

曲霉菌的 RAPD 分析及其在酿造工业中的应用

潘 力, 王 斌* 郭 勇

(华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510640)

摘 要:以米曲霉沪酿 3.042(AS3.951)、黄曲霉 GIM3.18、酱油曲霉 AS3.495 为参照,利用 RAPD 分子标记技术对 16 株曲霉菌进行系统发育分析。通过改进提取方法,获得了质量较好的模板 DNA,凝胶电泳结果和分光光度法检测结果表明其适合用于进一步的 RAPD-PCR 试验。从 9 个待选引物中筛选到 3 个扩增产物谱带多、特征好、覆盖面广的引物(Primer1、Primer2、Primer5),重复实验证明其 RAPD-PCR 扩增图谱具有较好的稳定性,扩增产物谱带一般 8~14 条,各试验菌株主带 4~9 条,次带丰富。由此构建的系统进化树较好地吻合了传统的形态分类学,证实了 RAPD 分子标记技术在此类微生物系统发育分析中应用的可行性,也为酿造工业中检出产黄曲霉毒素的污染菌株提供了理论基础。

关键词:曲霉菌;RAPD;系统发育分析;黄曲霉毒素

中图分类号:Q78,Q935 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)03-0533-04

曲霉菌中的一些类群在酿造工业上具有重要应用,如米曲霉具有较强的蛋白质分解能力,同时也具有糖化活力,很早就被用于酱油和酱类生产上,黄曲霉产液化型淀粉酶的能力强,蛋白质分解能力仅次于米曲霉,并且它能分解 DNA 产生核苷酸,应用广泛,酱油曲霉则主要应用于酱油酿造行业。这些具有重要应用价值的曲霉菌多属于黄曲霉菌群(*Aspergillus flavus* Group),鉴于它们在酿造工业上的重要应用,对其进行分类研究就显得十分重要。另一方面,酿造工业生产中常污染一些产黄曲霉毒素的菌株(多为黄曲霉),严重危害酿造行业的生产安全性。因此加强此类曲霉菌的分类研究,对产毒菌株加以区别、鉴定,是十分必要的。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)分子标记,即随机扩增多态性 DNA,是由 Williams 和 Welsh 等 1990 年建立的一种有效的分子标记技术^[1],现已广泛应用于动植物及微生物的遗传多样性分析、物种亲缘关系分析、种群分类和基因组研究等领域^[2-4],但其在曲霉菌分类研究中的应用还不多见。本文应用 RAPD 分子标记技术对 16 株曲霉菌进行分类分析,考察 RAPD 分子标记技术在此类真菌分类中应用的可行性,为其在真菌分类中的应用积累经验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:16 株试验菌株包括米曲霉 5 株、黄曲霉 6 株、酱油曲霉 5 株,购自中国普通微生物菌种保藏管理中心

(CGMCC)、中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)和广东省微生物研究所(GIM)等单位,如表 1 所示。其中一些菌株可产黄曲霉毒素,在酿造行业中已被弃用(表 1),但它们仍时常成为酿造工业生产的污染菌株。

表 1 试验菌株

Table 1 The basic information of the test strains

No.	Name	Taxonomy	Source
1	GIM3.18	<i>Aspergillus flavus</i>	GIM
2	GIM3.17*	<i>Aspergillus flavus</i>	GIM
3	CICC2219*	<i>Aspergillus flavus</i>	CICC
4	CICC2390*	<i>Aspergillus flavus</i>	CICC
5	CICC2402*	<i>Aspergillus flavus</i>	CICC
6	CICC2404*	<i>Aspergillus flavus</i>	CICC
7	AS3.951	<i>Aspergillus oryzae</i>	GIM
8	GIM3.451	<i>Aspergillus oryzae</i>	GIM
9	GIM3.453	<i>Aspergillus oryzae</i>	GIM
10	CICC2001	<i>Aspergillus oryzae</i>	CICC
11	CICC2357*	<i>Aspergillus oryzae</i>	CICC
12	AS3.495	<i>Aspergillus sojae</i>	GIM
13	AS3.661	<i>Aspergillus sojae</i>	CGMCC
14	AS3.880	<i>Aspergillus sojae</i>	CGMCC
15	CICC2005	<i>Aspergillus sojae</i>	CICC
16	CICC2395	<i>Aspergillus sojae</i>	CICC

The strains with * could produce aflatoxin during their metabolism.

