

PCR 技术在链格孢霉鉴定中的应用

曹乃清, 张宏誉**

(山东大学 附属省立医院变态反应门诊, 济南 250021)

摘要: 目的 应用 PCR 技术对链格孢霉进行鉴定, 以期获得制备链格孢霉变应原制剂的纯菌种。方法 采用空气曝皿收获链格孢霉菌种并进行培养, 应用 PCR 技术对其进行鉴定。结果 经空气曝皿、形态学鉴定为链格孢霉菌株的 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外灯下鉴定扩增所得条带约 580 bp; 测序结果经 Blast 比对, 544 个碱基中 543 个能够与链格孢霉 26s rDNA 的 545 个碱基比对上, 缺失 1 个, 不能识别 1 个, 相符率达 99%。结论 证实待检真菌为链格孢霉。

关键词: PCR 技术; 链格孢霉

中图分类号: R379; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-8705(2009)02-0095-05

Usefulness of PCR Technique in Identification of *Alternaria Alternata* Allergen Extracts

CAO Nai-qing, ZHANG Hong-yu**

(Department of Allergy, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China)

Objective To produce the allergen extracts with *Alternaria alternata* while were identified by PCR technique. **Methods** *Alternaria alternata* was collected from air and cultured under 26°C, identified by PCR technique. **Result** The fungus that was collected from air and identified as *Alternaria alternata* by morphology, its 26srDNA was amplified by PCR, resulting a 580 bp band, after sequencing, under microscope there were 543 bases those could be identical and consistent to the *Alternaria alternata* data from internet based on the result of blast comparison, corresponding rate is 99%. **Conclusion** We succeeded in collecting and producing *Alternaria alternata*.

Key words: PCR; *Alternaria alternata*

Chin J Allergy Clin Immunol, 2009, 3(2):95-99

真菌孢子广泛存在于大气中, 被认为是引起呼吸道变态反应性疾病的重要变应原之一; 这种变应原与花粉变应原相比, 颗粒直径 <10 μm, 甚至 <5 μm, 能够进入下呼吸道, 主要引起哮喘症状的发生^[1]; 与此对比, 花粉颗粒直径 >10 μm, 主要沉积于鼻咽部并引起鼻部和眼部症状; 用真菌孢子或孢子的提取液进行激发试验, 能够引起支气管哮喘患者气道平滑肌的痉挛, 导致哮喘症状的发生^[2]。在美国和其他工业化国家中, 大约有 20% 的人口因吸入变

应原而罹患过敏性哮喘和鼻炎, 其中有 10% 的患者病情较重^[3]; 皮肤试验结果显示至少 3%~10% 的成人和儿童对真菌过敏^[4]。长期以来, 链格孢霉(*Alternaria alternata*) 被认为是引起呼吸道过敏性疾病的重要变应原之一, 并且与哮喘患者的呼吸骤停相关^[5], 因此对其进行研究具有十分重要的临床意义。本研究通过空气曝皿收获链格孢霉, 在 26°C 下培养, 微量提取 DNA、PCR 扩增、电泳、测序及进行比对, 以此对链格孢霉进行分子生物学鉴定, 为

* 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院变态反应科, 北京 100730; # 通信作者 电话: 010-65296341, 电子邮件: zhy1941@yahoo.com.cn

该变应原制剂的鉴定提供一种新思路、新方法。

材料和方法

试剂与仪器

蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、氯化钠、葡萄糖、琼脂糖、KOH、甘油、Tris-碱、EDTA、SDS、三氯醋酸、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、溴酚蓝、二甲苯氰 FF、蔗糖、热稳定 DNA 聚合酶及 dNTP 溶液 (北京天为时代)、通用引物 (ITS5: 5'-GTC GTA ACA AGG TTT CCG TAG GTG-3'; ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' 鼎国生物)、Eppendorf AG 22331 型 PCR 扩增仪 (德国)、BigDye 循环测序试剂盒、ABI 377 型 DNA 自动测序仪 (Perkin Elmer)、高压锅、生物安全柜、接种针、MIR-162 型培养箱、光学显微镜、1L 锥形瓶、琼脂糖凝胶电泳仪、微波炉。

