

荧光定量 PCR 检测霉变烟叶中米曲霉方法的建立

蓝东明¹, 唐庆芸¹, 杨博², 王永华¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 为建立快速高效的烟草霉变微生物定量与定性的检测方法, 本研究针对陈旧烟叶中分离的米曲霉的 rDNA ITS1 基因片段设计一对特异引物, 制备含 ITS1 基因的重组质粒作为阳性对照, 建立了米曲霉基因组的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法。结果显示, 标准曲线的相关系数为 0.998, 最低可检测浓度为 10^1 copy/ μ L 的阳性质粒, 与其他的微生物的基因组不发生交叉反应, 该技术可为检测烟叶霉变微生物提供快速可靠的检测手段。

关键词: 丝状真菌; 荧光定量 PCR; 烟草

文章编号: 1673-9078(2013)7-1721-1724

Establishment of a Real-time PCR Assay for Detection of Mold Fungi in Tobacco

LAN Dong-ming¹, TANG Qing-yun¹, YANG Bo², WANG Yong-hua¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To establish a rapid and effective detection method for mold fungi in tobacco, a real-time PCR assay based on SYBR Green I was developed with a pair of primers designed according to the rDNA ITS1 gene of *Aspergillus oryzae* isolated from commercial tobacco. A recombinant T-vector containing the ITS1 gene was constructed as a positive control. The correlation coefficient of the standard curve was 0.998 and was highly sensitive with a detection limit of 10^1 copy/ μ L of positive recombinant plasmid. The technology was specific toward the genome of *Aspergillus oryzae* without any cross-reaction with other microbe genome. The developed real-time PCR method in this study can be used for detection of mold fungi in tobacco.

Key words: mold fungi; Real-Time PCR; tobacco

烟叶是具有较高经济价值的商品, 但烟叶表面残留的微生物在适合的环境条件下, 能够利用烟叶的营养物质进行繁殖, 导致烟叶发生霉变^[1]。烟叶霉变会导致烟叶原本的香味消失, 品质下降, 丧失使用价值; 严重霉变的烟叶甚至可能产生毒素, 影响消费者吸食烟草的安全^[2]。对烟叶霉变发生的预防和控制, 一直是烟草行业中重要的课题。造成烟叶霉变的最根本源头是霉菌, 黄福新、李春艳等研究我国多地烟仓的霉变烟叶, 发现引起烟叶霉变的微生物主要是曲霉和青霉, 其中曲霉是优势菌群^[3-4]。对引起烟叶霉变的微生物进行实时的监控, 在烟叶霉变的早期作出有效的预警, 能让企业能及时采取相应措施, 防治进一步的损失。传统检验烟叶霉变的方法一般是眼看、手捏、鼻

收稿日期: 2013-03-17

基金项目: 广州市科技发展重点项目(粤烟 22120111 科字第 15 号)

作者简介: 蓝东明 (1980-), 男, 博士, 讲师, 分子生物学; 唐庆芸

通讯作者: 王永华 (1973-), 女, 博士, 教授, 工业酶与生物脂质及食品安

全

闻或通过检测菌落密度, 以烟叶中霉菌数高于 $2.5\sim 3.0\times 10^3$ cfu/g 作为烟叶霉变的临界值, 但这些方法耗时长、准确性低且带有滞后性^[2]。荧光定量 PCR 技术是在普通 PCR 方法的基础上改进的可对微生物进行定量定性的检测方法, 由于具有快速、准确、灵敏、重现性好等优点, 已广泛应用在食品安全检测、医学、生命科学等多个领域^[5-6]。本文从陈旧烟丝中分离出一株米曲霉菌, 并建立了荧光定量 PCR 技术对米曲霉进行快速检测, 旨在建立一个快速、准确判断烟叶霉变程度的检测方法。缺烟草霉变微生物的综述, 特别是相关的检测方法。另外本文只是做了米曲霉, 但题目等都是讲烟草霉变微生物。建议添加修改相关内容。

