

近岸污染指示半知菌灰黄青霉 (*Penicillium griseofulvum*) 的分子检测

白树猛^{1,2}, 田黎^{1,2*}, 史振平², 刘宁¹, 张久明²

(¹国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266061)

(²青岛科技大学化工学院, 青岛 266042)

摘要:【目的】通过分子方法检测近海污染环境优势种灰黄青霉, 并由此而推断污染程度做准备。【方法】根据 GenBank 中青霉属不同种和相近属种的 ITS 序列差异和灰黄青霉特有的 IAO 序列, 设计了污染区优势种灰黄青霉的特异性引物 AS1/RS4 和 IAO1/IAO2, 建立相应的特异探针检测体系。通过 PCR 和套式 PCR 技术, 分析比较两对特异序列检测灰黄青霉的差异。【结果】建立的分子检测体系可以排除其它近似或相关菌株干扰, 从环境中扩增到目的基因片段。利用引物 AS1/RS4 作为核酸探针, 通过套式 PCR 菌株 DNA 的检测灵敏度可达到 10 fg/ μ L, 当仅有 10 个数量级分生孢子时即可检测出, 从沉积物中检测灵敏度为 10² 个数量级孢子/0.25 g。特异酶基因 IAO1/IAO2 检测灵敏度较前者稍低。【结论】利用特异序列作为探针检测污染环境优势种灰黄青霉的方法可行, 在一定范围内, 灰黄青霉的出现频率及数量对污染程度有较好的指示作用。

关键词: 近海污染; 灰黄青霉; 分子检测

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0076-05

近岸海洋污染检测与治理是国家“十一五”重大技术需求, 生物检测可直接反应污染对生物的影响, 是其中不可缺少的部分。作为指示生物, 微生物具有取样方便, 反应灵敏, 研究周期短, 成本低等优势。国内外已报道的指示微生物仅涉及原核微生物^[1-3], 真核微生物(真菌)作为指示生物的研究尚未见报道。真核微生物与高等生物更为接近, 通过它们推测污染对高等真核生物的影响更为准确^[4-6]。课题组以在海洋环境中分布最广的真菌类群—半知菌作为材料, 从近海污染区域获得的半知菌中筛选出一株灰黄青霉 (*Penicillium griseofulvum*), 该菌株的出现与污染的程度有一定的关系, 不同污染物的种类和程度变化可导致该菌株

形态与色素发生不同的变化, 显示良好的指示作用。

用传统的分离培养的方法在环境中检测该菌, 受人为的影响较大, 灵敏度较低。利用分子生物学技术可使检测的准确性和灵敏度大大提高。真菌的 ITS 序列具有较高的种属特异性, 能够反映同一属内不同种间的序列差异。利用 ITS 特异序列作为核酸探针的检测陆地真菌得方法已有报道^[7], 但未见用于海洋污染环境。M. A. Dombrink-Kurtzman^[8]曾报道在灰黄青霉基因中发现异戊醇氧化酶 (Isoamyl Alcohol Oxidase, IAO) 编码基因。虽然此基因的功能作用还未了解清楚, 也未见进一步利用, 但是该基因发现仅存在于青霉属的灰黄青霉种的基因组中, 也具备作为基因特异探针的潜力。本文通过 PCR 和套式

基金项目: 国家自然科学基金 (40776098, 40976104)、国家高技术研究发展计划 (2007AA09Z435, 2007AA091507, 2008AA09Z407)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-532-88967423; E-mail: wshw8@yahoo.com.cn

作者简介: 白树猛 (1983-) 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 从事海洋微生物的研究。

收稿日期: 2009-06-22; 修回日期: 2009-08-15

PCR 技术,分别研究比较 ITS 序列和 IAO 序列对灰黄青霉(*P. griseofulvum*)检测的可能性和灵敏度差异,为进一步在海洋环境应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:污染区优势种灰黄青霉菌株 JYX-201(*P. griseofulvum*)为本实验室筛选获得并保存。

1.1.2 主要仪器和试剂:PCR 仪、凝胶电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司;Taq 酶(加拿大 Fermentas 公司);dNTP(美国 Promega 公司);Ultra Clean™ Soil DNA Kit(美国 MOBIO Labs 公司);DNA marker 购自广州东盛生物科技有限公司;引物合成由上海生物工程公司完成。

