

一株产重楼皂甙内生细菌的分离与鉴定

张晓洁^{1,2} 查岭生³ 陈小静¹ 冯定胜¹ 王一丁^{1*}

(四川师范大学生命科学学院 成都 610068)¹ (蚌埠医学院医学检验系 蚌埠 233000)²

(淮北煤炭师范学院生物系 淮北 235000)³

摘要: 从产自四川彭州的华重楼 (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch) 地下块茎中分离得到 16 株菌。经以薯蓣皂甙元为标准对照的薄层层析分析, 表明其中编号为 SNUS-1 (AY842149) 的菌株能分泌重楼皂甙或其类似化合物。16S rDNA 序列 (约 1,500bp) 系统发育分析表明: 菌株 SNUS-1 与 *Pseudomonas tolassii* (AF255336) 和 *Pseudomonas tolassii* (D84028) 的遗传距离分别为 0 和 0.003, 在系统进化树上三者又严格聚为一族, 结合形态及生理特征确定其为托氏假单孢菌 (*Pseudomonas tolassii*)。

关键词: 重楼, 内生菌, 甙体皂甙, 16S rDNA, 假单孢菌属

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0084-05

Isolation and Identification of an Endopyte of *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch

ZHANG Xiao-Jie^{1,2} ZHA Ling-Sheng³ CHEN Xiao-Jing¹
FENG Ding-Sheng¹ WANG Yi-Ding^{1*}

(College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068)¹

(Department of laboratory medicine Bengbu Medical College, Bengbu 233000)²

(Biology Department, Huaibei Coal Industrial Teachers College, Huaibei 235000)³

Abstract: Sixteen endophytes were isolated from the hypogenous stems of *Paris polyphylla* var. *chinensis* in Sichuan. Through thin layer chromatography (TLC) with standard comparison of *Paris chinensis* Franch saponins, the fermentation cultures of strains marked SNUS-1 were identified to contain *Paris chinensis* Franch saponins or its analogue. A phylogenetic anlysis based on 16S rDNA gene sequences (about 1500bp) shows that the p-distance of the strain SNUS-1 from *Pseudomonas tolassii* (AF255336) and *Pseudomonas tolassii* (D84028) are 0 and 0.003, respectively. These three strains gather into a cluster strictly in the phylogeny tree. Strain SNUS-1 was identified an *P. tolassii* based on physiological, biochemical and molecular characteristics.

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

近年来国内外研究表明, 从植物的根、茎、叶、果实等中分离到了很多植物内生菌, 能够产生具有与与宿主相同或相似的药用活性成分^[1], 内生菌正成为研究热点。

华重楼 (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch) 是百合科重楼属植物, 具有较高的药用价值, 其主要药用活性成分为甙体皂甙。重楼具有止血、祛痰和抑菌、镇痛镇静、抗早孕杀灭精子、抗细胞毒、抗肿瘤、心血管和免疫调节等作用^[2], 是多种中成药和新药的主要原料。其自然生产量远远低于制药业的年消耗量, 面临着野生资源枯竭的危险。重楼的引种驯化和组培快繁研究一直进展不大, 用重楼的茎、叶和花蕾作外植体尚

* 通讯作者 Tel: 86-28-84766411, E-mail: wwwyiding@163.net

收稿日期: 2005-12-28, 修回日期: 2006-03-09

未获得愈伤组织；由幼芽诱导的愈伤组织生长缓慢，并且有的愈伤组织中不含原植物中的甾体皂甙^[3]。为寻找新的、可再生重楼资源，我们对重楼的内生菌进行了研究。本文从华重楼中分离得到一株可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 材料与方法

