

# 曲霉属产毒真菌 DNA 的制备及其毒素相关基因 *aflR* 的 PCR 检测

蒋丹<sup>1,2,3</sup>, 靳卫林<sup>1,2</sup>, 苏德山<sup>1,2</sup>, 黄耀江<sup>1,2</sup>

1. 中央民族大学, 北京 100081

2. 北京市食品环境与健康工程技术研究中心, 北京 100081

3. 辽宁出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 大连 116001

**摘要** 研究了用改良的CTAB法提取曲霉属产毒真菌DNA的方法,并与试剂盒提取法进行比较。经过改良的CTAB法能够成功提取出曲霉属产毒真菌的DNA,且浓度和纯度均可达到PCR扩增的标准。根据合成黄曲霉毒素的*aflR*基因设计两对引物,运用PCR方法进行扩增鉴定,结果表明黄曲霉、寄生曲霉和溜曲霉基因中可检出*aflR*基因,烟曲霉和杂色曲霉中并未检出,达到对黄曲霉毒素产生菌进行鉴定的目的。这种方法可为产毒真菌的快速检测提供参考。

**关键词** 产毒真菌;DNA提取;黄曲霉毒素;PCR检测

中图分类号 Q149

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.14.004

## DNA Preparation of Toxigenic *Aspergillus* and PCR Detection of *aflR* Toxin Gene

JIANG Dan<sup>1,2,3</sup>, JIN Weilin<sup>1,2</sup>, SU Deshan<sup>1,2</sup>, HUANG Yaojiang<sup>1,2</sup>

1. Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. Beijing Engineering Research Center of Food Environment and Public Health, Beijing 100081, China

3. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China

**Abstract** This paper discusses the modified CTAB method for DNA extraction of toxigenic *Aspergillus* and compares it with the kit extraction method. The modified CTAB method successfully extracted DNA of toxigenic *Aspergillus*. The concentration and purity reached the standard of PCR amplification. Two pairs of primers were designed based on the *aflR* gene for aflatoxin biosynthesis regulation, and the toxigenic *Aspergillus aflR* gene was identified by using PCR amplification. The results show that the *aflR* gene is contained in the genome of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasitic* and *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus fumigates* and *Aspergillus versicolor* are not detected, realizing the purpose for identifying aflatoxin producing strains. This method provides a reference for rapid detection of toxigenic fungi.

**Keywords** toxic fungi; DNA extraction; aflatoxin; PCR detection

真菌是一类有细胞壁,不含叶绿素,无根叶茎,以腐生或寄生方式生存,能进行有性或无性繁殖的微生物<sup>[1,2]</sup>。真菌毒素是由真菌产生的具有毒性的次级代谢产物,广泛污染农作

物、食品及饲料等植物性产品。真菌及其所产生的真菌毒素具有毒性强、结构稳定、分子量小等特点,且在自然界分布广泛,对储粮、动物饲料和食品侵染的机会较多<sup>[3]</sup>。到目前为

收稿日期:2014-01-17;修回日期:2014-03-26

基金项目:教育部新世纪优秀人才项目(NCET-11-0842);北京市科技创新基地培育与发展工程项目(Z131106002813027)

作者简介:蒋丹,副研究员,研究方向为食品安全与健康,电子信箱:jiangdan66@163.com;靳卫林(共同第一作者),硕士研究生,研究方向为分子生态学,电子信箱:jwldsg@126.com;黄耀江(通信作者),教授,研究方向为生物化学与分子生物学、食品安全与公众健康,电子信箱:yaojiangh@hotmail.com

引用格式:蒋丹,靳卫林,苏德山,等.曲霉属产毒真菌DNA的制备及其毒素相关基因*aflR*的PCR检测[J].科技导报,2014,32(14):31-34.

