

文章编号: 1004-616X(2004)01-0013-04

指状青霉提取物诱发 *E. coli* ND-160 及 *K12 infA* 基因突变^①张巧¹, 杨胜利², 宋爱云², 宫亚欧², 赵国强²

(1. 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学基础医学院, 河南 郑州 450052)

【摘要】背景与目的: 研究指状青霉(*Penicillium digitatum*)提取物对大肠杆菌菌株的致突变性。材料与方法: 采用 *E. coli* ND-160 菌株回复突变试验、*K12 infA* 基因突变试验及其突变序列分析。结果: 指状青霉提取物: ①可明显地诱导 ND-160 菌株回复突变; ②对 *K12* 菌株可诱发其 *infA* 基因 DNA 序列中 5 个碱基位点突变, 且其中 1 个位点的突变还可导致编码相应氨基酸的改变(Lys→Val)。结论: 指状青霉对大肠杆菌基因有明显的致突变性。

【关键词】指状青霉; 大肠杆菌; 基因突变

中图分类号: P329.34 文献标识码: A

Mutagenicity of the Extract from *Penicillium digitatum* to *E. coli* ND-160 and *K12 infA*ZHANG Qiao¹, YANG Sheng-li², SONG Ai-yun², et al

(1. Department of Toxicology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To study the mutagenicity of the extract from *Penicillium digitatum* to *E. coli* gene. MATERIAL AND METHODS: ① Reverse mutation assay and *K12 infA* gene mutation test were used; ② The sequence of mutated *infA* gene was determined and analyzed. RESULTS: ① The extract from *penicillium digitatum* significantly induced the reverse mutation of *E. coli* ND-160; ② Five points nucleotide mutation of *K12 infA* gene were induced by the extract and one of them led to amino acid variation(lys→val). CONCLUSION: *Penicillium digitatum* have obvious mutagenic effect.

【KEY WORDS】*Penicillium digitatum*; *E. coli* ND-160; *K12 infA*; gene mutation

早在上世纪 40 年代, 人们就证实了指状青霉是广泛存在并且能引起柑桔类水果霉烂的主要病原真菌^[1]。近年来常有因误食霉变柑桔等水果或其深加工产品(如果脯、果汁、果酱等)而致中毒事件发生。该方面的报道多为急性中毒的研究, 而对其危害更

大的遗传毒性作用则知之不多, 尤其是指状青霉代谢产物引起的食物中毒只有轻度的腹泻, 由此往往使人们忽略了对其遗传毒性作用的重视。作者用 *E. coli* ND-160 菌株回复突变试验及 *K12* 菌株 *infA* 基因突变试验对指状青霉提取物进行了致突变效应检测, 旨

① 收稿日期: 2003-03-04; 修订日期: 2003-05-20

作者简介: 张巧(1965-), 女, 郑州市人, 讲师, 研究方向: 遗传毒理学。

Tel: 0371-6974364, E-mail: zhangqiao@zzu.edu.cn

frequency of disomy for chromosome 1, 13, 21 and structural abnormalities in human spermatozoa using multicolor fluorescence in situ hybridization[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13: 2 489-2 494.

[11] Slotter ED, Xiu L, Dan H, et al. Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions, and numerical abnormalities in the sperm of healthy men[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67: 862-872.

在为预防指状青霉引起人类遗传毒性作用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株 *ND-160* 菌株由 Bridges BA 赠予; *K12* 菌株由本校微生物学与免疫学教研室提供。

1.2 指状青霉提取物制备 将从霉烂桔子中分离出的优势真菌指状青霉接种于 Czapek's 培养基 27 °C 培养 2 周后,用三氧甲烷萃取、蒸干、称重。每毫克提取物相当于 25 g 培养物。用蒸馏过的 DMSO 溶解,4 °C 保存备用。

