

郝莉花,吴晓宗,董彩文,等. 红枣中链格孢菌的多重 PCR 检测[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):301-303.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.086

红枣中链格孢菌的多重 PCR 检测

郝莉花^{1,2}, 吴晓宗^{2,3}, 董彩文^{2,3}, 陈春生^{1,2}, 纵伟^{2,3}

(1. 河南省产品质量监督检验院,河南郑州 450000; 2. 食品生产与安全河南省协同创新中心,河南郑州 450000;

3. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院,河南郑州 450002)

摘要:为快速、灵敏并且特异性地检测红枣中链格孢菌,选取 2 对链格孢菌特异引物,优化多重 PCR 检测中的引物比例、退火温度、dNTP 浓度及 Mg^{2+} 浓度等条件,结果表明多重 PCR 扩增出了预计的链格孢菌 PCR 产物,优化的条件为 Alt-F2\R2: Alt-F1\R1 = 3:1、退火温度 52℃、dNTP 浓度 0.05 mmol/L、 Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L。该方法在检测红枣链格孢菌中具有很好的应用和开发前景。

关键词:红枣;链格孢菌;多重 PCR;检测

中图分类号: TS207.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0301-02

红枣(*Zizyphus jujuba* Mill.)是集营养、保健于一体的优质干果,含有丰富的多糖、维生素 C、黄酮、cAMP 等成分^[1-2],但红枣在自然条件下贮藏容易发生真菌病害感染引起的霉变,在霉变过程中,真菌产生的二次代谢产物真菌毒素具有很强的毒性,会给食用者带来危害^[3-4]。近年来的研究表明,链格孢菌是红枣霉变中的主要真菌之一^[5-7],因此对其进行快速准确地检测,对控制红枣产品的安全性具有重要意义。

多重 PCR 检测技术具有快速、简便且特异性的优点,在许多植物真菌的检测中得到广泛应用^[8-10],但对枣中链格孢菌的多重 PCR 检测尚未见报道。本研究针对枣中链格孢菌特菌 Alt-F1\R1 扩增片段和 Alt-F2\R2 扩增片段设计引物,采用多重 PCR 对其进行鉴定,研究其多重 PCR 检测条件,旨在为枣产品的链格孢菌检测提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

Taq 酶、dNTP,均购自 TaKaRa 公司;真菌 DNA 提取试剂盒,Omega 公司;5311 型 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;LPH 恒温培养箱,上海鸿都电子科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病原真菌总 DNA 的提取 将霉变红枣上刮下的菌丝洗涤、干燥,液氮研磨后转移至 EP 管中,使用试剂盒提取基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板,0.8% 琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA。

1.2.2 链格孢菌引物单重 PCR 特异性试验 根据序列比对结果,选取 2 对链格孢菌的特异引物:

Alt-F1;5'-TGTCTTTTGGCTACTTCTTGTTCCT-3';

Alt-R1;5'-CGACTTGTGCTGCGCTC-3';

Alt-F2;5'-CTTTTGGCTACTTCTTGTTCCT-3';

Alt-R2;5'-CAGGCATGCCCTTTGGATAC-3'。

其中:Alt-F1、R1 扩增片段约 370 bp;Alt-F2、R2 扩增片段约 240 bp。

分别从不同红枣真菌菌丝中提取基因组 DNA,作为 PCR 反应的模板,分别用以上 2 种引物进行 PCR,看能否扩增出相应的条带。PCR 反应体系为 50 μ L:DNA 模板 2 μ L、10 \times 缓冲液 5 μ L、dNTP(每种 2.5 mmol/L)2 μ L、引物(10 μ mol/L)各 2 μ L、Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.4 μ L,无菌水补足至 50 μ L。PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min,然后 94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,35 个循环,72℃延伸 10 min。反应结束后取 5 μ L PCR 产物加 1 μ L 6 \times 溴酚蓝上样缓冲液,在 2% 琼脂糖凝胶上 110 V 电泳 35 min。

1.2.3 2 种引物的比例对多重 PCR 反应的影响 引物 Alt-F2\R2 和 Alt-F1\R1 的比例分别为 4:1、3:1、2:1、1:1、1:2,PCR 反应体系为 50 μ L:DNA 模板 2 μ L、10 \times 缓冲液 5 μ L、dNTP(每种 2.5 mmol/L)2 μ L、引物各 2 μ L、Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.4 μ L、无菌水补足至 50 μ L。PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,38 个循环;72℃延伸 10 min。反应结束后取 5 μ L PCR 产物加 1 μ L 6 \times 溴酚蓝上样缓冲液,在 2% 琼脂糖凝胶上 110 V 电泳 35 min。