菌种获得与培养

于北京协和医院门诊楼顶层用琼脂葡萄糖平皿进行曝皿 3 分钟, 置于 26℃ 恒温下培养 3 天, 将生长出来的菌落逐一分离提纯, 置 26℃ 恒温下培养 6 天, 菌落形态、镜下鉴定为链格孢霉的真菌进行 PCR 鉴定。

DNA 微量提取

用接种环取少量旺盛生长于平皿上的供试链格孢霉菌细胞, 混悬于 100 μl 裂解液中, 100℃ 水浴 15 分钟, 冷却后加入 2.5 mol/L 醋酸铅 (pH 7.5) 100 μl, 混匀, 置于冰中 1 小时, 13 000 转/分离心, 上清液用等体积氯仿-异戊醇重复一次后加入等体积预冷的异丙醇, 混匀后于 -20℃ 静置 15 分钟, 13 000 转/分离心 15 分钟, 沉淀用 70% 和无水乙醇 100 μl 各洗涤一次, 真空烘干后加入 50 μl 无菌水, 溶解后 -20℃ 保存备用^[6]。

PCR 扩增

按下列次序, 将各成分加在 0.5 ml 微量离心管内混合:

10×扩增缓冲液	5 μl
20 mmol/L 4 种 dNTP 混合液 (pH8.0)	1 μl
20 μmol/L ITS5 引物	2.5 μl
20 μmol/L ITS4 引物	2.5 μl
2 U/μl 热稳定 DNA 聚合酶	2 单位

H ₂ O	30 μl
模板 DNA	8 μl
总体积	50 μl

放置微量离心管于 PCR 仪上, 扩增供试菌 26srDNA。按下列反应条件进行 36 个循环: 94℃, 1 分钟; 53℃, 1 分钟; 72℃, 1 分钟 20 秒^[7]。

电泳

抽取扩增样品 5 μl, 用琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果^[8]。

1.5% 的琼脂糖凝胶的制备: 取 0.3 g 琼脂糖 (美国 Sigma 公司) 加入 TAE 缓冲液 20 ml, 煮沸至琼脂糖完全溶解, 稍冷却, 加入 10 mg/ml 溴化乙锭 1~2 μl, 混匀, 铺板。

上样: 取扩增产物 5 μl, 加 10 mg/ml 甘油溴酚蓝加样液 1 μl, 100 mV 恒压电泳约 30 分钟。加入 5 μl 标准分子质量 DNA Marker 为 PCR 产物相对分子质量大小的参照标准。

紫外灯下鉴定扩增条带。

测序

剩余的 PCR 产物由华大中生公司应用 ABI3730XL 测序仪及 Big 循环测序试剂盒进行直接双向测序。

结 果

形态学鉴定

菌落在培养基上呈绒状, 灰黑色至黑色, 25℃ 培养 7 天, 直径为 50~70 mm; 分生孢子梗分隔, 分枝或不分枝, 褐色, 较短, 约 (50×3) μm~(50×6) μm (图 1)。显微镜下可见分生孢子呈倒棒形或卵形, 砖格状分隔, 单个或成串地着生于孢梗的顶端, 大小极不规律, 通常为 30~36 μm×14~15 μm, 褐色至褐黑色, 壁光滑或粗糙 (图 2)。

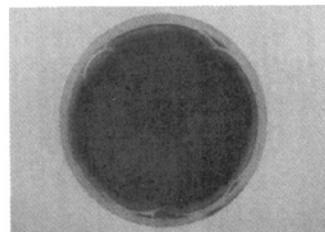


图 1 链格孢霉培养形态

Fig 1 Morphology of *Alternaria alternata*

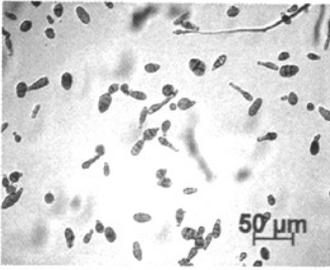


图 2 链格孢霉光学显微镜下形态
Fig 2 *Alternaria alternata* under microscope

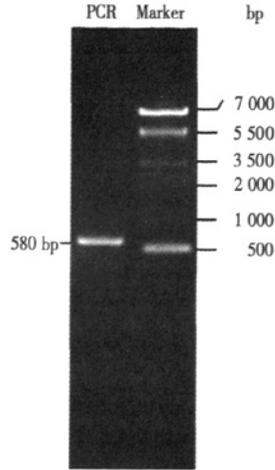


图 3 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果
Fig 3 Electrophoresis result of PCR

