

· 药材与资源 ·

吉林双阳梅花鹿核蛋白体蛋白 L 27 cDNA 的克隆

魏征人¹, 陈 越¹, 杨 煜¹, 于永利^{1*}

(吉林大学基础医学院 免疫学教研室, 吉林 长春 130021)

摘 要: 目的 为了开发我国珍稀动物——吉林双阳梅花鹿的基因资源, 在分子水平上揭示鹿药材的药理作用。方法 构建了梅花鹿脾脏细胞 cDNA 质粒文库, 克隆了一些看家基因并进行了序列分析。结果 其中的一个序列在核酸及推导的氨基酸序列水平上与编码人、犬、大鼠、小鼠核蛋白体蛋白 L 27 (ribosomal protein L 27) cDNA 序列和对应的氨基酸序列高度同源, 并具有完整的开放阅读框架(ORF)。结论 发现了双阳梅花鹿核蛋白体蛋白 L 27 全长 cDNA 序列, 此序列已经在 Genbank 中登录, 登录号为: AF373231。

关键词: 双阳梅花鹿; 核蛋白体蛋白 L 27; 序列分析

中图分类号: R 282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0075-05

Cloning of ribosomal protein L 27 cDNA from Jilin Shuangyang sika deer

WEI Zheng-ren¹, CHEN Yue¹, YANG Yu¹, YU Yong-li¹

(Department of Immunology, Basic Medical School of Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: **Object** To develop the gene resources of Jilin Shuangyang sika deer, a rare animal in China and reveal the pharmacological functions of deer medicinal material on the molecular level. **Methods** A cDNA plasmid library of spleen cells derived from Shuangyang sika deer was set up. Some housekeeping genes were cloned and analyzed. **Results** One of the cDNA sequences and its deduced amino acid sequence in deer share high homology with a group of cDNA sequences encoding ribosomal protein L 27 in human, rat, Canis and mouse and their corresponding amino acid sequence respectively. It has the completed open reading frame as well. **Conclusion** A novel full-length cDNA encoding Shuangyang sika deer ribosomal protein L 27 is discovered. This sequence has been deposited in Genbank under accession number AF373231.

Key words: Shuangyang sika deer; ribosomal protein L 27; sequence analysis

梅花鹿, 别名花鹿, 为哺乳纲偶蹄目鹿科鹿属, 学名为 *Cervus nippon* Temminck, 英文名叫 sika deer。在我国主要分布在东北、华南、四川等地。这些分布地区都具有良好的自然条件, 特别是吉林省双阳地区气候适宜, 多山林, 河网密集, 地质肥沃, 饲料充足, 已有 300 多年的养鹿历史, 是国务院命名的唯一“中国梅花鹿之乡”。在 1990 年, “双阳梅花鹿育种”项目获国家科技进步一等奖。在品种和饲养规模上要优于其他地区。作为传统珍贵的中药材, 鹿茸、鹿血、鹿鞭等具有滋补强壮、延缓衰老、加速组织溃疡愈合等多种药理作用^[1]。为在分子水平上揭示鹿药材的药理作用, 自 20 世纪 90 年代起, 国外的研究学者开展了分布在其各自地域相关鹿种的基因研究工作, 其中具代表性的有: Moscarella 等发现了分布

在澳洲的白尾鹿(white tailed deer)线粒体基因组中 OV 124 控制区序列; Kuehn 等发现了美洲红鹿的微卫星 DNA^[2]; Ellis 等克隆了美洲马鹿的 MHC I 类抗原分子的 mRNA。但是针对分布在我国境内各个鹿种 cDNA 克隆的研究工作国内外尚未见报道。不同物种的基因测序工作既能完善和深化人们对生命体的理解, 又能带来巨大的社会效益和经济利益, 所以各国家对基因资源的争夺已经到了白热化的地步。为了保护我国珍稀动物梅花鹿的基因资源, 我们实验室自 1998 年始首次对双阳梅花鹿的基因信息展开了研究, 构建了多种鹿组织细胞的 cDNA 文库, 对其库容进行了大规模的测序工作, 获得了一些重要的 cDNA 克隆, 其中有梅花鹿核蛋白体蛋白 L 27 全长 cDNA 序列。