1.2.4 退火温度对多重 PCR 反应的影响 选择 1 种引物的比例,分别在不同的退火温度下进行 PCR,其他条件不变。

1.2.5 Mg^{2+} 浓度对多重 PCR 反应的影响 在 PCR 反应体系中,改变 Mg^{2+} 的加入量,使其终浓度分别为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mmol/L,其他条件不变,进行 PCR。

1.2.6 dNTP 浓度对多重 PCR 反应的影响 在 PCR 反应体系中,改变 dNTP 的加入量,使其终浓度分别为 0.05、0.06、0.07、0.08、0.09 mmol/L,其他条件不变,进行 PCR。

2 结果与讨论

2.1 链格孢菌引物单重 PCR 特异性验证

链格孢菌引物单重 PCR 特异性验证结果见图 1、图 2。

从图 1、图 2 可以看出,Alt-F1\R1 和 Alt-F2\R2 引物

收稿日期:2015-07-25

基金项目:国家质检总局科技计划(编号:2013QK232)。

作者简介:郝莉花(1979—),女,山西晋中人,硕士,工程师,从事食品安全检测研究。E-mail:zzulisp@126.com。

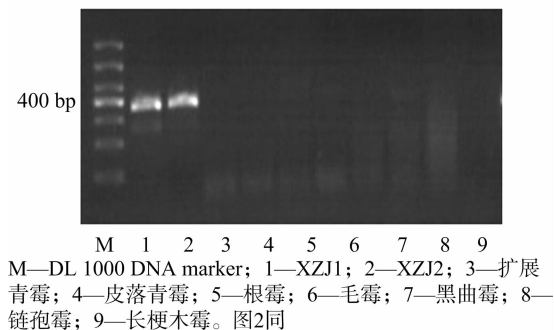


图1 Alt-F1\R1引物特异性

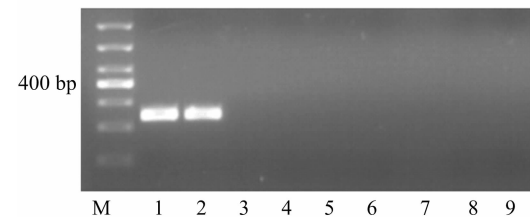


图2 Alt-F2\R2引物特异性

能够从链格孢属中的 2 种菌株: XZJ1 (*Alternaria* sp.) 和 XZJ2 (*Alternaria brassicae*) 的 DNA 中分别扩展出大小约 400、250bp 的特异条带, 而从其他真菌如扩展青霉、皮落青霉、根霉、毛霉、黑曲霉、链孢霉、长梗木霉的 DNA 中未能扩增出条带, 说明这 2 对引物可以作为链格孢霉的特异性引物。

2.2 多重 PCR 反应中 2 种引物的比例优化

多重 PCR 反应中 2 种引物的比例优化结果见图 3。从图 3 可以看出, 当引物 Alt-F2\R2 和引物 Alt-F1\R1 的比例为 3:1 时, 2 条带扩增效果较好。随着引物比例增大, 小条带逐渐减弱, 因此 2 种引物的比例初步确定为 Alt-F2\R2: Alt-F1\R1 = 3:1。

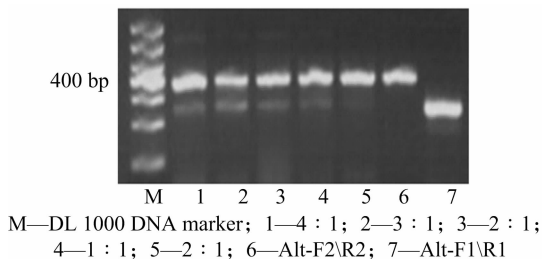


图3 Alt-F2\R2和Alt-F1\R1引物比例优化

2.3 多重 PCR 反应退火温度优化

多重 PCR 反应退火温度优化结果见图 4。从图 4 可以看出, 当退火温度为 52 °C 时, 2 条带扩增效果较好, 因此退火温度初步确定为 52 °C。

2.4 多重 PCR 反应 Mg^{2+} 浓度优化

多重 PCR 反应 Mg^{2+} 浓度优化结果见图 5。从图 5 可以看出, Mg^{2+} 浓度变化对引物 Alt-F2\R2 和引物 Alt-F1\R1 的多重 PCR 反应影响不大, 因此 Mg^{2+} 浓度采用 1.5 mmol/L。

