



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103667070 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201310343403. 1

(22) 申请日 2013. 08. 08

(83) 生物保藏信息

CCTCC No. M2013198 2013. 05. 09

(71) 申请人 浙江医药高等专科学校

地址 315100 浙江省宁波市高教园区(南区)
鄞县大道东段 888 号

(72) 发明人 董丽辉 凌庆枝

(74) 专利代理机构 宁波天一专利代理有限公司
33207

代理人 徐良江

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006. 01)

C12P 17/12 (2006. 01)

C12R 1/885 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图6页

(54) 发明名称

蛇足石杉植物内生真菌及其在制备石杉碱甲中的应用

(57) 摘要

本发明涉及蛇足石杉植物内生真菌, 其生物分类和分子生物学鉴定为木霉菌(Trichoderma sp.) L44, 该菌已保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC NO: M2013198。本发明还提供了其在制备石杉碱甲中的应用。本发明为石杉碱甲的来源提供了一个新的微生物。本发明发明的微生物, 有生长繁殖迅速, 不受季节, 气候等外界环境的限制, 产量提升空间大等优势。能对药用植物蛇足石杉的野生资源进行有效的保护, 避免过度的采挖。

1. 蛇足石杉植物内生真菌,其特征在于:生物分类和分子生物学鉴定为木霉菌(*Trichoderma* sp.) L44,该菌已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC NO: M2013198。

2. 根据权利要求1所述的蛇足石杉植物内生真菌,其特征在于:其在PDA培养基培养的菌落形态为:28℃培养2-3天菌落直径为50mm,培养到5-6天可以铺满整个培养皿,菌落在生长2-3天颜色为白色,菌丝细丝状,5-6天生长至整个平皿,

菌落中间有细小的深绿色颗粒状,培养至6-7天,培养菌落上布满绿色颗粒状物,在PDA培养基上反面为乳白色,菌落边缘一圈略显淡黄色。

3. 根据权利要求1所述的蛇足石杉植物内生真菌,其特征在于:菌丝平滑,分枝,无色有隔菌丝,

菌株的分生孢子梗粗,无色,直径为10-15 μ m;分生孢子顶囊近乎球形,直径为50-65 μ m,产孢结构单层或双层,分生孢子球形至近球形,直径为2.5-5 μ m。

4. 根据权利要求1所述的蛇足石杉植物内生真菌,其特征在于:基因登录号为KF018088 ITS碱基序列为:

```
GAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTC
GGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGT
ATACCCCCTCGCGGGTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCA
ACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTG
GCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAA
CACCCAATTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA。
```

5. 根据权利要求1所述的蛇足石杉植物内生真菌在制备石杉碱甲中的应用。

6. 根据权利要求5所述的蛇足石杉植物内生真菌在制备石杉碱甲中的应用,其特征在于:发酵条件:温度28℃,接种量10%,种龄48h,转速150r/min,发酵时间7天,发酵结束后对发酵液和菌丝进行化学提取,分离可得石杉碱甲。

蛇足石杉植物内生真菌及其在制备石杉碱甲中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于药用植物的微生物提取和产物培养,具体涉及从蛇足石杉中分离内生真菌和利用内生真菌发酵生产石杉碱甲。

背景技术

[0002] 大量的流行病学调查资料显示,全球人口的老齡化已成世界趋势,阿尔茨海默病又称阿尔茨海默病性老年痴呆,一般简称 Alzheimer 病 (Alzheimer's disease, AD),是痴呆的最主要类型,当仁不让地成为了现代社会的“常见病”。据 Ellis 等研究表明,60 岁以上老年人发生痴呆的比率为 6-12%; 随着年龄的增长,发病的可能性也明显增加,如对于 85 岁以上的老人来说,痴呆的发生率高达 20-40%。尽管痴呆有多种类型,但 50% 以上属于 AD。

[0003] 目前,全世界 AD 的发病人数高达 2000 万。在日本 65 岁以上者老年痴呆症发病率约为 3.8%,其中女性患病率高于男性。在美国 AD 患病人数已达 500 万,并预期在 2050 年将增加至 1000 万,其中每年为 AD 患者的药物及护理所支出的费用高达 1500 亿美元,该病已成为除心血管病、癌症和脑卒中以外危害人民健康的第 4 大杀手。

