

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.24.013

黄曲霉素产毒真菌多重聚合酶链式反应体系的建立*

叶焱敏^{1,2}, 林娜², 张晓芹^{2△}, 石森林¹

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310000; 2. 浙江中医药大学附属丽水市中医院, 浙江 丽水 323000)

摘要:目的 探讨黄曲霉素产毒真菌 DNA 的提取方法,并建立其多重聚合酶链式反应(PCR)检测体系。方法 优选最佳 DNA 提取试剂盒和样品处理方式;根据杂色曲霉 1(Ver-1)、杂色曲霉 B(VerB)、ITS 序列分别设计多重 PCR 引物,优化 PCR 体系,评价引物的特异性和灵敏性,以黄曲霉素产毒真菌验证体系的适用性。结果 液氮研磨后,以 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取效果最佳;所设计的多重 PCR 引物特异性良好,灵敏度达到 1 ng/μL,该体系在 7 d 内的重复性和稳定性均良好。结论 所建立的多重 PCR 检测体系可用于黄曲霉素产毒真菌的测定,可快速检出该类真菌。

关键词: DNA 提取;黄曲霉素产毒真菌;多重聚合酶链式反应;快速检测

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)24-0044-06

Establishment of Multiplex Polymerase Chain Reaction Detection System for Aflatoxigenic Fungi

YE Yaomin^{1,2}, LIN Na², ZHANG Xiaoqin², SHI Senlin¹

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang, China 310000; 2. Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Lishui, Zhejiang, China 323000)

Abstract: **Objective** To investigate the DNA extraction method of aflatoxigenic fungi, and to establish its multiplex polymerase chain reaction(PCR) detection system. **Methods** The DNA extraction kit and sample treatment method were optimized. Multiple PCR primers were designed according to the *Aspergillus variegatus* 1 (Ver-1), *Aspergillus variegatus* B (VerB) and ITS sequences, the PCR detection system was optimized, the specificity and sensitivity of the primers were evaluated, and the applicability of the system was verified by aflatoxigenic fungi. **Results** Ezup column fungal genomic DNA extraction kit had the best extraction effect of mycelia after grinding with liquid nitrogen. The designed multiplex PCR primers had good specificity and sensitivity of 1 ng/μL, and the established detection system had good repeatability and stability within 7 d. **Conclusion** The established multiplex PCR detection system can be used for the determination and rapid detection of aflatoxigenic fungi.

Key words: DNA extraction; aflatoxigenic fungi; multiple polymerase chain reaction; rapid detection

真菌毒素污染是影响食品安全的重要因素^[1],其中黄曲霉、寄生曲霉等真菌所产生的黄曲霉素具有高致癌性、致病性,广泛存在于玉米、花生、木耳、大豆等食品中,是威胁人类健康的首要真菌毒素^[2-4]。黄曲霉素产毒真菌的快速检测和防治是目前真菌毒素污染领域的研究热点。当前对黄曲霉素产毒真菌的检测主要依靠传统的形态学或免疫学方法。传统形态学方法主要基于菌株形态、生理特征等进行鉴别,耗时耗力,且需要的经验性较强;免疫学方法主要依靠黄曲霉素的抗性特点进行检测,检测样品需经纯化、孵育等多个环节,检测周期长、操作复杂^[5-7]。分子生物学技术的发展为黄曲霉素产毒真菌的快速检测提供了新途径。孙长坡等^[8]、MAHMOUD 等^[9]、AHMAD 等^[10]等分别基于 RFLP、SSR、功能基因等对不同真菌进行了鉴定。多重聚合酶链式反应(PCR)法是指在同一反应体系中加入多对引物,同时检测出 2 种以上目的基因的方法,具有高效、快速、高通量等优势^[11-14]。从黄曲霉素的生物合成途径分析,杂色曲霉 B(VerB)、杂色曲霉 1(Ver-1)是黄曲霉素产生的关

键基因^[15-19],对这 2 个基因进行及时检测也是鉴定黄曲霉素产毒真菌的关键;ITS 基因是真菌通用基因,可通过该基因测序有效排除假阳性和假阴性。目前尚无针对以上 3 种基因开展黄曲霉素产毒真菌的多重 PCR 体系研究。DNA 质量是影响多重 PCR 的主要因素,CTAB^[20]、SDS^[21]及相关改良方法是目前常用的总 DNA 提取方法,不同研究对象常需采用相应提取方法方可获得高质量总 DNA。为此,本研究中拟在考察了最佳 DNA 提取方式的基础上,基于 VerB、Ver-1、ITS 基因序列设计多重 PCR 引物,建立黄曲霉素产毒真菌的多重 PCR 检测体系,为该类真菌的分子鉴定提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器: MJ-150-II 型霉菌培养箱、HZQ-X300C 型恒温振荡器、DK-8D 型三孔电热恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司); GenoSens 1850 型凝胶成像仪(北京勤翔生物技术有限公司); NanoDrop 2000 型微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司); T100 型 PCR 仪

