

产甾体皂甙华重楼内生菌的筛选与鉴定

赵 明 贺声蓉 陈小静 黄春萍 王一丁*

(四川师范大学生命科学学院 成都 610068)

摘 要: 从华重楼 (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch) 的地下块茎中分离筛选得到 2 株可能产生甾体皂甙的内生菌 (SS01 和 SS02)。薄层层析检测菌株 SS01、SS02 的发酵产物分别有 3 条和 2 条层析带与重楼总皂甙的层析带迁移率相当。形态和生理生化特征初步表明 SS01 和 SS02 分属于肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 细菌。扩增、测序得到 SS01 和 SS02 的部分 16S rDNA 序列, GenBank 接收号分别为 AY842143 和 AY842144。用 Blastn 调出与菌株 16S rDNA 同源的序列, 用 ClustalW 进行多重序列对比, 用软件 Phylip 按 Neighbor-Joining 方法构建 16S rDNA 系统发育树。菌株 SS01 和 SS02 分别与 *Cedecea davisae* DSM 4568、*Paenibacillus daejeonensis* 处于同一分支, 相似性分别为 98.9% 和 97.7%。将它们鉴定为 *Cedecea davisae* SS01 和 *Paenibacillus daejeonensis* SS02。

关键词: 华重楼, 内生菌, 甾体皂甙, 16S rDNA 序列分析

中图分类号: Q939.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2005) 05-0776-04

1993 年 Stierle 等^[1]首先从短叶红豆杉的韧皮部中分离到一株能产紫杉醇的内生真菌。随后研究者在多种植物中分离到能产生与宿主相同或相似生理活性代谢产物的内生菌, 如产长春碱的长春花内生菌等^[2]。

重楼主要药用成分为甾体皂甙, 具有止血、止痛、抗肿瘤、免疫调节和抗怀孕等多种生理活性, 是云南白药、宫血宁等多种药物的主要原料, 其需求量很大^[3]。由于重楼的引种驯化和组织培养没有取得突破性进展, 重楼原料供不应求, 寻找新的、可再生的重楼替代资源成为必然^[4]。周立刚等^[5]从滇重楼中分离得到发酵培养物含甾体化合物的内生真菌。本文从华重楼 (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch) 中分离得到 2 株可能发酵产生重楼甾体皂甙的细菌, 并通过形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析对菌株进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料: 新鲜野生华重楼、华重楼粉, 由四川光大制药提供。

1.1.2 试剂: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒为上海华舜生物工程公司产品; *Ex Taq* 酶和 PCR 相关试剂购自大连 TaKaRa 公司, 其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基: 分离培养基为固体马铃薯培养基, 发酵培养基为液体马铃薯培养基, 按文献^[6]配制。

1.2 重楼内生菌的分离

将鲜重楼块茎, 用自来水洗净泥土, 无菌水冲洗 2 次, 无

菌滤纸吸干水分。常规无菌操作下, 75% 乙醇浸泡 1min, 水冲洗 3 次, 滤纸吸干水分, 0.2% 的碘汞浸泡 5min, 水冲洗 10 次, 滤纸吸干水分。用无菌解剖刀将已表面消毒的重楼块茎削去表皮, 切成 3cm 大小的正方体, 置于分离培养基平板内, 28℃ 培养 4~8d。待平板有菌长出后, 平板划线纯化, 直至得到单菌落, 斜面保存备用。

1.3 发酵液的初步鉴定

1.3.1 重楼总皂甙的制备: 重楼粉 10g 加入乙醚 60mL, 60℃ 超声振荡脱脂 3h, 过滤, 滤渣用 60mL 和 40mL 甲醇超声振荡提取 2 次 (60℃, 各 3h), 合并滤液, 回收甲醇; 用 5mL 蒸馏水溶解, 再用 60mL 和 40mL 水饱和的正丁醇萃取 2 次, 合并、回收正丁醇; 用 2mL 甲醇溶解, 即得重楼总皂甙。

1.3.2 菌株发酵液 TLC 检测: 将分离得到的菌株, 分别接入发酵培养基中 28℃、150r/min 振荡培养。培养 48h 和 96h 分别取培养液 1mL, 1000r/min 离心 5min。取上清 20 μ L, 用微量移液器点于薄层层析板上, 以重楼总皂甙、发酵培养基为对照。层析液为氯仿-甲醇 (100:1), 显色液为 10% 磷钼酸-5% 硫酸乙醇溶液, 105℃ 烘 3~5min, 至重楼总皂甙显出清晰蓝色斑点为止。

