

内生真菌植物活性成分快速检测方法

潘峰, 吴卫

(四川农业大学农学院, 成都 611130)

摘要: 快速检测内生真菌 (endophytic fungi) 代谢产物中是否含有与宿主植物相同或相似的活性成分对有价值菌株的筛选十分关键。为此, 对内生真菌代谢产物研究分析的常用方法, 如化学反应筛选、色谱分析、光谱分析、分子生物学方法以及活性筛选等进行了初步总结, 以期从事相关工作的科研人员提供一定参考。

关键词: 微生物学; 内生真菌; 综述; 植物活性成分; 检测方法

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)19-1984-11

Rapid detection methods of natural plant active components from endophytic fungi

PAN Feng, WU Wei

(Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: It is a crucial step to screen or detect rapidly those endophytic fungi which have potential to produce bioactive components which are equal or similar to their host plants. In order to provide references for the researchers in such field, the main methods such as chemical reaction methods, chromatography methods, spectroscopy methods, molecular biology methods and biological activity methods that could screen or detect bioactive compounds from endophytic fungi were generalized in this paper.

Key words: microbiology; endophytic fungi; review; plant active components; detection method

0 引言

内生真菌是指部分生活在健康植物组织内部, 而不使宿主植物表现出明显感染症状的真菌^[1]。目前, 从藻类植物、苔藓植物、蕨类植物、裸子植物和被子植物中均分离得到过内生真菌^[1-6]。自 STIERLE 等^[7-8]从红豆杉中分离得到一株可以产具有抗癌活性的紫杉醇内生真菌后, 内生真菌开始引起人们关注。随后, 多个课题组都从红豆杉属 (*Taxus* Linn.) 各个种的多个部位中发现了产紫杉醇或其类似物的内生真菌^[9]。除紫杉醇外, 不少学者又开始从内生真菌中筛选其他化学物质, 如喜树碱^[10]、长春新碱^[11]、西贝碱^[12]等。这些物质活性强, 需求大, 来源少, 价格昂贵, 如果只依靠植物提供, 会对其植物资源造成很大压力, 用获得的优良的产与宿主相同活性成分的菌株, 通过深入研究对菌株进行改造就可以生产目标产物。而微生物发酵工业的高效快速可控, 无疑展现了诱人的前景。

内生真菌是一个庞大的特殊真菌类群, 对其与宿主专一性分析表明, 平均每种宿主有 4~5 种专性内生真菌, 按全球目前已知的 2 万种植物计算, 内生真菌总数可以超过 100 万种^[13]。但能够产生与宿主相同或相似成分的内生真菌比例非常低。如孙端方等^[14]从罗汉松属 (*Podocarpus*) 植物中分离到 155 株内

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20115103110009)

作者简介: 潘峰 (1989—), 男, 博士研究生, 主要研究方向: 药用植物资源开发与利用及其内生真菌的研究

通信联系人: 吴卫, 教授, 主要研究方向: 药用植物资源. E-mail: ewuwei@gmail.com

生真菌, 通过筛选发现仅菌株 EPTP-1 等少数菌株可以产生紫杉醇。再如卢陆洋等^[15]在南方红豆杉中分离得到 91 株单一的丝状真菌, 经过筛选和验证仅得到 1 株 D62 产生紫杉醇。

如何从大量内生真菌中筛选目的内生真菌是基础又关键的一步。由于分离得到的真菌众多, 为减少工作量, 通常用一些精密度不高但易操作、成本低的方法作初筛。常见的如薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC)、显色反应等。由于目标成分明确, 理化性质清楚, 在筛选的过程中可直接将注意力放在目标化合物上。如在生物碱的筛选中, 常见的是首先用生物碱显色剂如碘化铋钾等进行初筛^[16-17], 大大减轻后续的工作压力。为确认筛选得到的真菌是否真实含有目标成分, 还需用更精密的方法进行验证, 不同的方法只能得到化合物的部分信息, 通常需将多种手段联用。如卢陆洋等^[15]在筛选产紫杉醇内生真菌时, 首先以标准紫杉醇为对照进行 TLC 筛选, 再用紫外-可见吸收光谱 (ultraviolet-visible absorption spectrometry, UV-Vis)、高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和质谱 (mass spectrometry, MS) 分析, 确认其产生了目标成分。因此, 通过分析手段便可检测其代谢产物中是否含有目标产物而不需进行复杂的分离过程。可见, 快速又准确地获得目标真菌既是重点也是难点。为此, 这里就近年来对产植物活性成分相同或相似的内生真菌研究报道进行总结, 归纳了目前筛选和分析目标内生真菌的常见方法。

1 化学反应筛选

1.1 显色反应

显色反应类型众多, 如目前药物分析中的显色反应有配位显色反应、氧化还原显色反应、离子缔合显色反应、重氮化-偶合显色反应、亚硝化显色反应和缩合显色反应等^[18]。由于研究的目标成分已知, 容易判断其显色反应类型和显色试剂, 而且显色反应快速、简单且较易观察判断, 可以对大量样品进行初步筛选。显色反应用于真菌代谢产物常见的研究有 2 种方式。