*基金项目:浙江省基础公益研究计划项目[LGF19H280002]。

第一作者:叶焱敏,女,在读硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药制剂学,(电子信箱)43926030@qq.com。

△通信作者:张晓芹,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为药用植物与分子生物学,(电子信箱)751008018@qq.com。

(美国 Bio-Rad 公司); GNJS-II 型菌落计数器(上海谷宁仪器有限公司)。

试剂: dNTP、Taq 酶、DNA Marker 及真菌、植物基因组 DNA 提取试剂盒, 均购自上海生工生物技术有限公司(批号分别为 GA14KA7272, AK71529A, H701KA0592, H111KA8418, GB16KA7790)。细菌琼脂粉、胰蛋白胨、葡萄糖、酵母浸粉、马铃薯-葡萄糖琼脂(PDA)培养基、沙氏葡萄糖液体(SDB)培养基, 均购自杭州水露生物科技有限公司。

菌株: 包括黄曲霉 *Aspergillus flavus* AS 3.3554、寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* AS 3.124、土曲霉 *Aspergillus terreus* AS 3.3935、杂色曲霉 *Aspergillus versicolor* AS 3.3886、红曲霉 *Monascus* sp AS 3.782、烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* AS 3.3572、毛霉 *Mucor* AS 3.3447、链格孢霉 *Alternaria* AS 3.4255、青霉 *Penicillium expansum* AS 3.3875、黑曲霉 *Aspergillus niger* CMCC(F) 98003 和构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* AS 3.3916, 均购自杭州水露生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养

将 1.1 项下 11 种菌株分别接种于 PDA 培养基上, 28℃ 培养箱中活化培养 5~7 d, 以菌落计数器观察各菌株的生长情况。

1.2.2 不同 DNA 提取方法考察

提取试剂盒考察: 分别用 Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒、Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取各菌株 DNA, 各菌株 DNA 采用液氮研磨的取材方式, 以 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果和 ITS 基因序列结果评价提取试剂盒的优劣。

处理方式考察: 采用提取效果较优的试剂盒, 评价 DNA 不同取材方式对总 DNA 提取的影响。即对平皿培养后的菌落采取以下 3 种取材方式, 直接将菌丝从平皿上刮下, 放入 2 mL 离心管中, 进行 DNA 提取; 用提取试剂盒中的 buffer PCB 将斜面培养的菌丝溶解, 取溶解液适量置 2 mL 离心管中, 进行 DNA 提取; 平皿上的菌丝转移至研钵内, 液氮研磨后再用试剂盒提取。总 DNA 提取产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证。

1.2.3 目标基因引物设计与扩增

根据 Ver-1, VerB, ITS 序列, 通过引物设计软件 Primer 5.0 设计相对应的多重 PCR 引物(见表 1), 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.4 单重 PCR 检测的特异性与灵敏度测定

PCR 反应体系: 10.0 μL 5×PCR buffer, 5.0 μL 10 mmol/L dNTP, 5 μmol/μL 引物 2 μL, 4 μL 25 mmol/L MgCl₂, 0.5 μL Taq 酶(5 U/μL), 1 μL DNA 模板

表 1 黄曲霉素产毒真菌的多重 PCR 目标基因及引物

Tab. 1 Multiplex PCR target genes and primers of aflatoxigenic fungi

目标基因 及登录号	引物	序列	长度 (bp)	退火温 度(℃)	产物大 小(bp)
Ver-1 (MH752564.1)	Ver1-A	5'-CTGACCCCAAGTATGAAC-3'	20	51.3	629
	Ver1-B	5'-GGGAACCAACAAGACGC-3'	18	58.1	
VerB (MH752564.1)	VerB-1	5'-GGGACAAGTTCTACTGAAG-3'	20	51.1	1143
	VerB-2	5'-CGATGACGGCAGTAAGCT-3'	18	53.6	
ITS	ITS1	5'-AGAAGTCGTAACAAGTTTCCGTAGG-3'	26	51.5	765
	ITS2	5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3'	20	57.6	

(10 ng/μL), 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测产物纯度。

以 1.1 项下 11 种菌株的 DNA 为模板, 在不同反应管中分别扩增 Ver-1(800 bp)、VerB(1 000 bp)、ITS(600 bp) 目标基因片段, 测定单基因 PCR 的特异性。以浓度确定的黄曲霉菌株基因组 DNA(20 ng/μL) 为模板, 按质量浓度 1 pg/μL~10 ng/μL 进行梯度稀释, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测单基因 PCR 扩增的灵敏度。

1.2.5 多重 PCR 特异性与灵敏度测定

以 1.1 项下 11 种菌株的 DNA 为模板, 在同一反应管中同时进行 Ver-1(800 bp)、VerB(1 000 bp)、ITS(600 bp) 目标基因片段的扩增, 测定多重 PCR 的特异性。以浓度确定的黄曲霉菌株基因组 DNA(20 ng/μL) 为模板, 依次稀释至 10, 1 ng/μL, 100, 10, 1, 0.1 pg/μL, 然后分别经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测多重 PCR 扩增的灵敏度。

