

标准菌株 CMCC(F)98003 的多相复核鉴定

姚粟 李辉 程池*

(中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心 北京 100027)

摘要: 采用形态学观察、Biolog 全自动微生物鉴定系统、ITS rDNA 序列分析、ITS 区特殊位点碱基分析、 β -微管蛋白基因序列分析方法,对《中国药典》(CHP)中指定使用的培养基质控参考菌株 CMCC(F)98003 进行了多相复核鉴定。结果表明:CMCC(F)98003 为黑曲霉,与 CHP 收载的科学名称是一致的。鉴于黑曲霉与巴西曲霉虽然较为接近,但已成为两个不同的种,其形态学、系统发育学和代谢产物等特性均存在一定差异,《中国药典》是否需要更换新的丝状真菌代表菌株,以保持与国际上其他药典的一致性值得研究。

关键词: CMCC(F)98003, 黑曲霉, 巴西曲霉, 多相鉴定

Polyphasic Identification Approaches for Reference Strain CMCC(F)98003

YAO Su LI Hui CHENG Chi*

(China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, China Center of Industrial Culture Collection, Beijing 100027, China)

Abstract: To identify reference strain CMCC(F)98003, which cited in Chinese Pharmacopoeia (CHP), polyphasic approaches including morphological features, Biolog identification system, ITS rDNA sequence, specific positions based on the ITS region and β -tubulin gene sequences analysis were used. Results indicated that CMCC(F)98003 was identified as *Aspergillus niger* and consistent with the scientific name in CHP. Although *A. brasiliensis* is close to *A. niger*, they have been classified as two different species and their morphology, phylogenesis and metabolic profiles are distinct. To maintain the consistency of international Pharmacopoeia, whether CHP replaces the new representative of filamentous fungi strain is worth studying.

Keywords: CMCC(F)98003, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis*, Polyphasic identification

标准菌株 CMCC(F)98003 保藏于中国医学细菌菌种保藏管理中心,从 2005 年开始,作为丝状真菌的代表菌株,被《中国药典》(第 8 版)指定为标准菌株,用于无菌检查法和微生物限度检查法的培养基

质控和方法验证试验^[1]。目前在公开的文献中,未能检索到该菌株的分离和鉴定研究信息。

近年来,随着分子系统学和基因发育学研究的进展,黑色曲霉的分类研究十分活跃。2007年,

Ja'nos Varga 等人发表了黑色组曲霉的新种巴西曲霉(*Aspergillus brasiliensis* sp. nov.), 该菌种与黑曲霉(*Aspergillus niger*)在分类学地位上很接近, 很难通过传统的形态学观察等表型分析方法进行鉴定和区分^[2]。巴西曲霉的发表使得原来鉴定为黑曲霉的菌种有可能分属于2个不同的种, 即黑曲霉和巴西曲霉。2008年, Jan Houseknecht 等人通过形态学、Biolog 碳源利用分析、5.8S rDNA ITS 区序列及特定位点碱基分析、Rep-PCR 分析等表型结合基因型鉴定技术, 对广泛应用于各国药典和相关标准中的标准菌株 ATCC16404进行了多相鉴定分析, 结果表明, ATCC16404与巴西曲霉模式菌株 IMI 38172^T 的表型和基因型完全符合, 与黑曲霉模式菌株 ATCC16888则存在差异, ATCC16404被重新命名为巴西曲霉^[3]。

随后, ATCC 对这株菌种的科学名称进行了更正^[4], 2010年世界微生物菌种数据中心(WDCM)编制的《培养基相关参考菌株目录》中也采用了新的科学名称^[5], 2010年版《美国药典》也对这株菌也进行了更名, 成为《美国药典》中第一株更名的标准菌株^[6]。

CMCC(F)98003 是《中国药典》中的重要质控菌株^[7], 本文采用形态学分析、Biolog 全自动微生物鉴定系统、ITS rDNA 区序列分析及特殊位点碱基分析和 β -微管蛋白基因序列分析等技术, 对 CMCC(F)98003 进行多相复核鉴定, 以确定标准菌株的科学性和准确性。

1 材料

1.1 菌株

黑曲霉 *A. niger* CMCC(F)98003, 购自中国药品生物制品检定所中国医学细菌保藏管理中心。

1.2 培养基及试剂

查氏酵母膏琼脂培养基(Czapek yeast extract agar, CYA): K₂HPO₄ 1 g, 查氏浓缩液 10 mL, 酵母抽提物 5 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL。

