

一株产紫杉醇罗汉松内生真菌的分离和鉴定

孙端方¹, 冉雪琴¹, 王嘉福^{1,2*}

(¹贵州大学动物科学学院, ²农业生物工程省级重点实验室, 贵阳 550025)

摘要:【目的】紫杉醇是重要的抗癌药物, 主要从罗汉松等植物中提取, 为了保护罗汉松等种质资源, 本文从罗汉松植株中分离产紫杉醇内生真菌, 并对内生真菌所产紫杉醇的抗肿瘤活性进行了分析。

【方法】采用组织块法自罗汉松的根、茎、叶等组织中分离内生真菌; 通过四唑蓝 (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT) 比色法筛选有抗肿瘤活性的内生真菌菌株, 通过薄层层析 (Thin Layer Chromatography, TLC) 和高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 对内生真菌所产活性物质进行鉴定; 采用抽提法抽提内生真菌所产紫杉醇, 应用 Vero 细胞对抽提的紫杉醇的活性进行了分析。【结果】从罗汉松属 (*Podocarpus*) 植物中分离到 155 株内生真菌, 其中 28 株内生真菌具有较高的抑癌活性。将其中一株菌株 A2 命名为 EPTP-1, 经形态学和分子分类学分析鉴定为烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。菌株 EPTP-1 中抽提的紫杉醇 5.553 $\mu\text{g/L}$ ~555.3 $\mu\text{g/L}$ 作用 24h 表现出明显的致细胞凋亡作用。菌株 EPTP-1 发酵 5 天时紫杉醇的产率为 0.5578 \pm 0.0294 mg/L。【结论】从罗汉松中分离到了一株产紫杉醇内生真菌 EPTP-1, 可作为紫杉醇类药物工业化生产的候选菌株。

关键词: 罗汉松; 内生真菌; 紫杉醇

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0589-07

植物内生真菌 (Endophytic fungi) 生活在植物体内或一定阶段处于植物体内, 包括菌根真菌和植物病原菌^[1]; 由于内生真菌与其宿主植物的长期共生, 很可能传递或吸收了遗传物质/酶, 或者通过共进化获得了相似的基因^[2], 从而具有相同的合成次生代谢产物的能力。

紫杉醇 (Taxol)^[3]表现出广泛的抗肿瘤活性, 尤其对卵巢癌、乳腺癌、肝癌等具有显著的疗效^[4]。1993 年 Stierle 等^[5]首次从太平洋短叶红豆杉中分离到产紫杉醇内生真菌 (*Taxomyces andrenae*)。目前, 紫杉醇的生产途径有 4 种: ①从红豆杉组织中提取; ②化学合成; ③通过培养的植物细胞或愈伤组织获取; ④微生物发酵。第一种途径是现今临床药用紫杉醇的主要生产方式, 但红豆杉属于濒危植物, 生长缓慢^[6], 因此生产的成本高, 也不利于红豆杉的保护;

化学合成途径^[7]通常以紫杉醇的前体为原料, 但合成过程的中间产物复杂且副作用不清楚, 缺乏安全保障; 近年来, 出现了以植物细胞、或组织培养方法生产紫杉醇^[8], 但由于培养条件严格难以规模化生产; 因此通过微生物发酵方法生产紫杉醇具有远大的发展前途, 不仅能获得生理活性与植物来源一致的紫杉醇, 同时还具有成本低、易于工业化生产等优点。

迄今, 产紫杉醇内生真菌菌株主要从濒危物种红豆杉科 (*Taxaceae*) 中分离, 却忽略了与红豆杉亲缘关系较近的三尖杉科 (*Cephalotaxaceae*) 罗汉松科 (*Podocarpaceae*) 等植物^[9]。罗汉松中含有紫杉醇及其同系物、红杉醇、多种黄酮类物质^[10,11], 对人结肠癌细胞 (HT-29)、肺癌细胞 (A-549)、乳腺癌细胞 (mcF7) 等肿瘤细胞株均有一定的抑制作用^[10]。同时, 罗汉松在贵州、四川等多个省份境内分布, 因此,

基金项目: 省长专项资金项目(黔省专合字 2005-108 号)

*通讯作者。Tel: +86-851-3863510; Fax: +86-851-8298005; E-mail: jfwang@gzu.edu.cn

作者简介: 孙端方(1987-), 男, 贵州省安顺人, 硕士研究生, 研究方向为微生物基因工程。E-mail: SunDFWolf@Yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-11-02; 修回日期: 2008-02-06