基金项目:广东省自然科学基金(04020061)、广东省科技攻关项目(2004B20201011)

* 通讯作者。Tel 86-20-87113841; Fax 86-20-87113847; E-mail: wangbin19810621@163.com

作者简介:潘力(1967-),男,贵州贵阳人,副教授,博士,主要从事工业微生物、医药微生物及生物化工方面的研究。E-mail:btlipan@scut.edu.cn

收稿日期:2006-08-30;接受日期:2006-09-29;修回日期:2006-11-25

1.1.2 试剂和仪器 PCR 试剂盒、RNase、DNA 分子量标准(λ -EcoT 141 Digest) 购自 TaKaRa 公司,其他常规试剂为国产分析纯试剂。德国 Eppendorf 公司 BioPhotometer 分光光度计;德国 SORVALL 公司 Biofuge stratos 型高速冷冻离心机;德国 Eppendorf 公司 Mastercycler gradient 梯度 PCR 仪;德国 CHRIST 公司 ALPHA1-4 型真空冷冻干燥机;美国 Bio-RAD 公司水平电泳仪;美国 Pall 公司 PURELAB Plus 型纯水仪等。

1.2 形态特征观察试验

将 16 株试验菌株从活化的斜面培养物中穿刺接种到查氏培养基平板上,置 28℃ 培养箱中培养,每天观察菌株生长状态,待培养特征明显时(5d 左右)拍照并采集特征数据。

1.3 模板 DNA 的制备和 RAPD 扩增反应

将试验菌株的孢子悬浮液接种于综合马铃薯液体培养基中,28℃ 200r/min 振荡培养 2d 左右。过滤收集菌丝体,冻干,液氮研磨后转移至 EP 管中,参考 Laura E. via 等^[5]的方法经改良后提取基因组 DNA 作为 RAPD-PCR 反应的模板,双蒸水加入适量 10mg/mL RNase 溶解后置 -20℃ 保存备用。1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度法检测模板 DNA 的质量。

RAPD 扩增反应由 Mastercycler gradient 梯度 PCR 仪完成,所使用的 9 个引物列于表 2,由美国 Invitrogen 公司合成。扩增体系如下(总体积 25 μ L):10 \times PCR buffer 2.5 μ L,25mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L,dNTPs(各 2.5mmol/L)1.0 μ L,25 μ mol/L 引物 0.2 μ L,5U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L,50 μ g/mL 模板 DNA 1.0 μ L,双蒸水 18.6 μ L。扩增程序设定为:94℃ 预变性 5min;94℃ 1min,36℃ 1min,72℃ 2min(45 个循环);72℃ 5min,4℃ 保存。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,拍照、保存。

表 2 RAPD-PCR 反应所使用的引物

Table 2 The primers for RAPD-PCR reaction

Primer	Sequence(5'→3')	Primer	Sequence(5'→3')
Primer1	AATCGGGCTG	Primer6	CTGCAATCGTG
Primer2	CTGCTGGGAC	Primer7	AGCGCCATTC
Primer3	TGCGGGTCCT	Primer8	GTGCGAGCAA
Primer4	ATGTAACGCC	Primer9	GTAATGCCCT
Primer5*	CGGC[A/C]CT[T/A]		

Primer5 is a degenerate RAPD primer^[6].

1.4 数据处理

根据 RAPD-PCR 扩增结果得出各菌株的扩增数据,在得到的 RAPD-PCR 扩增产物电泳图上有条带记为“1”;无条带记为“0”。所有菌株的扩增数据共同组成一个“0-1”数据矩阵。然后,根据 Nei 等的相似系数分析公式计算两两菌株间的相似系数,相似系数(F_{ab})=($2 \times N_{ab}$)/($N_a + N_b$) \times 100%。其中, N_{ab} 为菌株 a 和菌株 b 之间共有的 DNA 扩增片段数目, N_a 为菌株 a 具有的 DNA 扩增片段数目, N_b 为菌株 b 具有的 DNA 扩增片段数目。根据原始的“0-1”数据矩阵,利用 Phylip3.65 软件包采用距离依靠法(distance methods)中的邻位相连法(Neighbor-joining)构建 16 株试验菌株的系统发育树。

2 结果

2.1 RAPD-PCR 扩增图谱分析

RAPD-PCR 反应所需模板的制备参考了 Laura E. via 等所

用的基因组 DNA 的提取方法,主要是针对丝状真菌细胞壁的结构特点进行了改进。由于试验菌株均属于曲霉属,因此制备的模板 DNA 的大小相差不大,在琼脂糖凝胶电泳图上显示大小一致的电泳条带,约为 20kb。利用分光光度法测定其浓度和纯度,证明所得模板 DNA 纯度较高(OD_{260}/OD_{280} 在 1.80~1.90 之间),浓度适中(650 μ g/mL 左右),能够用于进一步的 RAPD-PCR 试验。