1.2.6 多重 PCR 检测的重复性与稳定性测定

平行提取 3 份黄曲霉菌株 DNA, 按上述条件进行单管多重 PCR 扩增, 验证体系的重复性; 分别在第 1, 4, 7 天用同一份黄曲霉菌株 DNA 进行单管多重 PCR 检测, 验证体系的稳定性。

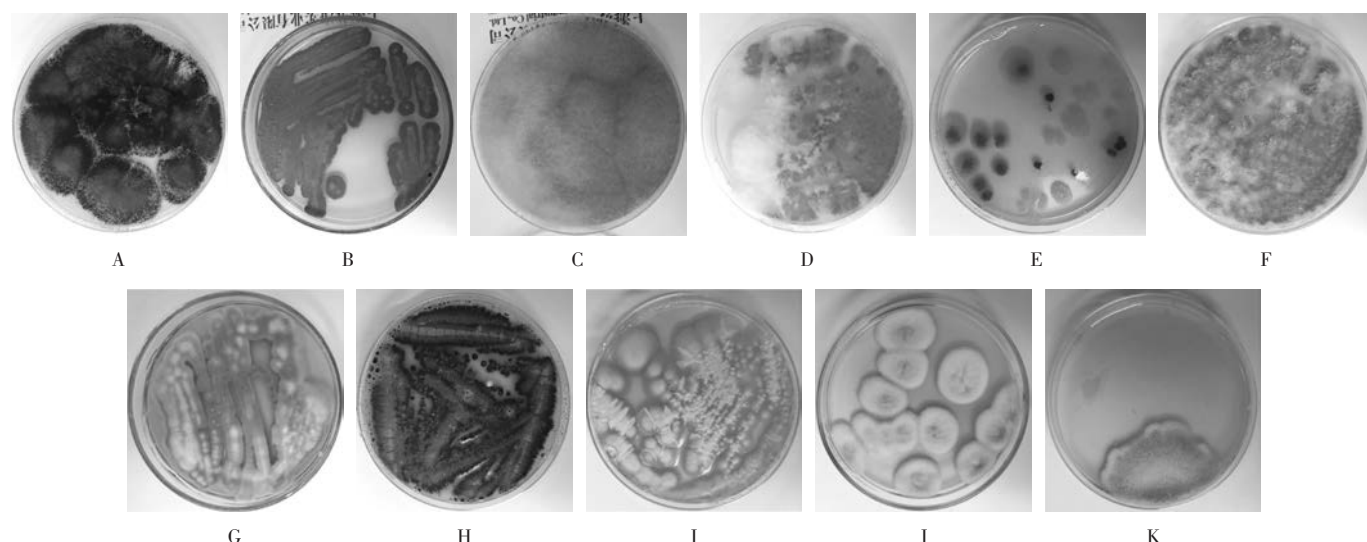
2 结果

2.1 菌株培养

各菌株培养结果见图 1。

2.2 DNA 提取方法比较

试剂盒优选: 将 1.1 项下 11 种菌株用液氮研磨后, 分别采用 Ezup 柱式真菌基因组抽提试剂盒和 Ezup 柱式植物基因组抽提试剂盒进行总 DNA 的提取。结果采用真菌基因组抽提试剂盒的 DNA 条带显示率为 100%, 采用植物基因组抽提试剂盒的 DNA 条带显示率为 50% (见图 2); 以真菌共有 ITS 序列为目标基因, 进行 PCR 扩增, 结果采用真菌基因组抽提试剂盒的 ITS 扩增率为 100%, 而采用植物基因组抽提试剂盒, ITS 扩增率为

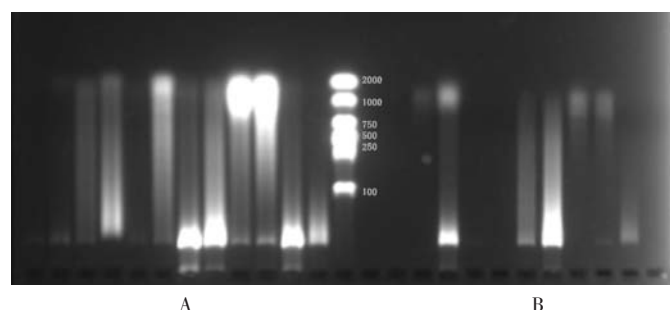


A. 黑曲霉 B. 青霉 C. 毛霉 D. 寄生曲霉 E. 红曲霉 F. 黄曲霉 G. 杂色曲霉 H. 烟曲霉 I. 土曲霉 J. 构巢曲霉 K. 链格孢霉

图 1 各菌株培养结果 (×100)

A. *Aspergillus niger* B. *Penicillium expansum* C. *Mucor* D. *Aspergillus parasiticus* E. *Monascus* F. *Aspergillus flavus* G. *Aspergillus versicolor*
H. *Aspergillus fumigatus* I. *Aspergillus terreus* J. *Aspergillus nidulans* K. *Alternaria*

Fig. 1 Culture results of each strain (×100)