[0004] 石杉碱甲,是我国首次从蕨类植物石杉科石杉属植物蛇足石杉中分离出的一种生物碱,其化学结构独特,与美国 FDA 批准的其他 AD 治疗药物 (Tacrine、Donepezil、Rivastigmine、Galanthamine 等) 相比,石杉碱甲具抑制 AChE 活性高、毒副作用低、可提高记忆力和保护心血管等特点,成为治疗 AD 最有前景的天然药物^[7]。

[0005] 目前石杉碱甲生产仅能从蛇足石杉等石松属植物中提取,存在严重的原料短缺和生态环境破坏等问题。由于石松属植物植株矮小 (10~30cm),生境要求苛刻,生长缓慢 (自然条件下 12cm 成苗生长需 10~15 年),石杉碱甲含量极低 (约 0.02% 左右),野生资源十分有限 (我国为蛇足石杉主产区,实际商业可采量仅 200 吨/年),收集非常困难,无法满足日益增长的需求。

[0006] 为解决石杉碱甲药源问题,人们对蛇足石杉人工栽培技术进行了探索,但令人遗憾的是,其人工栽培技术一直无法突破。同时,许多机构开展了化学合成及组织细胞培养技术研究。石杉碱甲结构复杂,反应步骤多、反应条件苛刻、得率低、环境污染大,同分异构体因无法分离而导致合成物活性低,化学合成法现无法应用于商业化生产。蛇足石杉等石松属植物愈伤组织和细胞培养极其困难,自 1957 年开展石松属植物组织培养研究以来,研究进展极其缓慢,直到 2008 年 Ma 和 Gang 才实现了粗糙马尾杉 (*P. squarrosus*) 体外繁殖。

[0007] 利用植物内生真菌发酵生产植物天然药物成为一种可供选择的有效途径。如能采用内生真菌发酵生产石杉碱甲,不仅能有效地解决 HupA 的药物来源、降低药品价格,而且可有效地保护生态环境。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种蛇足石杉植物内生真菌,同时还提供一种采用该菌种发

醇生产高产石杉碱甲的方法,以缓解目前石杉碱甲临床用药供给严重不足的局面。

[0009] 本发明的技术方案如下:蛇足石杉植物内生真菌,经 18S rDNA 和微生物学鉴定为木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44,该菌已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏时间 2013 年 5 月 9 日,保藏号 CCTCC NO:M 2013198。

[0010] 本发明所属的菌株(*Trichoderma* sp.)L44,固体培养特征为:

采用 PDA 培养基培养 L44 菌株,菌落形态为:28℃培养 2-3 天菌落直径为 50mm,培养到 5-6 天可以铺满整个培养皿,菌落在生长 2-3 天颜色为白色,菌丝细丝状,5-6 天生长至整个平皿。菌落中间有细小的深绿色颗粒状,培养至 6-7 天,培养菌落上布满绿色颗粒状物,在 PDA 培养基上反面为乳白色,菌落边缘一圈略显淡黄色。

[0011] 菌丝形态:菌丝平滑,分枝,无色有隔菌丝。

[0012] 菌株(*Trichoderma* sp.)L44 的分生孢子梗粗,无色,直径为 10-15 μm;分生孢子顶囊近乎球形,直径为 50-65 μm,产孢结构单层或双层,分生孢子球形至近球形,直径为 2.5-5 μm。

[0013] 本发明以(*Trichoderma* sp.)L44 为发酵生产菌株,培养条件为:

以 PDA 为培养基,该培养基配方为:常规方法,土豆 200g,加水煮沸过滤得滤液,蔗糖 20g,加水定容到 1L, pH6.5。

[0014] 发酵条件:温度 28℃,接种量 10%,种龄 48h,转速 150r/min,发酵时间 7 天。发酵结束后对发酵液和菌丝进行化学提取,分离可得石杉碱甲及其类似物。