在选用的 9 个引物中,Primer1、Primer2、Primer5 通过 RAPD-PCR 反应在试验菌株上获得了基因组多态性条带,其扩增产物谱带多,特征好,覆盖面广。统计所有电泳图谱,共获得电泳条带 181 条,其中多态性条带 74 条,约占总数的 40.9%。由于 RAPD 标记是一种显性标记,通常 RAPD 分析中一条带就代表基因组上一个位点的产物^[7],这意味着对试验菌株的 181 个位点进行了检测。3 个引物的扩增图谱中,Primer1 和 Primer5 的扩增图谱最好(图 1、2,图中各数字编号的意义见表 1),扩增产物谱带一般 8~14 条,各试验菌株主带 4~9 条,次带丰富。各菌株既有彼此相同的共同条带,又有各自的特征条带,共同条带证明各菌株具有大致相同的遗传基础,特征条带则说明了它们的遗传分化。重复实验证明 3 个引物的 RAPD-PCR 扩增图谱具有较好的稳定性。综合分析 3 个引物的扩增图谱,可以将 16 株试验菌株清楚地区分开。

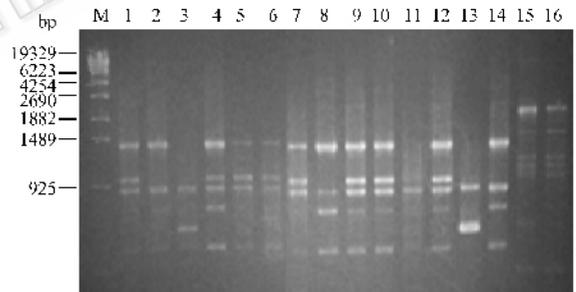


图 1 Primer1 得到的试验菌株的 RAPD-PCR 扩增图谱

Fig.1 RAPD-PCR patterns of the test strains with Primer1. M. DNA molecular marker.

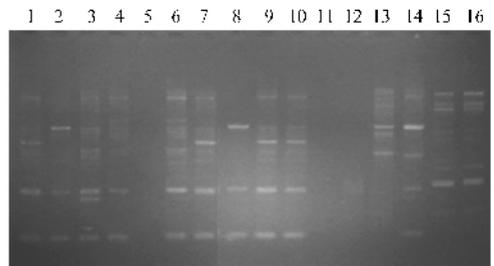


图 2 Primer5 得到的试验菌株的 RAPD-PCR 扩增图谱

Fig.2 RAPD-PCR patterns of the test strains with Primer5.

2.2 基于 RAPD-PCR 扩增图谱的系统发育分析

根据引物 Primer1、Primer2、Primer5 的 RAPD-PCR 扩增图谱,得到“0-1”数据矩阵,并由此计算出了两两菌株间的遗传相似系数。各菌株间的相似系数在 8.0%~96.6% 之间,平均 47.15%,说明各菌株之间具有比较丰富的 RAPD-PCR

扩增产物多态性, 遗传分化比较明显。根据得到的“0—1”数据矩阵, 利用 Phylip3.65 软件包采用距离依靠法中的邻位相连法构建了 16 株试验菌株的系统发育树(图 3)。

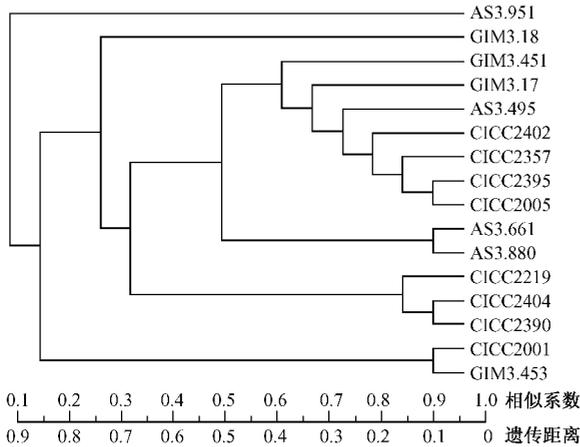


图 3 试验菌株的系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree of the test strains.

