

苹果汁中棒曲霉素主要产生菌的 ITS 序列分析鉴定^{*}

苏青峰, 岳田利, 袁亚红, 高振鹏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 从浓缩苹果汁生产原料中分离出多种棒曲霉素产生菌, 形态学初步鉴定表明其均为青霉属和曲霉属真菌。为确定其分类地位, 又用 ITS-rDNA 测序鉴定进行了验证。将 ITS-rDNA 提取后进行 PCR 扩增, 测序后提交到 European Molecular Biology Laboratory (EMBL) 核酸数据库, 通过 Blast 程序, 将 ITS-rDNA 序列与 Genbank 中的核酸序列进行对照, 结果确定其确为青霉属与曲霉属菌株。

[关键词] 棒曲霉素; 扩张青霉; ITS-rDNA; PCR; 浓缩苹果汁

[中图分类号] Q93-331; TS201.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)07-0131-04

棒曲霉素(Patulin)又称张青霉素, 化学名称为 4-羟基-4-氢-呋喃(3, 2-C)吡喃-2(6H)-酮(4-Hydroxy-4H-furo[3, 2-C]pyran-2(6H)-one), 是某些真菌的有毒内酯代谢产物。已发现能产生棒曲霉素的菌有青霉属、曲霉属、裸囊菌属及丝衣霉属^[1, 2]。

1961年, Dickens 和 Jones 发现大白鼠皮下注射棒曲霉素后, 注射部位会诱发肿瘤^[3]。之后, 又相继发现其具有致畸性和致突变性。因此, 棒曲霉素在各类食品中的存在, 引起了各国卫生、毒理、医学、食品生产和安全等各方面专家学者的极大关注。WHO (World Health Organization) 将棒曲霉素污染列为严重影响人们身体健康的有害物质之一, 并规定其在苹果汁中的 MPC (Maximum Permitted Concentration) 为 50 $\mu\text{g/L}$ 。

传统的菌物分类以形态特征和生理生化指标为分类基础, 但大部分菌物的种类多、分布广、形态特征复杂, 且少数形态特征和生理生化指标会随着环境的变化而变化, 因此, 常引起分类系统的不稳定或意见分歧。近年来, 随着分子生物学的发展, 分子生物学技术在真菌学研究中得到了广泛而深入的应用, 利用分子生物学方法鉴定未知菌具有快速、简便和高特异性的优点。真菌基因组中编码核糖体的基因包括 25S rDNA, 5S rDNA, 18S rDNA 和 5.8S rDNA 4种。位于 25S rDNA 3'端与 18S rDNA 5'端

之间的序列称为核糖体内转录间隔区 (Internal transcribed spacers, ITS)。真菌的 4 种核糖体基因及间隔区有不同的进化程度, 有的序列比较保守, 有的序列进化较快, 因此可以根据其序列, 将真菌鉴定到属、种、亚种、变种, 甚至菌株的水平。用于扩增 rDNA 不同区域的保守引物已设计成功^[4], 并已广泛用于菌物系统进化的研究。本研究应用 ITS-rDNA 序列分析方法, 鉴定了陕西地区浓缩苹果汁生产原料主产地最常见的棒曲霉素的主要产生菌, 以期从源头上控制棒曲霉素的产生, 为提高果汁品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从浓缩苹果汁生产原料的主产地——陕西礼泉、乾县、白水、眉县采集富士、秦冠、澳洲青苹等苹果品种, 并从其腐烂果中分离出多种真菌进行棒曲霉素产毒试验。PAT01~PAT15 经 HPLC 检测^[5]均为棒曲霉素主要产生菌, 对照《真菌鉴定手册》^[6]初步鉴定其为青霉属和曲霉属真菌, 为进一步确定, 需进行分子生物学鉴定。供试菌编号、采集原料品种和采样地点详见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 引物合成 供试菌的引物合成方法参照文

^{*} [收稿日期] 2005-03-29

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2001BA51A15); 科技部西部专项(2001BA901A19)

[作者简介] 苏青峰(1979-), 男, 陕西延安人, 在读硕士, 主要从事食品生物技术研究。

[通讯作者] 岳田利(1965-), 男, 陕西凤翔人, 教授, 主要从事食品生物技术研究。

献[4]。引物 I: 5' TCC GTA GGT GAG CCT GCA GC -3'。
G -3'; 引物 II: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT

表 1 采集供试菌株的苹果品种与采样地点
Table 1 Sources of the reference strains

菌株编号 Strains number	苹果品种 Sources	采样地点 Point of collection	菌株编号 Strains number	苹果品种 Sources	采样地点 Point of collection
PA T01	秦冠 Q inguan	礼泉 L iquan	PA T09	秦冠 Q inguan	白水 Baishui
PA T02	秦冠 Q inguan	礼泉 L iquan	PA T10	秦冠 Q inguan	白水 Baishui
PA T03	秦冠 Q inguan	礼泉 L iquan	PA T11	富士 Fuji	白水 Baishui
PA T04	秦冠 Q inguan	礼泉 L iquan	PA T12	富士 Fuji	白水 Baishui
PA T05	富士 Fuji	乾县 Q ianxian	PA T13	澳洲青苹 Aus Green	眉县 M eixian
PA T06	富士 Fuji	乾县 Q ianxian	PA T14	澳洲青苹 Aus Green	眉县 M eixian
PA T07	富士 Fuji	乾县 Q ianxian	PA T15	澳洲青苹 Aus Green	眉县 M eixian
PA T08	富士 Fuji	乾县 Q ianxian			

1.2.2 供试菌株模板 DNA 的制备 挑取少量菌落,加入 1 mL 洗涤液(25 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA, 1.2% PVP), 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀加入 200 μ L 丙酮溶液,混匀,冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 沉淀加入 500 μ L TE 溶液,混匀, 12 000 r/min 离心 5 min; 将沉淀重新悬于 400 μ L 裂解液(2% SDS, 20 mmol/L NaAc, 40 mmol/L Tris, 10 mmol/L EDTA), 反复吹打混匀,冰浴 5 min 后 70~75 $^{\circ}$ C 温浴 20 min, 加入 100 μ L 5 mol/L NaCl, 14 000 r/min 离心 10 min, 上清液中加入 100 μ L 的酚/氯仿/异戊醇(体积比 25:24:1)混合液,离心后用无水乙醇和体积分数 70% 的乙醇分 2 次干燥, 12 000 r/min 离心 2 min, 干燥物溶于 50 μ L TE 中,加 RNase A (0.25 mg/mL), -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 模板 DNA 的检测 称取 0.4 g 琼脂糖,加入 40 mL 0.5 $\times$ TBE 缓冲液(10 $\times$ TBE, 54 g Tris, 27.5 g 硼酸, 20 mL 0.5 mol/L 的 EDTA, pH 8.0, 定容到 1 000 mL), 即用 1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)电泳鉴定提取的 DNA。每孔点样 5 μ L (3 μ L 样品+ 2 μ L Loading buffer), 5 V/cm², 电泳 1 h。

1.2.4 模板 DNA 的扩增 模板 DNA 经琼脂糖电泳检测显示特异性条带后,参照文献[7]修改,然后配制 PCR 反应体系,其中含模板 DNA 2.2 μ L, 5 μ g/ μ L Taq DNA polymerase 0.25 μ L, 20 mmol/mL 引物 I 和引物 II 各 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, 用 ddH₂O 补足 50 μ L。

加样完成后用微量可调加样器和一次性吸头向每一管中加 50 μ L 矿物油;振荡各管,短暂离心后进

行 PCR 循环。

PCR 循环扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 1 min 变性, 56 $^{\circ}$ C 1 min 退火, 72 $^{\circ}$ C 1 min 延伸, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min 终延伸, 扩增样于 4 $^{\circ}$ C 保藏。

1.2.5 DNA 的回收 按每 mL Binding buffer 中加 1 g 切片的比例, 将供试菌株 PCR 切片加入盛有 Binding buffer 的试管中, 55~60 $^{\circ}$ C 水浴至凝胶溶化。将凝胶溶液置于收集柱中, 10 000 g 离心 1 min, 弃去离心液。再用 Binding buffer 洗柱, 10 000 $\times$ g 离心 1 min 后弃去离心液, 在柱中加入 SPW buffer 溶液, 放置 2~3 min 后, 10 000 $\times$ g 再次离心 1 min, 弃去离心液。最后将柱放置于新的 1.5 mL 离心管中, 柱床上加入 50 μ L 的 DNA Elution buffer (30~50 μ L), 即为最终的 DNA 回收溶液, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 的粗提

粗提得到的模板 DNA 经过琼脂糖电泳检测有明显条带, 表明其提取效果良好, 可供进一步扩增。

2.2 模板 DNA 的 PCR 扩增结果

供试菌株模板 DNA 经过 PCR 扩增后, 在 500~600 bp 处有明显的特异性条带(图 1), 符合真菌的碱基大小范围, 但有拖尾现象出现。由于在粗提液检测中并未发现拖尾, 说明外源 DNA 残余污染的可能性较小, 其原因可能是模板 DNA 的含量太高, 此外, PCR 条件还需进一步摸索。

2.3 扩增回收产物测序结果

扩增的 DNA 经过回收后送交上海生工生物工程公司测序, 将测出的 ITS DNA 序列提交到

European Molecular Biology Laboratory (EMBL) 核酸数据库, 通过 Blast 程序将供试菌株 ITS-rDNA 序列与 Genbank 中已有的核酸序列进行对照, 其