止,已经发现了300多种化学结构不同的真菌毒素<sup>[4]</sup>。曲霉属产毒真菌主要包括黄曲霉、寄生曲霉、杂色曲霉、溜曲霉、烟曲霉、赭曲霉等,主要产生黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、烟曲霉震颤素和赭曲霉毒素等<sup>[5]</sup>。

产毒真菌及其真菌毒素的污染,一方面对人类或动物健康造成损害,引起中毒甚至癌症<sup>[6]</sup>;另一方面给农产品、食品行业造成严重的经济损失。全球每年约有25%的农作物及农产品遭受真菌及其真菌毒素污染,造成损失可能达到数百亿美元<sup>[7]</sup>。无论从经济方面还是人与动物健康方面,预防和减轻真菌毒素污染,进行产毒真菌的检测和鉴定都具有重要意义。

在国内,对产毒菌种的鉴定研究进行的不多,鉴于国内产毒真菌的分布与污染范围较广,本文建立曲霉属丝状真菌DNA提取的改进方法,针对黄曲霉毒素合成过程中的*aflR*基因建立PCR快速检测体系,旨在对黄曲霉毒素合成过程中的基因进行检测,以期对产毒真菌及真菌毒素检测的进一步发展提供贡献。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

PCR仪(美国Bio-Rad公司),GelDoc XR+凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),NanoDrop 2000超微量分光光度计(美国热电公司),TGL-20M高速台式冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司),DYCP-31D型水平电泳槽、DYY-11型电泳仪(北京市六一仪器厂),电热恒温培养箱(天津市中环实验电炉有限公司),超净工作台(北京碧都空气净化设备公司),恒温水浴锅(金坛市荣华仪器制造有限公司),液氮罐(乐山市东亚机电工贸有限公司),高压灭菌锅(江阴滨江医疗设备厂)。

马铃薯葡萄糖肉汤培养基(北京奥博星生物技术有限公司),琼脂糖(Gene Company Ltd.),真菌基因组DNA提取试剂盒、100bp DNA Ladder Marker、 $\lambda$ DNA/*Hind* III、Super Green I(北京欣科中晶生物科技有限公司),dNTPs、*Taq* DNA聚合酶、 $10\times Taq$  buffer( $Mg^{2+}$  plus)(北京博奥拓达科技有限公司),CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、EDTA(乙二胺四乙酸)、硼酸、PVP-40(聚乙烯吡咯烷酮)、氯化钠、Tris饱和酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇等均为分析纯。

### 1.2 菌株的活化和培养

本试验共选取5株菌株:黄曲霉(40536)、寄生曲霉(40365)、溜曲霉(30585)、烟曲霉(3.5835)、杂色曲霉(2474),以上标准菌株均由辽宁省出入境检验检疫局提供。菌株活化后接种于马铃薯葡萄糖肉汤培养基中,于恒温摇床上27℃、120 r/min培养4 d,真空抽滤后收集菌丝体,无菌超纯水洗涤数次并用无菌滤纸吸干水分,用于基因组DNA的提取。

### 1.3 基因组DNA的提取

参考谷艳昌<sup>[8]</sup>、周小玲等<sup>[9]</sup>的方法,设计一种改良的CTAB法提取曲霉属丝状真菌基因组DNA。经反复试验,得出提取

曲霉属丝状真菌基因组DNA的具体步骤为:

- 1) 取一定量菌丝体于研钵中,液氮研磨成粉末状后迅速转移到1.5 mL离心管中;
- 2) 加入600  $\mu$ L预热的CTAB溶液(2% CTAB,200 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L EDTA pH值8.0,1.4 mmol/L NaCl,1% PVP-40,0.2%  $\beta$ -巯基乙醇),迅速盖紧管盖,充分震荡,65℃水浴30 min,期间不断震荡;
- 3) 室温冷却后加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(体积比为25:24:1),反复颠倒混匀1 min,13000 r/min离心10 min;
- 4) 吸取上清于另一离心管中,加入等体积的氯仿-异戊醇(体积比为24:1),反复颠倒混匀1 min,13000 r/min离心10 min;
- 5) 吸取上清于另一离心管中,加入5  $\mu$ L 10 mg/L的RNaseA溶液,37℃水浴1 h;
- 6) 重复步骤3)、4);
- 7) 吸取上清于另一离心管中,加入0.7倍体积的异丙醇和0.2倍体积的5 mol/L的NaCl溶液,颠倒混匀,4℃沉淀后13000 r/min离心10 min;
- 8) 去上清,加500  $\mu$ L 70%乙醇清洗沉淀,4℃ 13000 r/min离心10 min,去上清后倒扣于滤纸上,干燥DNA,干燥时间为15 min左右,长时间的干燥不利于下一步DNA的溶解;
- 9) 加入50  $\mu$ L TE缓冲液溶解基因组DNA,于-20℃冰箱保存。