[0015] 本发明所述的蛇足石杉内生真菌(*Trichoderma* sp.)L44,基因登录号为 KF018088 ITS 碱基序列为:

```
GAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTC
GGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGT
ATACCCCTCGCGGGTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCA
ACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTG
GCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTAAAC
CACCCAATTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
```

本发明的效果:本发明为石杉碱甲的来源提供了一个新的微生物。

[0016] 本发明发明的微生物,有生长繁殖迅速,不受季节,气候等外界环境的限制,产量提升空间大等优势。能对药用植物蛇足石杉的野生资源进行有效的保护,避免过度的采挖。

附图说明

[0017] 图 1 为本发明所述木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44 的菌落形态。

[0018] 图 2 为本发明所述木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44 在 400 倍显微镜下的菌丝形态。

[0019] 图 3 和图 4 为本发明所述木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44 在电镜下的孢子形态。

[0020] 图 5 为本发明所述木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44 发酵提取物的薄层图。

[0021] 图 6 为本发明所述木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44 发酵提取物高效液相图谱,A 为石杉碱甲标准品色谱图。

图7为本发明所述木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44发酵提取物高效液相图谱, B为木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44发酵提取物色谱图。

具体实施方式

[0022] 以下结合附图实施例对本发明作进一步描述。

[0023] 步骤一:产石杉碱甲木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44的分离筛选

从浙江省杭州市,天目山采集野生蛇足石杉植株,带回实验室培养。

[0024] 选用新鲜,健康的植物蛇足石杉,去污粉洗净后,流水冲洗 4h。

[0025] 在超净工作台上按茎、叶、根分开,茎用 0.1% 升汞溶液消毒 15min,叶片和根在 0.1% 升汞溶液中浸泡 10min,取出材料,无菌水冲洗 6 遍。

[0026] 在无菌条件下,将根茎叶分别切成 0.5cm 的长度接种于 MS 培养基上。MS 培养基配方为:硝酸钾(KNO_3) 1900mg/L,硝酸铵(NH_4NO_3) 1650 mg/L,磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 170 mg/L,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 370 mg/L,氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 440 mg/L,碘化钾(KI) 0.83 mg/L,硼酸(H_3BO_3) 6.2 mg/L,硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.2 mg/L,硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6 mg/L,钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25 mg/L,硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025 mg/L,氯化钴(CoCl_2) 0.025 mg/L,乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA) 37.3 mg/L,硫酸铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8 mg/L,肌醇 100 mg/L,甘氨酸 2 mg/L,盐酸硫胺素 0.1 mg/L,盐酸吡哆醇 0.5 mg/L,烟酸 0.5 mg/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 7 mg/L, pH6.0。28℃,光照强度为 1600lux 培养 40d,将最后一次荡洗的水涂布在平板上作对照。培养 7d 以后,对照板上并没有菌生长,而千层塔的切口处有菌丝长出,用接种环将菌丝接种到新的 PDA 培养基上,平板划线分离,得到纯的菌株。

[0027] 步骤二:产石杉碱甲木霉菌 L44 菌丝体的培养

将木霉菌 L44 接种于马铃薯液体培养基中培养,其中 250ml 的锥形瓶装 100ml 的培养基,培养条件:温度 28℃,转速 150r/min,培养时间 48h。

[0028] 将种子液按 10% 的体积比接种到 250ml 的扩大培养基中,培养条件:温度 28℃,转速 150r/min,培养时间 7d,得到菌丝体。

[0029] 步骤三:菌丝体的收集和产物提取

过滤收集菌丝体,用蒸馏水清洗 3 次,挤干水,于 50℃ 真空干燥箱干燥至衡重,称重备用。

[0030] 称取菌丝体,用 100 倍的无水乙醇热回流提取有效成分,浓缩提取液到原体积的 1/10。发酵液浓缩后用 3 倍体积的无水乙醇醇沉,5000r/min 离心除去沉淀,将上清液浓缩到 1mL。