1.4 菌株形态和生理生化特征研究

产甾体皂甙菌株的形态学观察和生理生化实验参照文献^[7]进行。

1.5 菌株 16S rDNA 序列分析

按试剂盒操作说明书提取细菌基因组 DNA 为模板, 以 27F (5'-AGAGTTTGATCATGCTCAG-3') 和 1540R (5'-

基金项目: 四川师范大学校级科研基金“团队项目”

* 通讯作者。Tel: 86-28-84766411; E-mail: wangyiding63@hotmail.com

作者简介: 赵 明 (1979-), 男, 四川绵阳人, 硕士, 研究方向为微生物资源学。E-mail: zmzm1010@hotmail.com

其他作者: 张小洁, 冯定胜

收稿日期: 2004-12-27, 修回日期: 2005-04-27

AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3')为上下游引物^[8],扩增各菌株的16S rDNA。PCR反应体系为 *Ex Taq* 酶 0.3 μ L, dNTP 4 μ L, DNA模板 1 μ L, 上游引物(17 μ mol/L)1.3 μ L, 下游引物(22 μ mol/L)1 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 双蒸水 33.4 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 4min, 循环30次, 72 $^{\circ}$ C 15min。用胶回收试剂盒回收片段,由上海生物芯片工程公司测序。测序引物为 27F、518F(5'-CAGCAGCCGCGGTAATACGG-3')和 1540R^[8]。

用 Blastn 比较菌株 16S rDNA 与 GenBank 中已登录的序列,调出与菌株 16S rDNA 同源并经过菌种鉴定的序列,用 ClustalW 进行多重序列对比,用软件 Phylip 按 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,计算菌株间同源性。

2 结果

2.1 重楼内生菌的分离

采集野生重楼,进行表面消毒、分离内生菌,对得到的菌落进行平板划线纯化,最后分离纯化到 107 株菌。

2.2 发酵液的初步鉴定

经 TLC 检测,菌株 SS01 和 SS02 的发酵液与重楼总皂甙有显色相同、迁移率相当的层析带(斑),凝胶成像系统扫描结果见图 1。重楼总皂甙有 4 条蓝色层析带,相对迁移率 R(f)分别为 0.90、0.78、0.55 和 0.36;菌株 SS01 的发酵液有 4 条蓝色层析带,相对迁移率 R(f)分别为 0.78、0.55、0.36 和 0.12;菌株 SS02 的发酵液有 3 条蓝色层析带斑点,相对迁移率 R(f)分别为 0.91、0.56 和 0.09。其中,菌株 SS01、SS02 分别有 3 条和 2 条层析带与重楼总皂甙的层析带迁移率相当,初步表明菌株 SS01 和 SS02 可能发酵产生重楼甾体皂甙。

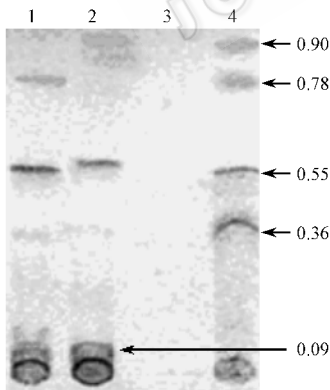


图 1 内生菌发酵液与重楼总皂甙的 TLC 比较

Fig. 1 The TLC comparison of endophytosis metabolites to *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch saponins

1. 2. Metabolites of SS01 and SS02; 3. CK of culture medium; 4. *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch saponins.

2.3 菌株形态和生理生化特征

菌株 SS01、SS02 的形态特征与生理生化试验结果见表 1 检索文献[9]初步鉴定 SS01 为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)细菌,SS02 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)细菌。

表 1 菌株形态和生理生化特征

Table 1 The morphology, physiological and biochemical characteristics of the strains

| Characteristics | SS01 | SS02 |
|----------------------|------------------|--------------------|
| Shape of strain body | Shaft | Long shaft |
| Width of rod | 0.25 μ m | 0.5 ~ 0.75 μ m |
| Length of rod | 0.75 ~ 1 μ m | 4.5 ~ 5 μ m |
| Spore | - | + |
| Gram staining | - | + |
| Oxidase test | - | - |
| Catalase | + | - |
| Indole test | + | + |
| Casein hydrolysis | - | + |
| Gelatin hydrolysis | - | + |
| Nitrate reduction | + | + |
| M. R test | + | + |
| Starch hydrolysis | - | + |
| Glucose utilization | + | + |
| V. P | + | + |