1.3 *E. coli ND-160* 菌株回复突变试验 参照黄幸纾等的方法^[2]。本试验不加 S₉, 试验设溶剂(DMSO, 0.1 ml/皿)对照组; 阳性(疟涤平, 2.5 mg/皿)对照组; 试验组(提取物分别为 3、6、12、及 24 mg/皿)。每次每剂量设 3 个平行皿重复 2 次, 结果取平均值。

1.4 *E. coli K12* 菌株培养及其 DNA 制备 菌株培养参照 *ND-160* 回复突变试验培养方法。设以下 6 组: 生理盐水对照组; DMSO 对照组; 指状青霉提取物 60、120、240 和 480 μg 试验组。培养后取单个菌落混悬在 100 μl 盐水中, 加 30 μl 裂解液, 置 55 °C 水浴 30 min。DNA 制备参照 Sambrook 方法^[3], 用 1×TE 10 μl 溶解, -20 °C 保存备用。

1.5 引物设计及合成 参照 Cummings 报道的 *infA* 基因序列 M63145^[4], 利用 OLIGO、PRIMERS 等分子生物学软件辅助设计 *infA* 引物。上游引物 P₁ 5' ATGCCACTCGATTGAAGTC3', 下游引物 P₂ 5' AGGTTCCGCACATTACTCCG3' (802-1311)。引物扩增长度为 510 bp, 由上海生物工程公司合成, 引物经 PAGE 纯化。

1.6 PCR 扩增及其产物分析、克隆和测序

10×Taq Buffer 3 μl, 2.5 mmol/L 4×dNTP 2 μl, Tag 酶 1 U(Promega 公司产品), P1 和 P2 各 1 μl, 模板 5 μl, 去离子水补足 30 μl 体积。使用 PE-480 型 DNA 扩增仪进行扩增, 程序为: 94 °C 180 s, 94 °C 50 s, 72 °C 60 s, 三温循环 25 圈。将扩增产物 10 μl 置体积分数为 1.5 % 的琼脂糖凝胶上(含 EB 0.5 μg/ml), 以 30 V/cm 的电压电泳 40 min, 紫外线分析仪于 256 nm 下观察到 510 bp 处有扩增带即为 *infA* 基因扩增

产物。后用 Promega 公司 PCR 产物克隆试剂盒进行 PCR 鉴定, 对阳性菌进行培养, 提取质粒, 用 Sanger 末端终止法, 于 ABI373 自动测序仪进行双链测序。

1.7 DNA 序列的计算机分析 采用 GOLDKEY, DNASIS 等软件对 6 个测出的 DNA 序列进行分析。

2 结果

2.1 *ND-160* 回复突变试验 不同剂量指状青霉提取物诱发 *ND-160* 回复突变效应见图 1。该提取物可明显地诱发 *ND-160* 菌株回复突变, 在有效剂量范围内, 回复突变效应随剂量增加而递增, 其剂量反应曲线呈线性关系。见表 1 及图 1。

表 1. 大肠杆菌 *ND-160* 回复突变试验结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1. The result of *E. coli ND-160* reverse mutation test ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Dosage mg · plate ⁻¹	Clones of reverse mutation
Test 1	3	276 ± 21
Test 2	6	489 ± 37
Test 3	12	661 ± 60
Test 4	24	785 ± 65
Positive control	2.5	607 ± 53
Negative control	0.1(ml)	18 ± 4

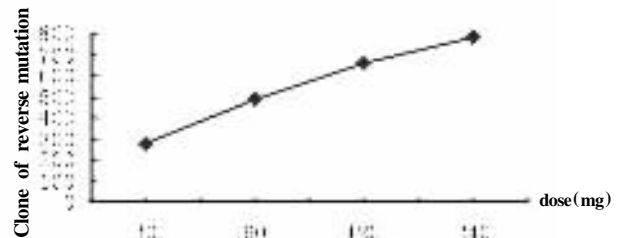


图 1. 指状青霉提取物诱导 *E. coli ND-160* 回复突变效应

Figure 1. The effect of *E. coli ND-160* reverse mutation induced by the extract of *Penicillium digitatum*