DNA 电泳结果

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析，紫外灯下鉴定扩增所得条带约 580 bp (图 3)。

测序结果

PCR 产物序列结果如表 1 所示。

Blast 比对

将测序结果通过 GenBank 进行 Blast 比对，544 个碱基中 543 个能够与链格孢霉 26s rDNA 的 545 个碱基比对上，未比对上缺失 1 个，不能识别 1 个。

测序图谱分析结果

见图 4。

待检真菌与链格孢霉基因相似性达 99%，形态学和分子生物学证据均表明待检真菌为链格孢霉 (*Alternaria alternata*)。

表 1 PCR 产物测序结果
Table 1 Sequence of PCR

```

CTGCGGAGGGACATTACACAAAATATGAAGGCGGGCTCGAACCTCTCGGGGTTACACC
CTTGCTGAATATTACACCCTTGCTTTTGGCTACTTCTTGTTGCTTGGTGGGTTCGCCC
ACCACTAGGCACAAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAAATTAATA
ATTACAACCTTTCAACAACGGCATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCGCAGCGAAAT
GGCATAACTAGTGTCAATTCGACAGAAATTCAGTCAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTC
CGCCCTTTCGTATTCCAAAAGGGCATGCCTGTTCCAGCGTCATTTGTACCCCTCAAGCTTTC
CTTGGTCTGGGGCTCTTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCCGCTTAAAGTAATTGGCAG
CCGGCTACTGCTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTGGCACTCTCTATCAGCAAAGGCTTAGC
ATCCAYTAAGCCCTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGCTAGGGATACCCGCTGAAT
TAAGCATATCA
    
```

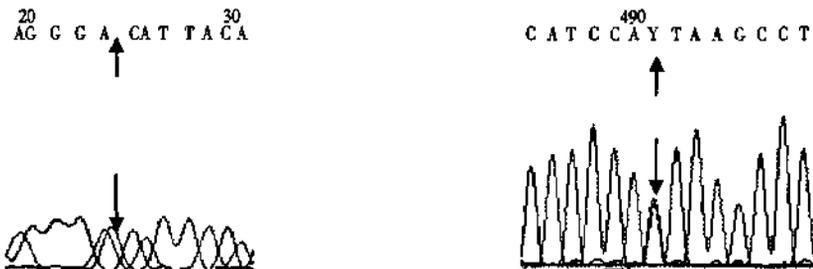


图 4 Blast 比对结果
Fig 4 Result of Blast

讨 论

变应原制备的前提是真菌鉴定,真菌鉴定的主要方法为形态学鉴定和分子生物学鉴定^[9]。当对一个真菌进行鉴定时,首先要对菌株进行分离培养,然后根据其是丝状真菌还是酵母菌,按常规程序进行培养、观察和记载,依据观测的特征推断其隶属的属种。

真菌在基质上开始生长时,首先看到的就是丝状物。生物学上把每一根细丝叫作菌丝,一团菌丝则称为菌丝体^[10]。真菌的菌体除藻状菌某些种类和酵母菌为单细胞外,其他种类菌体的基本构造都是分枝或不分枝的菌丝,因生长基质所含养料的不同,不同种的真菌,其菌丝体可呈疏松的网状、絮状,或绒毛状^[11];菌丝体或无色透明,或暗褐色至黑色,或呈现鲜艳的颜色,甚至分泌出某种色素于菌丝体外部、或分泌出有机物质而成结晶并附着在菌丝的表面,菌丝的结构是真菌形态的一个重要特征。