查氏浓缩液配方: NaNO₃ 30.0 g, KCl 5.0 g, MgSO₄·7H₂O 5.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, CuSO₄·5H₂O 0.05 g, 无菌水 100 mL。

2%麦芽汁琼脂培养基(2% ME): 称取 20 g 牛津麦芽汁提取物(#LP0039B), 18 g 琼脂; 加蒸馏水至 1000 mL, 煮沸溶解; 冷却后调整 pH 值至 5.5 ± 0.2。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA): 取去皮的马铃薯 200 g, 切成小块; 加水 1000 mL, 煮沸 30 min; 滤去马铃薯块, 滤液补足至 1000 mL; 加葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g。

75% T/FF.IF 浊度标准管、FF-IF 接种液、FF (100 μ L)鉴定微平板购自 Biolog 公司; Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 Marker 购自天根生化科技有限公司; GoldView 购自北京塞百盛基因技术有限公司; 蛋白酶 K 购自 Merck 公司; 其他化学药品均为进口分装或国产分析纯。

2 方法

2.1 形态学鉴定

接种针挑取菌落孢子对称三点接种于 CYA 平皿培养基, 25°C 培养 7 d 观察并记录其培养特征, 包括菌落直径、菌落颜色、菌落质地、渗出液和菌落反面颜色等; 同时挑取菌体制做显微形态观察载片, 用乳酸苯酚溶液固定, 于普通光学显微镜下观察并记录细胞特征, 包括分生孢子头、顶囊、产孢结构、梗基、瓶梗、分生孢子等。

2.2 Biolog 全自动微生物鉴定系统鉴定

Biolog 全自动微生物鉴定系统鉴定曲霉菌方法参见文献[8]。

2.3 基因组 DNA 提取

简化 CTAB 法提取基因组 DNA 参见文献[9]。

2.4 ITS rDNA 区序列扩增及检测

以菌株 CMCC(F)98003 基因组 DNA 为模板, 以 ITS4 和 ITS5 为引物, 进行 ITS rDNA 区扩增。引物序列为 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'^[10]。PCR 混合液扩增反应体系为 100 μ L, 10 × 扩增缓冲液 10 μ L; DNA 模板 1 μ L; dNTPs (每种 2.5 mmol/L) 8 μ L; 引物(10 μ L/L)各 2.5 μ L; Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 1.3 μ L; 无菌超纯水补足总体积 100 μ L。ITS 区扩增反应程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。PCR 扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳分离检测, 染料为 Goldview。

2.5 β -微管蛋白基因序列扩增及检测

以菌株 CMCC(F)98003 基因组 DNA 为模板, 以 Bt2a 和 Bt2b 为引物, 对 β -微管蛋白基因序列进行扩增。引物序列为 Bt2a: 5'-GGTAACCAAATCG

GTGCTGCTTTC-3'; Bt2b: 5'-ACCCTCAGTGTAGT GACCCTTGGC-3'^[11]。PCR 反应体系除引物不同外, 其他与 ITS rDNA 区序列 PCR 反应体系相同。PCR 扩增反应程序: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min, 32 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。PCR 扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳分离检测, 染料为 Goldview。

2.6 序列测定、分析及系统发育树的构建

纯化后的 PCR 产物用 ABI3700 基因测序仪测序。测序由北京宝杰罗生物技术有限公司完成。测序结果用 Chromas 软件参照正反序列图谱人工校对。由 GenBank 获得曲霉属黑色组相关菌株的 ITS rDNA 和 β -微管蛋白基因序列, 以 Clustal X 进行序列比对后, 用 MEGA 3.1 的 Neighbor-joining 法构建

系统发育树, 并进行 1000 次 Bootstraps 检验。

3 结果与分析

3.1 形态学鉴定

CMCC(F)98003 在标准培养条件下, 菌落形态和细胞形态见图 1, 菌落直径 60 mm-70 mm; 厚度 2 mm; 颜色炭黑色; 表面平坦, 有放射状沟纹; 质地丝绒状; 少量无色渗出液; 菌落反面淡黄褐色; 无可溶性色素。分生孢子头球型, 直径 50 μ m-80 μ m; 孢梗茎直径 10 μ m-15 μ m, 壁平滑; 顶囊球型, 直径 30 μ m-40 μ m, 表面全面可育; 产孢结构双层, 梗基 (10-12) μ m \times (2-3) μ m; 瓶梗(6-8) μ m \times (2-3) μ m; 分生孢子球型, 直径 3 μ m-4 μ m, 壁粗糙。该菌株的形态学特征符合黑曲霉 *A. niger* 的形态特征。