1 材料与方法

1.1 实验材料

陈旧烟丝在市场上购买获得。

1.2 试剂

PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)固体培养基购自

广东环凯微生物科技有限公司; 溶壁酶购自广东省微生物菌种保藏中心; RNA 酶、Taq DNA 聚合酶, dNTP mixture, DNA marker, pMD18-T 载体试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司均购自宝生物工程(大连)有限公司; 引物由上海生物工程公司合成; 其余试剂均为进口分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 烟丝表面真菌的分离与纯化

用已灭菌的镊子取小撮烟丝, 分别置于 PDA 培养基上, 30 °C 倒置培养 2~4 d。菌落长出后观察菌落的外观形态, 挑选形态不同的菌落, 挑取前缘菌丝, 回接于 PDA 斜面培养基上培养, 直至获得纯培养。(什么培养基)接种到 PDA 平板中央, 30 °C 倒置培养 2~4 d。分离培养直到出现单菌落(这个是很重要的关键点, 牵涉到你如何得到单菌落, 是 1.3.3 实验的基础, 否则有可能混杂不同的霉菌, 你测序不出来的, 请较详细说明)。待菌落生长好后, 观察菌落的外观形态, 并在光学显微镜下观察真菌的菌丝及分生孢子梗的形态。

1.3.2 基因组 DNA 的提取^[7]

将真菌菌丝接种于 PDA 液体培养基中, 30 °C 培养 2 到 3 d。取足量菌体, 滤纸过滤。加入 5 mL 2% 溶壁酶, 30 °C 保温 2 h。加入 1 mL 的 10% SDS、3 mL 氯化苄, 用漩涡仪剧烈震荡, 使管内混合物呈乳状。50 °C 保温 1 h, 每隔 10 min 振荡混合一次。再加入 3 mL 3mol/L NaAC 混匀, 冰上放置 15 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清。加入 3 mL 饱和酚, 涡旋振荡 60 s 后, 8000 r/min 离心 5 min。再加入 3 mL 氯仿混匀, 常温下 8000 r/min 离心 5 min。这个步骤重复 2 到 3 次直到两液层间不出现白色产物。将上清液转移到干净的离心管中, 加入 10 μL RNA 酶 (5 mg/mL), 放置在 37 °C 反应 10 min 消化 RNA。反应后加入 3 mL 氯仿, 混匀后常温 8000 r/min 离心 5 min。将上清液转移到干净的离心管中, -20 °C 保存。

1.3.3 真菌 ITS (Internal transcribed spacer) 序列扩增及分析

真菌 ITS 区基因扩增: 采用通用引物 ITS-1: (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') 和 ITS-4: (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[8]。反应体系为 100 μL, 10×Buffer: 10 μL; dNTP: 5 μL; 引物各: 5 μL; Taq DNA 聚合酶: 3 μL; 基因组 DNA: 5 μL, 无菌水补足体积 100 μL。PCR 程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物取样进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 上样量 5 μL, 采用 80 V 电压, 电泳 30 min 后, 利用紫外凝胶成像系统检测扩增情况。

PCR 产物送往华大基因进行测序, 获得基因序列后, 通过 Blast 软件分析。

1.4 荧光定量 PCR 检测方法的建立

1.4.1 引物设计

根据 1.3.3 获得真菌 ITS1 基因的核苷酸序列, 应用 Primer express 3.0 软件设计出荧光定量 PCR 引物, 上游引物为: 5'- GCTTGATGGGCAGCAATGAC-3' 下游引物: 5'-GATGAAGAACGCAGCGAAAT-3', 引物扩增的核酸片段的理论大小 136 bp。

1.4.2 荧光定量 PCR 反应体系及条件

反应体系为 25 μL: SYBR® Premix ExTaq™ II 12.5 μL, PCR Forward Primer 1 μL, PCR Reverse Primer 1 μL, 模板 2 μL, 无菌水 8.5 μL。反应条件为: 95 °C 30 S; 95 °C 5 S, 60 °C 30 S (136 bp) (40 个循环); 绘制融解曲线。荧光定量 PCR 仪为罗氏公司的 LightCycler® 480, 并使用荧光定量 PCR 仪自带软件分析数据。

1.4.3 阳性质粒标准品的制备

将真菌 ITS1 PCR 扩增产物纯化后, 连接到 pMD18-T 载体中, 并转化 DH5α 感受态细胞。应用菌落 PCR 方法鉴定阳性克隆, 并提取阳性的重组质粒, 进一步交由华大基因公司进行测序验证, 测序正确后将此质粒作为标准品, 用于荧光定量 PCR 检测。