1.2 样品与菌株 DNA 提取

将 JYX-201 菌株接种在海水 PDA 培养基中,在 25℃ 培养 18 h,收集菌丝体待用;同样方法培养至 7 d,收集分生孢子,用无菌水稀释过滤,得到孢子悬浮液,以血球计数板测定分生孢子浓度。取 300 μL 孢子悬浮液置于 Eppendorf 管中。收集菌丝体和分生孢子均采用玻璃珠法提取基因组 DNA^[9]。

收集胶州湾近海沉积物样品,取 0.25 g 至 2 mL BeadSolution 离心管中,涡旋混匀,采用 Ultra Clean™ Soil DNA Kit^[10] 提取沉积物样品的 DNA。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

1.3.1 引物 AS1/RS4 设计:根据 GeneBank 中 *Penicillium* 属不同种和相近属种的 ITS 序列(登录号为:EU888291、FJ549439、FJ549440、FJ549438、DQ339557、DQ767598、DQ767603、DQ767591、DQ810190、DQ810194、DQ339565、AY373939、AY373843、AY373937、DQ339568、EU272527、AY306014、FJ571468、EU128614、FJ487938、EU272527、AY306014、AY373941、EU021618、EF669983、EF669708)进行比对分析,根据单核苷酸多态性原理,综合考虑引物对 3' 末端、T_m 值以及避免形成二级结构的要求,设计了 *P. griseofulvum* 的特异性引物 AS1/RS4。序列如下:AS1:5'-CCTGC GGAAGGATCATTACT-3';RS4:5'-CAATTCACATTA CGTATCGCAC-3'。扩增目标产物 267 bp。

1.3.2 引物 IAO1/IAO2 设计:基于 Isoamyl Alcohol Oxidase (IAO) 编码基因设计菌株灰黄青霉(*P. griseofulvum*)特有引物。序列如下:IAO1:5'-TACG GTGCTCGCTCTTCTTCC-3';IAO2:5'-TTTCTCGCTTCC CTCGCTCAT-3'。扩增目标产物 347 bp。

1.3.3 常规 PCR 反应:为保证 PCR 扩增产物的特异性,对扩增反应体系和条件进行优化,用于检测的 PCR 扩增反应体系为 50 μL,包括:相应浓度的 DNA 模版 1 μL,正反引物(10 μmol/L)1 μL,dNTP(2.5 mmol/L)1 μL,10 × Buffer 5 μL,MgCl₂(1.5 mmol/L)1.5 μL,DMSO 1.5 μL,BSA(0.1%)1.5 μL,无菌超纯水 36 μL, *TapDNA* 聚合酶(2 U)0.25 μL。PCR 反应程序为:94℃ 变性 5 min;94℃ 变性 1 min,57℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 50 s,32 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

1.3.4 套式 PCR 反应:以 ITS 区通用引物 ITS1/ITS4(ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[13] 作为第一轮反应引物,与上述设计的特异性引物 AS1/RS4 组合进行套式 PCR,体系同上。

以 IAO 引物 IaoRT3F/IaoRT3R(IaoRT3F:5'-ACTGACACTGCCTGCTCTTAC-3'; IaoRT3R:5'-ATCCTCAACTTGCCAGTCTTC-3')^[11] 作为第一轮反应引物,与上述设计的特异性引物 IAO1/IAO2 组合进行套式 PCR,体系同上。

1.4 PCR 扩增检测

1.4.1 设计引物特异性与稳定性检测:将课题组保存的海洋环境常分离到的半知菌包括青霉属 9 个种 *P. griseofulvum*、*P. crustosum*、*P. commune*、*P. spinulosum*、*P. expansum*、*P. sacculum*、*P. citrinum*、*P. chrysogenum*、*P. Polonicum* 和近缘属 9 个种 *Paecilomyces variotii*、*Aspergillus aculeatus*、*A. oryzae*、*Cladosporium cladosporioides*、*Nectria gliocladioides*、*Cephalosporium* sp.、*Cylindrocarpon* sp.、*Fusarium* sp.、*Monilochaetes* sp.。采用 1.2 方法提取 DNA,其中 *P. griseofulvum* 为 3 株分别来自 3 个不同海域,其余均为 1 株,用设计的引物 PCR 扩增,对设计引物的种特异性与稳定性进行检测。