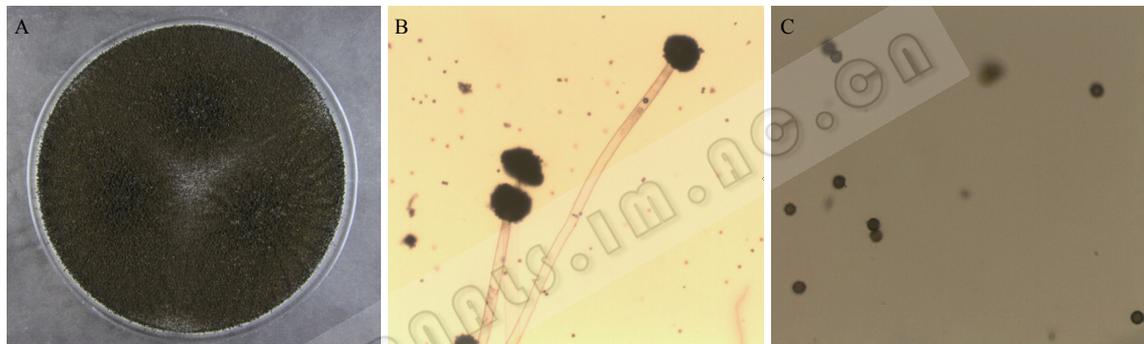


图 1 25°C 培养 7 d 菌种的宏观形态和显微形态

Fig. 1 Macromorphology and micromorphology on 25°C, 7 d

注: A: 菌落形态; B: 分生孢子梗形态(\times 100); C: 分生孢子形态(\times 400)。

Note: A: Colony morphology; B: Conidiophore morphology (\times 100); C: Conidial morphology (\times 400).

3.2 Biolog 全自动微生物鉴定系统鉴定

选取黑曲霉模式菌株 ATCC16888 和巴西曲霉 ATCC16404 作为对照, 对 CMCC(F)98003 进行 Biolog 全自动微生物鉴定, 系统鉴定结果显示黑曲霉模式菌株 ATCC16888 和巴西曲霉 ATCC16404 在利用麦芽糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-海藻糖、 α -酮戊二酸、苦杏仁苷和 D-果糖这几个碳源进行生长方面存在差异, CMCC(F)98003 基本与 ATCC16888 一致, 能够利用麦芽糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-海藻糖、苦杏仁苷和 D-果糖生长, 不能够利用 L-苹果酸和 α -酮戊二酸生长, 结果见表 1。因此认为 CMCC(F)98003 与黑曲霉模式菌株 ATCC16888 具有类似的代谢图谱, 而与巴西曲霉 ATCC16404 存在差异。

表 1 碳源利用情况
Table 1 Carbon Source Utilization

碳源 Carbon source	ATCC16888	ATCC16404	CMCC(F)98003
麦芽糖 Maltose	+	-	+
β -甲基-D-葡萄糖苷 β -Methyl-D-Glucoside	+	-	+
D-海藻糖 D-Trehalose	+	-	+
L-苹果酸 L-Malic Acid	v	+	-
α -酮戊二酸 α -Ketoglutaric acid	-	w	-
苦杏仁苷 Amygdalin	+	-	+
D-果糖 D-Fructose	+	v	+

注: -: 没有生长; +: 生长旺盛; w: 微弱(边界)生长; v: 可变。

Note: -: No growth; +: Strong growth; w: Weak growth; v: Varied growth.

3.3 基因组提取、PCR 扩增与序列测定分析

ITS rDNA 区序列是曲霉菌鉴定常用序列, 其结构见图 2^[12]。菌株 CMCC(F)98003 提取的基因组 DNA 片段大于 23 kb, 满足 PCR 扩增的需求。用引物对以 ITS4 和 ITS5 为引物扩增 ITS rDNA 区序列, 用引物对 Bt2a 和 Bt2b 扩增 β -微管蛋白基因序列, 目的条带分别约为 630 bp 和 550 bp, 见图 3。

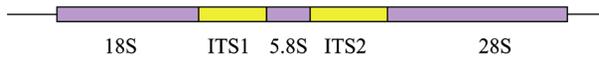


图 2 真核核糖体 DNA 操纵子的 ITS 区结构图

Fig. 2 Diagram of the organization of ITS region of the eukaryotic ribosomal DNA operon