一种是利用显色培养基进行。YOON 等^[19]研究来自真菌的纤维素酶, 利用雷玛唑亮蓝、酚红、刚果红和 tryphan 蓝配制了多种显色培养基, 在培养基中分别添加纤维素和纤维二糖, 通过判断显色清除区域的有无和大小, 间接初步推断产纤维素酶的有无和含量。

另一种是直接将真菌代谢产物提取出来, 加入少量显色试剂, 对比阳性和阴性对照, 判断是否产生了目标产物。如生物碱的显色反应在内生真菌的研究中较常用。许多生物碱都有明显活性, 如长春碱、长春新碱、喜树生物碱和贝母生物碱等, 从真菌中筛选到产此类产物的菌株意义重大。生物碱与一些试剂反应呈现不同的颜色, 如钒酸铵-浓硫酸溶液与可待因反应呈蓝色, 与吗啡反应呈棕色, 与莨菪碱反应呈红色, 这些反应在对大量的内生真菌进行初筛时具有高效简便的特点。李端等^[20]用硫酸铜-氢氧化钠的显色反应并结合其他方法快速从 11 株内生真菌中筛到 3 株可能产生麻黄类生物碱。除生物碱外, 黄酮类物质也较易发生显色反应, 常见的有 HCL-Mg 显色反应、四氢硼钠反应、三氯化铝显色、锆盐-枸橼酸反应、醋酸镁显色和碱性试剂反应等。利用黄酮的显色反应筛选产黄酮类化合物的内生真菌菌株具有很强的可行性。韩晓丽等^[21]从银杏中分离出多种内生真菌, 利用三氯化铝法并结合 HPLC 法获取了 7 株可以产黄酮的内生真菌。沈书庆等^[22]从杜仲的不同部位分离得到 44 株内生真菌, 通过显色反应快速筛选到 3 株产黄酮类化合物的内生真菌。

1.2 沉淀反应

许多次生代谢产物在加入某些特定试剂后会出现具有特殊颜色的沉淀物, 观察代谢产物能否产生与阳性对照相同或相似的沉淀可以快速缩小研究对象, 减轻后续研究压力。值得注意的是, 沉淀反应一般

和上述显色反应共同用于目标真菌的筛选。这是由于许多沉淀反应过程中伴随着显色反应, 或许多化合物同时具有沉淀反应和显色反应, 将二者结合起来不仅可以提高筛选效率, 而且能提高筛选的准确性。例如前面提到的李端等^[20]利用显色反应的同时, 也利用碘化铋钾沉淀反应对内生真菌菌株进行了初步检测。本课题组曾从暗紫贝母^[17]、甘肃贝母^[16]、瓦布贝母^[23]等分离得到了大量的内生真菌, 发酵后提取其代谢物并添加显色试剂碘化铋钾试剂、碘-碘化钾试剂和改良碘化铋钾试剂等, 观察沉积及颜色变化, 可快速筛选到多株能够产生物碱的菌株。因此, 在面对大量筛选时, 若研究的目标产物能够产生特殊的沉淀反应, 结合显色反应和沉淀反应可快速地缩小范围。

然而, 对于那些没有明显特殊显色反应或沉淀反应的成分, 或者其条件较复杂, 以及显色或沉淀试剂昂贵等, 都不适宜用此法筛选。而且显色反应和沉淀反应只适用于初步的定性检测, 无法进行定量检测。此外, 由于显色反应和沉淀反应只是反映一类或多类物质的一个特性, 因此会有许多成分对目标成分检测产生干扰, 故此法仅作初步研究之用。

2 色谱方法

2.1 TLC

TLC 点样量一般在 μg 级别, 样品耗损少, 主要用于分析检查, 通常一张薄层板可以同时分析多个样, 其具有快速、简便、高分辨率、高效率 and 低成本的优势。不同化合物在不同展开剂中迁移速率一般不同, 同一物质或其结构相似物在进行同一次展开操作中迁移率基本一致。TLC 可以作为一种基本的分析手段对特定化合物进行初步分析。本课题组在对瓦布贝母内生真菌产生物碱菌株的筛选时就利用 TLC 对代谢产物产生物碱的情况进行初步分析, 并取得了良好结果^[23]。GANGADEVI 等^[24]利用 TLC 对内生真菌次生代谢产物进行分析, 并利用多种展开剂展开后喷施显色剂, 然后微热显色, 以紫杉醇为标准物, 最终得到了与紫杉醇比移值 (R_f) 一致的内生真菌。AMNA 等^[25]也通过 TLC 技术初步分析了一株可以产喜树碱的内生真菌。

由于部分物质极性性质相差不大或相同, 这会使得其与目标成分的 R_f 值差别很小, 再加上薄层板的边缘效应及点样不均等误差会造成同一物质在薄层板不同位置 (如两边和中间) R_f 存在差距, 这些状况会导致在分析时存在误差。此外, 内生真菌的代谢产物含量非常低, 这会导致部分含量极低的成分无法识别出来。如果仅凭 TLC 分析明显存在不足, 如本课题组曾对内生真菌 WBS007 的菌丝和发酵液的生物碱成分同时进行 TLC 分析, 随后进一步进行了 HPLC 分析, 发现菌丝体和发酵液都存在贝母辛, 通过 TLC 未从菌丝体提取物中检测到这一成分^[23]。