1.4.2 基因组 DNA 的灵敏度检测:将 JYX-201 菌株的基因组 DNA,从 100 ng/μL 的浓度开始,逐步按 10 倍的数量级向下稀释至 1 ag/μL,从每一个浓度的样品中取 1 μL 为模板,应用两种引物分别进行常规 PCR 和套式 PCR 扩增。

1.4.3 菌株分生孢子 DNA 的灵敏度检测:菌株 JYX-201 的分生孢子计数后提取的 DNA 样品,将其浓度定为 10⁶ 个孢子/μL DNA,按 10 倍的数量级稀释到 1 个孢子/μL,分别以各个浓度的 1 μL DNA 为模板进行套式 PCR 扩增。

1.4.4 沉积物样品中 DNA 灵敏度检测:菌株分生

孢子记数后与 0.25 g 灭菌沉积物混匀,提取 DNA,并将浓度定容到 10^6 个孢子/ μL DNA,按 10 倍的梯度稀释到 1 个孢子/ μL ,分别取 1 μL 作为模板进行套式 PCR 检测。

1.4.5 近海沉积物样品 *P. griseofulvum* 的检测:从胶州湾海泊河入海口(中度污染区域)、李村河入海口(重度污染区域)和石老人海域(轻度污染区域)沉积物样品中快速提取 DNA,并将 DNA 样品浓度分别稀释至 10^{-1} 倍和 10^{-2} 倍,以菌株基因组 DNA 作为阳性对照,进行套式 PCR 检测。

2 结果和分析

2.1 设计引物特异性与稳定性

实验结果表明,两种引物都可以从 3 个不同环境分离到的菌株 *P. griseofulvum* 的 DNA 中扩增出目的条带,其它青霉属的 8 个种 *P. griseofulvum* *P. crustosum*、*P. commune*、*P. spinulosum*、*P. expansum*、*P. sacculum*、*P. citrinum*、*P. chrysogenum*、*P. Polonicum* 和近缘属 9 个种 *Paecilomyces variotii*、*Aspergillus aculeatus*、*A. oryzae*、*Cladosporium cladosporioides*、*Nectria gliocladioides*、*Cephalosporium* sp.、*Cylindrocarpon* sp.、*Fusarium* sp. PCR 扩增均无扩增条带,表明两对引物均具有很高的 *P. griseofulvum* 种的特异性,且较稳定重复操作性好,可以将环境中的该种与其它近似种区分开,作为检测 *P. griseofulvum* 的特异引物。

2.2 PCR 扩增基因组 DNA 的灵敏度检测结果

引物 AS1/RS4 在 50 μL 的反应体系中含有 10 pg/ μL 的基因组 DNA 时,仍然可以扩增到 267 bp 的特异性条带。进一步以 ITS 区通用引物 ITS1/ITS4 分别对菌株不同浓度的基因组 DNA 进行 PCR 扩增的产物为模板,以特异性引物 AS1/RS4 进行套式 PCR 扩增。结果表明,套式 PCR 产物量与单独进行特异性引物扩增的 PCR 产物量相比有明显提高,能使原来看不到扩增条带的样品(1、100、10 fg/ μL)产生相应条带,引物 AS1/RS4 的套式 PCR 反应可以使检测灵敏度至少提高 10^3 倍。

而当利用 IAO1/IAO2 作为引物进行 PCR 扩增时,只能扩增到 10 ng/ μL 的 DNA 浓度,虽然通过套式 PCR 扩增,检测灵敏度增加到 10 pg/ μL 的浓度,检测效率也提高 10^3 倍。但无论常规 PCR 还是套式 PCR,IAO1/IAO2 检测灵敏度都比引物 AS1/RS4 的灵敏度低。