* 收稿日期: 2003-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助(3070705)

作者简介: 魏征人(1970—), 男, 吉林省长春市人, 讲师, 博士, 研究方向为动物基因组学的工作。E-mail: weizhengren@hotmail.com

* 通讯作者 E-mail: ylyu@mail.jlu.edu.cn

1 材料

1.1 实验标本: 吉林双阳梅花鹿脾脏细胞来自吉林双阳梅花鹿鹿乡生产基地饲养的成年健康雄鹿。

1.2 质粒和菌种: 质粒 PSPORT I 购自美国 Gibco/Brl 公司, DH5 α 宿主菌为本实验室保存。

1.3 试剂盒、酶和常用试剂: 用于质粒 cDNA 文库建立的试剂盒 Superscript[®] Plasmid System 购自美国 Gibco/Brl 公司; 用于 mRNA 分离纯化试剂盒 PolyA Tract[®] 购自美国 Promega 公司; Not I, Sal I 均购自日本 Takara 公司; 用于总 RNA 提取的 Trizol 试剂购自美国 Gibco/Brl 公司。

2 方法

2.1 鹿脾脏细胞中总 RNA 的提取: 按照美国 Gibco/Brl 公司的 Trizol 试剂说明书操作。取鹿脾脏细胞 2 g, 完全磨碎后加入 20 mL Trizol 细胞裂解液, 然后加入 5 mL 氯仿, 12 000 $\times g$ 离心 15 min; 转移上层水相, 在水相中加入 6 mL 异丙醇, 12 000 $\times g$ 离心 15 min, 加入 75% 乙醇 20 mL 洗涤沉淀, 弃上清, 充分干燥后用 500 μ L 0.1% DEPC 水溶解沉淀。用紫外分光光度计检测 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 。

2.2 mRNA 的分离纯化: 按照美国 Promega 公司 PolyA Tract[®] 试剂盒使用说明书操作。先用 0.5 $\times$ SSC 溶液(每次 0.3 mL)洗涤磁珠 3 次。将 2.1 步骤中获得的总 RNA 500 μ L, 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 然后加入 3 μ L Oligo dT 和 13 μ L 20 $\times$ SSC 溶液, 在室温条件下孵育, 直到冷却为止。反应液加到洗涤过的磁珠中, 在室温条件下孵育 10 min, 再用 0.1 $\times$ SSC (每次 0.3 mL)洗涤磁珠 4 次。最后加入 0.25 mL DEPC 水洗脱磁珠上的 mRNA。

2.3 cDNA 双链的合成及与载体的连接: 以 6 μ L mRNA 为模板, 加入 10 mmol/L dNTP Mix 1 μ L, 再加入 Superscript II RT 4 μ L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 后, 放置冰上终止反应从而合成 cDNA 的第一链; 在第一链反应液中加入 *E. coli* RNase H 1 μ L 和 *E. coli* DNA polymerase I 1 μ L, 16 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 加入 2 μ L T4 DNA polymerase, 然后 16 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 将反应液置于冰上, 加入 10 μ L 0.5 mmol/L EDTA 终止反应。将合成的 50 μ L 双链 cDNA 连入 2 μ L PSPORT 质粒中。cDNA 的第一链、第二链的合成量、双链合成后小于 400 bp 小片段的去除及与载体连接前 cDNA 的定量用同位素示踪的方法跟踪检测。以上过程按照 Gibco/Brl 公司的质粒文库建立试剂盒 Superscript[®] Plasmid System 使用说明书操作。

2.4 重组质粒的电转化: 制备 DH5 α 感受态细胞后, 将

0.2 cm 电转杯及支架放在冰上预冷, 在电转杯中加入 40 μ L 感受态细胞, 再加入 2 μ L 重组质粒(cDNA-PSPORT)在 2 500 V, 200 Ω , 25 μ F, 4 ms 条件下电转。然后置于冰上, 加 SOC 培养基至 1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 培育 1 h。分别以 1, 10, 100 μ L 转化菌液铺 LB 平板(含 100 μ g/mL Amp), 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜^[3]。