从罗汉松类植物体内分离产紫杉醇内生真菌对紫杉醇类药物的生产具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 罗汉松的根、茎、叶新鲜样本采自贵州省梵净山国家自然保护区、省植物园、省药用植物园、贵州大学校园, 时间 2006 年 3~7 月。

1.1.2 主要试剂和仪器: 展开剂: 乙酸乙酯/异丙醇 (94:6, V/V, 下同); 氯仿/甲醇 (7:1), 显色剂: 甲醇/硫酸/香草醛 (96:3:1) 溶液。紫杉醇标准品购于上海康九化工有限公司, 纯度 99.5%; MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, 四唑蓝比色法) 试剂盒 (ZKAO20005) 购于上海卓康科技有限公司; 非洲绿猴肾细胞株 (Vero) 购于中国典型培养物保藏中心 (武汉大学保藏中心); 胶回收试剂盒为 Omega 公司产品, 质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司; Taq 酶、pMD-18T Vector kit、EcoR、Hind 限制性内切酶均购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物的合成及碱基序列的测定由上海捷瑞生物工程有限公司完成; PCR 仪 (Bio-Rad 公司产品 icycler); 酶标仪 (Bio-Rad Model 680)。

1.1.3 培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB)、查氏培养基^[12], 以及 Luria-Bertani (LB) 培养基^[13] 参照文献配制。Vero 细胞完全培养基: 1640 细胞培养基, 含胎牛血清 10%、谷氨酰胺 1%、氨苄青霉素、链霉素均为 0.05 mg/mL, 7.4% NaHCO₃ 调 pH6.8~7。

1.2 内生真菌的分离、代谢产物的抽提

参照文献^[14]方法对内生真菌进行分离和纯化, 取 100 mL 菌液 (含菌体), 通过甲醇、氯仿抽提的有机相蒸干获得内生真菌的粗提物。

1.3 抗肿瘤活性菌株的筛选

参照 MTT 试剂盒说明书测定内生真菌的抗肿瘤活性。1 mL Vero 细胞完全培养基溶解内生真菌粗提物; 每孔加入 1 μL 粗提物溶解液, 等量的细胞培养基为对照; 分别作用 24、48、72、96 h, 以下列公式计算内生真菌粗提物对 Vero 细胞的抑制率:

$$\text{抑制率 (I)} = (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{实验组}}) / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$$

选择粗提物作用 48、72 h 对 Vero 细胞生长的抑制率大于 10% 以上的 28 株内生真菌菌株进行下一步

的紫杉醇产物鉴定。

1.4 产紫杉醇内生真菌的鉴定

1.4.1 薄层层析 (TLC) 检测: 参照文献方法^[14]进行。

1.4.2 高效液相 (HPLC) 分析: 色谱条件: C18 色谱柱流动相为磷酸 (pH3.0): 乙腈=72:28 (v/v), 柱温 25、流速 1 mL/min、检测波长 250 nm; 紫杉醇标准品浓度 ($C_{\text{标准品}}$, mg/L)、标准品峰面积 ($A_{\text{标准品}}$) 和样品峰面积 ($A_{\text{样品}}$) 测算样品中紫杉醇的浓度 ($C_{\text{样品}}$), 据下列公式计算菌液中紫杉醇浓度 ($C_{\text{菌液}}$):

$$C_{\text{样品}} = (C_{\text{标准品}} \times A_{\text{样品}}) / A_{\text{标准品}} \quad C_{\text{菌液}} = (C_{\text{样品}} \times V_{\text{样品}}) / V_{\text{菌液}}$$

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 形态学分类: 依据内生真菌的孢子结构及菌落外部形态进行分类^[15]。

1.5.2 ITS (Internal transcribed spacer, ITS) 序列分析: 根据已知真菌的保守序列设计一对特异性引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCC-TCCGCTTATTGATATGC-3'), CTAB 法提取内生真菌的基因组 DNA^[13]。PCR 采用 20 μL 反应体系, 反应条件: 94 1 min, 55 30 s, 72 1 min 30 个循环; 72 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收纯化目的片段, 连接至 pMD-18T 载体, 转化大肠杆菌 TG1, 经菌落 PCR、质粒酶切鉴定的阳性克隆, 测定碱基序列。以 NCBI 数据库中 blastn 程序比对分析, 使用 Mega 4.0 软件 Clustal W 方法进行聚类分析。