2.2 气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatograph/mass spectrometer, GC/MS)

GC/MS 主要由三部分组成: 色谱部分、MS 部分和数据处理系统。色谱部分与一般的色谱仪基本相同, 其检测器是串联的质谱仪。在色谱部分, 混合样品在合适的色谱条件下被分离成单个组分, 然后进入质谱仪进行鉴定。目前, GC/MS 的质谱仪部分使用最多的是四极质谱仪。离子源主要是电子轰击源 (electron impact ion source, EI) 和化学电离源 (chemical ionization source, CI)。在内生真菌活性物质上的应用主要集中在那些易挥发或气化的成分。如张玲琪等^[26]曾从陈化的鸢尾根状茎分离到产鸢尾酮的丝状真菌, 首先通过 TLC 筛选, 由于鸢尾酮是小分子物质, 易挥发, 所以又采用 GC/MS 分析, 得到了一株可同时产 A-鸢尾酮与 B-鸢尾酮的 *Rhizopus oryzae* 94y-01 菌株。

利用 GC/MS 分析的一个明显优势是除了以目标成分作为比照外, 还可以依据其离子碎片峰与存在

的化学物质库进行比照,从而得到更多有价值的成分。但是 GC/MS 分析只适用于分子量较小、较易挥发且热稳定性的成分。由于较多目标成分为强极性、难挥发、热不稳定性物质,这为利用 GC/MS 分析带来了困难。如最常见的紫杉醇、喜树碱等物质就不适合 GC/MS 分析。

2.3 HPLC

作为色谱分析法的一个分支,HPLC 法是 20 世纪 60 年代末期,在经典液相色谱法和气相色谱法的基础上发展起来的新型分离分析技术。经过近 30 年的发展,目前 HPLC 法在分析速度、分离效能、检测灵敏度和操作自动化方面,都达到了与气相色谱法相媲美的程度,并保持了经典液相色谱对样品适用范围广、可供选择的流动相种类多和便于用作制备色谱等优点。液相色谱填充柱的柱效可达 $2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 块/m 理论塔板数,选择性高。HPLC 法不仅可以分析不同类型的有机化合物及其同分异构体,还可分析在性质上极为相似的旋光异构体。由于内生真菌次生代谢产物含量一般都较低,在 $\mu\text{g/L}$ 至 mg/L 级别^[23],HPLC 一般配备的检测器大多检测灵敏度高。如被广泛使用的紫外吸收检测器,最小检出量可达 10^{-9} g; 用于痕量分析的荧光检测器,最小检出量可达 10^{-12} g。此外,由于高压输液泵的使用,相对于经典液相(柱)色谱,其分析时间大大缩短,当输液压力增加时,流动相流速会加快,完成一个样品的分析时间仅需几分钟至几十分钟。这些对内生真菌次生代谢目标产物的检测具有重要意义,相对于柱色谱而言,可以大大节约时间。HPLC 还有一个优势就是,通过绘制线性曲线,可以很方便地获得目标成分的含量,这对于内生真菌次生代谢产物的研究来说很重要,因为只有达到产一定量目标成分的真菌才具有实际生产的意义。GANGADEVI 等^[27]在研究一株产紫杉醇的内生真菌时就利用 HPLC 进一步分析出菌株 TAC-15 可产生一个与紫杉醇标准品相同保留时间(retention time, RT)的色谱峰,从而判断此菌株极可能产生紫杉醇,并利用其建立的标准曲线计算出含量。同样,LIU 等^[28]利用 HPLC 分析了一株可以产 10-羟基喜树碱的真菌,并利用标准曲线计算出其在液体发酵物中的含量。PARTHASARATHY 等^[29]研究了一株分离自匙羹藤的内生真菌,通过与匙羹藤新昔元标准品的 HPLC 的 RT 值进一步确认了此菌株能够产生匙羹藤新昔元,通过标准曲线计算出其含量。这样的例子非常多,HPLC 是目前用于内生真菌目标产物定性和定量分析最常用的方法。然而,该法同一时间只能分析一个样,分析时间一般为 20~60 min 不等,因此如果样品过多,则会给分析带来一定困难。

2.4 高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC/MS)

液质联用又叫液相色谱-质谱联用技术,以液相色谱作为分离系统,MS 为检测系统。HPLC/MS 体现了色谱和质谱优势的互补,将色谱对复杂样品的高分离能力,与 MS 具有的高选择性、高灵敏度及能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来。HPLC/MS 除了可以分析气相色谱/质谱(GC/MS)所不能分析的强极性、难挥发、热不稳定性化合物之外,还具有以下几个方面的优点:分析范围广、分离能力强、定性分析结果可靠、检测限低、分析时间快、自动化程度高。HPLC/MS 作为已经比较成熟的技术在内生真菌的检测中也占有很重要的地位。一种化合物一般都有一个特定的质谱图,当对通过 HPLC 分离后得到的单一成分进行质谱检测后,比对得到的质谱图就可以确认目标产物的存在。这一点,对于存在的少数具有结构类似,但分子量上存在差异的物质来说很关键。LI 等^[30]先通过 TLC,反相高效液相色谱(RP/HPLC)分析后,再利用 LC/MS 对菌株 F-40 进行了分析,最终判断其能产生紫杉醇。KOUR 等^[31]对一株 *Fusarium oxysporum* 内生真菌利用 LC/MS 进行了分析,并与 HPLC 等手段一起确认其能够产生鬼臼毒素。然而,目前 HPLC/MS 利用其质谱图可检索的库成分数目较少,而