1.1 实验材料来源

三月份从四川彭州采集1~3年生野生重楼。此时重楼处于生长旺盛期，各项生理指标较高，营养旺盛。

1.2 菌种分离、纯化

将新鲜重楼块茎，按下列程序表面消毒：自来水冲洗→75%酒精漂洗(3~5min)→无菌水冲洗3~4次→0.1% HgCl₂漂洗(2~5min)→无菌水冲洗5次。用无菌刀将其切成1cm³小块，置于PDA琼脂培养基中，26℃恒温培养。将用同样方法消毒的未进行切割的重楼块茎在培养基中做对照培养。培养5~14d，分别待平板上长出菌落，用划线、稀释等分离方法，经过分离、筛选、纯化的反复过程，直至得到纯化的典型菌落。

1.3 液体发酵培养

结合菌落观察和镜检结果的综合判定，取其中各具典型特征的菌株在PDA液体培养基中进行发酵培养。80mL三角瓶装液体培养基10mL，接入菌株。培养温度26℃，150r/min，培养时间5~14d。

1.4 甾体皂甙的初步定性检测

1.4.1 泡沫反应：取1mL菌液置具塞试管中，加2mL水，振摇10s产生大量蜂窝状泡沫，放置10s，观察泡沫。

1.4.2 Liberman反应：取1mL菌液溶于醋酐，加浓H₂SO₄-醋酐试剂，颜色由黄变成红、紫，最后形成绿褐色。

1.4.3 Salkowski反应：取1mL菌液溶于氯仿，置于试管中，沿壁滴加浓H₂SO₄，氯仿层显红色，且有绿色荧光出现。

1.5 发酵液的TLC分析

1.5.1 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。

1.5.2 TLC检测：取1mL菌液1,000r/min离心5min。取上清20μL，用微量移液器点于薄层层析板上，以重楼总皂甙、空白发酵培养基为对照。层析液为氯仿-丙酮(100:1)，显色液为10%磷钼酸5%硫酸乙醇溶液，105℃烘1~3min，至重楼总皂甙显出清晰蓝色斑点为止。

1.6 菌株形态及生理生化特征研究

经初步分析确定产甾体皂甙的菌株，其形态学观察和生理生化实验参照《微生物分类学》文献进行^[4]。

1.7 菌株16S rDNA序列分析

按细菌基因组DNA提取试剂盒操作说明书提取基因组DNA，以其为模板，以27F

(5' -AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG -3') 和 1540R (5' - AAG GAG GTG ATC CAA CCG CA -3')^[5]为上下游引物, 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 延伸 15min。用胶回收试剂盒回收片段, 委托上海生物芯片工程公司测序。

用 Blastn 比较菌株 16S rDNA 与 GenBank + EMBL + DDBJ 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 ClustalX1.8 进行多重序列对比, 再结合 MEGA2.1 进行遗传距离分析, 并采用 NJ、MP 及 BI 等不同方法及 MrBayes3-0b4 等生物学软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离

本实验分离得到 16 株菌。由于对照培养基中均未见菌落生长, 因此可断定分离到的为重楼内生菌。

2.2 甾体皂甙的初步定性检测

初步定性检测结果见表 1。

表 1 甾体皂甙的初步定性检测结果

	泡沫反应	Lieberman 反应	Salkowsk 反应
SNUS-1	+++	+++	++
空白发酵液	-	-	-
重楼总皂甙	+++	++++	++++

注: +++表示反应明显, ++表示反应较明显, -表示未见反应

2.3 TLC 分析结果

TLC 检测发现菌株 SNUS-1 的发酵液与重楼总皂甙有颜色相同、迁移率相当的显色带 (斑), 凝胶成像系统扫描结果见图 1, 各斑点相对迁移率 R_f 结果见表 2。由图表可知: SNUS-1 有 4 个蓝色斑点, 其中在 $R_f=0.38$ 和 $R_f=0.95$ 与重楼总皂甙斑点相当, 表明 SNUS-1 可发酵产生重楼甾体皂甙及其类似物。