[0031] 实施四:菌丝体提取物中石杉碱甲的鉴定

采用 2cm×10cm 的硅胶板,展开剂为:氯仿/丙酮/异丙醇(4:6:4),显色剂:0.3% 高锰酸钾溶液,用毛细管直接将 0.4 μL 样品和石杉碱甲标准品点在距薄层板一端约 1cm 处,点完干燥后将板置于展开液中,待展开到离板另一端约 1cm 处取出层析板,自然干燥。待溶剂基本挥发后,用喷雾器喷上显色剂,吹干,记录斑点,测 Rf 值。

[0032] 结果显示,木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44 菌丝提取物样品中有石杉碱甲的类似物,迁移率与石杉碱甲标准品非常接近,菌丝 L44 中有石杉碱甲或类似物,见图 5。

[0033] 采用 DIONEX-3000 色谱系统, ODS-C18 反相柱(5 μ m, 4.6mm $\times$ 150mm), 色谱条件为: 流动相为甲醇:0.1 mol/L 醋酸铵(pH 6.0)=36:64; 流速 1mL/min, 进样量 20 μ L, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 308nm。称取石杉碱甲标准品 12.75mg, 于 25mL 的容量瓶中用流动相溶解置刻度。吸取石杉碱甲标准品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0mL 置于 10mL 容量瓶中稀释到刻度, 样品用流动相稀释成 5mL 的溶液, 膜过滤备用, 根据石杉碱甲标准品色谱峰的保留时间对样品定性, 以峰面积与对应浓度绘标准曲线, 并计算样品中石杉碱甲的含量。

[0034] 石杉碱甲标准品经过高效液相色谱检测, 不同浓度标准品都在保留时间 5.97min 有强的吸收峰, 菌株木霉菌 (*Trichoderma* sp.) L44 的菌丝体提取物在保留时间 5.960min, 有相似的吸收峰, 与其他杂质成良好的分离, 可见木霉菌 (*Trichoderma* sp.) L44 能产石杉碱甲, 并且石杉碱甲在菌丝体中, 应为胞内产物。根据标准曲线的回归方程, 算的木霉菌 (*Trichoderma* sp.) L44 样品中石杉碱甲含量为 7.43 μ g/mL, 共为 5mL, 样品中石杉碱甲量为 37.15 μ g, 菌丝体的重量为 0.387g, 所以每克干菌体的石杉碱甲的含量 95.99 μ g, 见图 6 和图 7。

[0035] 步骤五: 菌株的形态学鉴定

将内生真菌菌株 L44 接种于 PDA 培养基中, 对真菌菌落的形态特征进行观察, 见图 1。

[0036] 菌丝体显微观察: 将灭菌的滤纸于无菌水中湿润, 置于培养皿中, 放上灭菌载玻片上, 在载玻片上滴上一滴 PDA 培养基, 将真菌木霉菌 L44 接种到培养基上, 盖上盖玻片培养, 培养后对菌株的菌丝、孢子囊等微观形态进行观察记录, 见图 2、图 3, 最后, 比照《真菌鉴定手册》。

[0037] 菌株的分子鉴定: 将培养在 PDA 上的内生真菌菌丝刮下, 置于试管中, 加 500 μ L CTAB 提取缓冲液, 玻棒研磨, 65 $^{\circ}$ C 保温 1h, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清, 饱和酚和氯仿异戊醇分别抽提后, 用无水乙醇沉淀, 12000 r/min 离心, 倒出乙醇溶液, 沉淀晾干后, 溶于 50 μ L 纯水中备用。

[0038] PCR 扩增菌株 ITS 区段 根据已知真菌的保守序列设计特异性引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCC-TCCGCTTATTGATATGC-3'), 以真菌基因组 DNA 为模板, 扩增菌株 ITS 区段。PCR 反应体系为: PCR 体系建立(25 μ L): Template (基因组) 1 μ L, 引物各 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, dNTP (各 10 mmol/L) 0.5 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, Taq (5U/ μ L) 0.2 μ L 加水至 25 μ L。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5min; 循环 94 $^{\circ}$ C 30S, 55 $^{\circ}$ C 35S, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环, 延伸 8min。PCR 产物用 1% 凝胶电泳进行检测, 送交上海生工生物工程技术有限公司测序, 所得 ITS 序列如下: GAACCTGCGGAGGGATC ATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTG CGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTA TAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTC TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGG TCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCC TGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGA CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