从图 3 可以看出, 当相似系数达到 0.13 的水平时, 米曲霉 AS3.951(沪酿 3.042) 已经分化出来; 当相似系数达到 0.20 的水平时, 又有两株米曲霉 CICC2001、GIM3.453 分化出来。这说明在黄曲霉菌群中米曲霉是较早分化、单独进化的一支。当相似系数达到 0.40 的水平时, 剩余的 13 株菌分化为 3 组: 黄曲霉 CICC2219、CICC2404、CICC2390 聚为一组; 5 株酱油曲霉(AS3.495、AS3.661、AS3.880、CICC2005、CICC2395) 位于同一进化支上; 黄曲霉 GIM3.18 单独分化。然而, 在以酱油曲霉为主的进化枝条上出现了两株米曲霉(GIM3.451、CICC2357) 和两株黄曲霉(GIM3.17、CICC2402), 并且 GIM3.17、CICC2357、CICC2402 是产黄曲霉毒素的菌株。穿刺培养很难从形态特征上区分这些产黄曲霉毒素的菌株(图 4), 而基于 RAPD 分子标记的分类分析能够清晰地将它们彼此分开, 这为检出这些时常污染酿造工业生产的产黄曲霉毒素的菌株提供了比较理想的技术手段。

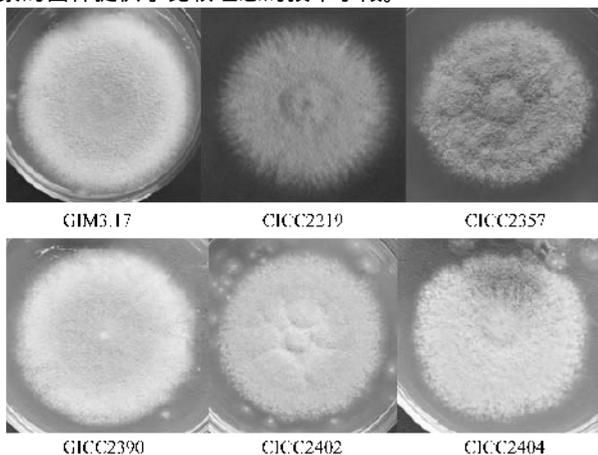


图 4 产黄曲霉毒素菌株的形态特征

Fig.4 The morphological characteristics of the six aflatoxin-producing strains.

3 讨论

真菌类群的分类研究, 长期以来局限于以形态学性状为主的分析, 主要依靠菌丝、色素、无性世代的形态、性征、致病性等特征进行分类^[8,9]。而这些形态学性状易受环境条件的影响而不稳定, 使得不同研究者的研究结果并不一致, 甚至偏差很大, 因此其分类研究一直比较混乱。近年来, 随着血清学、酶学、分子生物学以及计算机技术等逐步应用到真菌分类学中^[9,10], 真菌的分类研究有了长足的发展。

黄曲霉菌群中包括许多重要的工业微生物, 在酿造工业中具有重要的应用。然而一些黄曲霉菌株能够产生黄曲霉毒素, 被其污染的酿造产品具有强烈的致癌性, 能引起人、家禽、家畜中毒以至死亡。本文结合传统的分类指标, 探索了 RAPD 分子标记在曲霉菌分类研究中的应用。从总体上看, 基于 RAPD 分子标记的分子系统学与基于基因组 DNA 的形态分类学具有良好的吻合度, RAPD 扩增谱带能较好地反映试验菌株之间的遗传距离, 将其应用于此类真菌的系统发育分析是可行的。同时, 本研究为区别、鉴定酿造工业中产黄曲霉毒素的污染菌株进行了有益的探索。

研究表明, RAPD 分子标记能够比较全面地反映被测生物基因组 DNA 的多态性^[11], 从而可以反映不同生物间的亲缘关系。RAPD 分子标记灵敏度高, 速度快, 操作简便, 不易受环境、发育等因素的影响, 并且无需知道待鉴定生物的基因组信息, 特别适合于基因组信息了解甚少的真菌类群的系统发育分析^[12,13]。研究中发现, 虽然基于 RAPD 分子标记的分子系统学与基于基因组 DNA 的形态分类学具有良好的吻合度, 但二者总有一定程度的偏离。造成这种现象的原因是与不同分类水平相关的, 是与它们反映的基因组多态性信息的程度相关的^[8,14], 因此二者不可能完全吻合。这也从另一方面说明分类研究应综合应用各种技术手段, 才能得到比较客观、准确的分类结果。此外, 有关资料表明, RAPD 技术的高灵敏性导致其重复性差、不稳定等问题, 雷丽萍等^[15]经多次实验后认为只要扩增仪一定, 扩增条件一致, 其结果仍有高度的重复性。只要筛选到合适的引物, RAPD 分子标记作为种内或种间的分类鉴定指标是可行的。