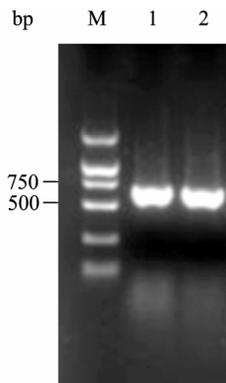


图 3 CMCC(F)98003 的 ITS rDNA 区序列和 β -微管蛋白基因序列 PCR 扩增结果

Fig. 3 ITS rDNA and β -tubulin gene PCR amplification results of CMCC(F)98003

注: M: DL2000 marker; 1: ITS rDNA 区 PCR 扩增结果; 2: β -微管蛋白基因 PCR 扩增结果。

Note: M: DL2000 marker; 1: ITS rDNA PCR amplification result; 2: β -tubulin gene PCR amplification result.

选用 GenBank 中提交的黑曲霉模式菌株 ATCC16888(FJ195350)和巴西曲霉模式菌株 IMI 381727(AJ280010)的 ITS rDNA 序列作为对照, 与 CMCC(F)98003 的 ITS rDNA 序列(ITS rDNA 区序列长度为 627 bp)进行比较研究。将 ITS rDNA 序列进行对位排列后, 以 18S 和 ITS1 区之间的 TTACCG 序列中的第一个“C”为 1 位点, 比较 3 株菌种在 140、166、172、173 和 384 这 5 个位点的碱基情况, 如表 2 所示, CMCC(F)98003 这几个位点碱基分别为 A、T、A、A 和缺失, 与黑曲霉模式菌株 ATCC16888 完全一致, 而巴西曲霉模式菌株 IMI 381727 在这几

个位点的碱基分别为 C、C、T、C、T。CMCC(F)98003 的 ITS rDNA 序列与巴西曲霉模式菌株 IMI 381727 存在近 1%的碱基差别, 这说明 CMCC(F)98003 与黑曲霉模式菌株 ATCC16888 的相似性更高。

表 2 ITS 序列特殊位点碱基差异
Table 2 Difference of base position in ITS sequence

碱基位点 Base position	140	166	172	173	384
<i>Aspergillus brasiliensis</i> IMI 381727	C	C	T	C	T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16888	A	T	A	A	缺失
CMCC(F)98003	A	T	A	A	缺失

注: 以 18S 和 ITS1 区之间的 TTACCG 序列中的第一个“C”为 1 位点。

Note: The first C in the border sequence (TTACCG) of 18S and ITS1 is here defined as position 1.

3.4 菌株系统发育分析

在 GenBank 中选取曲霉黑色组模式菌种的 ITS rDNA 序列, 以 *A. flavus* CBS100927^T (AY819992)为外群, 构建菌株 CMCC(F)98003 与曲霉黑色组相关种的 ITS rDNA 系统发育树, 见图 4。CMCC(F)98003 与 *A. niger* ATCC 16888 聚类在分类距离最近的一个分支上, 序列相似性达 100%, 与曲霉属黑色组内其他种(*A. niger* ATCC 16888^T AY373852、*A. brasiliensis* IMI381727^T AJ280010、*A. tubigenensis* CBS 134.48^T AJ223853、*A. costaricensis* CBS115574^T DQ900602、*A. vadsensis* CBS113365^T AY585549 和 *A. piperis* CBS112811 DQ900603)也具有很高的相似性, 序列同源性均在 98.6%–100%之间, 因此需要采用其他分子标记进行种水平的区分鉴定。

在 GenBank 中选取 19 株曲霉黑色组模式菌种的 β -微管蛋白基因序列, 以 *A. flavus* CBS100927^T (AY819992)为外群, 构建菌株 CMCC(F)98003 的 β -微管蛋白基因序列系统发育树, 见图 5。系统发育分析表明: 菌株 CMCC(F)98003 与黑曲霉 *A. niger* CBS554.65^T 聚在一个系统发育分支, 序列同源性为 100%, 与黑色组的其他种序列同源性均在 94.7%以下。因此结合形态学、碳源利用情况和 ITS rDNA 序列系统发育分析等多相鉴定的结果, 将 CMCC(F)98003 鉴定为黑曲霉。

