

成都市售辣椒中产黄曲霉毒素菌株的分离及其基因分析*

凌莉¹, 叶正茂¹, 王溯源¹, 金燕¹, 陈宇航¹, 郑田利¹, 张立实^{1,2}, 裴晓方^{1,2,△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041); 2. 四川省食品安全监测与风险评估重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 从成都市售辣椒粉中,分离产黄曲霉毒素的菌株,探究产毒基因 *aflR*、*omt-1* 和 *ver-1* 与产黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)能力的关系。**方法** 采用传统培养法分离菌株,多重 PCR 方法筛查潜在产黄曲霉毒素菌株,对潜在产黄曲霉毒素菌株进行产毒培养,以 ELISA 方法检测潜在产毒株 7 d 产毒培养液中 AFB₁ 含量;同时基于潜在产毒株的产毒关键基因 *aflR*、*omt-1* 和 *ver-1* 构建系统进化树,分析其同源性。**结果** 64 份辣椒样品中,分离到 17 株潜在产 AFB₁ 的黄曲霉菌株,有 11 株分离株产毒,产毒黄曲霉分离率为 64.71%;且基于 *aflR*、*omt-1* 和 *ver-1* 基因与产毒标准菌株有较高同源性;有 6 株分离株不产毒,与米曲霉序列有较高同源性。**结论** 控制黄曲霉污染是黄曲霉控制中重要的环节之一。并非含有产毒基因的黄曲霉都会产 AFB₁ 毒素,产 AFB₁ 能力与产毒基因 *aflR* 的序列有着直接联系,而 AFB₁ 合成量的高低与 *omt-1* 和 *ver-1* 基因有关。

【关键词】 黄曲霉毒素 B₁ 黄曲霉 辣椒粉 同源性分析 *AflR* *Omt-1* *Ver-1*

Isolation and Study on the Aflatoxin Genes of Aflatoxin-producing Fungi in Paprika Samples in Chengdu LING Li¹, YE Zheng-mao¹, WANG Su-yuan¹, JIN Yan¹, CHEN Yu-hang¹, ZHENG Tian-li¹, ZHANG Li-shi^{1,2}, PEI Xiao-fang^{1,2,△}. 1. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Risk Assessment, Sichuan Province, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: xxpeiscu@163.com

【Abstract】 Objective To isolate aflatoxin-producing strains from paprika samples and to do a preliminarily study on the relationship between aflatoxin-producing ability and the genes *aflR*, *omt-1* and *ver-1*. **Methods** Fungi were isolated by traditional culture method. Potential aflatoxin-producing strains were screened by phenotypic traits and multiplex PCR. After these potential aflatoxin-producing strains cultured in the toxigenic culture medium, the levels of aflatoxin B₁ (AFB₁) of the cultures were tested with ELISA method. The phylogenetic tree of *aflR*, *omt-1* and *ver-1* was constructed to explore the relationship between these genes and the AFB₁-producing capacity. **Results** 17 potential aflatoxin-producing fungi were isolated. The ratio of positive toxigenic strains is 64.71%. 11 isolates were positive in AFB₁ detection while existing high sequence homology with AS 3.4408, 6 isolates were negative in AFB₁ detection while existing high sequence homology with *Aspergillus oryzae*. **Conclusion** *Aspergillus flavus* are potential candidates for aflatoxin control. Not all *Aspergillus flavus* have AFB₁-producing capacity, *aflR* gene had a direct relation to AFB₁-producing capacity, while *ver-1* and *omt-1* were related to the level of AFB₁ producing.

【Key words】 Aflatoxin B₁ *Aspergillus flavus* Paprika Homology analysis *AflR* *Omt-1* *Ver-1*

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)具有极强毒性,还有致癌、致畸、致突变的作用,是食品安全和公共卫生的一大威胁^[1]。黄曲霉毒素主要是由黄曲霉群的黄曲霉和寄生曲霉真菌产生,主要包括 B₁、B₂、G₁、G₂ 及 B₁、B₂ 在体内经过羟化衍生而成的代谢产物 M₁、M₂ 等 10 多种,其中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)毒性最强^[2]。