利用人工解析谱图不仅耗时费力,且如果没有对照品的话,该方法的实用性将大大降低,这是较 GC/MS 而言一个明显的不足。

3 光谱方法

3.1 UV-Vis

紫外线是波长为 100~400 nm 辐射的总称。每一种物质都有各自特定的电子吸收光谱,因此,从电子吸收光谱可以得到许多有关结构和能级的信息,大多物质都有各自的紫外光谱吸收带,从物质的紫外吸收光谱中可以得到许多有关结构和能级的信息。许多元素的摩尔吸光系数已由原来的几万提高到数十万,灵敏度良好^[32]。用分光光度计进行溶液浓度的测量时,一般相对误差在 1%~3% 范围内,采用先进的双光束示差分光光度计进行测量时,误差可降至 1% 以下,精密度优越。计算机技术和信息技术的广泛应用使分光光度计的性能有了极大提升,软件系统的广泛应用大大加强了数据分析处理能力,为 UV-Vis 仪器的广泛应用提供了技术支持,大大提高了其准确度,而且仪器操作简便、快速、价格较低、测定方法易于推广。除单独使用外,其作为一种灵敏的检测器,常与 HPLC, GC 等联用。将经过色谱分离得到的单一物质进行紫外线扫描,就能准确地确定在一定保留时间下波峰对应物质的紫外吸收特性。这对内生真菌次生代谢物的检测十分有用。因为,当未知物质的紫外吸收波谱与目标成分的波谱相差很大时,其为同一种物质的可能性几乎为零;反之,则很可能为同一种物质。UV-Vis 的信息对帮助判断内生真菌产物是否存在与标准物相同的化合物很有意义。然而,由于待测样品一般是混合物,许多物质都具有一定的紫外吸收值,这就会使所得图谱无法使用,因此该法需对样品进行纯化,或者依附于其他在线分离系统,如 HPLC 等。同时,由于多种物质不具有紫外吸收,这就导致其无法使用,如贝母类生物碱大多不具有紫外吸收而导致无法利用 UV-Vis 进行检测^[23]。

3.2 红外光谱 (infrared spectroscopy, IR)

IR 是以波长或波数为横坐标,以强度或其他随波长变化的性质为纵坐标所得到的反映红外射线与物质相互作用的谱图。IR 是由于分子发生振动能级的跃迁而产生的,又称振动光谱,任何气态、液态、固态样品均可进行红外光谱测定。由于每种化合物均有红外吸收,尤其是有机化合物的 IR 能提供丰富的结构信息,通过谱图解析可以获取分子结构的信息,因此 IR 是有机化合物结构判断的重要手段之一。目前,其在识别假药、生药鉴别、中成药成分分析^[33-34]等领域有较广泛的应用。而对于检测内生真菌次生代谢产物是否包含目标产物也是很重要的手段。由于每种物质都有特定的 IR,通过对检测液进行红外吸收检测,对得到的光谱与标准物的 IR 进行比较,就可以对比发酵产物中是否含有目标成分。然而,值得注意的是,由于内生真菌次生代谢产物种类众多,成分复杂,在红外检测时,不同物质很可能发生相互影响。为得到更加准确的 IR 信息,和 UV 一样需要对样品进行纯化,再进行红外分析。此外,与 HPLC 和 UV 联用类似,也可以将其与 HPLC 联用,提高检测的准确度和精密度。

3.3 核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)

NMR 及其影像技术作为一项新的检测技术在医学、农业、食品、药品等行业也广泛应用。目前研究最多的是 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR. ^1H 的核磁共振称为质子磁共振 (proton magnetic resonance),简称 PMR,或 ^1H NMR. ^{13}C 的核磁共振简称 CMR,或 ^{13}C NMR. 目前,在内生真菌目标成分的研究中也广泛采用。ZHU 等^[35]对一株内生真菌 Sif14 用 HPLC 和 LC/MS 分析后,再由 ^1H NMR 等技术最终确认了其能够产

生宿主植物的活性成分石杉碱甲。同样, PURI 等^[36]对 TLC, HPLC, LC/MS 和 MS 分析后用 ^1H NMR 等最终确认一株来自桃儿七的内生真菌 (*Trametes hirsuta*) 能产生具有抗癌活性的足叶草毒素。此外, NMR 技术在确认分离自内生真菌的未知物质也占据举足轻重的作用, 在此不做赘述。但是该方法也有诸多不足, 例如待测样品需要进行分离纯化, 仪器本身价格昂贵, 这些都给 NMR 方法的推广和使用带来了障碍。