2.4 16S rDNA 系统发育分析

分别提取菌株 SS01、SS02 基因组 DNA,按方法通过 PCR 得到各菌株 1.5kb 左右的 16S rDNA。委托上海生物芯片工程公司测得 SS01 的 16S rDNA 部分序列,长度为 1482bp (GenBank 接收号为 AY842143),SS02 的 16S rDNA 部分序列,上游为 539bp、下游为 644bp (GenBank 接收号为 AY842144)。Blastn 比较发现 SS01 的 16S rDNA 与多株肠杆菌科细菌的 16S rDNA 相似,调出其中已鉴定菌株的 16S rDNA,用 ClustalW 进行多重序列对比,用软件 Phylip 按 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 2)。由图 2 可知菌株 SS01 的 16S rDNA (AY842143)与 AY493976(*Cedecea davisae* DSM 4568)距离最近,经 ClustalW 计算,二者同源性为 98.9%,由此判断菌株 SS01 与 *Cedecea davisae* DSM 4568 同种,鉴定为 *Cedecea davisae* SS01。Blastn 比较发现 SS02 的 16S rDNA 上下游序列分别与多株芽孢杆菌的 16S rDNA 相似,同上法构建系统发育树(图 3)。由图 3 可知 SS02 的 16S rDNA 上下游序列分别与 AF391124(*Paenibacillus daejeonensis*)距离最近,用 ClustalW 计算 SS02 的部分 16S rDNA (1183bp)与 AF391124 的同源性为 97.7%,表明 SS02 与 *Paenibacillus daejeonensis* 同种,命名为 *Paenibacillus daejeonensis* SS02。

3 讨论

甾体皂甙是重楼的主要药用成分,现已从重楼属植物中分离得到 44 种甾体皂甙^[10]。本实验制备的重楼总皂甙 TLC 只有 4 条层析带,表明制备方法和分析方法都有待改进。菌株次生代谢物与重楼总皂甙有显色相同、迁移率相当的层析带,初步表明其可能产生重楼甾体皂甙,需进一步研究菌株产生何种甾体皂甙及其是否具有重楼药用活性。若重楼内生菌能发酵产生甾体皂甙,利用内生菌发酵则可能成为解决重楼资源短缺问题的一条新途径。