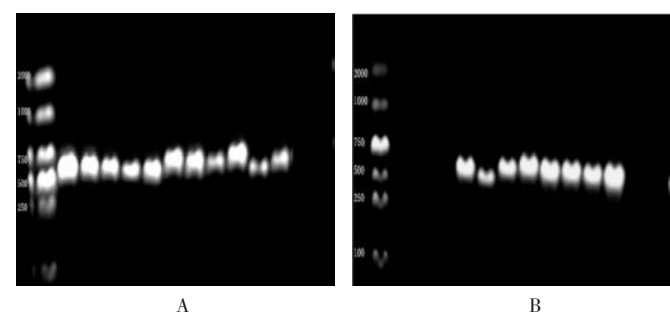


A. Ezup 柱式真菌基因组抽提试剂盒 B. 柱式植物基因组抽提试剂盒 Marker

图 2 两种不同试剂盒 DNA 琼脂糖凝胶图像

A. Ezup column fungal genome extraction kit B. Column plant genome extraction kit Marker

Fig. 2 DNA agarose gel images of two different kits



A. Ezup 柱式真菌基因组抽提试剂盒 B. Ezup 柱式植物基因组抽提试剂盒

图 3 两种不同试剂盒 ITS 扩增条带

A. Ezup column fungal genome extraction kit B. Ezup column plant genome extraction kit

Fig. 3 The ITS amplification bands of two different kits

66.7% (见图 3)。故选用真菌基因组抽提试剂盒提取。

取材方式:采用 Ezup 柱式真菌基因组抽提试剂盒提取各菌的 DNA,按 1.2.2 项下方法处理样品。结果第 1 种取材方式总 DNA 直接电泳,条带显示率为 16.7%,第 2 种为 50.0%,第 3 种为 100.0% (见图 4);以真菌共有 ITS 序列为目标基因进行扩增,结果第 1 种取材方式 ITS 扩增率为 75.0%,第 2 种为 91.7%,第 3 种为 100.0% (见图 5)。故选用液氮研磨法处理样品。

2.3 单重 PCR 检测特异性与基因序列比对

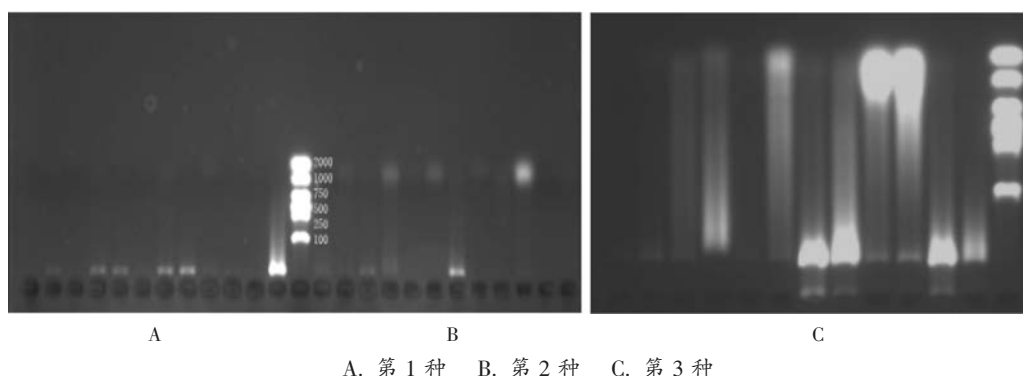
将 11 种菌株的 DNA 用 3 个引物 (ITS, Ver-1, VerB) 进行 PCR 扩增后,仅黄曲霉和寄生曲霉出现 3 个条带,分别为 600, 800, 1 000 bp 的特异片段,其余 9 种仅获得 600 bp 的特异片段,详见图 6。

测序后与 GenBank 中已知基因序列对比 (见图 7),可见 600, 800, 1 000 bp 片段分别对应的是各菌株的 ITS 片段、黄曲霉和寄生曲霉的 Ver-1 与 VerB 基因序列,表明针对目的 DNA 片段检测的引物设计成功。

2.4 多重 PCR 检测的特异性及灵敏性

特异性分析:将 1.1 项下 11 种菌株以液氮研磨处理,按 1.2.4 项下方法扩增 (图 8 A)。黄曲霉、寄生曲霉是已知可产毒的菌株,均出现了 3 个条带 (泳道 1 和 2),除了构巢曲霉 ITS 条带较弱以外,其余菌株均仅出现了 1 个明亮的 ITS 条带 (泳道 3 ~ 11)。

灵敏性分析:将已知浓度的黄曲霉 DNA 进行梯度稀释 (0.1 pg/μL ~ 10 ng/μL),按 1.2.4 项下方法扩增 (见图 8 B)。结果表明,在 DNA 质量浓度达到 1 ng/μL 时,