2.6 多重 PCR 反应 dNTP 浓度优化

多重 PCR 反应 dNTP 浓度优化结果见图 6。从图 6 可以看出, 当 dNTP 浓度超过 0.05 mmol/L 后, 其浓度变化对引物 Alt-F2\R2 和引物 Alt-F1\R1 的多重 PCR 反应影响不大。

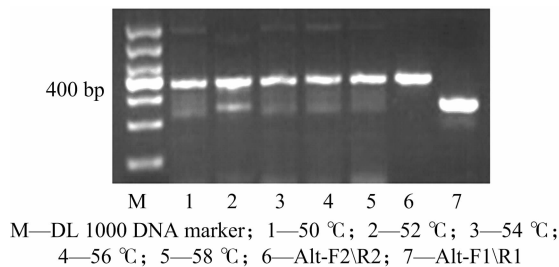


图4 多重 PCR 退火温度优化

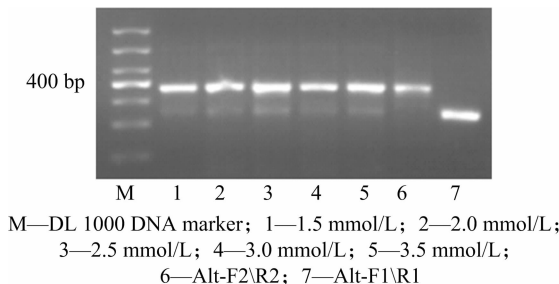
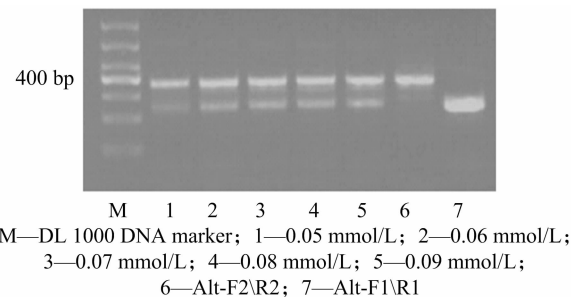
图5 多重PCR Mg^{2+} 浓度优化

图6 多重 PCR dNTP 浓度优化

3 结论

多重 PCR 检测需要通过调整 PCR 反应体系中某些反应条件来实现。试验中发现引物比例、退火温度是影响多重 PCR 的 2 个重要因素, 而 dNTP、 Mg^{2+} 浓度对多重 PCR 的影响较小。研究验证了 2 对链格孢菌引物具有扩增特异性, 并初步确定了 2 对引物多重 PCR 的引物比例、退火温度、 Mg^{2+} 浓度和 dNTP 浓度。表明该方法可检测枣中链格孢菌, 具有快速、灵敏并且特异性的优点。

参考文献:

- [1] 鲁周民, 刘 坤, 闫忠心, 等. 枣果实营养成分及保健作用研究进展[J]. 园艺学报, 2010, 37(12): 2017-2024.
- [2] 王恒超, 陈锦屏, 符 恒, 等. 骏枣干制过程中几种营养物质的变化规律[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 48-52.
- [3] 于丽娜, 闫红飞, 宗淑萍, 等. 冬枣黑痂病原菌毒素致病机制研究[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(1): 33-35.
- [4] 赵笑天, 史惠娟, 原 超, 等. 鲜枣干枣和裂果枣中 9 种真菌毒素及 77 种农药残留的分析与检测[J]. 农产品加工, 2011(3): 61-67.
- [5] 任玉峰, 马爱瑛, 刘雅琴, 等. 灵武红枣采后主要病原真菌的鉴定[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(9): 128-130.
- [6] 甘 瑾, 唐文林, 潘 禄, 等. 灵武红枣采后病原菌的分离及天然抗菌物质的筛选[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版,

杨文婷,江明,朱文婷,等. 酶法提取 10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ的工艺优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):303-306.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.087

酶法提取 10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ的工艺优化

杨文婷,江明,朱文婷,韦琴

(武汉工商学院环境与生物工程学院,湖北武汉 430000)

摘要:采用纤维素酶法提取曼地亚红豆杉中的 10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ(10-DAB),并对酶处理的条件进行优化。以 10-DAB 提取率为指标,考察酶用量、酶处理时间、酶处理温度及 pH 值等因素对提取率的影响,通过单因素试验及响应面试验得出纤维素酶法提取 10-DAB 的最佳条件,并结合实际进行优化。结果得到酶处理最佳条件为:纤维素酶用量 2%、酶处理时间 3 h、酶处理温度 42 ℃、pH 值 5.0,此时 10-DAB 提取率为 0.5297% ± 0.001 067%,与模型预测值 0.533 6% 接近,说明工艺条件稳定,模型可靠。

关键词:曼地亚红豆杉;10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ;纤维素酶;响应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0303-04