1.4.4 荧光定量 PCR 特异性

提取巨大芽孢杆菌, 毕赤酵母和米曲霉等微生物的基因组 DNA, 并以各菌株的基因组 DNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 观察分析是否出现扩增曲线, 以验证其荧光定量 PCR 引物的特异性。

1.4.5 荧光定量 PCR 敏感性

利用紫外分光光度计检测质粒 260 nm 吸光值, 并根据质粒的分子量确定本试验制备的阳性重组质粒原液的拷贝浓度, 按倍比稀释, 分别稀释为 10⁷ 拷贝/μL, 10⁶ 拷贝/μL, 10⁵ 拷贝/μL, 10⁴ 拷贝/μL, 10³ 拷贝/μL, 10² 拷贝/μL, 10¹ 拷贝/μL, 以不同浓度的阳性质粒作为模板进行荧光定量 PCR, 观察分析扩增曲线的情况, 以评价其敏感性。

1.4.6 标准曲线

将已知拷贝数的阳性质粒倍比稀释作为模板, 进行荧光定量 PCR 扩增, 得到相应的扩增曲线, 并计算 Ct 值与阳性质粒拷贝数的线性对应关系, 产生相应的标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 陈旧烟丝表面真菌分离

从烟丝样品中分离获得一株真菌, 其菌落形态及

显微镜观察结果如图 1 所示：菌株在 PDA 培养基上生长良好，培养 4 d 后，菌落直径 4~5 cm，菌落呈黄绿色。显微镜观察可见，分生孢子梗较长，稍粗糙，无横隔。孢子梗顶端为球形，表面长满一层辐射状小梗，小梗顶端着生成串的球形分生孢子。丝状真菌是造成烟叶霉变的主要微生物类群。王革等人对云南烟叶贮藏期霉变微生物进行了调查，共发现了八种不同类型的曲霉^[9]。邱立友等对烤烟叶面微生物进行了分离，发现烟叶上的霉菌分别有曲霉属、青霉属、木霉属等^[10]。

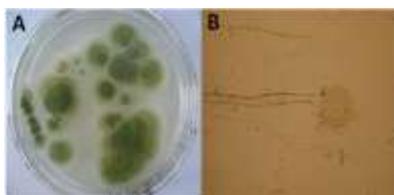


图 1 烟丝真菌的形态及显微镜检测

Fig.1 Colonial and macroscopic morphology of the mold fungi from store tobacco and analysis of their conformation

2.2 分子生物学鉴定

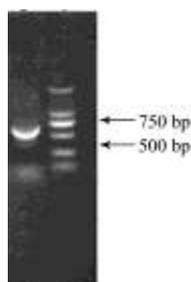


图 2 rDNA ITS 扩增产物电泳检测

Fig.2 Electrophoresis analysis of PCR products of rDNA ITS

以真菌的基因组作为模板，利用 ITS1 通用引物进行扩增，经琼脂糖凝胶电泳和紫外进行检测，如图 2 示，PCR 产物单一特异性条带，大小为 500 bp 左右。纯化的 PCR 产物克隆到 pMD-18T 载体中，同时对其测定其序列。将 ITS 区段序列与 NCBI 基因数据库内的已知菌株的相应序列进行比对 (Blast)，根据真菌的形态特征和培养性状，结合 ITS 同源性比较结果，鉴定该菌株为米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。传统的微生物分类鉴定主要根据微生物的形态、生长及生理生化等特征进行分类，但由于微生物种类繁多，种属甄别难度较大。朱宏建等人对从霉变烟叶中分离五种真菌，通过分子生物学方法对 18S rDNA 的 ITS 进行分析，确定了这些微生物为土生曲霉，米曲霉及黑曲霉等^[11]。