表 2 内生菌发酵液与重楼总皂甙相对迁移率的比较

样品	SSO1	重楼总皂甙	培养基对照
斑点数	4	6	0
R_f 相当数	3		
	-	0.96	-
	0.86	0.86	-
	-	0.57	-
R_f	0.38	0.38	-
	-	0.25	-
	0.18	-	-
	0.11	-	-

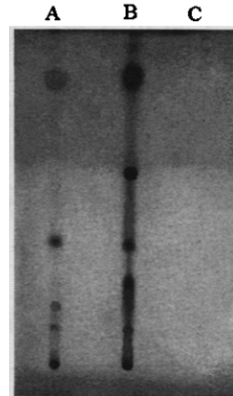


图 1 菌株发酵液的 TLC 图谱
A SNUS-1, B 重楼总皂甙, C 空白发酵液

2.4 SNUS-1 的形态及生理

菌株 SNUS-1 的形态特征与生理生化试验结果见表 3, 检索《伯杰细菌鉴定手册》^[6], 初步确定 SNUS-1 为假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 细菌。且从表 3 可以看出: 该菌株与托氏假单胞菌 (*Pseudomonas tolaasii*) 的形态及生理生化特性一致。

表 3 菌株 SNUS-1 形态和生理生化特征

形态	乳白色, 小, 中凸, 圆, 粘	接触酶实验	+
菌体大小	0.75 μm ~ 1.00 μm × 0.5 μm ~ 1.0 μm	硝酸盐还原实验	+
革兰氏染色	-	明胶水解实验	+
类脂粒染色	+	淀粉水解实验	-
氧化酶实验	+	葡萄糖氧化	+
过氧化氢酶实验	+	葡萄糖发酵实验	-