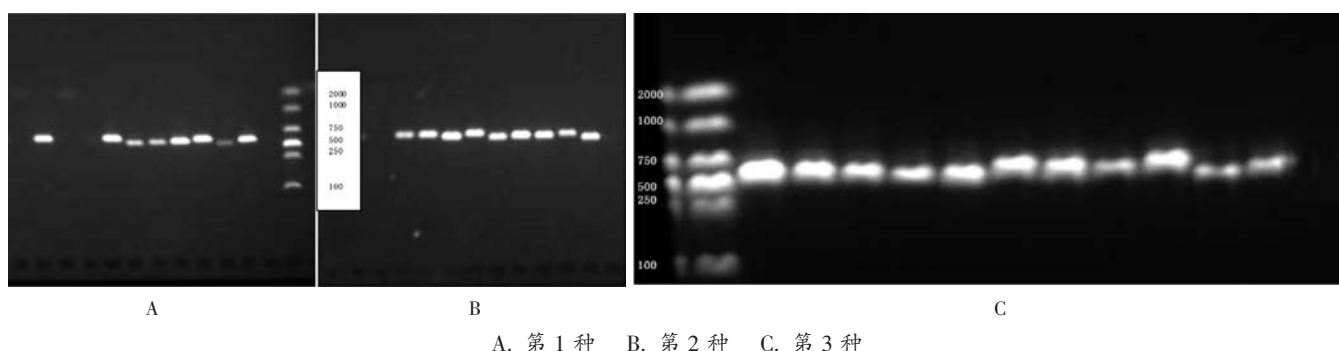


A. 第 1 种 B. 第 2 种 C. 第 3 种

图 4 不同取材方式提取的 DNA 凝胶图

A. The first kind B. The second kind C. The third kind

Fig. 4 DNA gel images extracted by different sampling methods

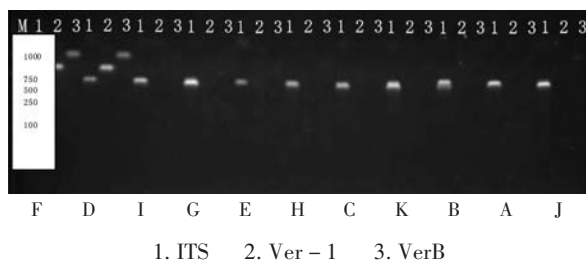


A. 第 1 种 B. 第 2 种 C. 第 3 种

图 5 不同取材方式下各菌株的 ITS 图像

A. The first kind B. The second kind C. The third kind

Fig. 5 ITS images of each strain under different sampling methods



1. ITS 2. Ver-1 3. VerB

图 6 11 种菌株 3 个目的基因单重 PCR 检测结果

1. ITS 2. Ver-1 3. VerB

Fig. 6 Single PCR detection results of target genes of 11 strains

出现明亮的多重条带(泳道 5);而 DNA 质量浓度在 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 时,ITS 条带亮度很弱,另外 2 个目标条带则完全不显现(泳道 4)。

2.5 多重 PCR 检测的重复性与稳定性

平行提取 3 份黄曲霉的 DNA,进行多重 PCR 检测(图 9 A)。取同 1 份黄曲霉总 DNA,分别在第 1,4,7 天进行 PCR 检测(图 9 B)。结果表明,所建立的体系连续 3 次检测结果一致,且在 7 d 内稳定性良好。

3 讨论

3.1 DNA 提取方式对多重 PCR 体系的影响

DNA 质量对多重 PCR 结果的影响较大,常用的 DNA 提取方式有 CTAB 法、SDS 法、改良 SDS 法等,本

研究中根据 DNA 提取方式的不同,考察了 2 种提取试剂盒,发现以 CTAB 法为原型的 Ezup 柱式提取试剂盒所提取的 DNA 效果更佳。

以真菌为原材料的 DNA 提取主要有菌株冻干粉直接提取、菌株复苏培养后收集菌丝体提取、菌株培养后菌丝体用液氮研磨后提取等多种方式,本研究中对不同提取方式均进行了尝试,结合实际发现,菌株用平皿扩大培养后,刮取菌落用液氮研磨后再提取 DNA,所得总 DNA 质量最佳。原因可能是真菌的细胞裂解程度相关,液氮冷冻处理后,再加裂解液水浴,可显著提高细胞破碎度、增加 DNA 溶出率,从而提高 DNA 产量。

3.2 引物设计对多重 PCR 体系的影响

在进行黄曲霉素产毒真菌的检测中发现,若想获得高灵敏度、高重复性、高稳定性的 PCR 体系,优质、合适的引物也是关键。本研究初期共设计了 20 对引物,通过单重 PCR 筛选,最终获得 3 条最佳引物。在引物设计中,将引物长度控制在 $18 \sim 27 \text{ bp}$ 、产物长度控制在 $200 \sim 500 \text{ bp}$ 、引物 GC 含量控制在 $40\% \sim 60\%$,并尽量减少引物二聚体的形成和发卡结构的形成,可有效提高引物有效性和特异性。