序列提交到 GenBank 核酸序列数据库并得到登录号 KF018088。

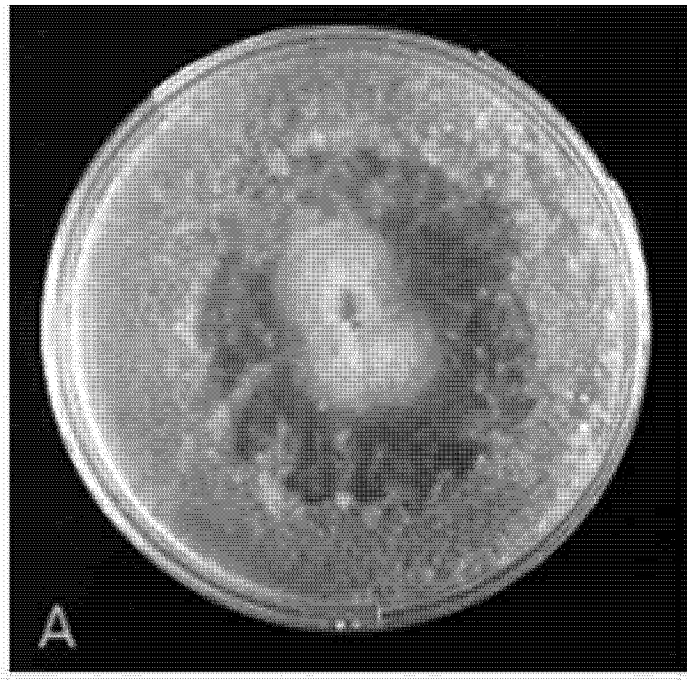


图 1



图 2