4 分子生物学方法

4.1 基因片段比对法

一个代谢产物的合成需要多步代谢反应, 其中某些关键途径的关键酶基因是控制该化合物生成的关键。当对某一化合物代谢途径的关键酶基因或某个必须基因有一定了解时, 可以利用相应引物对宿主植物和真菌DNA同时进行扩增, 对得到的扩增片段进行测序并比较其相似性。李嘉琳等^[37]用红豆杉C-13苯丙氨基侧链CoA乙酰基转移酶 (C-13 phenylpropanoid side chain-co-acyltransferase, BAPT) 基因的引物对红豆杉中合成紫杉醇的内生真菌的基因组DNA进行PCR反应, 测序并比较其与红豆杉BAPT基因片段大小一致, 序列相似度达到99%, 而其中1%的差别可能是PCR过程中错配引入, 而不产紫杉醇的真菌却没有这样的结果。此外, ZHANG等^[38]筛选得到多株产紫杉醇内生真菌, 以 *dbat-F* (ATGGCDGGV TCHACDGAN) 和 *dbat-R* (RRAWGGYTTWGTKACATATT) 为引物扩增DBTA基因, 然后测序, 从美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 获取了红豆杉和南方红豆杉的DBTA序列, 比对后发现其相似度分别为99%和97%。可见, 利用分子生物学具有理论可行性。而且, 多位学者通过这种方法对内生真菌进行初筛取得了良好的结果。

在此, 以研究比较深入的产紫杉醇内生真菌为例加以说明。由于紫杉醇合成过程中, 已经发现了其合成的关键基因, 即10-去乙酰巴卡亭III-10-O-乙酰基转移酶 (10-deacetylbaicatin III-10-O-acetyl transferase, DBAT) 和BAPT基因, 那么在筛选过程中检测不到这种基因的就肯定不会产生紫杉醇, 这样就可以迅速排除那些非目标内生真菌。张鹏等^[39]就通过这样的方法快速准确地从75株菌株中筛选到一株产紫杉醇的内生真菌YN6。ZHOU等^[40]利用基因TS特异性引物作PCR并测序, 最终从38株菌株中筛选到3株产紫杉醇的内生真菌。可以看出这种方法的可行性。

4.2 关键酶基因分子探针法

通过对合成某代谢产物必须的关键酶基因进行PCR扩增和序列比对是研究此类内生真菌较为有效的方法, 但是工作相对麻烦。目前, 已有研究通过对这类基因设计出关键酶基因分子探针来快速筛选或者研究产目标成分的内生真菌。例如, 迄今已有紫杉二烯合成酶编码基因TS, 3-氨基-3-苯基丙酰转移酶编码基因BAPT和脱乙酰巴卡亭III-10-O-乙酰转移酶编码基因DBAT的部分编码序列被设计成探针, 用来检测菌株是否具有合成紫杉醇的潜力^[41-43]。MIAO等^[43]利用DBAT部分序列作探针, 从分离自中国红豆杉中的几十株内生真菌中最终找到了4株具有合成紫杉醇能力的内生真菌。ZHANG等^[41]利用BAPT和DBAT的部分编码序列作基因探针, 从近百株植物内生菌中筛选得到了3株产紫杉醇的菌株。为验证基因探针的可靠性, KUMARAN等^[42]利用TS基因中的保守区部分序列作探针, 对3株高产紫杉醇真菌进行基因探针的检测, 结果全部都呈阳性, 从而进一步证实了利用TS的部分序列作探针的可行性。此外, 喜树碱、长春新碱等生物合成途径的关键酶基因都有较充分的研究^[44-45], 在此基础上设计合适的探针就可以用于相应

目标菌株的筛选。

但需要注意的是,许多活性成分生物合成途径相关的关键酶基因并不是很清楚,此类方法的使用也因此受到限制,而且整个合成途径涉及非常多的基因,如果只比对个别基因并不能保证一定产生目标产物,可能只是生成其前产物。还有许多能够产生目标成分的真菌与其宿主植物可能存在不同的进化路线,形成不同的合成目标产物的途径,从而利用此类筛选就有可能导致漏筛。如YANG等^[46]利用高通量测序技术,对从榛子中分离出来的产紫杉醇的青霉菌(*Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431)进行测序,通过生物信息学分析,对13个在植物体紫杉醇合成的基因与此株菌相应基因进行了聚类分析,发现二者存在较大差别。

5 活性筛选

通常,从植物内生真菌中筛选其与宿主植物相同或相似的化合物,一般都选择从这些具有显著生物活性的成分着手,例如紫杉醇、紫杉烷类、喜树碱、长春碱、长春新碱、鬼臼毒素、黄酮类化合物,石杉碱等^[47]。基于此,可以利用目标成分的特殊活性进行筛选。蛇足石杉含生物碱石杉碱甲和石杉碱乙,均具有很强的抑制胆碱酯酶(cholinesterase, ChE)活性,临床试验证实石杉碱甲对治疗重症肌无力^[48]和早老年性痴呆有显著疗效^[49]。刘海元等^[50]利用乙酰胆碱酯酶活性筛选模型对从蛇足石杉中分离得到的60株内生真菌进行了筛选,最终发现了12株具有较强抑制活性的内生真菌,提示其次生代谢产物中含有石杉碱甲或石杉碱甲类似物。此外,紫杉醇具有良好的抗癌效果,孙端方等^[14]通过四唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法测定了内生真菌粗提物对Vero细胞的抑制率,以此筛选有抗肿瘤活性的内生真菌菌株,从155株分离自罗汉松的内生真菌中筛选出28株活性较强的菌株,用于进一步分析。可见,一旦建立了一个合适的活性筛选模型,便可以快速而有效地缩小进一步研究范围,而且由于是以活性为指导,得到的真菌就可能通过进一步研究而得到具有类似活性的新型物质或者原目标产物的类似物。然而,该方法是利用活性进行筛选,而内生真菌次生代谢的众多活性成分往往含量极低^[23],有时也会漏筛,同时由于许多成分具有相似的活性,这必然对目标成分的筛选带来干扰,造成误筛。同时,一个好的活性筛选模型的建立也需要较多的工作,也给本法的利用带来不利影响。