2.5 质粒纯化及酶切电泳对插入片段大小的鉴定: 挑选白色菌落若干个, 分别接种于含 5 mL LB, Amp 100 μ g/mL 试管中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 140 r/min 摇动过夜。次日, 每管取 1.5 mL 菌液用北京鼎国生物技术公司的质粒快速提取试剂盒抽提质粒。之后用 Not I, Sal I 双酶切, 取酶切产物做 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察电泳结果, 将释放出 cDNA 片段的质粒送检上海基康基因公司进行测序, 测序仪为美国 AB 公司 DNA Sequencer 3100。

3 结果

3.1 鹿脾脏细胞总 RNA 的提取: 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 甲醛变性电泳后清晰可见在 18S, 28S 处各有 rRNA 两条带, 且 28S 大于 18S, 整个泳道未见 RNA 降解现象。紫外测定表明 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 2.0$, 说明抽提的总 RNA 完整且纯度符合后续逆转录的要求。

3.2 cDNA 第一链的合成定量: 经计算, cDNA 第一链合成量为 3.19 μ g, 符合构建文库的要求。

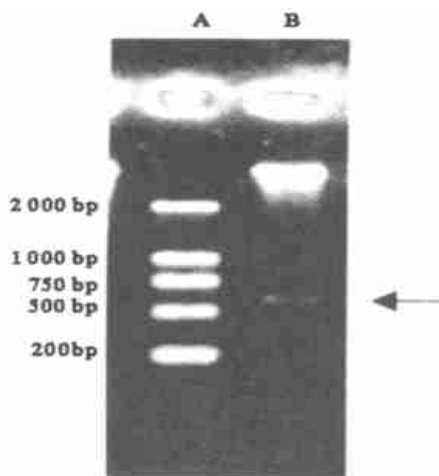
3.3 与载体连接前 cDNA 溶液浓度定量: 用分子筛色谱去除 cDNA 小片段和多余的衔接子接头后, 对大于 400 bp cDNA 溶液进行定量, 浓度约为 12.5 ng/ μ L, 符合与载体 PSPORT I 连接要求(与 PSPORT I 载体连接要求 cDNA 溶液浓度 ≥ 10 ng/ μ L)。

3.4 库容克隆数的计算: cDNA 与 PSPORT 载体连接之后, 电转入大肠杆菌 DH5 α , 从 1 000 μ L 转化的菌液中取 100 μ L, 用含抗生素的平板筛选阳性重组子, 得到 830 个阳性克隆, 经计算鹿脾脏 cDNA 质粒文库的库容总量为每毫升 8 300 个克隆。

3.5 质粒文库某一 cDNA 序列的获得: 从抗生素平板中随机挑选的一白色菌落, 接种到液体培养基中培养扩增, 提取重组质粒, 得到质粒文库其中的一个 cDNA 序列, 用 Pst I 和 Not I 双酶酶切, 从中释放出一大小为 600 bp 左右的 cDNA 片段, 见重组质粒酶切电泳图 1。送检质粒测序, 测序结果见图 2。

3.6 序列分析

3.6.1 核酸水平上的比较和分析: 利用美国生物信息中心的 Genbank 中的核酸数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)和在线 Blast 系列软件比较发现: 质



泳道 A: DL-2000 标识 泳道 B: Not I, Sal I 酶切质粒 PSORT 后释放的 cDNA 片段

Lane A: DE-2000 marker Lane B: released cDNA fragment from recombinant PSORT by Not I and Sal I digesting

图 1 鹿 cDNA 文库中其中 1 个重组质粒酶切电泳分析

Fig 1 Electrophoretic analysis of one certain recombinant plasmids derived from cDNA library of sika deer