1.6 内生真菌产紫杉醇的活性分析

内生真菌粗提物按 1% (V/V) 加入 Vero 细胞中培养, 采用 AO/EB 荧光素染色法参照文献方法^[16]测定 Vero 细胞的凋亡率。

1.7 产紫杉醇内生真菌发酵时间的优化

产紫杉醇内生真菌同期接种于 PDB 培养液, 培养 1~11 d, 测定培养液中的紫杉醇含量, 重复 3 次。

2 结果和分析

从剪切后罗汉松组织中分离出 155 株真菌; 同期对照组中未剪切的罗汉松组织中没有任何菌落长出, 证实分离到的 155 株真菌均为内生真菌。

2.1 抗肿瘤活性

以 155 株罗汉松内生真菌的粗提物为样本, 采用 MTT 法 (表 1) 测得 28 株内生真菌粗提物作用 48 h、72 h 对 Vero 细胞的生长抑制率均在 10% 以上, 具有抗肿瘤活性, 占分离内生真菌总数的 18.1%; 其中菌株 A2 作用 48、72 h 时对 Vero 细胞的抑制率分别为

72.11%、和 76.78%，同浓度的紫杉醇标准品分别为 71.64%、74.83%，二者之间的差异不显著 ($P < 0.05$)。抑制率在 70% 以上的菌株共有 7 株，占分离内生真菌总数的 4.52%；选择上述 28 株内生真菌菌株进行下一步的紫杉醇产物鉴定。

表 1 罗汉松内生真菌的抗肿瘤活性分析

Table 1 The anti-tumor activity of endophytic fungi strains separated from *Podocarpus*

Inhibitory ratio	Numbers of strain (%)			
	24h	48h	72h	96h
Low*	26 (16.8%)	15 (9.68%)	13 (8.39%)	5 (3.23%)
Medium*	17 (11.0%)	12 (7.74%)	12 (7.74%)	10 (6.45%)
High*	4 (2.58%)	8 (5.16%)	9 (5.81%)	7 (4.52%)
Total	47(30.3%)	35 (22.6%)	34 (21.9%)	22 (14.2%)

*The anti-tumor activity of endophytic fungi strains separated from *Podocarpus* was detected by MTT method. Vero cells incubated with extracts from endophytic fungi for 24, 48, 72 and 96 hours separately. Strains with inhibitory ratio in 10%~40% was defined as "Low" activity, 40%~70% as "Medium" activity and 70%~100% as "High" activity.

2.2 内生真菌活性产物的鉴定

采用 TCL 法对 28 株抗肿瘤内生真菌的抽提物进

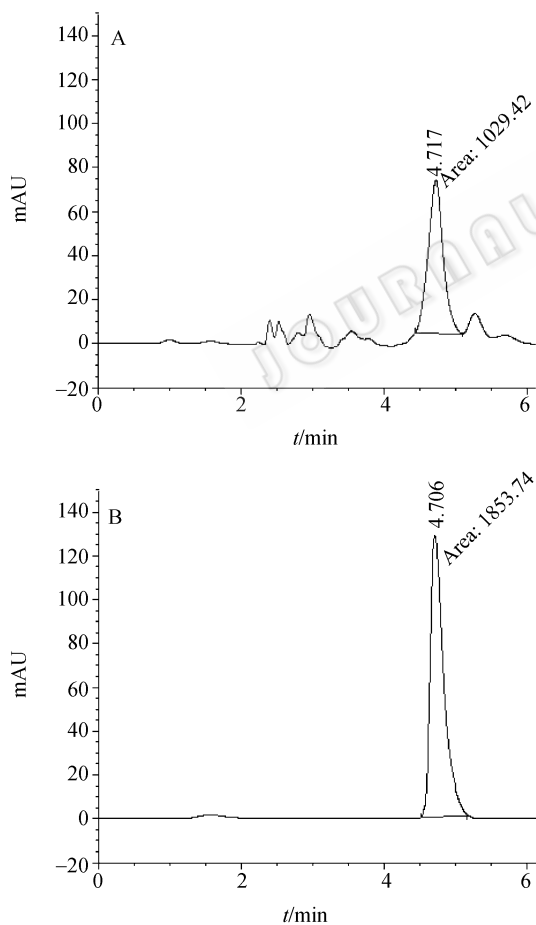


图 1 罗汉松内生真菌 A2 产紫杉醇的 HPLC 分析

Fig. 1 The profile of taxol produced by endophytic fungi strain A2 separated from *Podocarpus* compared with taxol standard by HPLC. A: Extracts from strain A2; B: Taxol standard.