综上所述,本研究中设计的引物具有良好的特异

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy			
Sequences producing significant alignments						
Download Manage columns Show 100						
☒ select all 100 sequences selected						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒ Aspergillus sp. isolate MEBP0049 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	970	970	100%	0.0	100.00%	MT645617.1
☒ Aspergillus flavus isolate LUQHE small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	970	970	100%	0.0	100.00%	MT645322.1
☒ Aspergillus flavus isolate MT1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	970	970	100%	0.0	100.00%	MT629885.1
☒ Aspergillus flavus isolate BB-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, ar	970	970	100%	0.0	100.00%	MT584825.1
☒ Aspergillus oryzae isolate 2011F18 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	970	970	100%	0.0	100.00%	MT558944.1
☒ Aspergillus flavus isolate 2011F7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	970	970	100%	0.0	100.00%	MT558941.1
☒ Aspergillus flavus isolate H internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complet	970	970	100%	0.0	100.00%	MT550030.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_740 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT530016.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_595 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT529871.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_562 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT529838.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_544 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT529820.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_513 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT529789.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_316 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT529692.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_324 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT529400.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_118 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT529394.1
☒ Aspergillus flavus clone SF_114 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, J	970	970	100%	0.0	100.00%	MT529390.1

A

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments							
Download Manage columns Show 100							
select all 51 sequences selected							
GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
	Aspergillus flavus ver-1 gene, partial cds, strain RIB 1427	628	628	100%	5e-176	100.00%	AB007805.1
	Aspergillus flavus strain SJ-16 chromosome 3	623	623	100%	2e-174	99.71%	CP047251.1
	Aspergillus oryzae genes for AFLR_AFLJ_Putative short-chain alcohol dehydrogenase, Putative nonsolomonic acid reductase and VER1, co	623	623	100%	2e-174	99.71%	AB071288.1
	Aspergillus oryzae DNA, aflatoxin biosynthesis gene cluster, complete sequence, strain RIB40	623	623	100%	2e-174	99.71%	AB196490.1
	Aspergillus oryzae avrA, avrB, avrC, avrD, avrE, avrF, avrG, avrH, avrI, avrJ, avrK, avrL, avrM, avrN, avrO, avrP, avrQ, avrR, avrS, avrT, avrU, avrV, avrW, avrX, avrY, avrZ, avrAA, avrAB, avrAC, avrAD, avrAE, avrAF, avrAG, avrAH, avrAI, avrAJ, avrAK, avrAL, avrAM, avrAN, avrAO, avrAP, avrAQ, avrAR, avrAS, avrAT, avrAU, avrAV, avrAW, avrAX, avrAY, avrAZ, avrBA, avrBB, avrBC, avrBD, avrBE, avrBF, avrBG, avrBH, avrBI, avrBJ, avrBK, avrBL, avrBM, avrBN, avrBO, avrBP, avrBQ, avrBR, avrBS, avrBT, avrBU, avrBV, avrBW, avrBX, avrBY, avrBZ, avrCA, avrCB, avrCC, avrCD, avrCE, avrCF, avrCG, avrCH, avrCI, avrCJ, avrCK, avrCL, avrCM, avrCN, avrCO, avrCP, avrCQ, avrCR, avrCS, avrCT, avrCU, avrCV, avrCW, avrCX, avrCY, avrCZ, avrDA, avrDB, avrDC, avrDD, avrDE, avrDF, avrDG, avrDH, avrDI, avrDJ, avrDK, avrDL, avrDM, avrDN, avrDO, avrDP, avrDQ, avrDR, avrDS, avrDT, avrDU, avrDV, avrDW, avrDX, avrDY, avrDZ, avrEA, avrEB, avrEC, avrED, avrEE, avrEF, avrEG, avrEH, avrEI, avrEJ, avrEK, avrEL, avrEM, avrEN, avrEO