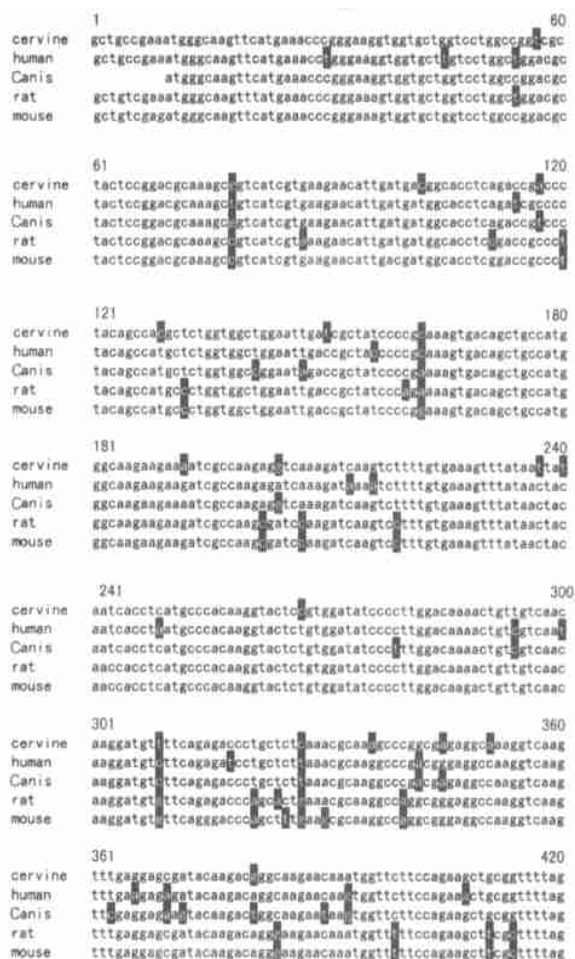
ATG GGC AAG TTC ATG AAA CCG GAG AAG GTG GTG CTG GTC CTG GGC GGT CAG TAC TCG
M G K F M K P G K V V L V L A G R Y S
GGA CAG AAA GCG GTC ATC GTG AAG AAC ATT GAT GAG GGC ACC TGA GAG CGA CCG TAC
G R K A V I V K N I D G T S D R P Y
AGC CAC GCT CTG GTG GCT GGA ATT GAT CAG TAT CCG CAG AAA GTG ACA GCT GCC ATG
S H A L V A G I D R Y P R K V T A A M
GGC AAG AAG AAA ATG GGC AAG AGG TCA AAG ATC AAG TGT TTT GTG AAA GTT TAT AAT
G K K K I A K R S K I K S F V K V Y N
TAT AAT CAG CTC ATG CCG ACA AGG TAC TCG GTG GAT ATC CCG TTG GAG AAA ACT GTT
Y N H L M P T R Y S V D I P L D K T V
GTC AAG AAG GAT GTT TTC AGA GAG GCT GCT CTC AAA CAG AAA GGC CGA GAG GCA
V N K D V F R D P A L K R K A R R E A
AAG GTC AAG TTT GAG GAG CGA TAC AAG ACG GGC AAG AAC AAA TGG TTC TTC CAG AAG
K V K F E E R Y K T G K N K W F F Q K
CTG CCG TTT TAG
L R F *

图 2 鹿核蛋白体蛋白 L 27 全长 cDNA 的测序结果

Fig 2 Sequencing data of full-length cDNA sequence encoding cervine ribosomal protein L 27

粒文库 EST-3 与人核蛋白体蛋白 L 27 (ribosomal protein L 27 78—488 bp) 有 92% 的同源性; 与犬核蛋白体蛋白 L 27 (23—433 bp) 有 93% 的同源性; 与小鼠核蛋白体蛋白 L 27 (7—426 bp) 有 90% 的同源性; 与小鼠核蛋白体蛋白 L 27 有 90% 的同源性。比较结果见图 3, 进一步在 Genbank 中查找人、大鼠、小鼠、犬核蛋白体蛋白 L 27 mRNA 序列发现: 它们的 mRNA 编码区均为 411 bp。

3.6.2 氨基酸水平上的比较和分析: 将完整的开放阅读框架输入 Swissprot 数据库, 用 Blastp 蛋白质比较发现: 在氨基酸水平上质粒文库 EST-3 序列与人



白色背景中为保守序列

White regions show s blocking domain

图 3 鹿核蛋白体蛋白 L 27 全长 cDNA 序列与人、犬、大鼠、小鼠在核酸水平上的比较

Fig 3 Alignment of full-length cDNA sequence encoding cervine ribosomal protein L 27 in human, Canis, rat, and mouse