参 考 文 献

- [1] Hanafy MF, Henry TW, Leslie LD. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of *Gaeumannomyces* species. *Soil Biol Biochem*, 1996, 28(6): 703-710.
- [2] 尹燕妮, 陈永芳, 李师默, 等. 植物病原棒形细菌的 RAPD 分析. *微生物学报*, 2005, 45(6): 837-841.
- [3] 李钧敏. 土壤可培养细菌 DNA 的提取及 RAPD 条件的优化. *微生物学通报*, 2003, 30(5): 5-9.
- [4] 陈勇, 倪汉文. 稗草致病菌-尖角突脐孢菌菌株 RAPD 指纹图谱的分析. *微生物学报*, 2003, 43(4): 409-416.
- [5] Laura EV, Joseph OF. Comparison of methods for isolation of *Mycobacterium avium* complex DNA for use in PCR and RAPD

- [6] Sameer S, William P, Robert L, *et al.* Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates by degenerate (D-) RAPD fingerprinting. *Molecular and Cellular Probes*, 1995, 9(6):405 - 414.
- [7] 孔秀英, 葛春民, 贾继增, 等. 山羊草属五个基本基因组系统发育的 RAPD 分析. *植物学报*, 1999, 41(4) 393 - 397.
- [8] 宓鹤鸣, 邢旺兴, 程荣珍, 等. 随机扩增多态性 DNA 技术在中药红曲基原菌系统分类中的应用. *第二军医大学学报*, 2000, 21(10) 944 - 946.
- [9] 谢艺贤, 郑服丛. 应用 DNA 分子进行真菌分类的原理及方法. *华南热带农业大学学报*, 2000, 1(1) 35 - 40.
- [10] Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, *et al.* Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(2) 765 - 771.
- [11] 唐传红, 张劲松, 陈明杰, 等. 利用拮抗试验和 RAPD 对灵芝属菌株进行分类研究. *微生物学通报*, 2005, 32(5) 72 - 76.
- [12] Yuan GF, Liu CS, Chen CC. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(6) 2384 - 2387.
- [13] Véronique LG, Jean-Louis P, Beate H, *et al.* Typing of *Clostridium perfringens* strains by use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) system in comparison with zymotyping. *Anaerobe*, 1997, 3(4) 245 - 250.
- [14] 邢旺兴, 宓鹤鸣, 陈士景, 等. 不同产地红曲基原菌的 RAPD 分析. *药学实践杂志*, 2001, 19(3) 163 - 165.
- [15] 雷丽萍, 白万明, 李天飞, 等. RAPD 在捕食性真菌遗传特性分析及分类鉴定中的应用. *云南农业大学学报*, 1998, 13(1) 6 - 9.

RAPD analysis of *Aspergilli* and its application in brewing industry

PAN Li, WANG Bin*, GUO Yong

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract Phylogenetic analysis of sixteen *Aspergilli* was done by RAPD technology using *Aspergillus oryzae* AS3.951, *Aspergillus flavus* GIM3.18 and *Aspergillus sojae* AS3.495 as controls. First, genome DNA of the sixteen test strains were prepared by improved extraction method, and their quality was verified by electrophoresis and spectrophotometry. They displayed an identical band (approximately 20kb) in agarose gel electrophoresis, which conformed to the fact that these strains all belong to *Aspergillus*. OD_{260}/OD_{280} of the prepared DNA ranged from 1.80 to 1.90, illustrating that they were good enough to be used as templates in the following RAPD-PCR experiment. Then, three appropriate primers (Primer1, Primer2, Primer5) for RAPD-PCR were screened from nine random primers, and repetitive experiments demonstrated that the RAPD-PCR polymorphic patterns of the sixteen test strains based on these three primers were stable. There were usually 8 ~ 14 bands in their RAPD-PCR patterns, where the number of the main bands was 4 ~ 9 and the secondary bands were abundant. There were totally 181 bands in their RAPD-PCR patterns, where the percentage of polymorphic bands reached to 40.9% (74 bands). The similarity coefficient between the strains was calculated based on their RAPD-PCR patterns, ranging from 8.0% to 96.6%. All these data suggests that the genetic polymorphism of the strains is abundant and they have evident genetic differentiation. The phylogenetic tree of the sixteen test strains was reconstructed according to their RAPD-PCR patterns with Primer1, Primer2 and Primer5. It basically corresponded to traditional morphological taxonomy, demonstrating that the application of RAPD molecular marker in the phylogenetic analysis of these *Aspergilli* is feasible. Besides, the aflatoxin-producing strains (GIM3.17, CICC2219, CICC2357, CICC2390, CICC2402, CICC2404) could be easily discriminated by RAPD molecular marker, whereas it is difficult to distinguish them by conventional morphological taxonomy. Consequently, RAPD molecular marker provides a novel clue to discriminating aflatoxin-producing strains in brewing industry.

Keywords : *Aspergilli* ; RAPD ; phylogenetic analysis ; aflatoxin