2.2 指状青霉提取物诱导 *K12 infA* 基因突变试验

2.2.1 *K12 infA* 基因序列分析 生理盐水及溶剂对照组 *infA* 基因 DNA 序列与 *infA* 基因 M63145 序列同源性比较未发现变异; 试验组中所有 4 个剂量诱导的 *infA* 基因 DNA 序列与 *infA* 基因 DNA M63145 序列比较, 发现有 5 个碱基位点发生变异, 提示指状青霉提取物可诱发 *K12 infA* 基因多个位点突变。见图 2。

	810	820	830	840	850	860
M63145. SEQ	ATGCCACTCCATTGAAGTCTGGCGTGAAGATGAGCTTGTGCGCGTATGTACGGCGTGG					
100 % SAMP-1.SEQ					
100 % SAMP-2.SEQ					
99.4 % SAMP-3.SEQ					

```

99.0 % SAMP-4.SEQ .....
99.0 % SAMP-5.SEQ .....
99.0 % SAMP-6.SEQ .....
           870      880      890      900      910      920
M63145. SEQ CCCAGGGAACGCTATTTTGTGGGAGTCCATGTTCCAGCCGGATGGAAAATGCGTCTAAAA
SAMP-1 SEQ .....A:.....
SAMP-2 SEQ .....A:.....
SAMP-3 SEQ .....C:.....
SAMP-4 SEQ .....G:.....
SAMP-5 SEQ .....G:.....
SAMP-6 SEQ .....G:.....
           930      940      950      960      970      980
M63145. SEQ CGGCGCTTCTGGTATTCTGTGAGGAATTTATCGGTCATGGCGGTAAGCTTATCGACTGCC
SAMP-1 SEQ .....
SAMP-2 SEQ .....
SAMP-3 SEQ .....
SAMP-4 SEQ .....
SAMP-5 SEQ .....
SAMP-6 SEQ .....
           990      1000      1010      1020      1030      1040
M63145. SEQ AGGTCCTTAACGATCACACAGCATCGCTTGGTGCCTGCGAAATCCCCGCCGGGATTACC
SAMP-1 SEQ .....G:.....
SAMP-2 SEQ .....G:.....
SAMP-3 SEQ .....C:.....
SAMP-4 SEQ .....C:.....
SAMP-5 SEQ .....C:.....
SAMP-6 SEQ .....C:.....
           1050      1060      1070      1080      1090      1100
M63145. SEQ TTAATTATCTCAATCAAATGCGCCTCGGACGATTGCCGAATAATTTCTGGGTACCACGAT
SAMP-1 SEQ .....
SAMP-2 SEQ .....
SAMP-3 SEQ .....
SAMP-4 SEQ .....
SAMP-5 SEQ .....
SAMP-6 SEQ .....
           1110      1120      1130      1140      1150      1160
M63145. SEQ GCTTGTTTTACCACAAGAATGAATGTTTTCGGCACAATTTCTCCCCAGAGTGTATAATT
SAMP-1 SEQ .....A:.....
SAMP-2 SEQ .....A:.....
SAMP-3 SEQ .....A:.....
SAMP-4 SEQ .....G:.....
SAMP-5 SEQ .....G:.....
SAMP-6 SEQ .....G:.....
           1170      1180      1190      1200      1210      1220
M63145. SEQ GCGGTCGCAGAGTTGGTTACGCACATTACCCCGCTGCCGATAAGGAATTTTTCGCGTCAG
SAMP-1 SEQ .....T:..
SAMP-2 SEQ .....T:..
SAMP-3 SEQ .....C:..
SAMP-4 SEQ .....C:..
SAMP-5 SEQ .....C:..
SAMP-6 SEQ .....C:..
    
```

```

                1230      1240      1250      1260      1270      1280
M63145.SEQ  CTAACGCCCATCGTTTATCTCACCGCTCCCTTATACGTTGCGCTTTTGGTGCGGCTTAGC
SAMP-1.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-2.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-3.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-4.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-5.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-6.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::

                1290      1300      1310
M63145.SEQ  CGTGTGTTTTTCGGAGTAATGTGCCGAACCT
SAMP-1.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-2.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-3.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-4.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-5.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
SAMP-6.SEQ  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
    
```