AF 的生物合成过程非常复杂,已知至少涉及

到 21 步酶促反应和 17 种不同的酶^[3],其中 *aflR* 是 AF 生物合成最重要的调节基因,为其他 AF 合成相关基因的表达所必需,*aflR* 的中断可抑制其他 AF 合成相关基因的表达^[4]; *ver-1* 基因的表达产物在 AF 合成过程中催化杂色曲菌素 A 转变为毒性较高的中间产物杂色曲霉素^[5]; *omt-1* 基因(或称 *omt-A*)编码柄曲霉素转甲氧基酶,作为调节基因编码一个特异性的 DNA 结合蛋白,以活化生物合成途径^[6]。上述 3 个基因都是 AF 生物合成过程中的关键基因,只要缺少其中之一均不能合成 AF^[7],产毒基因对黄曲霉毒素生物合成的影响已有不少报

* 国家自然科学基金重点项目(No. 81030053)资助

△ 通讯作者, E-mail: xxpeiscu@163.com

道^[4,8-10],但是在同样的外界环境下,产毒能力不同的黄曲霉菌株在产毒基因上是否存在突变,这对于制定预防和控制黄曲霉毒素产生的策略具有重要意义。而且对于香辛料,比如辣椒中黄曲霉分离株的研究还未有文献报道。

因此,本研究通过表型和多重 PCR 方法筛选出辣椒样品潜在产黄曲霉毒素菌株后,进行了产毒培养和产毒能力验证,结合菌株实际产毒能力对产毒基因进行同源性分析,初步探究产毒基因与产毒能力的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 黄曲霉标准菌株 AS 3.4408(购自中国普通微生物保藏中心)。

1.1.2 主要试剂 察氏琼脂(CDM)、孟加拉红培养基(RBM)、产毒培养基:北京陆桥技术有限责任公司;BASO[®]棉蓝染色液:珠海贝索生物技术有限公司;PriboFast[®] AFB₁ 酶联免疫检测试剂盒:北京泰乐祺科技有限公司;Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒:BioFlux;PCR 试剂:TIANGEN, Primers (PAGE purified) Invitrogen 公司;Tween-20;Sangon;甲醇:四川成都科龙化工试剂厂;dNTPs (10 mmol/L):Roche。

1.2 方法

1.2.1 辣椒黄曲霉菌株分离方法 称取辣椒粉样品 25 g,加入 225 mL 生理盐水使用均质器混匀后,吸取 1 mL 依次稀释为原液浓度的 10^{-2} 到 10^{-4} ,分别取各浓度液 1 mL,倾注 15~20 mL 孟加拉红培养基,充分混匀,28 °C 培养 5 d 后,初步观察菌落形态,将黄曲霉疑似菌落以三点法点种于察氏培养基中,28 °C 纯培养 5 d 后,根据菌落形态和显微镜下特征进行鉴定。

1.2.2 潜在产黄曲霉菌株基因分析 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取黄曲霉基因组 DNA,针对黄曲霉 *ITS*、*aflR*、*omt-1* 和 *ver-1* 基因序列设计扩增引物。引物序列为 *ITS* F: 5'-TCCGTAGG TGAACCTGCGG-3', *ITS* R: 5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3'; *aflR* F: 5'-CGAAAGCTCCG GGATAGCTGTACG-3', *aflR* R: 5'-CCGTCAGA CAGCCACTGGACACGG-3'; *omt-1* F: 5'-GTGG ACGGACCTAGTCCGACTCAC-3', *omt-1* R: 5'-GTCGG CGCCACGCACTGGGTTGGGG-3'; *ver-1* F: 5'-GCCGACGGCCGCGGAGAAAGGTGGT-3',

ver-1 R: 5'-CCGCAGTCAATGGCCATGCAGCG-3'。多重 PCR 反应体系为 25 μ L,依次加入 ddH₂O 11.4 μ L, 10 \times Reaction Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.0 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.6 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 8 种引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, 模版 1.0 μ L。PCR 扩增条件:94 °C 2 min;94 °C 30 s,59 °C 30 s,72 °C 90 s,共 35 个循环;72 °C 7 min。将 *aflR*、*omt-1* 及 *ver-1* 基因 PCR 产物交于上海生工生物技术公司测序,测序结果与 GenBank 中 BLAST 数据库比对,进行同源性分析,选择同源性 $\geq 98\%$ 的核酸序列。使用 Mega (Molecular Evolution Genetics Analysis) 5.0 软件进行聚类分析,采用邻接法 (neighbor joining method) 构建系统发育树。