行鉴定，发现菌株 A2 粗提物中出现一个斑点与紫杉醇标准品的迁移率最接近，Rf 值分别为 0.65、0.70。

进一步对菌株 A2 的粗提物进行 HPLC 分析，A2 抽提物中最高峰的出峰时间为 4.717 (图 1-A, Area (mAU*s)=1029.42)，紫杉醇标准品的出峰时间为 4.705 (图 1-B, C_{标准品}=100.00mg/L, Area(mAU*s)=1853.74)，二者非常接近，证明 A2 菌株的代谢产物中确含紫杉醇，菌株 A2 为产紫杉醇罗汉松内生真菌，将该菌株命名为 EPTP-1；以图 1 中出峰面积为依据计算出 A2 菌株的粗提物中紫杉醇浓度为 C_{样品}=55.53 mg/L，每升菌液含紫杉醇 C_{菌液}=0.5553mg/L。

2.3 EPTP-1 的种属鉴定

2.3.1 形态学特征：产紫杉醇罗汉松内生真菌 EPTP-1 在查氏培养基上培养 7 d，菌落直径为 5 cm 左右，在 PDA 培养基上培养 6d 后菌落的直径为 8 cm 左右，中心略凸，有同心环状辐射纹，絮状黑灰颗粒，菌落反面呈淡黄色，分生孢子梗细长，上部有膨大顶囊，形如烧瓶，分生孢子头成熟时为致密圆柱体，分生孢子球形 (图 2)，PDB 培养基培养 5 d 后，菌丝球达 2~4 mm，淡黄色，菌液黄色。与《中国真菌志》(第五卷)曲霉属 (*Aspergillus*) 烟曲霉种 (*fumigatus*) 形态描述极为相似。

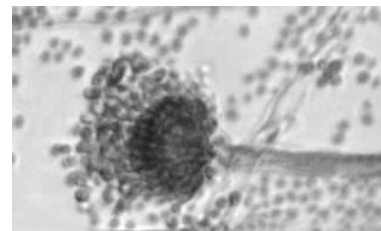


图 2 产紫杉醇罗汉松内生真菌菌株 EPTP-1 的孢子结构 (400×)

Fig. 2 The micrograph of spore of endophytic fungi EPTP-1 producing taxol (400×).

2.3.2 ITS 序列分析：以菌株 EPTP-1 基因组 DNA 为模板，以特异性引物 ITS1/4 为引物，扩增出 597 bp 的 DNA 片段，经克隆后测定碱基序列 (GenBank accession no. EU256469)，与曲霉属、新萨托菌属 (*Neosartorya*) 等相应序列的相似性为 95%~99%，证明扩增的片段确为 ITS 序列，包括 30 bp 的 18S rRNA、ITS1 (31~215 bp)、5.8S rRNA (216~371 bp)、ITS2 (372~539 bp) 和 58bp 的 23S rRNA。对 EPTP-1 菌株的 ITS 序列进行聚类分析 (图 3)，结果显示菌