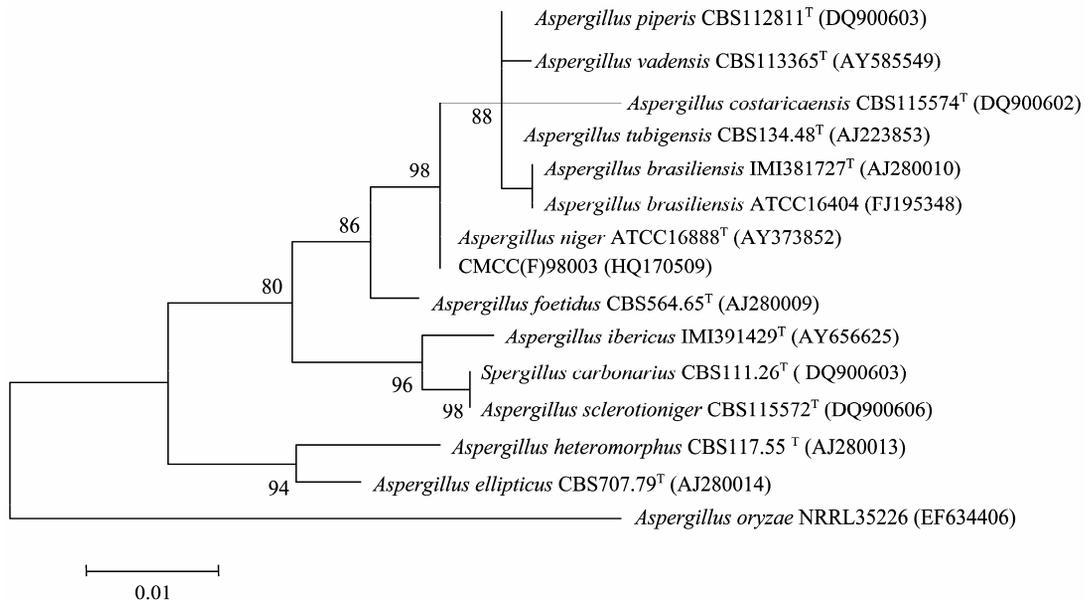


图 4 基于 ITS 区 rDNA 序列的黑色组曲霉的 NJ 系统发育树

Fig. 4 A Neighbor-joining tree of *Aspergillus* section *Nigri*, based on their ITS DNA sequences

注: 图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 50% 数值; 图例为遗传距离。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Only values above 50% are indicated. Bar, genetic distance.

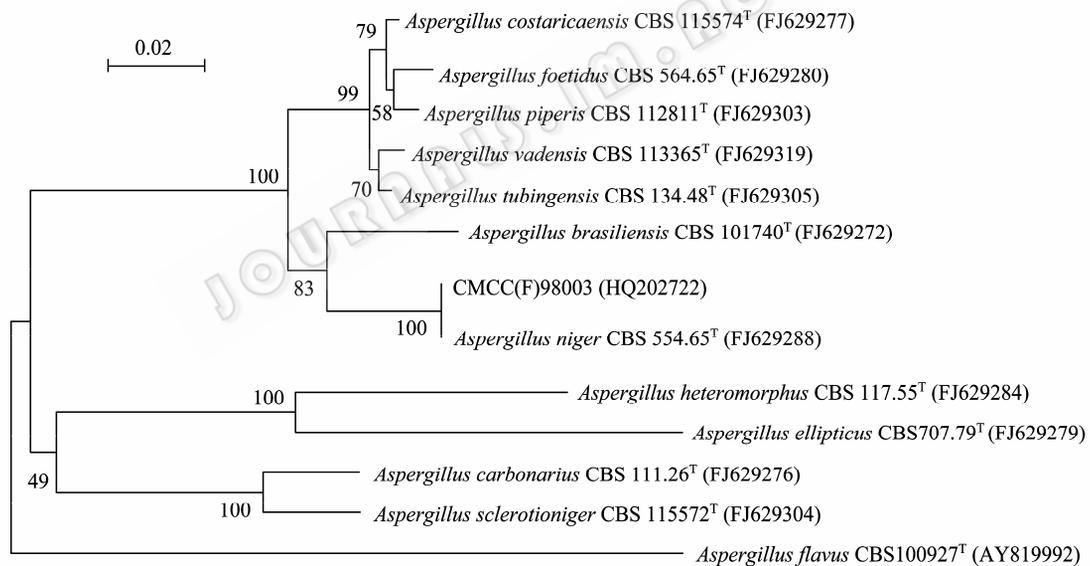


图 5 基于 β -微管蛋白基因序列的黑色组曲霉的 NJ 系统发育树

Fig. 5 Neighbour-joining tree based on β -tubulin sequence data of *Aspergillus* section *Nigri*

注: 图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 50% 数值, 图例为遗传距离。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Only values above 50% are indicated. Bar, genetic distance.