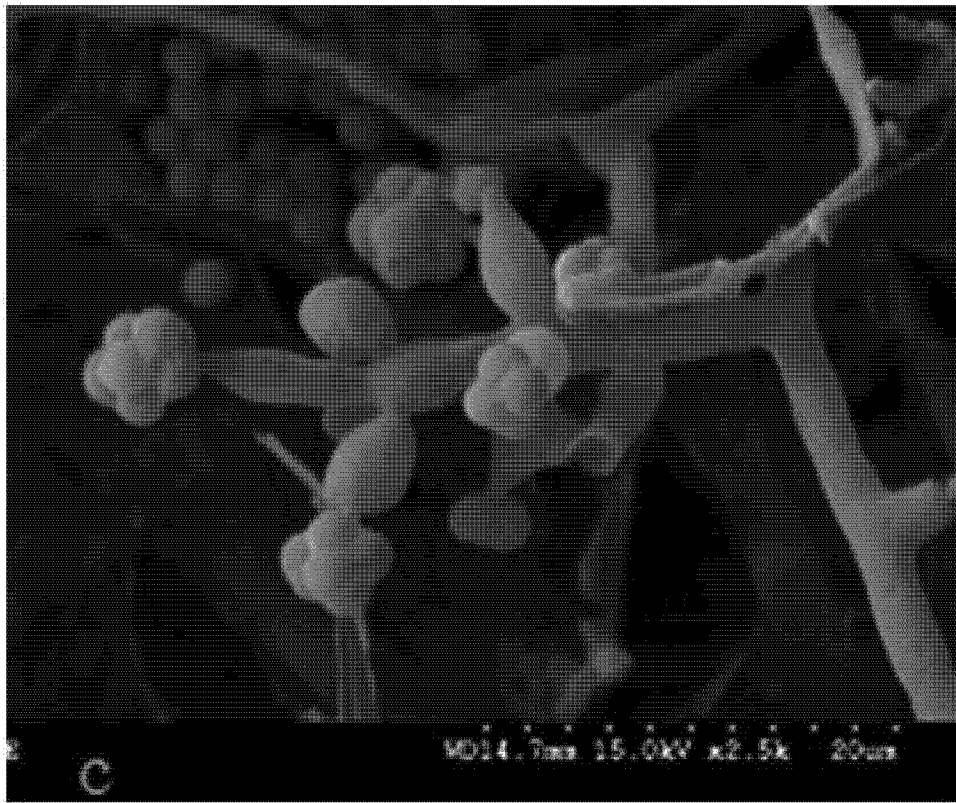


图 3



图 4

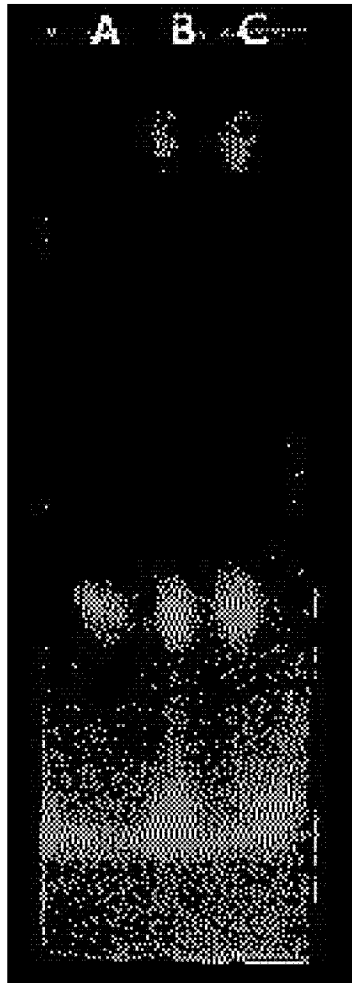