2.3 分生孢子 DNA 的灵敏度检测结果

2.3.1 分生孢子 DNA 的检测结果:应用 AS1/RS4

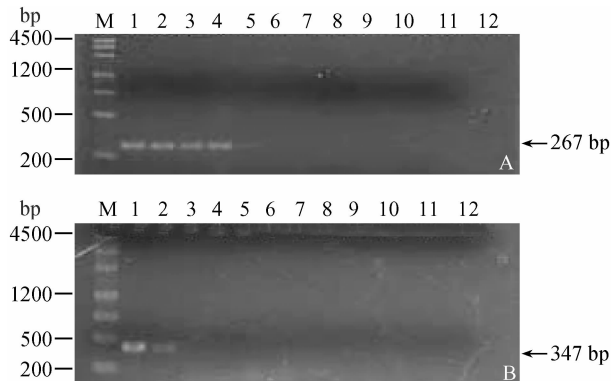


图 1 常规 PCR 扩增不同量基因组 DNA 的灵敏度检测。A:引物 AS1/RS4;B:引物 IAO1/IAO2

Fig. 1 Sensitivity of regular PCR for detection of genomic DNA. A: Primers AS1/RS4; B: Primers IAO1/IAO2. Lane M: DNA MARK3; Lane 1-12: Products amplified DNA at quantity of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 Pg, 10 pg, 1 Pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 ag, 1 ag in a 50 μL PCR reaction system, respectively.

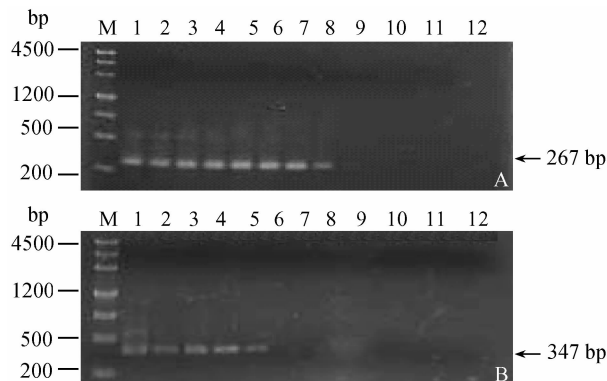


图 2 套式 PCR 扩增不同量基因组 DNA 的灵敏度检测。A:引物 AS1/RS4;B:引物 IAO1/IAO2

Fig. 2 Sensitivity of regular PCR for detection of genomic DNA. A: Primers AS1/RS4; B: Primers IAO1/IAO2. Lane M: DNA MARK3; Lane 1-12: Products amplified DNA at quantity of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 Pg, 10 pg, 1 Pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 ag, 1 ag in a 50 μL PCR reaction system, respectively.

在 50 μL 反应体系的套式 PCR 中含有 10 个数量级分生孢子的 DNA 量时还可以检测到特异性的扩增条带。而引物 IAO1/IAO2 通过套式 PCR 对分生孢子的检测灵敏度只能检测到 10^3 个数量级。

2.3.2 近海沉积物样品分生孢子 DNA 的检测结果:混入灭菌沉积物的分生孢子,应用 AS1/RS4 在 50 μL 反应体系中含有 10^2 个数量级分生孢子的 DNA 量时还可以明显检测到特异性的扩增条带。而引物 IAO1/IAO2 通过套式 PCR 对分生孢子的检测灵敏度只能检测到 10^5 个数量级。

2.4 近海沉积物样品中菌株的检测

利用引物 AS1/RS4 进行套式 PCR 可以从海泊

河入海口、李村河入海口和石老人海域沉积物 DNA 样品中检测到 *P. griseofulvum* 菌株的特异性条带, 从海泊河口沉积物样品中扩增的 DNA 条带最亮, 从石老人海域沉积物样品中扩增的 DNA 条带最弱。利用引物 IA01/IA02 进行套式 PCR, 从 3 个海域沉积物样品中都没有目的条带出现。