1.2.3 潜在产黄曲霉毒素菌株的产毒能力验证 将长有疑似菌株和标准菌株 AS 3.4408 的察氏琼脂在无菌条件下切成 1 cm² 小块,分别接种于装有 250 mL 产毒培养液的锥形瓶中,28 °C 培养 7 d。过滤后的产毒培养液,以 ELISA 试剂盒测定 7 d 产毒液的 AFB₁ 毒素水平。

2 结果

2.1 辣椒中黄曲霉菌株的分离

从 64 份成都市售辣椒粉样品中共分离出 40 株黄曲霉菌株,所有样品中未检出寄生曲霉。对样品中分离的 40 株黄曲霉菌株提取基因组 DNA 作为模板,采用多重 PCR 方法进行检测,判定共有 17 株分离株为可疑产毒阳性菌株,菌株编号依次为:F1、F4、F6、F9、F12、F14、F16、F17、F18、F19、F26、F27、F28、F29、F33、F37、F39。

2.2 潜在产黄曲霉毒素菌株产毒培养液 AFB₁ 含量测定结果

见附表。7 d 产毒培养液 ELISA 检测结果显示,17 株分离株中有 11 株的产毒液检出 AFB₁,检出率为 64.71%。其中,分离株 F4 和 F37 产生 AFB₁ 含量较高,分别为 149.11、122.54 μ g/kg,标准株 AS 3.4408 产生的 AFB₁ 含量为 93.50 μ g/kg;分离株 F1、F9、F12、F14、F16、F17、F18、F19 和 F28 的产毒液中有检出 AFB₁,但含量 < 5.00 μ g/kg;分离株 F6、F26、F27、F29、F33 和 F39 的产毒液中 AFB₁ 含量低于方法检出限 (0.1 μ g/kg),可以认为未检出 AFB₁。

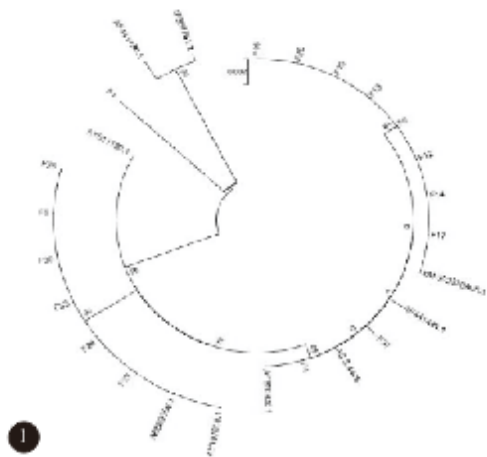
2.3 潜在产黄曲霉毒素菌株的基因分析

基于 *aflR* 基因的系统进化树显示(图 1),分离

菌株 F6、F26、F27、F29、F33、F39 聚为同一大支,与 AB569066.1 (*Aspergillus oryzae*)、AY197608.1 (*Aspergillus flavus*) 亲缘性很近; F9、F12、F14、F16、F17、F18、F19 和 F28 聚为另一大支,与 XM002379905.1 (*Aspergillus flavus*) 亲缘性较近; F4、F37 和黄曲霉标准菌株 AS 3.4408 聚为一个支,

附表 7 d 产毒培养液 AFB₁ 检测结果Table Test results of AFB₁ for the 7 d to xigenic culture medium

Levels of AFB ₁ (μg/kg)	Strain																	
	F6	F26	F27	F29	F33	F39	F1	F9	F12	F14	F16	F17	F18	F19	F28	F4	F37	AS3.4408
	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1.02	2.03	1.47	1.83	2.11	1.29	1.51	1.46	1.38	149.11	122.54	93.50

图1 基于 *aflR* 基因的系统进化树Fig 1 The phylogenetic tree of *aflR* gene

离菌株 F6、F26、F27、F29、F33 和 F39 聚为同一支,与 JN217223.1 (*Aspergillus oryzae*) 亲缘性很近; F9、F14、F17、F18、F19 和 F28 聚为同一小支,与 JN217226.1 (*Aspergillus flavus*) 和 L25836.1 (*Aspergillus flavus*) 有很高的亲缘性; F4、F12、F16 和 F37 聚为同一支,与 FN398186.1 (*Aspergillus flavus*) 亲缘性很高;黄曲霉标准株 AS 3.4408 与 FN398189.1 (*Aspergillus flavus*) 有较高亲缘性; F1 与 JN217219.1 (*Aspergillus parasiticus*) 亲缘性较近,同时也与 FN398186.1 (*Aspergillus flavus*) 和 JN217226.1 (*Aspergillus flavus*) 代表的这两支有较近亲缘性。