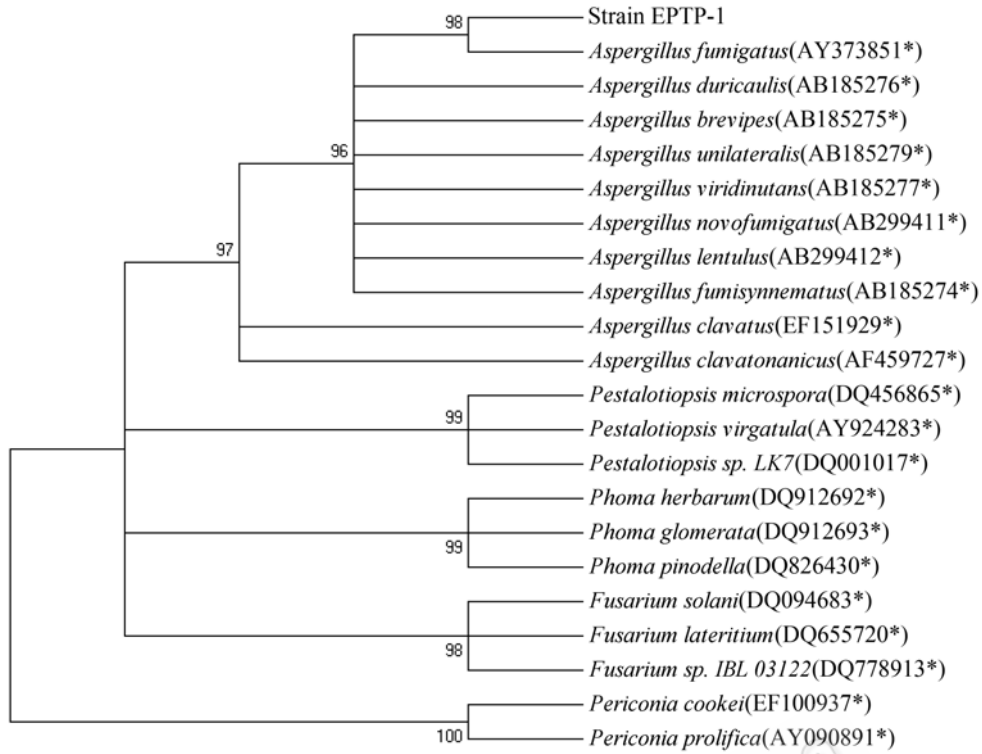


图 3 EPTP-1 菌株 ITS 碱基序列的聚类分析

Fig. 3 The neighbor-joining phylogeny of ITS sequence of strain EPTP-1. It was constructed by the Clustal W method (Mode: Nucleotide; Maximum Composite Likelihood) of Mega 4.0 that was tested bootstrap consensus (Replications: 1000. Random seed: 64238. Cut-off value for condensed tree: 95%).The referred NCBI accession numbers were included in brackets with stars.

株 EPTP-1 与烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的关系最近 (序列相似性 99%)。结合形态学和 ITS 分析结果将 EPTP-1 菌株定为曲霉属、烟曲霉种 (*Aspergillus fumigatus*)。

2.4 EPTP-1 所产紫杉醇的活性分析

采用 AO/EB 荧光素染色法对 EPTP-1 菌株粗提物进行了细胞凋亡分析,在荧光显微镜下,可见明显的早期和晚期凋亡细胞、坏死细胞 (图 4),对细胞凋亡率进行统计分析 (χ^2 检验、*F* 检验)结果表明 (图 5):

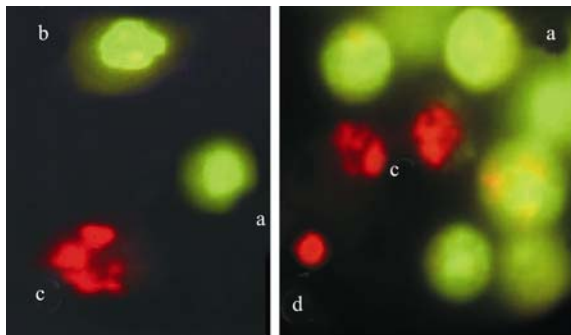


图 4 EPTP-1 菌株抽提紫杉醇的致细胞凋亡作用
Fig. 4 Apoptosis of Vero cells treated by extracts of strain EPTP-1. Cells were stained with AO/EB. a: Normal Vero cell; b: Early apoptotic; c: Later apoptotic cells; d: Necrotic Vero cell.

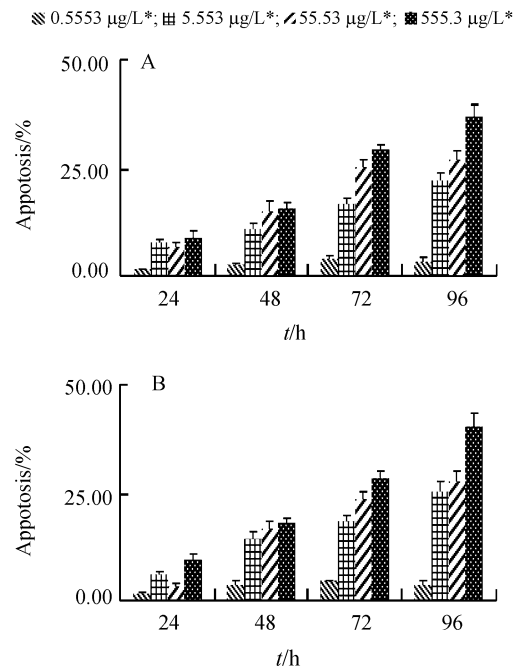


图 5 EPTP-1 菌株粗提物(A)及紫杉醇标准品(B)致 Vero 细胞的凋亡率

Fig. 5 Apoptosis rate of Vero cells incubated with extracts from endophytic fungi strain EPTP-1(A) compared with Taxol standard (B). *: The calculated concentration of Taxol