6 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

1971年,瑞典学者ENGVALL等^[51]将免疫技术发展为检测体液中微量物质的固相免疫测定方法,即ELISA。ELISA现在已成为目前分析化学领域中的重要组成部分,是一种特殊的试剂分析方法。ELISA的中心就是让抗体与酶复合物结合,然后通过显色来检测。1997年就有纯化抗紫杉醇抗体的报道^[52]。早在1996年,LI等^[53]就利用特定的抗紫杉醇抗体对来自落羽杉(*Taxodium distichum*)的内生真菌进行了检测筛选,最终获得产紫杉醇内生真菌。随后,他们又利用同样方法对来自榿树(*Torreya grandifolia*)的内生真菌进行TLC和光谱分析后,对初筛到的可以产紫杉醇的菌株进一步开展ELISA分析,获得良好结果^[54]。如今已经有商业化的紫杉醇免疫试剂盒。2000年,CARUSO等^[55]利用ELISA法从221株菌株中获得了15株产紫杉醇真菌。但是该法需要清楚抗体和酶复合物结合的机理,并且有合适的显色方法才可使用。加之许多成分在作用机理上研究并不充分,或者获得所需的酶复合物较难等也使该法目前只适用于紫杉醇等少数物质的筛选研究。

7 结论与展望

在产与宿主相同或相似活性成分的内生真菌的研究中, 利用上述不同方法可以快速筛选和判断所研究内生真菌是否产生目标成分。但是需要注意的是, 由于单一方法的局限性, 目前所有的研究都是多种分析方法相结合, 而不是只使用单独一种方法。如 GANGADEVI 等^[24]在研究产紫杉醇内生真菌时同时采用了 TLC, HPLC, UV, MS 和 ¹H NMR 等多种技术。此外, 一般筛选的顺序是先采用操作简单、快速、价格便宜的方法进行初筛, 例如显色反应、沉淀反应、活性测定等, 然后进一步利用 TLC, UV, IR, HPLC 等进行较深入的试验, 再通过 LC/MS, MS, NMR 等方法做最后测定。对于目标代谢产物生物合成途径关键酶基因等基础研究较多者, 也可利用分子生物学或 ELISA 做初步的筛选或后续验证。总之, 研究选取方法一般按照由易到难, 内生真菌数目由多到少的顺序进行, 同时参考所在实验室的条件合理选择。

[参考文献] (References)

- [1] HYDE K D, SOYTONG K. The fungal endophyte dilemma[J]. *Fungal Diversity*, 2008, 33: 163-173.
- [2] RAGHUKUMAR C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective[J]. *Fungal Diversity*, 2008, 31: 19-35.
- [3] STROBEL G. *Muscodor albus* and its biological promise[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, 33(7): 514-522.
- [4] ARNOLD A E, LUTZONI F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?[J]. *Ecology*, 2007, 88(3): 541-549.
- [5] HUANG W Y, CAI Y Z, HYDE K D, et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants[J]. *Fungal Diversity*, 2008, 33: 61-75.
- [6] HUANG W Y, CAI Y Z, SURVESWARAN S, et al. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 36: 69.
- [7] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [8] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, et al. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the *Pacific yew*, *Taxus brevifolia*[J]. *Journal of Natural Products*, 1995, 58(9): 1315-1324.
- [9] 康冀川, 靳瑞, 文庭池, 等. 内生真菌产紫杉醇研究的回顾与展望[J]. *菌物学报*, 2011, 30 (2) : 168-179.
KANG J C, JIN R, WEN T C, et al. Recent research advances on endophytic fungi producing taxol[J]. *Mycosystema*, 2011, 30(2): 168-179. (in Chinese)
- [10] KUSARI S, ZÜHLKE S, SPITELLER M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues[J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(1): 2-7.
- [11] 杨显志, 张玲琪, 郭波, 等. 一株产长春新碱内生真菌的初步研究[J]. *中草药*, 2004, 35 (1) : 79-81.
YANG X Z, ZHANG L Q, GUO B, et al. Preliminary study of a vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Chatharanthus roseus*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2004, 35(1): 79-81. (in Chinese)
- [12] YIN H, CHEN J. Sipeimine-producing endophytic fungus isolated from *Fritillaria ussuriensis*[J]. *Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences*, 2008, 63(11): 789.
- [13] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. *菌物系统*, 2001, 20 (1) : 148-152.
GUO L D. Advances of researches on endophytic fungi[J]. *Mycosystema*, 2001, 20(1): 148-152. (in Chinese)
- [14] 孙端方, 冉雪琴, 王嘉福. 一株产紫杉醇罗汉松内生真菌的分离和鉴定[J]. *微生物学报*, 2008, 48 (5) : 589-595.
SUN D F, RAN X Q, WANG J F. Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus from *Podocarpus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(5): 589-595. (in Chinese)