10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ(10-deacetylbaicatin Ⅲ,简称 10-DAB)是合成抗癌药物紫杉醇和多西紫杉醇的重要原料^[1-3]。紫杉醇为治疗多种晚期癌症的药物之一,因受到原材料来源的限制,其原料药市场总体呈现供不应求的趋势^[4],其制备方法有多种,而以 10-DAB 作为原料半合成是最具实用价值的方法之一,目前已占紫杉醇原料药总产量的 2/3 以上^[5-6],对于缓解红豆杉资源的短缺具有非常重要的现实意义。10-DAB 主要从红豆杉植株的枝叶中提取,但提取率通常比较低^[7-10],本研究利用纤维素酶对植物细胞壁进行水解,以促进 10-DAB 的溶出^[11-12],并通过响应面试验设计优化酶处理条件,从而确定酶法预处理的最佳条件^[13-15]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

曼地亚红豆杉(产地江苏);石油醚(30~60 ℃),95%乙醇,二氯甲烷,甲醇,柠檬酸,柠檬酸钠,以上化学试剂均为分析纯;400~800 U/g 纤维素酶(Sanland Chemical Co. LTD),400~800 U/g 果胶酶(Biosharp)。

752 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),KQ-50E 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公

司),YXQ-LS-50S11 酸度计(上海精密科学仪器有限公司) 1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制作 精确称取 10-DAB 标准品 5 mg,定容至 50 mL 容量瓶中,得到 0.1 mg/mL 10-DAB 母液;再分别精确量取该母液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,稀释至 5 mL,于 227 nm 处测定吸光度。

1.2.2 原材料的预处理 将曼地亚红豆杉植株洗净风干,40 ℃ 干燥 72 h,粉碎过 30 目筛,再以 1:5 的比例用石油醚浸渍 6 h,以初步脱脂及色素,阴凉处密封保存备用。

1.2.3 单因素试验 准确称取曼地亚红豆杉粉末 1 g,加入 1% 果胶酶及一定比例纤维素酶,再加入一定 pH 值的缓冲溶液至 20 mL,振荡混匀之后分别于一定温度水浴一定时间,所得样品 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清;以料液比 1 g:30 mL 加入无水乙醇超声处理 30 min,取无水乙醇层去除溶剂,残留物加 15 mL 蒸馏水混悬后用石油醚萃取至醚层接近无色,分液弃醚层,用 10 mL 二氯甲烷萃取,分离二氯甲烷层,通风橱中自然挥干除去溶剂,得干燥提取物^[12];精确量取 10 mL 甲醇溶解,并适当稀释,于 227 nm 处测吸光度。

初步拟定酶处理条件为:纤维素酶用量 2%、提取温度为 40 ℃、pH 值 5.0、酶处理时间 2 h,其他条件不变,改变其中 1 个条件进行单因素试验,酶处理温度分别为 20、30、40、50、60 ℃,酶处理时间分别为 1、2、3、4、5 h,纤维素酶用量分别为 1%、2%、3%、4%、5%、缓冲液 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0。不同 pH 值溶液用不同比例的 0.1 mol/L 柠檬酸溶液和 0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液配制,并用酸度计将 pH 值调至所需范围。

1.2.4 响应面试验 根据中心组合设计原理^[13-14],由单因素试验考察的结果选取酶预处理温度(x_1)、酶处理时间

(2);105-108.

收稿日期:2015-07-05

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究项目(编号:B2016337);武汉工商学院校级学术团队基金(编号:XSTD2015003)。

作者简介:杨文婷(1983—),女,湖北仙桃人,硕士研究生,讲师,主要从事天然产物提取及活性研究。Tel:(027)88147093;E-mail:47389578@qq.com。

通信作者:朱文婷,硕士研究生,讲师,主要从事天然产物提取及活性研究。Tel:(027)88147093;E-mail:251558801@qq.com。

2007,35(10):81-86.

[7]杨忆,武海燕,李朋华. 新郑灰枣枣果内生真菌的分离和鉴定[J]. 菌物学报,2015,34(1):164-168.

[8]张晓利,吕雪莲,沈永年,等. PCR-RFLP 和多重 PCR 技术检测常见病原性丝状真菌的实验研究[J]. 中国真菌学杂志,2010,5

[9]秦文彦,程洁,应盛华,等. 可污染食品及饲料的产黄曲霉毒素真菌的多重 PCR 检测[J]. 菌物学报,2007,26(3):448-454.

[10]张平平,王浩然,郭兆彪,等. 多重生物检测技术研究进展[J]. 军事医学,2012,36(9):713-716.