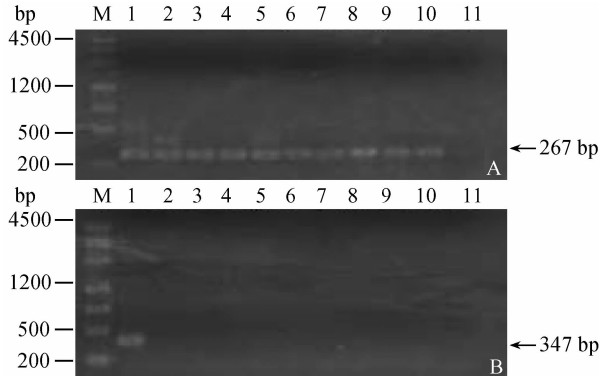


图3 引物扩增近海沉积物样品 DNA 的电泳图
A: 引物 ASI/RS4; B: 引物 IA01/IA02

Fig. 3 Electrophoresis of PCR-amplified products from coastal sediments. A: Primers ASI/RS4; B: Primers IA01/IA02. Lane M: DNA Mark 3; Lane 1: *Penicillium griseofulvum*; Lane 2 to 4: DNA of Li Cunhe sediments, 10^{-1} and 10^{-2} serial dilution; Lane 5 to 7: DNA of Shi Laoren sediments, 10^{-1} and 10^{-2} serial dilution; Lane 8 to 10: DNA of Hai Bohe sediments, 10^{-1} and 10^{-2} serial dilution; Lane 11, H_2O .

3 讨论

近岸污染可造成小环境的微生物群体发生变化, 一些敏感群体消失, 另一些耐受群体成为优势种, 课题组在海洋污染区半知菌多样性调查研究(另文发表)中发现, 在一定的污染程度内, 即轻度到中度污染, 半知菌多样性会有不同程度的增加, 到了重度污染, 半知菌多样性会急剧下降。一般海洋重度污染较容易观测, 因为这时海洋一些常见动物与植物消失, 海水和沉积物颜色也发生较大变化, 这种污染将会给人类造成较大的经济和环境损失, 修复的代价较大。而轻度到中度污染是最需要警示的时候, 这时的防治与修复较容易使环境逆转。本文用的灰黄青霉(*P. griseofulvum*) JYX-201 菌株, 在轻度到中度污染范围内, 随着污染程度的增加, 出现的频率与数量增加, 但传统的培养调查方法造成的误差较大, 故进行了上述探索性研究, 由于海洋受到污染后情况较复杂, 半知菌尤其是青霉属其它种的存在和增加会干扰指示菌的检测, 引

物设计的特异性就显得更为重要, 课题组根据多年的海洋半知菌调查和研究经验, 将设计的特异性引物在海洋环境常见的青霉属其它种和近缘种进行检测, 并用套式 PCR 提高检测灵敏度, 避免了其它菌的干扰。

真菌 ITS 序列在种属间表现出较高的特异性, 根据 GenBank 同属不同种的 ITS 序列差异, 设计特异性引物, 建立的 PCR 检测体系可以对靶标真菌进行检测, 在陆地微生物已得到较好的应用^[12-13]。课题组根据 JYX-201 的 ITS 序列差异设计了特异性引物 ASI/RS4, 通过套式 PCR 将菌株基因组 DNA 的检测灵敏度至少提高了 10^3 倍, 灵敏度可达到 $10 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。仅有 10 个数量级分生孢子时, 该引物就能检测出来。从沉积物中直接检测到该菌, 灵敏度可达 10^2 个数量级孢子/0.25 g。检测结果表明轻度污染区(石老人海域)灰黄青霉量较少, 随着污染的程度增加达到中度污染(海泊河入海口)菌体量最大, 表现条带最亮, 污染继续增加到重度污染(李村河入海口)菌体量又会降低, 结果与污染的理化监测和半知菌传统方法调查结果相符。该结果结合半知菌群体遗传多样性变化对海洋环境的反应, 可以对污染的理化监测起到辅助作用。

Mary Ann Dombrink-Kurtzman^[14] 在研究参与产生棒曲霉素的编码基因 Isoepoxydon Dehydrogenase (Idh) 的下游序列时发现异戊醇氧化酶 (Isoamyl Alcohol Oxidase, IAO) 的编码基因。目前 IAO 编码基因仅在土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、小麦赤霉菌 (*Gibberella zeae*)、灰黄青霉 (*P. griseofulvum*) 中发现。即在青霉属中仅在灰黄青霉一个种发现 IAO 编码基因的存在, 实验也证明了选择此编码基因作为灰黄青霉种的核酸探针具有很好的特异性。虽然利用设计的 IAO 特异引物 IA01/IA02 的分子检测, 灵敏度没有引物 ASI/RS4 好, 但此次探索对于该基因的应用无疑也会起到较好推动作用。此外, 课题组对该引物的再设计和优化选择的工作正在进行中。

参考文献

- [1] Fathy MES, Ashraf AK. Potential biological indicators for glutaraldehyde and formaldehyde sterilization processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30: 135-140.