同时,采用北京欣科中晶生物技术有限公司的真菌基因组DNA提取试剂盒,提取液氮研磨后的菌丝体DNA,与上述提取方法获得的DNA进行对比。

### 1.4 PCR检测体系

针对黄曲霉毒素蛋白活化基因*aflR*的基因序列<sup>[10,11]</sup>,采用Premier 5软件设计的引物如表1所示,引物序列由上海生物工程技术有限公司合成。

表1 用于PCR检测的目的基因及其引物  
Table 1 Target gene and primers for the PCR amplification detection

扩增片段	引物名称	引物序列
<i>aflR</i> (AY197608)	aflR-1 Left	5'-GAGCAAAGCACCCTGTCTTC-3'
	aflR-1 Right	5'-AACGATAAGGACGACCATGC-3'
	aflR-2 Left	5'-GAAGTAGGGACCCCATGAT-3'
	aflR-2 Right	5'-TGGTCTTCTCATCCACACA-3'

用改良的CTAB法提取的曲霉属5种真菌基因组DNA,分别扩增*aflR*基因,反应体系为50  $\mu$ L,含1  $\mu$ L DNA模板、5  $\mu$ L  $10\times Taq$  buffer、1  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP、上下游引物(20  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L和0.5  $\mu$ L *Taq* DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ L),用超纯水补足总体积。

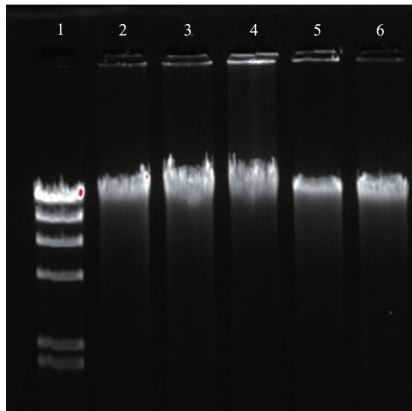
PCR扩增反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸60 s,30个循环;72℃延伸5 min。  
PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳检测。

## 2 实验结果

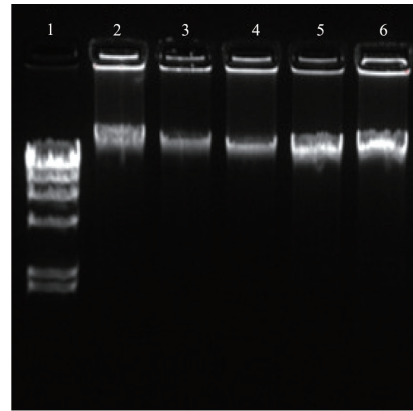
### 2.1 基因组DNA提取结果

从图1中可以看出,用改良的CTAB法和试剂盒法提取的曲霉属菌丝体基因组DNA凝胶电泳图条带清晰,分子量在

23 kb左右。经NanoDrop 2000超微量分光光度计测定,两种方法所提取样品的基因组DNA质量浓度分别在400 ng/μL和150 ng/μL左右。显然经过改良的CTAB法提取的基因组DNA浓度较高,但试剂盒法更快速,相对于改良的CTAB法会节省一半以上时间。试验表明,两种方法均可用于曲霉属菌丝体基因组DNA的提取,且浓度和纯度都能达到需求。与试剂盒法相比,经过改良的CTAB法更适用于提取曲霉属基因组DNA。



(a) 改良的CTAB法



(b) 试剂盒法

1—λDNA/*Hind* III分子量标准;2—黄曲霉基因组DNA;3—寄生曲霉基因组DNA;4—溜曲霉基因组DNA;5—烟曲霉基因组DNA;6—杂色曲霉基因组DNA