最高亲缘性菌株即为鉴定结果, 结果表明, 其均为青霉属与曲霉属真菌(表 2)。



图 1 供试菌株模板 DNA 的扩增结果
1~ 15 PAT01~ PAT15;M: DNA marker

Fig 1 Detection profile of DNA templates by PCR

表 2 扩增回收的 ITS-rDNA 序列分析结果

Table 2 Result of ITS-rDNA Sequence Analysis of DNA templates by PCR

菌种编号 Strains	鉴定对照菌 Identical strains	序列长度/bp Length	同源性/% Identity	NCBI 登录号 NCBI entrance ID
PAT01	<i>Penicillium expansum</i> strain ATCC 7861	608	99	AY373912.1
PAT02	<i>Penicillium expansum</i> strain ATCC 7861	608	99	AY373912.1
PAT03	<i>Aspergillus versicolor</i> strain SRRC 153	591	97	AY373882.1
PAT04	<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 506	1192	98	AF459735
PAT05	<i>Penicillium griseoroseum</i> strain VIC	594	96	AY425983.1
PAT06	<i>Penicillium polonicum</i> strain NRRL 995	1142	99	AF033475
PAT07	<i>Penicillium coprophilum</i> strain NRRL 13627	1142	98	AF033469
PAT08	<i>Aspergillus sojae</i> strain ATCC 14895	619	96	AY373867.1
PAT09	<i>Aspergillus toxicarius</i>	576	97	AB008421.1
PAT10	<i>Penicillium cordubense</i>	1143	98	AF527055.1
PAT11	<i>Penicillium viridicatum</i> strain FRR 963	609	98	AY373939.1
PAT12	<i>Aspergillus toxicarius</i>	576	98	AB008421.1
PAT13	<i>Penicillium tricolor</i> strain ATCC 10413	609	98	AY373935.1
PAT14	<i>Penicillium expansum</i> strain ATCC 7861	608	97	AY373912.1
PAT15	<i>Aspergillus oryzae</i> strain SRRC 2103	619	97	AY373857.1

3 讨 论

对陕西浓缩苹果汁原料中棒曲霉素产生菌的鉴定研究, 有利于进一步从根源上控制浓缩苹果汁中的棒曲霉素, 通过分子生物学鉴定确认危害苹果和果汁品质的主要真菌, 并进一步对其进行干扰控制, 可解决浓缩果汁的棒曲霉素残留问题。

在使用传统方法对棒曲霉素产生菌进行鉴定时, 缺乏相应的生理生化试验对照模式, 而且许多菌经过 5 代以上转接后, 就可能与前几代的形态完全不同, 给鉴定工作带来困难; 若单从形态学角度鉴定, 则需要事先对大量标准菌进行了解并一一比较

对照, 这不仅工作量大, 而且鉴定结果的可靠性难以保证。

应用分子生物学方法鉴定未知菌则可克服上述缺点。由于真菌的 ITS 区不加入成熟核糖体, 受到的选择压力较小, 进化速率较快, 在绝大多数真核生物中表现出极为广泛的序列多态性。同时, ITS 序列长度适中, 可以从不太长的序列中获得足够的信息, 因而可广泛用于属内种间或种内群体的系统学研究^[8,9], 对未知菌的鉴定更能显示出其快速、简便和高特异性的优势。此方法可在今后的食品科学相关研究中推广使用。

[参考文献]

- [1] Sommer N F, Buchanan J R, Fortlage R J. Production of patulin by *Penicillium expansum* [J]. Applied Microbiology, 1974, 28: 589- 593
- [2] Scott P M. Penicillium and aspergillus toxins[J]. Mycotoxins in Grain, 1994: 261- 285
- [3] Dickens F, Jones H E H. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances[J]. British Journal of Cancer, 1961, 15: 85- 88
- [4] White T J, Bruns T, Lee S, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990. 315- 322
- [5] GB 14974-94 苹果和山楂制品中展青霉素限量卫生标准[S].
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979
- [7] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003
- [8] 陈永青, 姜子德, 戚佩坤. RAPD 分析与 ITS 序列分析在拟茎点霉分类鉴定上的应用[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 39- 46
- [9] 程 度, 黄翔宇, 李宝健. 药用真菌高质量总DNA 的制备及基因组文库的构建[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 137- 139

Identification of dominating patulin-producing strain by ITS-DNA sequence analysis in apple juice concentrates

SU Qing-feng, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, GAO Zhen-peng

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Several patulin-producing strains isolated from raw material of apple juice concentrates were identified in morphology, in which all of them were penicillium and aspergillus. Then ITS-rDNA sequence analysis was used to confirm it. The ITS-rDNA sequence was submitted to European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and contrasted with DNA sequence in GenBank and confirmed that they were penicillium and aspergillus.

Key words: patulin; *Penicillium expansum*; ITS-rDNA; PCR; apple juice concentrate