大鼠、小鼠 100% 的一致, 与犬的核蛋白体蛋白 L 27 有 99.5% 的同源性。蛋白水平的总体比较见图 4。

3.6.3 应用 Prosite 数据库对特征结构域的分析: 其中具代表意义的有: 1) EGF-样结构域 CgCaaagc-GgtC (61-72) CtCagaccGacC (99-110); 2) 整合素 beta 链结构域 CaGa . GaCcCtgCtC (303-316); 3) 过敏毒素结合结构域 CCacGctctggtgGCTggaatt . . GatCgctatccCC (117-151); 4) p38 蛋白激酶长链结构域 CtaCtcGgaCG . . GTtcTT; 5) 一个富含丙氨酸、半胱氨酸大约 150 bp 的结构域和 2 个磷酸化位点。

4 讨论

cDNA 文库是携带源于某一组织或细胞的 cDNA 的质粒或噬菌体克隆群, 其常被用于新表达基

	1	50
cervine	MGKFMKPGKVVVLVLAGRYSGRKAVIVKNIDGGTSORPYSHALVAGIDRYP	
Canis	MGKFMKPGKVVVLVLAGRYSGRKAVIVKNIDGGTSORPYSHALVAGIDRYP	
human	MGKFMKPGKVVVLVLAGRYSGRKAVIVKNIDGGTSORPYSHALVAGIDRYP	
rat	MGKFMKPGKVVVLVLAGRYSGRKAVIVKNIDGGTSORPYSHALVAGIDRYP	
mouse	MGKFMKPGKVVVLVLAGRYSGRKAVIVKNIDGGTSORPYSHALVAGIDRYP	
	51	100
cervine	RKVTAAAMGKKKIAKRSKI KSFVKVYNNHLMPTRYSDIPLDKTVVKNKV	
Canis	RKVTAAAMGKKKIAKRSKI KSFVKVYNNHLMPTRYSDIPLDKTVVKNKV	
human	RKVTAAAMGKKKIAKRSKI KSFVKVYNNHLMPTRYSDIPLDKTVVKNKV	
rat	RKVTAAAMGKKKIAKRSKI KSFVKVYNNHLMPTRYSDIPLDKTVVKNKV	
mouse	RKVTAAAMGKKKIAKRSKI KSFVKVYNNHLMPTRYSDIPLDKTVVKNKV	
	101	138
cervine	FRDPALKRKARREAKVKFEEYKTKGNKWFQKLR	
Canis	FRDPALKRKARREAKVKFEEYKTKGNKWFQKLR	
human	FRDPALKRKARREAKVKFEEYKTKGNKWFQKLR	
rat	FRDPALKRKARREAKVKFEEYKTKGNKWFQKLR	
mouse	FRDPALKRKARREAKVKFEEYKTKGNKWFQKLR	

白色背景的为保守序列

white background shows blocking domain

图 4 鹿核蛋白体蛋白 L 27 推导的氨基酸序列
与人、犬、大鼠、小鼠的比较

Fig 4 Alignment of deduced amino sequence
of cervine ribosomal protein L 27
in human, Canis, rat, and mouse

因的发现、基因的结构和功能方面的研究。在实验中,采用了美国 Gibco/Brl 公司的 Superscript[®] Plasmid System 质粒文库构建试剂盒建立了鹿脾脏细胞的 cDNA 文库。这种质粒文库的主要特点是:在第一链的合成引物 Oligo dT 的侧翼连有携带 Not I 酶切位点的衔接子接头,因而在合成第一链之后 mRNA-cDNA 杂交双链的 poly A 尾便携带 Not I 酶切位点的衔接子。在合成第二链之后,通过平端连接在双链 cDNA 的两端附加上携带有 Sal I 酶切位点的衔接子,再通过 Not I 的酶切作用将 poly A 尾端的 Sal I 衔接子切下,从而使得双链 cDNA 的两端载有 Not I 和 Sal I 酶切位点的衔接子,这为定向克隆到带有 Not I 和 Sal I 酶切位点质粒载体 pSPORT 1 中创造了条件。除此之外,Superscript[™] 质粒文库建立系统还整合有下述一些优点:质粒纯化过程简便,便于大规模的测序;pSPORT 1 载体中的酶切位点多,提供多种选择机会,利于次级克隆到其他载体。目前我们从质粒 cDNA 文库所获取的 cDNA 中,绝大部分是编码重要因子、酶类蛋白的基因,与细胞的生长、代谢调节息息相关,这些基因呈高表达、多拷贝状态,是生物体在维持其基本生理状态所不可缺少的,是重要的看家基因 (housekeeping gene)。