, avrEP, avrEQ, avrER, avrES, avrET, avrEU, avrEV, avrEW, avrEX, avrEY, avrEZ, avrFA, avrFB, avrFC, avrFD, avrFE, avrFF, avrFG, avrFH, avrFI, avrFJ, avrFK, avrFL, avrFM, avrFN, avrFO, avrFP, avrFQ, avrFR, avrFS, avrFT, avrFU, avrFV, avrFW, avrFX, avrFY, avrFZ, avrGA, avrGB, avrGC, avrGD, avrGE, avrGF, avrGG, avrGH, avrGI, avrGJ, avrGK, avrGL, avrGM, avrGN, avrGO, avrGP, avrGQ, avrGR, avrGS, avrGT, avrGU, avrGV, avrGW, avrGX, avrGY, avrGZ, avrHA, avrHB, avrHC, avrHD, avrHE, avrHF, avrHG, avrHH, avrHI, avrHJ, avrHK, avrHL, avrHM, avrHN, avrHO, avrHP, avrHQ, avrHR, avrHS, avrHT, avrHU, avrHV, avrHW, avrHX, avrHY, avrHZ, avrIA, avrIB, avrIC, avrID, avrIE, avrIF, avrIG, avrIH, avrIJ, avrIK, avrIL, avrIM, avrIN, avrIO, avrIP, avrIQ, avrIR, avrIS, avrIT, avrIU, avrIV, avrIW, avrIX, avrIY, avrIZ, avrJA, avrJB, avrJC, avrJD, avrJE, avrJF, avrJG, avrJH, avrJI, avrJJ, avrJK, avrJL, avrJM, avrJN, avrJO, avrJP, avrJQ, avrJR, avrJS, avrJT, avrJU, avrJV, avrJW, avrJX, avrJY, avrJZ, avrKA, avrKB, avrKC, avrKD, avrKE, avrKF, avrKG, avrKH, avrKI, avrKJ, avrKK, avrKL, avrKM, avrKN, avrKO, avrKP, avrKQ, avrKR, avrKS, avrKT, avrKU, avrKV, avrKW, avrKX, avrKY, avrKZ, avrLA, avrLB, avrLC, avrLD, avrLE, avrLF, avrLG, avrLH, avrLI, avrLJ, avrLK, avrLL, avrLM, avrLN, avrLO, avrLP, avrLQ, avrLR, avrLS, avrLT, avrLU, avrLV, avrLW, avrLX, avrLY, avrLZ, avrMA, avrMB, avrMC, avrMD, avrME, avrMF, avrMG, avrMH, avrMI, avrMJ, avrMK, avrML, avrMM, avrMN, avrMO, avrMP, avrMQ, avrMR, avrMS, avrMT, avrMU, avrMV, avrMW, avrMX, avrMY, avrMZ, avrNA, avrNB, avrNC, avrND, avrNE, avrNF, avrNG, avrNH, avrNI, avrNJ, avrNK, avrNL, avrNM, avrNN, avrNO, avrNP, avrNQ, avrNR, avrNS, avrNT, avrNU, avrNV, avrNW, avrNX, avrNY, avrNZ, avrOA, avrOB, avrOC, avrOD, avrOE, avrOF, avrOG, avrOH, avrOI, avrOJ, avrOK, avrOL, avrOM, avrON, avrOO, avrOP, avrOQ, avrOR, avrOS, avrOT, avrOU, avrOV, avrOW, avrOX, avrOY, avrOZ, avrPA, avrPB, avrPC, avrPD, avrPE, avrPF, avrPG, avrPH, avrPI, avrPJ, avrPK, avrPL, avrPM, avrPN, avrPO, avrPP, avrPQ, avrPR, avrPS, avrPT, avrPU, avrPV, avrPW, avrPX, avrPY, avrPZ, avrQA, avrQB, avrQC, avrQD, avrQE, avrQF, avrQG, avrQH, avrQI, avrQJ, avrQK, avrQL, avrQM, avrQN, avrQO, avrQP, avrQQ, avrQR, avrQS, avrQT, avrQU, avrQV, avrQW, avrQX, avrQY, avrQZ, avrRA, avrRB, avrRC, avrRD, avrRE, avrRF, avrRG, avrRH, avrRI, avrRJ, avrRK, avrRL, avrRM, avrRN, avrRO, avrRP, avrRQ, avrRR, avrRS, avrRT, avrRU, avrRV, avrRW, avrRX, avrRY, avrRZ, avrSA, avrSB, avrSC, avrSD, avrSE, avrSF, avrSG, avrSH, avrSI, avrSJ, avrSK, avrSL, avrSM, avrSN, avrSO, avrSP, avrSQ, avrSR, avrSS, avrST, avrSU, avrSV, avrSW, avrSX, avrSY, avrSZ, avrTA, avrTB, avrTC, avrTD, avrTE, avrTF, avrTG, avrTH, avrTI, avrTJ, avrTK, avrTL, avrTM, avrTN, avrTO, avrTP, avrTQ, avrTR, avrTS, avrTT, avrTU, avrTV, avrTW, avrTX, avrTY, avrTZ, avrUA, avrUB, avrUC, avrUD, avrUE, avrUF, avrUG, avrUH, avrUI, avrUJ, avrUK, avrUL, avrUM, avrUN, avrUO, avrUP, avrUQ, avrUR, avrUS, avrUT, avrUU, avrUV, avrUW, avrUX, avrUY, avrUZ, avrVA, avrVB, avrVC, avrVD, avrVE, avrVF, avrVG, avrVH, avrVI, avrVJ, avrVK, avrVL, avrVM, avrVN, avrVO, avrVP, avrVQ, avrVR, avrVS, avrVT, avrVU, avrVV, avrVW, avrVX, avrVY, avrVZ, avrWA, avrWB, avrWC, avrWD, avrWE, avrWF, avrWG, avrWH, avrWI, avrWJ, avrWK, avrWL, avrWM, avrWN, avrWO, avrWP, avrWQ, avrWR, avrWS, avrWT, avrWU, avrWV, avrWW, avrWX, avrWY, avrWZ, avrXA, avrXB, avrXC, avrXD, avrXE, avrXF, avrXG, avrXH, avrXI, avrXJ, avrXK, avrXL, avrXM, avrXN, avrXO, avrXP, avrXQ, avrXR, avrXS, avrXT, avrXU, avrXV, avrXW, avrXX, avrXY, avrXZ, avrYA, avrYB, avrYC, avrYD, avrYE, avrYF, avrYG, avrYH, avrYI, avrYJ, avrYK, avrYL, avrYM, avrYN, avrYO, avrYP, avrYQ, avrYR, avrYS, avrYT, avrYU, avrYV, avrYW, avrYX, avrYY, avrYZ, avrZA, avrZB, avrZC, avrZD, avrZE, avrZF, avrZG, avrZH, avrZI, avrZJ, avrZK, avrZL, avrZM, avrZN, avrZO, avrZP, avrZQ, avrZR, avrZS, avrZT, avrZU, avrZV, avrZW, avrZX, avrZY, avrZZ	584	584	99%	1e-162	97.92%	AY510452.1