- [2] Richard D, Parke R, John HP, et al. Development and applications of microbial ecogenomic indicators for monitoring water quality: report of a workshop assessing the state of the science, research needs and future directions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2006, 116: 459-479.
- [3] Roane TM, Pepper IL. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microbial Ecology*, 1999, 38(4): 358-364.
- [4] Xivanand NV, Somshekhar RD, Anupam S, et al. Biological indicators in relation to coastal pollution along Karnataka coast. India. *Water Research*, 2006, 40: 3304-3312.
- [5] Khaled FN, Daniel C, Ghaby K, et al. *Brachidontes variabilis* and *Patella* sp. as quantitative biological indicators for cadmium, lead and mercury in the Lebanese coastal waters. *Environmental Pollution*, 2006, 142: 73-82.
- [6] 时全义, 白树猛, 田黎, 等. 胶州湾近岸污染与半知菌群落关系的研究. *海洋学报 (Acta Oceanologica Sinica)*, 2009, 31(4): 135-140.
- [7] 唐建辉, 王伟, 王源超, 等. 西瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* 的分子检测. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2006, 39(10): 2028-2035.
- [8] Mary AD. A Gene Having Sequence Homology to Isoamyl Alcohol Oxidase Is Transcribed During Patulin Production in *Penicillium griseofulvum*. *Current Microbiology*, 2008, 56: 224-228.
- [9] 杨隽娴. 潮间带植物生境药用微生物的获得与鉴定. 青岛科技大学硕士学位论文, 2008.
- [10] Monika G, Helgard N, Sibylle K, et al. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 58: 404-413.
- [11] Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G. Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber*. *Molecular Ecology*, 1998, 7(3): 273-277.
- [12] 王立安, 张文利, 王源超, 等. 大豆疫霉的 ITS 分子检测. *南京农业大学学报 (Journal of Nanjing Agricultural University)*, 2004, 27(3): 38-41.
- [13] 杨佩文, 李家瑞, 杨勤忠, 等. 根肿病菌核糖体基因 ITS 区段的克隆测序及其在检测中的应用. *云南农业大学学报 (Journal of Yunnan Agricultural University)*, 2003, 18(3): 228-233.
- [14] Mary AD. The isooxydon dehydrogenase gene of the patulin metabolic pathway differs for *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium expansum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 89: 1-8.

Molecular detection of *Penicillium griseofulvum* as the coastal pollution indicator

Shumeng Bai^{1,2}, Li Tian^{1,2*}, Zhengping Shi², Ning Liu¹, Jiuming Zhang²

(¹ First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

(² College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: [**Objective**] PCR method was used to detect *Penicillium griseofulvum*, a dominant species in marine contaminated sediments and thereby to deduce the contamination degree. [**Methods**] According to differences in internal transcribed space (ITS) sequences of *Penicillium* genus and specific IAO sequence, we designed species-specific primers AS1/RS4 and IA01/IA02 of *Penicillium griseofulvum* and established the corresponding PCR systems. By using PCR and nested-PCR, the detection sensitivity was compared. [**Results**] The primers could exclusively amplify destined DNA fragment from environment. Using AS1/RS4 as primers, the detection sensitivity could be 10 fg/ μ L and 10 spores. The detection sensitivity for the sediments was 10² spores/0.25 g sediments. While the detection was unsensitive when using IA01/IA02 as primers. [**Conclusion**] It is feasible that the species-specific primers be used as probes for the detection of environmental pollution dominant species, *Penicillium griseofulvum*, because the frequency of occurrence and amount of this strain could preferably indicate the pollution degree.

Keywords: coastal pollution; *Penicillium griseofulvum*; molecular detection

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40776098, 40976104) and the National High-tech R & D Program of China (2007AA09Z435, 2007AA091507, 2008AA09Z407)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-88967423; E-mail: wshw8@yahoo.com.cn

Received: 22 June 2009 / Revised: 15 August 2009

http://journals.im.ac.cn