4 讨论

黑曲霉属于黑色组曲霉, 该组包括 19 个种, 是比较难鉴定的族群之一, 传统的形态学观察法或单一分子生物学方法都难以给出充分的种水平鉴定结论。如黑曲霉与巴西曲霉的菌落形态、菌体形态以

及分生孢子梗结构均无明显区别, 只有在电子显微镜下才能够发现其孢子的差异性^[13]。黑曲霉的鉴定需要表型分析技术如菌落形态、细胞形态、碳源利用情况、Ehrlich 反应和代谢产物研究等, 结合基因型分析技术如 RFLP、DNA 杂交、RAPD、AFLP、ITS 区 rDNA 序列、 β -微管蛋白和钙调蛋白基因序列

等进行多相鉴定, 综合判断得出正确的鉴定结果。

黑曲霉是各类标准中常用的参考菌株之一, 将其准确鉴定至种水平并按其特征进行分类和描述, 对于完善标准的科学性和标准之间的协调性具有重要意义。

我国卫生行业标准《商业性微生物培养基质量检验规程》(ws/T 232-2002)、中国出入境检验检疫行业标准《培养基制备指南第二部分: 培养基性能测试实用指南》(SN/T 1538.2-2007)、卫生部《消毒技术规范》(2008)和《化妆品防腐剂效能评价方法》(征求意见稿)等采用了 ATCC16404 作为参考菌株^[6], 应根据其分类学地位的变化及时对标准进行修订。CMCC(F)98003 经多相复核鉴定仍为黑曲霉, 虽然不涉及标准文本的修订问题, 但却要考虑与国际药典标准菌株之间的协调一致性问题。

此外, 目前国内其他的国家标准《包装运输包装件防霉试验方法》(GB/T 4857.21-1995)^[14]、《电工电子产品基本环境试验规程 长霉试验方法》(GB 2423.16-90)^[15]、军用标准《军用设备环境试验方法霉菌试验》(GJB 150.10-86)^[16]、行业标准《抗菌塑料——抗菌性能试验方法和抗菌效果》(QB/T 2591—2003)^[17]等均采用有黑曲霉做为标准菌株, 包括 ATCC 6275 和 AS.3.3928, 也应该尽快采用多相鉴定技术进行复核鉴定。

参 考 文 献

- [1] 《中国药典》. 第 8 版. 北京: 化学工业出版社, 2005, 附录 68.
- [2] Ja'nos Varga, Sa'ndor Kocsube', Bea' ta To' th, *et al.* *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International*

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007(57): 1925-1932.

- [3] Jan Houseknecht, Elena Stamenova, Sung-Oui Suh, *et al.* Reclassification of ATCC® 16404TM and ATCC® 9642TM as *Aspergillus brasiliensis*. *Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter*, 2008, **14**(10): 2-14.
- [4] <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx>.
- [5] <http://www.wfcc.info/whatnew.html>.
- [6] 姚粟, 程池. 标准菌株 ATCC 16404 的分类学进展及影响. *食品与发酵工业*, 2010, **36**(9): 134-137.
- [7] 《中国药典》. 北京: 中国医药科技出版社, 2010 年: 附录 XIXQ 219-222.
- [8] 姚粟, 程池, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统——丝状真菌鉴定操作规程的研究. *食品发酵工业*, 2006, **32**(8): 63-67.
- [9] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA. *湛江海洋大学学报*, 2003, **23**(6): 72-73.
- [10] Bruns T, Lee S, Talor J, *et al.* Application and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [11] Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, *et al.* New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, 2004(50): 45-61.
- [12] 姚粟, 程池. 糖化酶生产菌种 CICC 2462 的 5.8S rDNA 分子生物学鉴定. *中国食品发酵工业*, 2005, **31**(1): 49-53.
- [13] Samson R A, Noonim P, Meijer M, *et al.* Diagnostic tools to identify black *Aspergilla*. *Studies in Mycology*, 2007(59): 129-145.
- [14] 《包装运输包装件防霉试验方法》. GB/T 4857.21-1995.
- [15] 《电工电子产品基本环境试验规程 长霉试验方法》. GB 2423.16-90.
- [16] 《军用设备环境试验方法 霉菌试验》. GJB 150.10-86.
- [17] 《抗菌塑料——抗菌性能试验方法和抗菌效果》. QB/T 2591-2003.