- [15] 卢陆洋, 秦竹, 徐金库, 等. 一株产紫杉醇内生真菌的分离及其代谢产物的研究[J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(3): 202-207.
LU L Y, QIN Z, XU J K, et al. Production of taxol an endophytic fungus isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Chin. Med. Biotechnol., 2010, 5(3): 202-207. (in Chinese)
- [16] 陈鹊, 王元彪, 刘正琼, 等. 产生物碱的甘肃贝母内生真菌的筛选、鉴定及抑菌活性测定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(22): 247-252.
CHEN Q, WANG Y B, LIU Z Q, et al. Isolation, identification and antibiotic activity of alkaloid-producing endophytic fungi from *Fritillaria przewalskii* Maxim.[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(22): 247-252. (in Chinese)
- [17] 陈鹊, 王元彪, 刘正琼, 等. 暗紫贝母产生物碱内生真菌的筛选及生物碱抑菌活性的测定[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(6): 406-410.
CHEN Q, WANG Y B, LIU Z Q, et al. Screening alkaloid-producing endophytic fungi isolated from *Fritillaria unibracteata* and testing the antimicrobial activity of alkaloid extracts[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(6): 406-410. (in Chinese)
- [18] 马卫兴, 许瑞波, 孙吉佑. 药物分析中的显色反应[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 266-267.
MA W X, XU R B, SUN J Y. Color reaction in pharmaceutical analysis[J]. Lishizhen Medicine and Materta Research, 2008, 19(2): 266-267. (in Chinese)
- [19] YOON J H, PARK J E, SUH D Y, et al. Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulases in fungi[J]. Mycobiology, 2007, 35(1): 21-24.
- [20] 李端, 郭利伟, 刘瑞, 等. 1株产麻黄碱内生真菌的筛选[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(9): 316-318.
LI D, GUO L W, LIU R, et al. Screening of 1 strains of endophytic fungi of ephedrine[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(9): 316-318. (in Chinese)
- [21] 韩晓丽, 康冀川, 何劲, 等. 银杏产黄酮内生真菌的分离与鉴定[J]. 菌物研究, 2008, 6(1): 40-45.
HAN X L, KANG J C, HE J, et al. Isolation and identification of endophytic fungi of flavonoid-producing *Ginkgo biloba*[J]. Journal of Fungal Research, 2008, 6(1): 40-45. (in Chinese)
- [22] 沈书庆, 殷红, 刘芸, 等. 产杜仲黄酮内生真菌的初步研究[J]. 菌物研究, 2008, 6(1): 46-48.
SHEN S Q, YIN H, LIU Y, et al. Primary studies on flavonoid-producing endophytic fungi isolated from a medicinal plant *Eucommia ulmoides*[J]. Journal of Fungal Research, 2008, 6(1): 46-48. (in Chinese)
- [23] PAN F, HOU K, GAO F, et al. Peimisine and peiminine production by endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabensis*[J]. Phytomedicine, 2014, 21(8-9): 1104-1109.
- [24] GANGADEVI V, MUTHUMARY J. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb.[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(5): 717-724.
- [25] AMNA T, PURI S C, VERMA V, et al. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(3): 189-196.
- [26] 张玲琪, 谷甦, 邵华, 等. 发酵产鸢尾酮真菌的分离鉴定及生香特性的初步研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 49-54.
ZHANG L Q, GU S, SHAO H, et al. Isolation, determination and aroma product characterization of fungus producing irone[J]. Mycosystema, 1999, 18(1): 49-54. (in Chinese)
- [27] GANGADEVI V, MUTHUMARY J. A novel endophytic taxol-producing fungus *Chaetomella raphigera* isolated from a medicinal plant, *Terminalia arjuna*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 158(3): 675-684.
- [28] LIU K, DING X, DENG B, et al. 10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(5): 689-693.
- [29] PARTHASARATHY R, SATHIYABAMA M. Gymnemagenin-producing endophytic fungus isolated from a medicinal plant