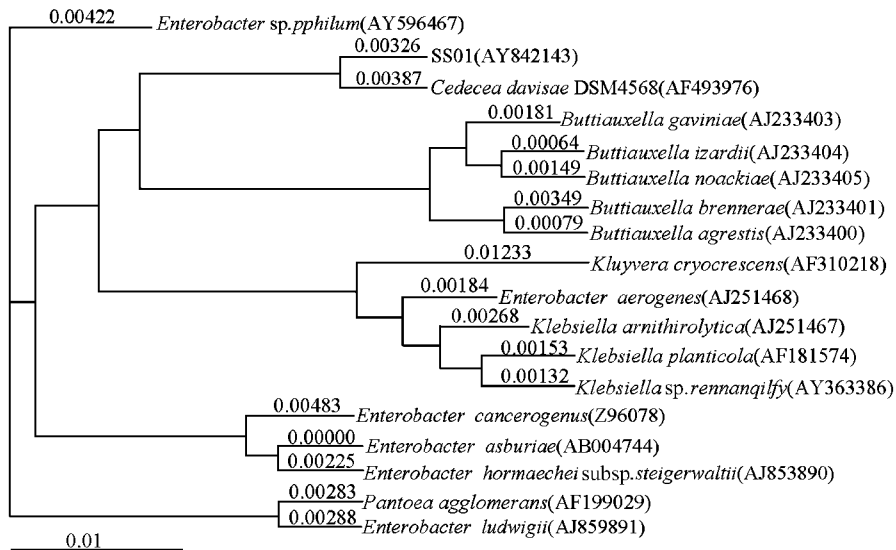


图2 SS01的16S rDNA系统发育树

Fig.2 16S rDNA phylogenetic tree of SS01

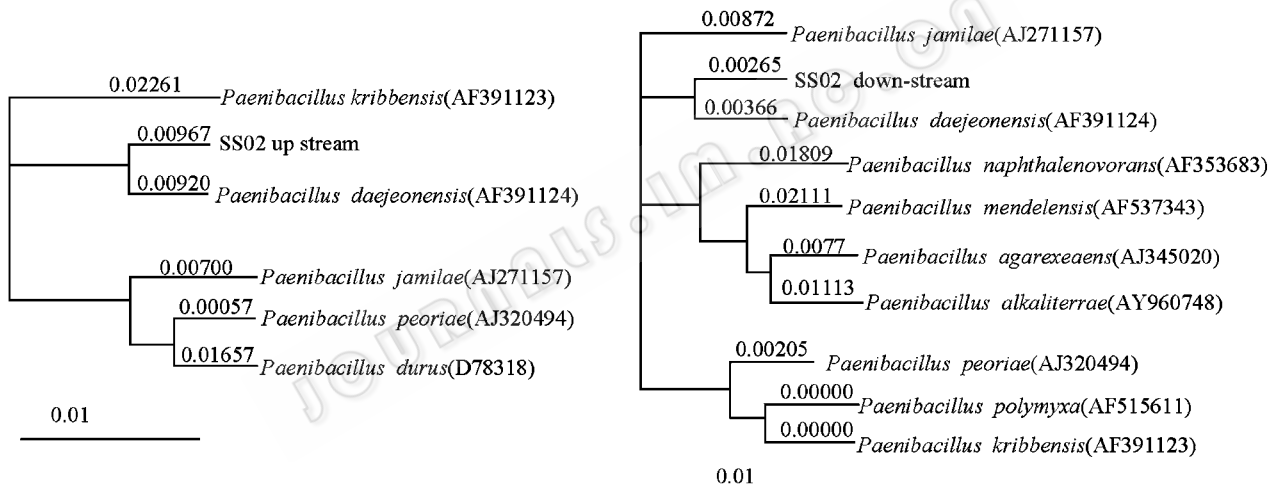


图3 SS02的16S rDNA系统发育树

Fig.3 16S rDNA phylogenetic trees of SS02

参 考 文 献

- [1] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of *Pacific yew*. *Science*, 1993, **260**(5105): 214 - 216.
- [2] 文文艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题. *生态学杂志*, 2004, **23**(2): 86 - 91.
- [3] 汤海峰, 赵越平, 蒋永培. 重楼属植物的研究概况. *中草药*, 1998, **29**(12): 839 - 842.
- [4] 李 恒, 杨兴华, 梁汉兴, 等. 重楼属植物. 北京: 科学出版社, 1998, 157.
- [5] Zhou L G, Cao X D, Yang C Z, et al. Endophytic fungi of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and steroid analysis in the fungi. *Natural Product Research and Development* 2004, **16**(3): 198 - 200.
- [6] 黄秀梨. 微生物学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1996, 114.
- [7] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990, 93 - 105.
- [8] 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002, 62 - 63.
- [9] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [10] 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展. *中草药* 2004, **35**(3): 443 - 447.

Screening and identification of steroidal saponins-producing endophytes from *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch

ZHAO Ming HE Sheng-rong CHEN Xiao-jing HUANG Chun-ping WANG Yi-ding*
(College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China)

Abstract: Two endophytic strains SS01 and SS02 with the potential for producing steroidal saponins were isolated from the underground stems of *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch. The TLC comparison indicated that there are 3 spots with similar R(f) between the metabolites of SS01 and the saponins of *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch. And there are 2 spots with similar R(f) between the metabolites of SS02 and the saponins of *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch. The characteristics of morphology, physiological and biochemical showed that SS01 belonged to Enterobacteriaceae and SS02 belonged to *Bacillus* sp.. The 16S rDNA of SS01 and SS02 were PCR and sequenced. The accessions of GenBank are AY842143 and AY842144, respectively. The two 16S rDNA phylogenetic trees were constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the relative bacteria species. In the first phylogenetic tree SS01 and *Cedecea davisae* DSM 4568 was the closest relative with 98.9% sequence similarity, and in the second phylogenetic tree SS02 and *Paenibacillus daejeonensis* was the closest relative with 97.7% sequence similarity. According to the phylogenetic analysis they were identified as *Cedecea davisae* SS01 and *Paenibacillus daejeonensis* SS02, respectively.

Key words: *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch, Endophyte, Steroidal saponins, 16S rDNA sequence analysis

Foundation item: The Research Fund of Sichuan Normal University

* Corresponding author. Tel 86-28-84766411; E-mail: wangyiding63@hotmail.com

Other authors: ZHANG Xiao-jie, FENG Ding-sheng

Received date: 12-27-2004

百科全书式的大型专科工具书《微生物学词典》问世

由著名微生物学教授周德庆先生和徐士菊女士共同编著的《微生物学词典》已由天津科学技术出版社于2005年4月出版发行。

这本积数年辛劳而产生的130余万字巨著,是第一部由我国微生物学家自己编著的大型专科工具书。该书收词原则明确,选词恰当,注释精练,涉及微生物学及其相关学科各个领域,跨越微生物学发展的各个时期,2003年的新出现名词亦有收录。该书渗透了两位教授近半个世纪微生物学教学和出版物编审的鲜活经验,用辞书形式展示了微生物学的全景。尤为重要的是编著者结合中国国情,巧妙地为广大读者提供了大量较难收集的资料。书后的7个附录可免去读者多方查找之苦,是微生物学工作者,特别是教育工作者的良师益友。

有意购买本书者,请与天津市和平区西康路35号天津科学技术出版社(邮编300051)刘锟先生(022-23332396或23332403)联系。本书定价88元,由此获得信息者可享受8折优惠,免收邮寄费。