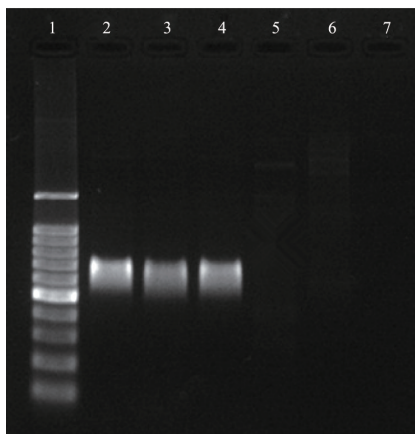
图1 两种提取方法得到的DNA的凝胶电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of the DNA btained by two methods

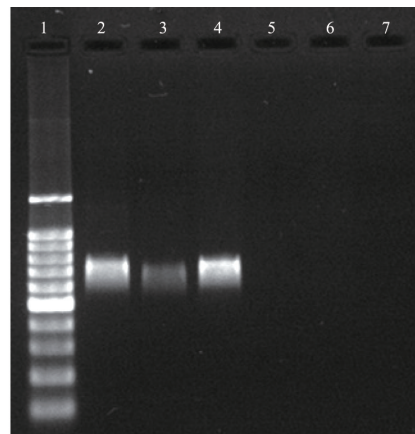
### 2.2 PCR检测结果

本研究对产黄曲霉毒素的*aflR*基因进行扩增。两对引物的扩增结果见图2。黄曲霉(40536)、寄生曲霉(40365)和

溜曲霉(30585)3种菌株呈阳性反应,其余两种菌株呈阴性反应。*aflR*基因的PCR检测法特异地针对含有*aflR*基因的菌株,能够通过PCR方法初步对产黄曲霉毒素的菌株进行筛选。



(a) *aflR*-1



(b) *aflR*-2

1—100 bp DNA分子量标准;2—黄曲霉;3—寄生曲霉;4—溜曲霉;5—烟曲霉;6—杂色曲霉;7—阴性对照

图2 两对引物的PCR扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of two pairs of primers

### 3 讨论

CTAB法主要用于植物基因组的提取,也有用于提取真菌DNA的报道<sup>[8,9]</sup>。在基因组DNA的提取过程中,对于曲霉属菌株,与直接从平板上刮取菌丝的方法相比,经过发酵过滤得到的菌体更丰富且易于研磨,DNA产量高<sup>[12]</sup>。在CTAB溶液中加入PVP-40和β-巯基乙醇,可有效减少酚类、醌类及多糖类物质的污染<sup>[13]</sup>。用酚-氯仿抽提的方法可有效去除蛋白类物质。试验发现,用异戊醇沉淀DNA明显优于无水乙醇,可以减少DNA的损耗。在沉淀过程中加入高盐溶液,可溶解溶液中残留的多糖等物质,提高了DNA的纯度<sup>[14]</sup>。直接用试剂盒提取菌丝体的基因组DNA时,由于曲霉属真菌菌丝体细胞壁较厚,导致提取的DNA浓度低。所以本试验的试剂盒法提取过程中也加入了液氮研磨步骤。

曲霉属产毒真菌中可产生黄曲霉毒素的包括黄曲霉菌和寄生曲霉菌。本试验通过对*aflR*基因的PCR检测可检出黄曲霉菌和寄生曲霉菌。通过电泳条带可发现溜曲霉同时被检出,可确定溜曲霉中也含有合成黄曲霉毒素必备的*aflR*基因。文献<sup>[15]</sup>报道个别溜曲霉菌株可产生黄曲霉毒素<sup>[15]</sup>,但这类研究并不多见,有待进一步的研究。烟曲霉和杂色曲霉没有检出*aflR*基因,可能的原因有两种:菌种基因组中没有*aflR*基因,并不产生黄曲霉毒素;本文所设计的引物不合适,无法检出。但目前为止还没有关于烟曲霉和杂色曲霉产生黄曲霉毒素的相关报道,也没有烟曲霉和杂色曲霉含有*aflR*基因的报道,本研究结果具有一定参考价值。