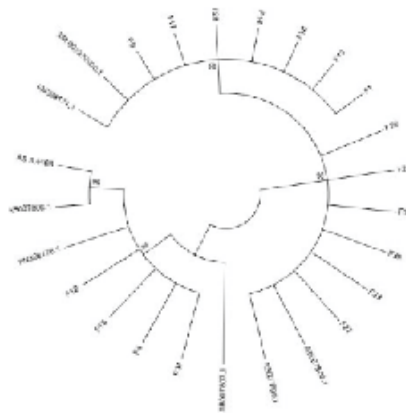
基于 *ver-1* 基因的系统进化树显示(图 3),分离菌株 F6、F26、F27、F29、F33 和 F39 聚为同一大支,与 AB007803.1 (*Aspergillus oryzae*)、AB007805.1 (*Aspergillus flavus*) 亲缘性较近; F1、F9、F14、F17、F18、F19 和 F28 聚为同一支,与 XM002379900.1 (*Aspergillus flavus*) 和 FN398174.1 (*Aspergillus flavus*) 亲缘性较近; F4、F12、F16 和 F37 聚为同一支,与 FN398176.1 (*Aspergillus*

与 AF441433.1 (*Aspergillus flavus*)、AY650936.1 (*Aspergillus flavus*) 亲缘性较近; F1 与 AY611180.1 (*Aspergillus flavus*)、AF441438.1 (*Aspergillus parasiticus*) 及 AF264761.2 (*Aspergillus sojae*) 亲缘性较近。

基于 *omt-1* 基因的系统进化树显示(图 2),分

图2 基于 *omt-1* 基因的系统进化树Fig 2 The phylogenetic tree of *omt-1* gene

flavus) 亲缘性很高;黄曲霉标准株 AS 3.4408 与 AB007806.1 (*Aspergillus flavus*) 有很高亲缘性。

图3 基于 *ver-1* 基因的系统进化树Fig 3 The phylogenetic tree of *ver-1* gene

3 讨论

在已知分类群中会产生 AFB₁ 的菌种为寄生曲霉和黄曲霉^[11]。寄生曲霉所有菌株都能产生 B 组和 G 组黄曲霉毒素,而黄曲霉只有部分菌株产毒,并且

只能产生 AFB₁^[12],因此,本研究对疑似产黄曲霉毒素菌株的分离主要针对黄曲霉和寄生曲霉。本研究观察菌落形态和镜下结构分离出了 40 株黄曲霉菌株,通过对 ITS 引物的扩增确保了分离菌株是黄曲霉或寄生曲霉,但产毒关键基因 *aflR*、*omt-1*、*ver-1* 的扩增鉴别出具有潜在产毒性能的菌株,只筛选出 17 株潜在产黄曲霉毒素的菌株,而这 17 株中,有 6 株经产毒验证不产黄曲霉毒素,黄曲霉是否产 AFB₁ 毒素与基因的有无和产毒基因的序列息息相关。

aflR、*omt-1* 和 *ver-1* 基因对 AFB₁ 的产生至关重要,对分离株 3 个基因的同源性分析显示,它们保持了很高的序列一致性,基本分为 B1 产量高、产量少和不产生 3 个大支,不产生的菌株序列在亲缘性上倾向于米曲霉,与已有报道一致。需要特别说明的是 F12、F16 基于 *omt-1* 和 *ver-1* 的亲缘性都与 F4、F37 较近,但只有 B1 产量高的 F4 和 F37 基于 *aflR* 有较高亲缘性,说明 *aflR* 对 B1 的合成起着决定性的作用。其中 F6、F26、F27、F29、F33、F39 聚为同一大支,不仅与 GenBank 中的黄曲霉序列有较近亲缘性,也与米曲霉序列同源性达 98% 以上,而这几株分离株产毒培养液中几乎检测不到 AFB₁,提示这一类分离株的产毒相关基因在进化方式上更趋向于不产生黄曲霉毒素的米曲霉,Watson 等^[13]发现可在米曲霉和酱油曲霉中检测到 *aflR*、*omt-1* 和 *ver-1* 基因,但检测不到其转录产物,说明米曲霉和酱油曲霉不产生黄曲霉毒素,米曲霉作为不产毒真菌,已经通过美国农业部的 GRAS (Generally Regarded As Safe) 认证^[14]。产毒阳性菌株 F1 虽然在菌落形态和镜下结构上更倾向于黄曲霉,但同时也与 GenBank 中的黄曲霉、寄生曲霉和酱油曲霉序列均有较近亲缘性。对于黄曲霉群,大多研究者认为米曲霉由黄曲霉进化而来,而酱油曲霉则是寄生曲霉的一个派生变种,它们的许多基因序列都有很高同源性,本研究结果也验证了这一观点;分离株 F4、F12、F16 和 F37 基于 *omt-1* 和 *ver-1* 基因的亲缘性较近,而这 4 株分离株中,F4 和 F37 产毒能力较强,且只有 F4 和 F37 基于 *aflR* 有较近亲缘性,提示 *aflR* 基因对于黄曲霉毒素的生物合成起着决定性的作用,与文献报道一致,*aflR* 基因的表达直接影响黄曲霉毒素的生物合成。