- Gymnema sylvestre* R. Br[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(6): 3141-3152.
- [30] LI C, LI Y, WANG Q, et al. Taxol production by *Fusarium arthrosporioides* isolated from yew, *Taxus cuspidata*[J]. Journal of Medical Biochemistry, 2008, 27(4): 454-458.
- [31] KOUR A, SHAWL A S, REHMAN S, et al. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 1115-1121.
- [32] 吴文铭. 紫外可见分光光度计及其应用[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4): 61-63.
WU W M. Application of UV-vis recording spectro photometer[J]. Life Science Instruments, 2009, 7(4): 61-63. (in Chinese)
- [33] 杨飞勇, 宋宇鹏, 周玉芬. 红外光谱在中药鉴别中的应用[J]. 科技致富向导, 2012(30): 229-230.
YANG F Y, SONG Y P, ZHOU Y F. Application of infrared spectroscopy in identification of traditional Chinese medicine[J]. Guide of Sci-tech Magazine, 2012(30): 229-230. (in Chinese)
- [34] 陈亚, 江滨, 曾元儿. 红外光谱在中药鉴别中的应用[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(3): 237-240.
CHEN Y, JIANG B, ZENG Y E. Application of infrared spectroscopy in identification of traditional Chinese medicine[J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2004, 21(3): 237-240. (in Chinese)
- [35] ZHU D, WANG J, ZENG Q, et al. A novel endophytic huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(4): 1469-1478.
- [36] PURI S C, NAZIR A, CHAWLA R, et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 122(4): 494-510.
- [37] 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[J]. 生物技术通报, 2006(增): 356-361.
LI J L, HU Y L, CHEN W D, et al. Identification and pilot study of taxus endophytic fungi's taxol-producing correlation gene *BAPT*[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(Suppl.): 356-361. (in Chinese)
- [38] ZHANG P, ZHOU P P, YU L J. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus x media*, *Aspergillus candidus* MD3[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 293(2): 155-159.
- [39] 张鹏, 刘博, 周蓬蓬, 等. 一株产紫杉醇内生真菌 YN6 的分离及鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(10): 961-967.
ZHANG P, LIU B, ZHOU P P, et al. Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus YN6[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 27(10): 961-967. (in Chinese)
- [40] ZHOU X, WANG Z, JIANG K, et al. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2007, 43(4): 439-443.
- [41] ZHANG P, ZHOU P, JIANG C, et al. Screening of taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(12): 2119-2123.
- [42] KUMARAN R S, HUR B K. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2009, 54(1): 21-30.
- [43] MIAO Z, WANG Y, YU X, et al. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2009, 45(1): 81-86.
- [44] 王磊, 吴家胜, 廖亮. 喜树碱生物合成途径及其相关酶研究现状及展望[J]. 浙江林学院学报, 2008, 25(6): 791-797.
WANG L, WU J S, LIAO L. Camptothecin: a biosynthetic pathway with associated enzymes and genes[J]. Journal of Zhejiang Forestry College, 2008, 25(6): 791-797. (in Chinese)
- [45] 韩梅, 赵博, 安志刚, 等. 长春花萜类吲哚生物碱生物合成途径中重要酶 (DXR、SLS、G10H、STR) 基因的克隆与表达[J]. 植物研究, 2007, 27(5): 564-568.
HAN M, ZHAO B, AN Z G, et al. Cloning and expression of cDNA encoding key enzymes (DXR, SLS, G10H and STR) in

- thepe indole alkaloids biosynthesis pathway from *Catharanthus roseus*[J]. Bulletin of Botanical Research, 2007, 27(5): 564-568. (in Chinese)
- [46] YANG Y, ZHAO H, BARRERO R A, et al. Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 69.
- [47] CHANDRA S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(1): 47-59.
- [48] 程源深, 吕传真, 应智林, 等. 石杉碱甲治疗重症肌无力症 128 例[J]. 新药与临床, 1986, 5 (4) : 197-199.
CHENG Y S, LÜ C Z, YING Z L, et al. Treatment of 128 cases of myasthenia gravis[J]. New Drugs and Clinical Remedies, 1986, 5(4): 197-199. (in Chinese)
- [49] 章海燕, 唐希灿. 石杉碱甲: 具有治疗神经退行性疾病的前景药物[J]. 上海医药, 2003, 24 (3) : 112-120.
ZHANG H Y, TANG X C. Huperzine A, a drug possessing the prospect of treating retrograde nervous disorders[J]. Shanghai Medical and Pharmaceutical Journal, 2003, 24(3): 112-120. (in Chinese)
- [50] 刘海元, 王明兹, 吴水生, 等. 乙酰胆碱酯酶活性筛选模型对蛇足石杉内生真菌的筛选研究[J]. 海峡药学, 2012, 24 (3) : 238-241.
LIU H Y, WANG M Z, WU S S, et al. The studies of filter to endophytic fungi from *Huperzia serrata* by the acetylcholinesterase activity screening model[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2012, 24(3): 238-241. (in Chinese)
- [51] ENGVALL E, PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G[J]. Immunochemistry, 1971, 8(9): 871-874.
- [52] 梅兴国, 阮翔, 孙亦民, 等. 抗紫杉醇抗体的制备方法[J]. 华中理工大学学报, 1997 (2) : 102-103.
MEI X G, RUAN X, SUN Y M, et al. Preparation method of anti taxol antibody[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 1997(2): 102-103. (in Chinese)
- [53] LI J, STROBEL G, SIDHU R, et al. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*[J]. Microbiology, 1996, 142(8): 2223-2226.
- [54] LI J Y, SIDHU R S, FORD E J, et al. The induction of taxol production in the endophytic fungus-*Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1998, 20(5): 259-264.
- [55] CARUSO M, COLOMBO A L, FEDELI L, et al. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers[J]. Annals of Microbiology, 2000, 50(1): 3-14.