菌株 EPTP-1 抽提物的细胞凋亡率与相同浓度的紫杉醇标准品之间没有显著差异 ($P>0.05$, χ^2); 与正常的 Vero 细胞相比, 当菌株 EPTP-1 的粗提物中紫杉醇浓度从 $5.553 \mu\text{g/L}$ 增加至 $555.3 \mu\text{g/L}$ 均表现出明显的致 Vero 细胞凋亡作用 ($P<0.01$, χ^2), 其间差异达到极显著水平 ($P<0.01$); 同一浓度作用 24、48、72、96 小时 Vero 细胞凋亡率均表现出增加趋势 ($P<0.01$); 当 EPTP-1 菌株的粗提物稀释至约 10^{-3} ($C_{\text{细胞培养基}}=0.5553 \mu\text{g/L}$) 浓度时, Vero 细胞的凋亡率与对照差异不显著。表明菌株 EPTP-1 产生的紫杉醇对 Vero 细胞的致凋亡作用具有时间和浓度依赖性, 表现出明显的剂量效应。

2.5 菌株 EPTP-1 所产紫杉醇的产率

将 EPTP-1 菌株接种 PDB 培养液培养 11d 测定所产紫杉醇的含量 ($C_{\text{菌液}}$), 结果显示 3 次重复之间的 $C_{\text{菌液}}$ 值差异不显著 ($P>0.05$), 表明 EPTP-1 菌株紫杉醇的产率稳定; 随着培养时间的延长, EPTP-1 菌株紫杉醇的产率发生先增加后下降的变化(图 6), 发酵 5d 时的产率最高, 为 $C_{\text{菌液}}=0.5578\pm 0.0294 \text{ mg/L}$ 。

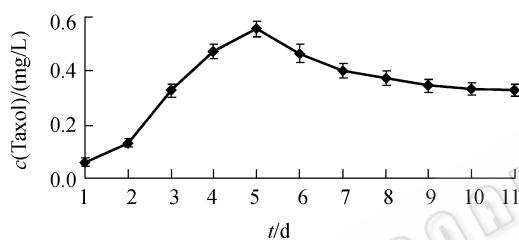


图 6 EPTP-1 菌株不同发酵时间菌液中紫杉醇产率的变化
Fig. 6 The Taxol concentration of the extracts of strain EPTP-1 in PDB medium at regular intervals.

3 讨论

在罗汉松内生真菌的分离过程中, 对照组未剪切罗汉松组织经培养没有真菌生长, 证实本文分离的 155 株真菌均为罗汉松内生真菌; 其中菌株 A2 的抽提物经 TLC 检测, 其斑点的迁移率与紫杉醇标准品相近, HPLC 分析抽提物的出峰时间与标准品的保留时间一致, 确认菌株 A2 产紫杉醇, 将其命名为 EPTP-1。

菌株 EPTP-1 紫杉醇的产率约 0.56 mg/L , 与产紫杉醇红豆杉内生真菌相比, 高于何颖等^[17]、马玉超等^[18]报道的菌株, 低于陈建华等^[14]分离的菌株。其间的差异可能与宿主植物有关, 罗汉松叶中紫杉醇的含量略低于红豆杉叶片^[11]。

EPTP-1 经形态学和分子分类学鉴定为曲霉属

(*Aspergillus*), 与红豆杉分离的产紫杉醇内生真菌种属不同^[17,18]。在红豆杉中产紫杉醇内生真菌出现频率较高的是拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*)、茎点霉属 (*Phoma*)、镰孢属 (*Fusarium*) 等。从榧树 (*Torreya grandifolia*) 分离出团黑孢霉属真菌 (*Periconia*)^[19]、从茜草科植物 (*Maguireothamnus speciosus*) 分离到尼泊尔盘孢属真菌 (*Seimatoantlerium*)^[20]。表明内生真菌与宿主之间有一定的相关性。

迄今, 内生真菌产生紫杉醇的机理尚不清楚, 紫杉醇合成相关基因是在共生时由宿主转移至内生真菌, 还是内生真菌与宿主同时进化获得了合成紫杉醇的能力? 根据红豆杉紫杉醇合成途径的关键酶 BAPT 基因设计的引物, 可从产紫杉醇红豆杉内生真菌克隆出相似的 BAPT 基因, 之间的碱基序列相似性达 98.9%^[21], 提示内生真菌的 BARP 基因可能来自红豆杉相关基因的转移; 但松树^[22]、杉树^[21]等分离的产紫杉醇内生真菌中却未能扩增出相应的片段, 说明这些内生真菌的 BAPT 基因与宿主的不同, 内生真菌中可能存在独立的进化途径, 具有合成紫杉醇的能力。罗汉松产紫杉醇内生真菌菌株 EPTP-1 的产紫杉醇性能是宿主的传递作用, 还是自身进化的结果尚待进一步研究。