此外,通过分析分离株 *aflR*、*omt-1*、*ver-1* 基因序列比对结果和系统进化树结果,本研究还发现,在 *aflR* 基因序列中发生的碱基突变主要分化出了产 AFB₁ 菌株和不产 AFB₁ 菌株,*aflR* 基因能否正确

表达直接影响 AFB₁ 的生物合成;而 *omt-1* 和 *ver-1* 基因序列发生的碱基突变更大程度上影响 AFB₁ 合成量的高低。此结果国内外目前未见相关报道。

本研究只对 17 株黄曲霉的 3 种产毒关键基因进行了同源性研究,菌株数目较少,且未研究产黄曲霉毒素的寄生曲霉,对产毒相关基因的同源性分析还不够深入全面;鉴于黄曲霉毒素合成的复杂性,其具体机理还有待进一步证实。后续还需扩大菌株的种类和数量,进行基因变异位点的定位分析、基因表达情况分析 & 氨基酸序列的变异分析的研究。

参 考 文 献

- Groopman JD, Wogan GN. Aflatoxin and hepatocellular carcinoma. In: T. M. Penning. Chemical Carcinogenesis. 1st ed. New York: Humana Press, 2011: 113-133.
- 路子显, 伍松陵, 孙长坡. 黄曲霉毒素合成相关基因表达与环境因素的关系. 生物技术通报, 2010; 11: 56-61.
- Jiujiang Y. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. Toxins, 2012; 4(11): 1024-1057.
- Amare MG, Keller NP. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. Fungal Genet Biol, 2014; 66: 11-18. doi: 10.1016/j.fgb.2014.02.008.
- Liang SH, Skory CD, Linz JE. Characterization of the function of the *ver-1A* and *ver-1B* genes, involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. Appl Environ Microbiol, 1996; 62(12): 4568-4575.
- Motomura M, Chihaya N, Shinozawa T, et al. Cloning and characterization of the O-methyltransferase gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of demethylsterigmatocystin to sterigmatocystin and dihydrodemethylsterigmatocystin to dihydrosterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. Appl Environ Microbiol, 1999; 65(11): 4987-4995.
- 徐 进, 罗雪云. 黄曲霉毒素生物合成的分子生物学. 卫生研究, 2003; 32(6): 628-631.
- Yu J, Ronning CM, Wilkinson JR, et al. Gene profiling for studying the mechanism of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Food Addit Contam, 2007; 24(10): 1035-1042.
- Lee JW, Roze LV, Linz JE. Evidence that a wortmannin-sensitive signal transduction pathway regulates aflatoxin biosynthesis. Mycologia, 2007; 99(4): 562-568.
- Georgianna DR, Payne GA. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. Fungal Genet Biol, 2009; 46(2): 113-125.
- 张国柱, 贾珍珍, 齐祖同等. 黄曲霉菌种产生黄曲霉毒素 B₁ 的调查研究. 真菌学报, 1983; 2(4): 253-257.
- 杨生瑞, 屈凌波, 孙长坡等. 黄曲霉菌株的分离、鉴定及产毒能力分析. 中国粮油学报, 2012; 27(6): 110-114.
- Watson AJ, Fuller LJ, Jeenes DJ, et al. Homologs of aflatoxin biosynthesis genes and sequence of *aflR* in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. Applied Environ Microbiol, 1999; 65(1): 307-310.
- Machida M, Asai K, Sano M, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature, 2005; 438(7071): 1157-61.

(2014-12-29 收稿, 2015-05-08 修回)

编辑 吕 熙