### 4 结论

经过改良的CTAB法能够有效提取曲霉属真菌的DNA。试剂盒提取过程相比CTAB法耗时短,效率高。且CTAB法相比试剂盒法更廉价,更适合基层推广使用。CTAB法提取的DNA浓度更高,同时还具备简单、易操作的特点,具有很强的实用性,可以广泛地应用于曲霉属真菌DNA提取中。

通过PCR的方法,针对黄曲霉毒素过程中必需的*aflR*基因成功地曲霉属产毒真菌的5种菌株进行了检测,整个PCR反应过程只需2~3 h,检测速度快,效率高,可为产毒真菌的快速检测提供参考,以建立快速检测体系。

#### 参考文献(References)

[1] 李群伟,王绍萍,鲍文生. 真菌毒素与人类疾病的研究与展望[J]. 中国地方病防治杂志, 2001, 16(1): 24-25.  
Li Qunwei, Wang Shaoping, Bao Wensheng. The research progress and prospect of mycotoxin and human disease[J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2001, 16(1): 24-25.

[2] 邢来君,李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 11-22.  
Xing Laijun, Li Mingchun. Ordinary mycology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999: 11-22.

[3] 李鹏,赖卫华,金晶. 食品中真菌毒素的研究[J]. 农产品加工·学刊, 2005(3): 12-15.  
Li Peng, Lai Weihua, Jin Jing. Progress of studying on mycotoxins in food[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2005(3): 12-15.

[4] 齐祖同. 中国真菌志[M]. 5卷. 北京: 科学出版社, 1997: 1-4.  
Qi Zutong. Flora fungorum sinicorum[M]. Vol 5. Beijing: Science Press, 1997: 1-4.

[5] Brera C, Miraglia M, Colatosti M. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: Sources of errors[J]. Microchemical Journal, 1998, 59(1): 45-49.

[6] Papp E, H-Otta K, Zúray Z, et al. Liquid chromatographic determination of aflatoxins[J]. Microchemical Journal, 2002, 73(1): 39-46.

[7] 苏福荣,王松雪,孙辉,等. 国内外粮食中真菌毒素限量标准制定的现状与分析[J]. 粮油食品科技, 2007, 15(6): 57-59.  
Su Furong, Wang Songxue, Sun Hui, et al. The state of mycotoxin maximum limit of grain[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2007, 15(6): 57-59.

[8] 谷艳昌,侯瑛,王海磊,等. 一种简易有效的提取真菌DNA化学改良方法[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 6884-6886.  
Gu Yanchang, Hou Ying, Wang Hailei, et al. A simple and effective chemical modification method for extracting DNA from fungi[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(15): 6884-6886.

[9] 周小玲,沈微,饶志明,等. 一种快速提取真菌染色体DNA的方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 89-92.  
Zhou Xiaoling, Shen Wei, Rao Zhiming, et al. A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA[J]. Microbiology, 2004, 31(4): 89-92.

[10] Yu J J, Chang P K, Ehrlich K C, et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1253-1262.

[11] Somashekar D, Rati E R, Chandrashekar A. PCR-restriction fragment length analysis of *aflR* gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 93(1): 101-107.

[12] 吴发红,黄东益,黄小龙,等. 几种真菌DNA提取方法的比较[J]. 中国农学通报, 2009, 25(8): 62-64.  
Wu Fahong, Huang Dongyi, Huang Xiaolong, et al. Comparing study on several methods for DNA extraction from endophytic fungi[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(8): 62-64.

[13] Cheng F S, Brown S K, Weeden N F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species[J]. Hortscience, 1997, 32(5): 921-922.

[14] 陈桂信,吕柳新,赖钟雄,等. 基因组DNA的提取与纯化[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(3): 329-331.  
Chen Guixin, Lü liuxin, Lai Zhongxiong, et al. Extraction and purification of genomic DNA in Nai (*Prunus salicina* Lindl. var. *cordata*) [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2004, 26(3): 329-331.

[15] Goto T, Wicklow D T, Ito Y. Aflatoxin and cyclopiazomic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4036-4038.

(责任编辑 王媛媛)