链格孢霉的不育菌丝匍匐,分隔;分生孢子梗单生或成簇,大多数不分枝,较短,与营养菌丝几乎无区别。分生孢子倒棒状,顶端延长成喙状,淡褐色,有壁砖状分隔,暗褐色,常数个成链,有人称这种分生孢子为同节孢子。该属菌是土壤、空气中常见的腐生菌,本研究培养的链格孢霉菌落在培养基上呈绒状、灰黑色至黑色,25℃培养7天直径50~70 mm;分生孢子梗分隔,分枝或不分枝,褐色,较短,可达(50×3) μm~(50×6) μm。分生孢子倒棒形或卵形,砖格状分隔,单个或成串地着生于孢梗的顶端,大小极不规则,通常为30~36 μm×14~15 μm,褐色至褐黑色,壁光滑或粗糙,从形态学上符合链格孢霉。

由于真菌的生长受温度、湿度及培养基条件的影响,有时可供考察的形态有限,只靠个别生理生化性状的差异作为真菌种间鉴别依据有时不可靠,为了制备一种应用于人体的变应原浸液,需要更加精确的鉴定方法,因此本研究在形态学鉴定的基础上,采用分子生物学技术(PCR法)对链格孢霉进行鉴定。随着DNA序列分析技术的日趋成熟和简化,rRNA基因(rDNA)及其转录间区(ITS)的

序列分析被愈来愈多的用于真菌分子分类学和分子系统学研究中^[5]。Kurtzman等^[12]和Robnett等^[13]测定了几乎所有已知种模式菌株的大亚基rRNA基因(26srDNA)中D1/D2区域的碱基序列(约500~600 bp),发现用这段序列,可以将绝大部分种区别开,而种内不同菌株间的碱基差异不大于1%。为了进一步验证本研究所培养的真菌为链格孢霉,本研究对所培养的链格孢霉的大亚基rRNA基因(26srDNA)中D1/D2区域的碱基序列进行了提取,同时进行DNA扩增,对扩增后的产物进行测序,序列进行Blast比较,结果与链格孢霉相似性达99%,确定该菌为链格孢霉。

综上,形态学和分子生物学鉴定均证实,本研究所培养的真菌为链格孢霉(*Alternaria alternata*),从而可为链格孢霉变应原制剂制备原材料的纯度及精确性提供保证。

参 考 文 献

- [1] Martinez-Canavate Burgos A, Valenzuela-Soria A, Rojo-Hernandez A. Immunotherapy with *Alternaria alternata*: present and future [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2007, 5:259-263.
- [2] Lopez M, Voiglander JR, Lehrer SB, et al. Broncho-provocation studies in basidiospore-sensitive allergic subjects with asthma [J]. *Allergy Clin*, 1989, 4:242-246.
- [3] Weeke ER. Epidemiology of allergic rhinitis. In: Wuethrich B ed. *Highlights in allergy and clinical immunology* [M]. Bern, Switzerland: Hogrefe & Huber Publishers, 1992: 167-172.
- [4] Chapman JA. Update on airborne mold and mold allergy [J]. *Allergy Asthma Proc*, 1999, 20:289-292.
- [5] O'Hollaren MT, Yunginger JW, Offord KP, et al. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324:359-363.
- [6] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基rDNA D1/D2区域序列分析及其分类意义 [J]. *菌物系统*, 2002, 21:27-32.
- [7] Laich FS, Alcoba-Florez J, Perez-Roth E, et al. Molecular characterization of *Alternaria alternata* causing ocular infection: detection of IGS-RFLP intraspecific polymorphism [J]. *Med Mycol*, 2008, 46:615-619.

- [8] Gomi K, Yamamoto H, Akimitsu K. Epoxide hydrolase: a mRNA induced by the fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 53:189-199.
- [9] 王端礼. 医学真菌学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004:318-321.
- [10] Yaman M, Radek R. Identification, distribution and occurrence of the ascomycete *Metschnikowia typographi* in the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2008, 53:427-432.
- [11] Wang AR, Lin WW, Chen XT, *et al.* Isolation and identification of *Sclerotinia stem rot* causal pathogen in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9:818-822.
- [12] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in 5' end of the large-subunit (26s) ribosomal DNA gene [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35:1216-1223.
- [13] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences [J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 1998, 73:331-371.

(2009-02-20 收稿)