根据 Genbank nr 数据库分析显示:在实验中所获得的是双阳梅花鹿核蛋白体蛋白 L 27 全长 cDNA 序列,有完整的开放阅读框架 (ORF),是一个全编

码的 cDNA 序列。将其命名为 Shuangyang cervine ribosomal protein L 27, mRNA, complete cds, 在 Genbank 中登录,登录号为:AF373231。通过 Blast 在线分析软件比较发现,鹿核蛋白体蛋白 L 27 在氨基酸水平上与人、小鼠、大鼠的核蛋白体蛋白 L 27 同源性为 100%,说明核蛋白体蛋白 L 27 在不同种属的哺乳动物之间呈现极度保守状态。UniGene 在线数据库显示:真核细胞的核蛋白体蛋白 L 27 位于 17 号染色体 q21.1-q21.2 上,组织表达谱非常广泛,几乎所有的真核细胞和原核细胞中都有表达,是重要的看家基因。药物实验发现:在镁离子存在的特定条件下,核蛋白体蛋白 L 27 是核糖体肽类转移酶活性中心的一部分,参与核糖体 50S 亚单位的组装,并能与大环内酯类药物结合,因此,大环内酯类药物可以通过与核蛋白体蛋白 L 27 相结合而极大地影响核糖体 50S 亚单位的组装和活性^[4]。Lin 等人还发现人核蛋白体蛋白 L 27 mRNA 的表达减少和 k562 细胞系的细胞凋亡有关。而肝癌、肺癌组织中核蛋白体蛋白 L 27 mRNA 超量表达^[5]。进一步的生物信息学分析和预测表明:鹿核蛋白体蛋白 L 27 中存在的 2 个磷酸化位点以及 p38 蛋白激酶长链结构域预测可能和细胞 JNK 传导通路形成联系,进而提示 L 27 及其基因表达与调控可能与细胞的凋亡和促分化有关;结构预测显示, L 27 富含丙氨酸、半胱氨酸的这段区域可以和氨甲蝶呤、环孢素等抗肿瘤药物结合。提示 L 27 做为筛选底物可对抗肿瘤药物进行筛选;由于 L 27 可以特异地结合大环内酯类抗生素,提示其可做为筛选底物对抗生素类药物进行筛选^[6]。

为了更加深入地研究核蛋白体蛋白 L 27 的生物学活性和证实生物信息的预测,我们下一步将其次级克隆到某一表达载体中进行表达,得到相应的重组蛋白后,用 pull down 的方法找到 L 27 作用的相关蛋白,以确实其在胞浆内的信号传导定位;并进行 L 27 基因调控的研究,找到肿瘤细胞超高表达的基因调控机制和反式作用因子; L 27 还可作为底物进行抗肿瘤药物、抗生素类药物的筛选研究和机理研究。有些国家一直在觊觎着我国珍稀动物的基因资源,为拥有更多的属于自己国家的基因专利和自主的知识产权,加强我国在国际竞争中的地位,实验室目前仍在从事双阳梅花鹿基因的测序工作,目标是开发出更多的鹿基因工程类产品,造福祖国和人民。

References:

- [1] Wang B X. *The Studies of Deer Pilose* (鹿茸的研究) [M]. Changchun: Jilin Press, 1997.
- [2] Kuehn R, Schroeder W, Pirchner F, et al. *C. elaphus* microsatellite sequence [J]. *Conserv Genet*, 2003, 4(2): 157-166.
- [3] Sambrook J. *Molecular Cloning* [M]. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor, 1998.
- [4] Tejedor F, Ballesta J P. Components of the macrolide binding site on the ribosome [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 1985, 16 (Suppl A): 5.
- [5] Lin C H, Palma J F, Solomon W B, et al. Phorbol ester induction of differentiation and apoptosis in the K562 cell line is accompanied by marked decreases in the stability of globin mRNAs and decreases in the steady state level of mRNAs encoding for ribosomal proteins L35, L31, L27, and L21 [J]. *Cell Mol Biol Res*, 1994, 40(1): 13-26.
- [6] Maguire B A, Manuilov A V, Zimmernann R A, et al. Differential effects of replacing *Escherichia coli* ribosomal protein L27 with its homology from *Aquifex aeolicus* [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(22): 6565-6572.

一株产长春新碱内生真菌的初步研究

杨显志¹, 张玲琪^{2*}, 郭波², 郭仕平^{2*}

(1. 电子科技大学物理电子学院, 四川 成都 610054; 2. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091)

摘要:目的 通过长春花叶内生真菌的分离, 筛选产生长春新碱的菌株。方法 从长春花叶中分离内生真菌, 对其发酵提取物进行 TLC 和 HPLC 分析。结果 从长春花叶中分离筛选到一株无孢菌群菌株: 97CY₃。它能产生长春新碱, HPLC 测定其长春新碱含量约为 0.205 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。结论 长春花内生真菌中, 有的菌株可产生与宿主所产相同的抗癌物质长春新碱。

关键词: 长春花; 无孢菌群; 内生真菌; 长春新碱

中图分类号: R282.15

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0079-03

Preliminary study of a vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*

YANG Xian-zhi¹, ZHANG Ling-qi^{2*}, GUO Bo², GUO Shiping²

(1. College of Physical Electronics, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China; 2. School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: **Object** To select the endophytic fungi which produce vincristine by isolating fungi from the leaves of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Methods** The endophytic fungi were isolated from the leaves of *C. roseus* and the zymotic extracts were analyzed by TLC and HPLC. **Results** An endophytic fungus which is *Mycelia sterilia* 97CY₃ can produce vincristine. The content of vincristine in the fungus was determined as 0.205 $\mu\text{g}/\text{L}$ by HPLC. **Conclusion** Some endophytic fungi isolated from *C. roseus* can produce the anticancer substance vincristine which is the same as that of host plant producing.

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; *Mycelia sterilia*; endophytic fungi; vincristine

长春新碱(vincristine, VCR)具有抗肿瘤活性, 尤其对白血病具有显著疗效, 通过干扰癌细胞纺锤体形成, 使细胞有丝分裂停止于中期, 从而阻止癌细胞的扩散^[1]。目前长春新碱主要是从夹竹桃科(Apocynaceae)植物长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中分离提取。但该生物碱在植物体内含量极低, 仅为百万分之几, 分离提取困难, 且植物生长缓慢, 资源短缺, 故限制了该药的进一步开发利用。因此, 寻找长春新碱新的药源, 已成为摆在人类

面前的一项重大研究课题。近年来国内外学者主要从 3 个方面来探索这类课题, 即化学合成法^[2,3]、植物细胞及组织培养法^[4]和微生物发酵法^[5-8]。目前人们普遍认为微生物发酵法是一种最具潜力的方法。本实验即采用微生物发酵方法, 在以前工作基础^[7,8]上, 首次报道从长春花植株的叶中分离产长春新碱内生真菌菌株的结果。

1 材料和方法

1.1 材料: 新鲜长春花(2~3年生)采自云南大理

* 收稿日期: 2003-05-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860005)

作者简介: 杨显志(1968—), 男, 四川安岳人, 硕士, 讲师, 曾在中学任教多年, 2002年7月毕业于云南大学生命科学学院微生物学专业, 主要从事微生物次生活性代谢产物及生物电磁学方面的研究, 正式发表论文6篇。

Tel: (028) 83201064 E-mail: yangbos158@sohu.com

* 通讯作者 Tel: (0871) 5033159 E-mail: yim401@public.yn.cn