图 2. 试验组的 DNA 序列与 M63145 对应部分 DNA 同源性比较结果
 Figure 2. The comparison of DNA sequence between test groups and M63245

2.2.2 计算机对试验组 *infA* 基因编码相应氨基酸序列推导分析 根据试验组 4 个剂量诱导的 *infA* 基因测出的 DNA 序列中 5 个突变位点而推导出的其编码相应氨基酸序列分析,发现有 1 个位点的突变导致了相应氨基酸的变异(Lys → Val),见表 2。

表 2. 实验组 5 个突变位点翻译氨基酸情况

Table 2. The amino acid variation of five nucleotide mutation sites

group	36 th	40 th	67 th	106 th	139 th
Samp-1	AAA - Lys	AAA - Lys	CAG - Gln	AAA - Lys	CGC - Arg
Samp-2	AAA - Lys	AAA - Lys	CAG - Gln	AAA - Lys	CGC - Arg
Samp-3	AAA - Lys	AAA - Lys	CAG - Gln	AAA - Lys	CGC - Arg
Samp-4	AAA - Lys	AAA - Lys	CAG - Gln	GAG - Val	CGC - Arg
Samp-5	AAA - Lys	AAA - Lys	CAG - Gln	GAG - Val	CGC - Arg
Samp-6	AAA - Lys	AAA - Lys	CAG - Gln	GAG - Val	CGC - Arg

3 讨论

大肠杆菌回复突变试验是细菌突变试验中仅次于 Ames 试验的一种简单、快速、敏感和应用广泛的检测方法。ND-160 是 K12 碱基移码突变的需乳糖和硫胺素的衍生株。曾有报道,在检测霉菌毒素致突变性方面,它优于 Ames 菌株^[5]。我们选用 ND-160 菌株,对指状青霉提取物的致突变性进行初筛,然后进一步观察其对 K12 *infA* 基因的致突变作用及其表达的影响,以证实指状青霉的遗传毒性作用。结果表明指状青霉提取物:①在不加 S₀ 条件下,可明显地诱导 ND-160 菌株回复突变,并存在剂量-反应关系;

②对 K12 *infA* 基因有致突变活性。DNA 序列分析显示,指状青霉提取物可诱发 *infA* 基因 5 个碱基位点发生变异;③在不同突变位点中,有 1 个位点突变导致编码相应氨基酸的改变(Lys → Val)。结果提示指状青霉提取物不仅可以引起大肠杆菌 DNA 突变,且可由此导致其表达的改变,表明指状青霉可产生明显的遗传毒性效应。

随着人们生活水平提高,水果及其加工产品社会消费量日益增加,因此,保证水果及其加工产品的卫生质量,对消费者,甚至其后代的身体健康是极其重要的,应引起人们高度重视。

参考文献:

- [1] Kenneth BR. A manual of the penicillia[M], 1st ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1949. 386 - 388.
- [2] 黄幸纾, 陈星若. 环境化学物质致突变致畸致癌试验方法 [M]. 第 1 版. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1985. 55 - 69.
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning [M]. 9th eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 49 - 51.
- [4] Cummings HS, Sands JF, Foreman PC, et al. Structure and expression of the *infA* operon encoding translational initiation fact IF1 transcriptional control by growth rate [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(25): 1 649 - 1 651.
- [5] 徐友梅, 郑其岚, 田俊峰, 等. 用细菌突变试验检测致癌因子/致突变因子的初步报告 [J]. 河南医学院学报, 1980, 15(1): 1 - 8.