图 5

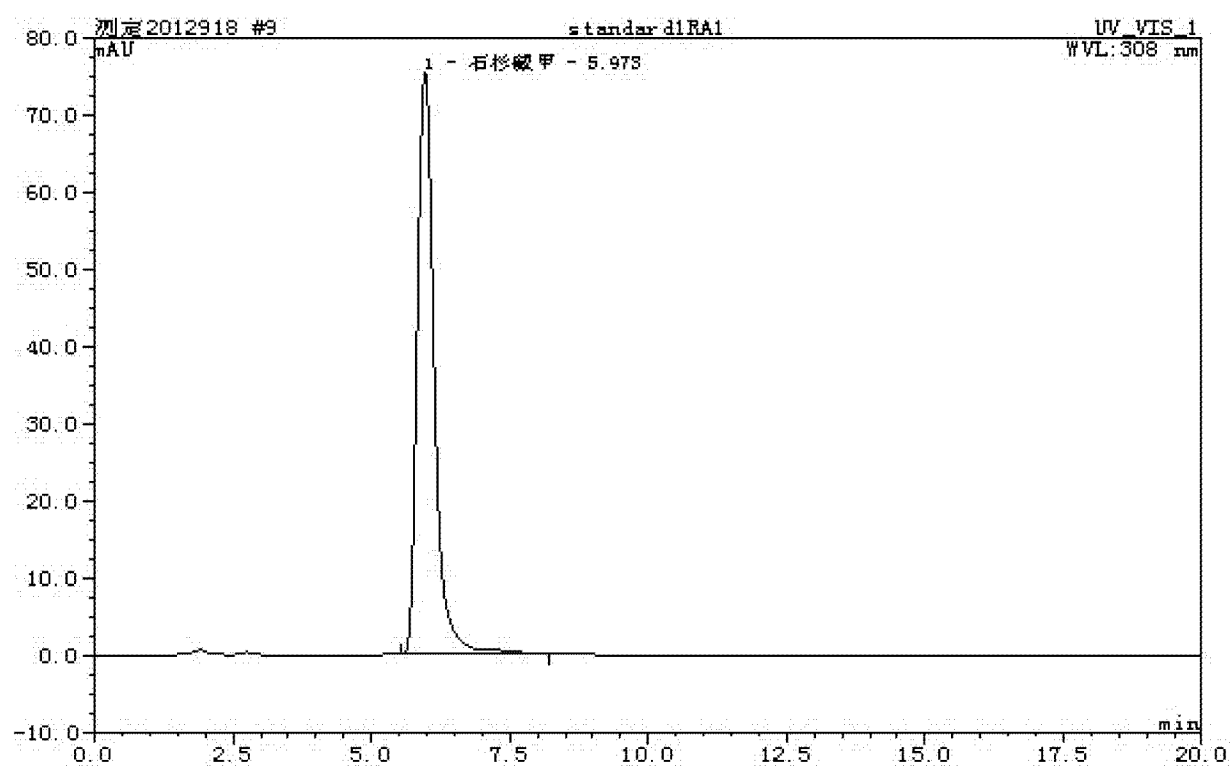


图 6

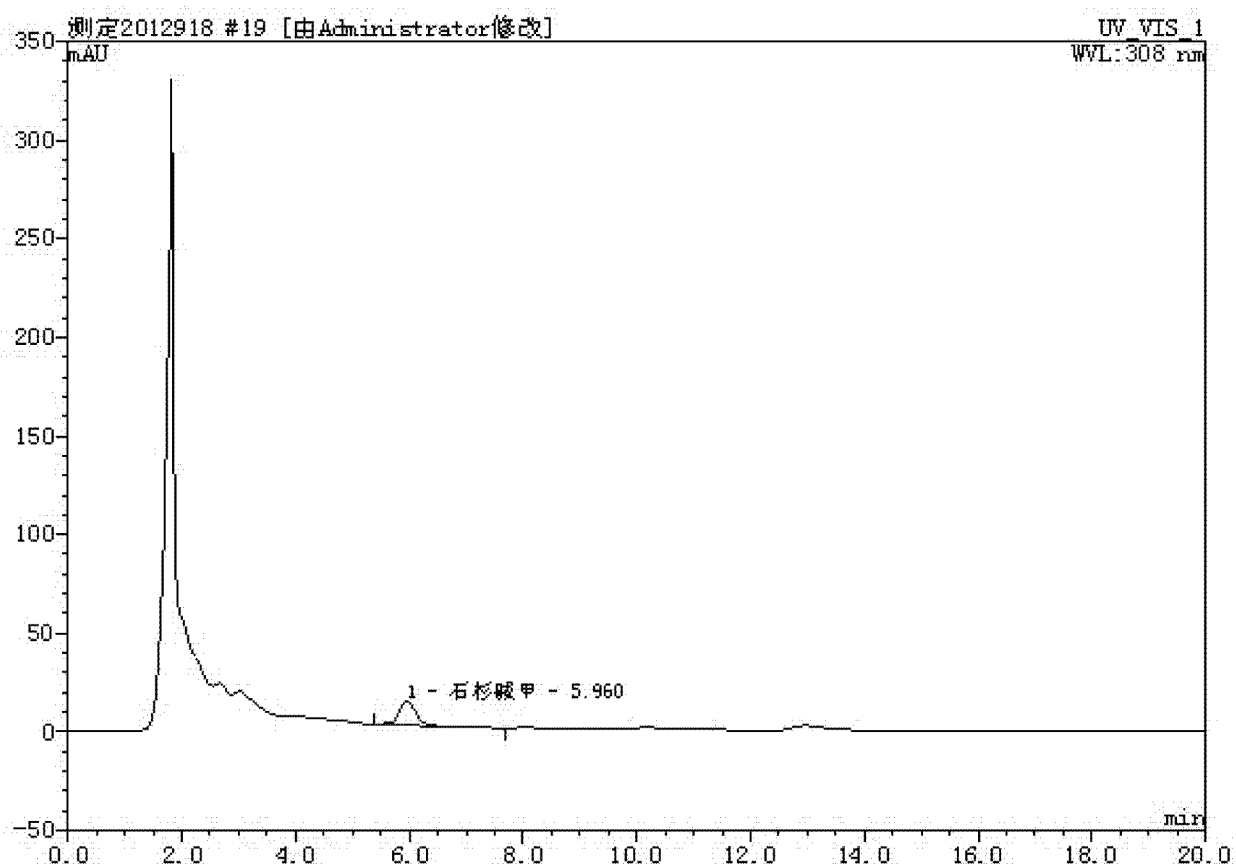


图 7