2.3 荧光定量 PCR 标准曲线

以含有米曲霉 ITS 序列的阳性质粒标准品进行倍比稀释作为模板进行荧光定量 PCR，利用

LightCycler@480 分析软件进行数据分析，以阳性标准品的拷贝数为 X 轴，以 CT 值为 Y 轴，建立标准曲线 (如图 3)。标准曲线的斜率为 3.295，截距为 38.80， R^2 值为 0.998，因而得到的标准曲线的方程为： $y = -3.295x + 38.80$ 。而且溶解曲线分析 (如图 4) 所示溶解曲线出现单一的峰图，没有出现其他的杂峰，表明没有非特异性扩增或引物形成二聚体，设计的荧光定量 PCR 引物特异性高。另外，荧光定量 PCR 扩增的片段长度为 136 bp，其熔解温度是 86 °C 比理论值 95 °C 要小。荧光定量 PCR 方法是一种快速准确进行定量定性的方法，广泛用于食品，医学及有害微生物检测中^[12]。但利用荧光定量 PCR 方法对烟叶霉变微生物进行检测，国内鲜有报道。相对于探针法，SYBR Green I 染料法价格便宜，操作简单，引物不需要进行化学修饰，尽管反应的特异性不如探针法，但通过设计特异的引物以及对溶解曲线分析，可以获得满意的效果。

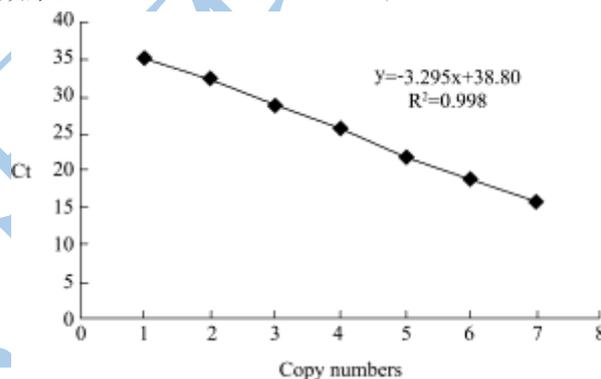


图 3 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.3 Standard curve of real-time PCR

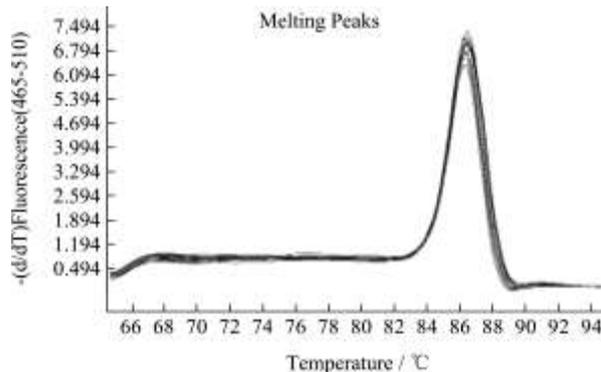


图 4 溶解曲线分析

Fig.4 Melting curve analysis

2.4 荧光定量 PCR 特异性检测

将巨大芽孢杆菌，毕赤酵母和米曲霉的基因组 DNA 作为模板进行荧光定量 PCR 扩增，如图 5 所示，只有米曲霉的基因组能检测出明显的扩增曲线，而其他的细菌及真菌的基因组均没有检测出来，结果表明所设计的检测米曲霉的应该定量 PCR 引物非常特异。