对 EPTP-1 菌株所产紫杉醇的活性进行了研究, 证实菌株 EPTP-1 所产紫杉醇有明显的致 Vero 细胞凋亡和坏死的作用, 与同浓度的紫杉醇标准品之间没有显著差异 ($P>0.05$), 并表现出明显的时间和剂量依赖性。实验中, 虽然最高浓度 ($555.3 \mu\text{g/L}$) 的紫杉醇致 Vero 细胞的凋亡率仅 36.83%, 但 MTT 法测定的菌株 A2 抽提物 ($555.3 \mu\text{g/L}$) 作用 72 h 时的细胞死亡率达 76.78%。说明内生真菌 EPTP-1 所产紫杉醇不仅引起明显的细胞凋亡, 而且所致的细胞坏死也是抑制癌细胞生长的重要因素。紫杉醇作用于癌细胞时, 首先结合到 β -微管蛋白的 N-端第 31 位氨基酸和 217~231 位氨基酸位点, 促进微管聚合并稳定微管结构, 阻止微管的解聚, 破坏了微管聚合与解聚的动态平衡, 阻碍纺锤丝的形成, 导致细胞周期阻断于 G_2/M 期, 从而诱发癌细胞凋亡^[23,24]。

微生物发酵法工业化生产紫杉醇盈亏平衡点为 1 mg/L 。EPTP-1 菌株在 PDB 培养基中的产率稳定, 发酵时间 5 d 时达到最大 0.5553 mg/L , 离盈亏平衡点 1 mg/L 还有一定的距离, 通过发酵条件的进一步优化

有望提高其产率。本文获得的内生真菌 EPTP-1 产紫杉醇, 具有明显的抑制癌细胞生长的活性, 可以作为紫杉醇药物发酵生产的候选菌株。

参 考 文 献

- [1] Petrini O. Fungal endophytes of tree leave. In: Andrews JH, Hirano SS. *Microbial Ecology of Leaves*. Hardcover: Springer-Verlag, 1991: 179–197.
- [2] Liang ZQ. The diversity of fungal secondary metabolites and their potential applications value. *Biodiversity*, 1999, 7(2): 145–150.
- [3] Wani MC, Taylor HL, Monroc F, *et al.* Plant antitumor agent VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971, 93: 2325–2327.
- [4] Woo HL, Swenerton KD, Hoskins PJ. Taxol is active in platinum-resistant endometrial adenocarcinoma. *Ain J Clin Oncol*, 1996, 19(3): 290–291.
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D, *et al.* Taxol and taxane production by *Taxus brevifolia*. an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, 1993, 260(9): 214–216.
- [6] 檀丽萍, 陈振峰. 中国红豆杉资源. 西北林学院学报(*Journal of Northwest Forestry University*), 2006, 21(6): 113–117.
- [7] Denis JN, Green AE, Gerenard D, *et al.* Highly efficient, practical approach to natural taxol. *J Am Chem Soc*, 1988, 110(17): 5917–5919.
- [8] 张洁, 段继诚, 梁振, 等. 东北红豆杉及其伤愈组织粗提取物中紫杉醇的 HPLC-ESI-MS/MS 分析研究. *药学学报(Acta Pharmaceutica Sinica)*, 2006, 41(9): 863–866.
- [9] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 曾建飞, 霍春燕主编. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 2004.
- [10] 顾世海, 张丹, 徐丽珍, 等. 小叶罗汉松化学成分的研究. *中草药(Chinese Traditional and Herbal Drugs)*, 1997, 28(10): 586–588.
- [11] 罗上德, 宁冰梅, 阮德春, 等. 红豆杉及其近缘植物中紫杉醇与同系物的高效液相色谱分析. *植物资源与环境(Journal of Plant Resources and Environment)*, 1994, 3(2): 31–33.
- [12] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* 精编分子生物学试验指南. 第四版. 马学军, 舒跃龙, 等译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [14] 陈建华, 刘佳佳, 臧巩固, 等. 紫杉醇产生菌的筛选与发酵条件的调控. *中南大学学报(Journal of Central South University)*, 2004, 35(1): 65–69.
- [15] 中国科学院中国孢子植物志编辑委员会, 齐祖同主编. 中国真菌志. 北京: 科学出版社, 2004.
- [16] 袁小鹏, 焦伟华, 徐如祥. 肿瘤细胞 AO/EB 荧光染色法在药敏试验中的可行性探讨. *癌症(Chinese Journal of Cancer)*, 1999, 18(3): 359–360.
- [17] 何颖, 谈锋, 谢建平. 红豆杉内生真菌产紫杉醇研究进展. 天然产物研究与开发(*Natural Product Research and Development*), 2006, 18: 519–523.
- [18] 马玉超, 赵凯, 王世伟, 等. 产紫杉醇(Taxol)内生真菌的生物多样性. *菌物研究(Journal of Fungal Research)*, 2003, 1(1): 28–32.
- [19] Li JY, Sidhu RS, Ford EJ, *et al.* The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *J Industrial Micro Biotech*, 1998, 20: 259–264.
- [20] Strobel GA, Ford E, Li JY, *et al.* *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov., a unique epiphytic fungus producing taxol from the Venezuelan Guyana. *Syst Appl Microbiol*. 1999, 22(3): 426–433.
- [21] 李嘉琳, 胡鸢雷, 陈维多, 等. 红豆杉内生真菌产紫杉醇相关基因 BAPT 的鉴定及初步研究. *生物技术通报(Biotechnology Bulletin)*, 2006, 增刊: 356–361.
- [22] Strobel GA, Hess WM, Li JY, *et al.* *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol producing endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*. *Aust J Bot*, 1997, 45: 1073–1082.
- [23] Symmans WF, Volm MD, Shapiro RL, *et al.* Paclitaxel-induced apoptosis and mitotic arrest assessed by serial fine-needle aspiration: implications for early prediction of breast cancer response to neoadjuvant treatment. *Clin Cancer Res*. 2000, 6 (12): 4610–4617.
- [24] Nardi M, De-Marce S, Fabi A, *et al.* Cisplatin and escalating doses of paclitaxel and epirubicin in advanced ovarian cancer. A phase study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001, 48(3): 255–258.

Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus from *Podocarpus*

Duanfang Sun¹, Xueqin Ran¹, Jiafu Wang^{1,2*}

¹Faculty of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

²Key Laboratory for Agricultural Bioengineering of Guizhou Province, Guiyang 550025, China)

Abstract: [Objective] Endophytic fungi can produce beneficial active components during symbiosis with host plants. We isolated a taxol-producing endophytic fungus strain from *Podocarpus*. [Methods] The anti-tumor activity of the endophytic fungus was detected by Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT) method with Vero cells. The production of taxol by one fungus was confirmed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). This strain was classified by morphology together with similarity of internal transcribed spacer (ITS) sequence by Clustal W method. The deduced apoptosis of taxol produced from the strain was detected by fluorescent staining method with Vero cells. [Results] A total of 155 endophytic fungi were isolated from the tissue of *Podocarpus*. The result showed that 28 strains inhibited the growth of Vero cell (inhibitory ratio 10%), and 7 strains had high activity (inhibitory ratio 70%). The taxol-producing ability of strain A2 was confirmed by TLC and HPLC. Therefore, we recognized strain A2 as an endophytic fungus capable of producing taxol from *Podocarpus*-1 and named it EPTP-1. Its output of taxol was 0.56 mg/L when growing in liquid potato dextrose medium. EPTP-1 was classified as *Aspergillus fumigatus*. Taxol extracted from strain EPTP-1 resulted in significant apoptosis of Vero cells at concentration of 5.553 $\mu\text{g/L}$ for 24h. The activity of anti-Vero growth by extracts from strain EPTP-1 was similar to that of the purchased standard taxol ($P>0.05$). [Conclusion] The identified endophytic fungus, strain EPTP-1, can be a candidate for taxol production.

Keywords: *Podocarpus*; Endophytic fungi; taxol

Supported by the Special-Purpose Foundation of Nomarch (2005-108)

*Corresponding author. Tel: +86-851-3863510; Fax: +86-851-8298005; E-mail: jfwang@gzu.edu.cn

Received: 2 November 2007/ Revised: 6 February 2008

《微生物学报》对摘要的写作要求

2007年12月修定

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论，并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围，采用的手段和方法，得出的结果和重要的结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。要求在文中给出[Objective], [Methods], [Results], [Conclusion]等 words。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。
 - (1) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2) 建议使用第一人称，以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。
 - (4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。
 - (5) 摘要中不用缩写语，除非是人人皆知的，如：DNA，ATP 等。
 - (6) 句子的开头处最好不要使用数字。