2.5 16S rDNA 分子系统学研究

选取与 SNUS-1 菌株最同源并经过菌种鉴定的另外 18 条 16S rDNA 序列, 采用多种生物学软件对其进行系统发育分析。

2.6 系统发育树的构建

通过不同的生物学软件, 重建这 19 种菌株的 16S rDNA 部分序列 (约 1500bp) 的系统发育树, 得到基本一致的树 (图 2)。

由图可知 SNUS-1 与 *Pseudomonas tolaasii* (AF255336) 和 *Pseudomonas tolaasii*

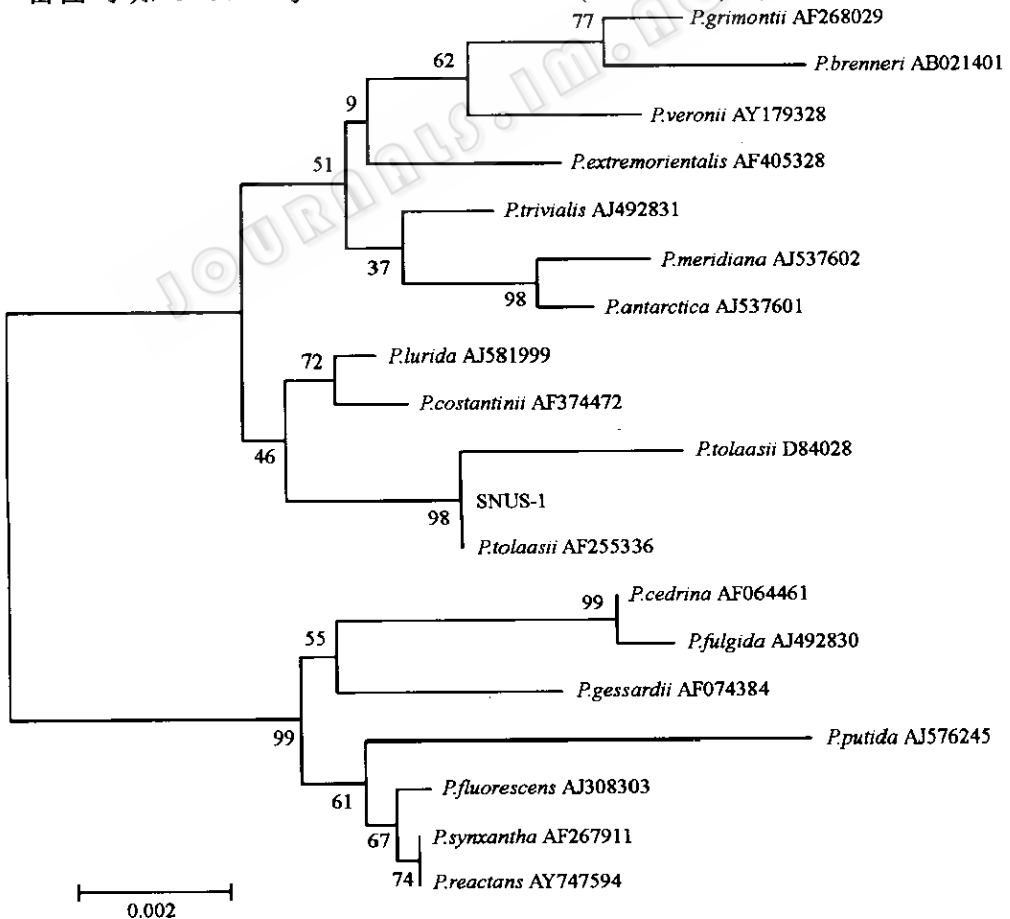


图 2 基于遗传距离构建的假单胞菌属 19 棵菌株的无根树 (自举 1,500 次)

(D84028) 的置信值为 98, 且它们三者严格聚为一族, 密不可分。结合遗传距离、形态特征以及生理特征, 可以确定该菌与托氏假单孢菌 (*Pseudomonas tolassii*) 同种, 鉴定为 *Pseudomonas tolassii*。

3 讨论

甾体皂甙市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^[7]。本实验分离得到的重楼内生菌虽然初步确定产重楼甾体皂甙, 但需进一步研究该菌产何种甾体皂甙, 以及是否具有重楼药用活性。华重楼内生菌的开发利用, 很可能为解决重楼资源短缺开辟了新路径。

另外, 华重楼大量用于中成药配方中, 其所含微生物及其代谢产物均可食入人体, 发挥生理作用。1999 年, 王世林等^[8]从滇重楼中分离得到一株可分泌大量胞外多糖的真菌重楼索霉 (*Hormomyces paridiphilus* M. Zang et S. L. Wang); 2004 年周立刚等^[9]从滇重楼中分离得到可发酵产生甾体化合物的内生真菌; 2005 年赵明等^[10]从华重楼中分离出两株可能产甾体皂甙的内生菌, 分别鉴定为肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 细菌; 本实验则从华重楼中筛选出产重楼皂甙的托氏假单孢菌 (*Pseudomonas tolassii*)。由此可见重楼属植物内生菌种类和功能的多样性。进一步研究华重楼内生菌及其代谢产物的生物活性, 必将有助于人们在更深的层次上认识药用植物的药效与生物多样性的关系。

参 考 文 献

- [1] 郭良栋. 菌物系统, 2001, 20 (1): 148 ~ 152.
- [2] 张霄霖, 刘月禅. 中国中医药科技, 2000, 7 (5): 346 ~ 347.
- [3] 李 恒, 杨兴华, 梁汉兴, 等. 重楼属植物. 北京: 科学出版社, 1998. 157.
- [4] 张纪忠, 黄静娟, 盛宗斗, 等. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1985. 214 ~ 218.
- [5] 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002. 62 ~ 63.
- [6] 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.
- [7] 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 中草药, 2004, 35 (3): 443 ~ 447.
- [8] 王世林, 周立刚, 李 英, 等. 微生物学报, 1999, 39 (2): 160 ~ 163.
- [9] Zhou L G, Cao X D, Yang C Z, et al. Natural Product Research and Development, 2004, 16 (3): 198 ~ 200.
- [10] 赵 明, 贺生容, 陈小静, 等. 微生物学报, 2005, 45 (5): 776 ~ 779.