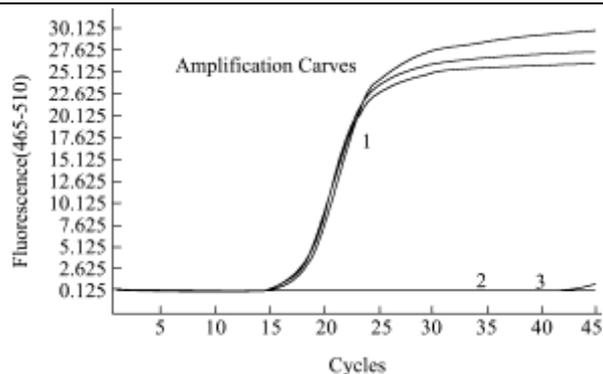


图5 荧光定量 PCR 特异性检测

Fig.5 Specific analysis of real-time PCR

注：1：米曲霉；2：巨大芽孢杆菌；3：毕赤酵母。

2.5 荧光定量 PCR 敏感性检测

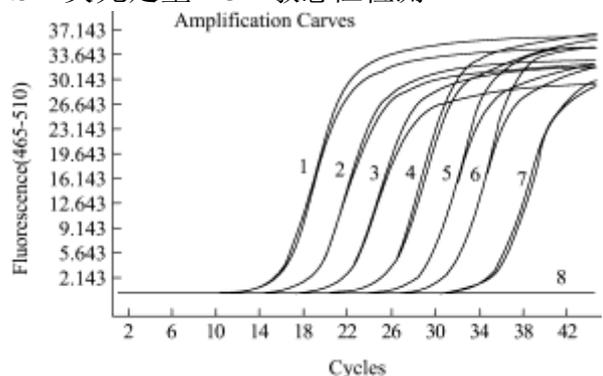


图6 荧光定量 PCR 敏感性检测

Fig.6 Sensitive analysis of real-time PCR

注：1： 10^7 拷贝/ μL ；2： 10^6 拷贝/ μL ；3： 10^5 拷贝/ μL ；4： 10^4 拷贝/ μL ；5： 10^3 拷贝/ μL ；6： 10^2 拷贝/ μL ；7： 10^1 拷贝/ μL ；8：对照。

利用建立的荧光定量 PCR 方法对含量为 $10^7/\mu\text{L}$ 至 $10^1/\mu\text{L}$ 阳性标准品进行检测，结果如图 6 所示，检测浓度为 $10^1/\mu\text{L}$ 拷贝数，能检测出扩增曲线，而低于此浓度没有扩增曲线。因此建立的荧光定量方法最低的检测浓度为 $10^1/\mu\text{L}$ 。相对于普通的 PCR 检测，荧光定量 PCR 检测方法使用了荧光染料因而非常灵敏，反应结束后无须对反应产物进行检测，且整个反应过程只需要 40 多分钟，提高了检测的效率。

3 结论

本研究从陈旧烟丝中分离一株丝状真菌，通过微生物形态学观察以及 rDNA ITS 分析法，确定分离的丝状真菌为米曲霉。以分离获得的米曲霉作为模式微生物，设计了一对特异的检测引物，建立了荧光定量 PCR 的检测方法，检测最低的阳性质粒的拷贝数为 $10^1/\mu\text{L}$ 。本研究建立的荧光定量 PCR 方法为霉变烟叶中米曲霉的早期检测提供快速、灵敏及可靠的方法。

参考文献

- [1] 雷丽萍, Bush L, Coyne MS, et al. 烟叶生长和晾制期间细菌种群动态变化[J]. 中国烟草科学, 2001, 3:4-6
- [2] 孔凡玉, 林建胜, 张成省, 等. 储烟霉变机理与防霉技术研究进展[J]. 中国烟草学报, 2009, 15(5):78-81
- [3] 黄福新, 周兴华, 朱桂宁, 等. 广西烟仓霉变发生状况调查及主要霉变因素探讨[J]. 广西农业科学, 2007, 38(4):411-414
- [4] 李春艳, 赵高岭, 叶红朝, 等. 河南烟叶仓储期优势霉菌的分离鉴定及防霉剂的筛选[J]. 烟草科技, 2011, 7:64-68
- [5] Schaada N, Fredericka R. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2002, 24(3): 250-258
- [6] 黄海泉. 实时荧光定量 PCR 技术在植物检疫中应用的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(1):5-8
- [7] 吴琦, 王红宁, 刘世贵. 三种黑曲霉细胞基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 生物技术, 2003, 13(6):30-31
- [8] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications [J]. Academic, San Diego, 315-322
- [9] 王革, 张中义, 孔华忠, 等. 云南烟叶贮藏期霉变研究(1)-曲霉[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(4):356-359
- [10] 邱立友, 赵铭钦, 岳雪梅, 等. 自然发酵烤烟叶面微生物区系的分离鉴定[J]. 烟草科技, 2000, 3:14-17
- [11] 朱宏建, 孙元华, 刘燕娟, 等. 片烟贮藏期霉菌的分子鉴定及杀菌剂的室内毒力测定[J]. 中国烟草学报, 2011, 17(2):63-66
- [12] Malorny B, Paccassoni E, Fach P, et al. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food [J]. Applied and Environmental Microbiology 2004, 70(12):7046-7052