B

Sequences producing significant alignments		Download	Manage columns	Show	100		
☒ Select all 46 sequences selected							
Description		GenBank	Graphics	Distance tree of results			
		Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☒	Aspergillus flavus strain SRRC_1007 cytochrome P450 monooxygenase (verB) gene, complete cds	3040	3040	100%	0.0	100.00%	AF106959.1
☒	Aspergillus flavus strain A1 chromosome 3	2979	2979	100%	0.0	99.33%	CP061061.1
☒	Aspergillus flavus strain AF36 chromosome 3	2979	2979	100%	0.0	99.33%	CP061021.1
☒	Aspergillus flavus strain K49 chromosome 3	2979	2979	100%	0.0	99.33%	CP061077.1
☒	Aspergillus flavus strain VCG1 chromosome 3	2979	2979	100%	0.0	99.33%	CP061093.1
☒	Aspergillus flavus isolate AF36 aflatoxin biosynthesis gene cluster, complete sequence	2979	2979	100%	0.0	99.33%	AY510455.1
☒	Aspergillus flavus strain SRRC_141 cytochrome P450 monooxygenase (verB) gene, complete cds	2979	2979	100%	0.0	99.33%	AF106960.1
☒	Aspergillus flavus strain A9 chromosome 3	2968	2968	100%	0.0	99.21%	CP061037.1
☒	Aspergillus flavus strain K54A chromosome 3	2968	5937	100%	0.0	99.21%	CP061065.1
☒	Aspergillus flavus strain Tox4 chromosome 3	2968	2968	100%	0.0	99.21%	CP061045.1
☒	Aspergillus flavus strain VCG4 chromosome 3	2968	2968	100%	0.0	99.21%	CP061063.1
☒	Aspergillus flavus strain AF13 chromosome 3	2968	2968	100%	0.0	99.21%	CP060960.1
☒	Aspergillus flavus isolate AF13 aflatoxin biosynthesis gene cluster, complete sequence	2968	2968	100%	0.0	99.21%	AY510451.1
☒	Aspergillus flavus isolate AF70 aflatoxin biosynthesis gene cluster, complete sequence	2963	2963	100%	0.0	99.16%	AY510453.1
☒	Aspergillus flavus strain SJ-16 chromosome 3	2940	2940	100%	0.0	98.91%	CP047251.1
☒	Aspergillus oryzae DNA, aflatoxin biosynthesis gene cluster, complete sequence, strain RIB40	2787	2787	99%	0.0	97.26%	AB196490.1
☒	Aspergillus oryzae avrA, verB, avrD, omtB genes for cytochrome P450 monooxygenase, avrenin dehydrogenase, O-methyltransferase B, c	2787	2787	99%	0.0	97.26%	AB076804.1

C

A. ITS B. Ver - 1 C. VerB

图 7 基因序列比对结果

A. ITS B. Ver - 1 C. VerB

Fig. 7 Results of gene sequence alignment

性,且引物灵敏度较高,平行重复 3 次,均可呈现明亮条带,7 d 内稳定性良好。这说明建立的多重 PCR 体系具有较好的适用性,可用于后续黄曲霉素产毒真菌的检测。

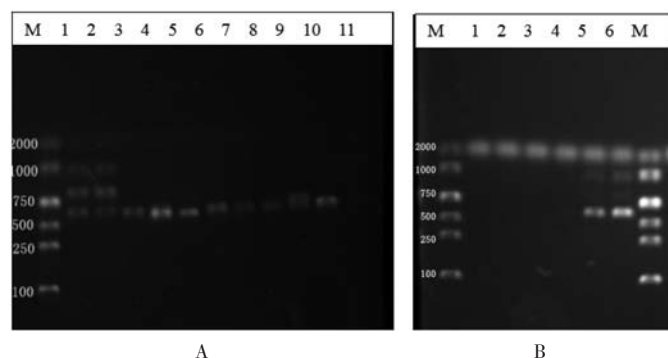
参考文献

[1] 范 楷,祭 芳,徐剑宏,等. 长三角地区市场常见农产品中

40 种真菌毒素的污染状况和特征分析[J]. 中国农业科学, 2021,54(13):2870 - 2884.

[2] YAZDANPANAH H,ESLAMIZAD S. Aflatoxins [J]. Toxinology, 2014,42(4):1 - 16.

[3] 杨博磊,张秀娟,王 刚,等. 我国土榨花生油黄曲霉毒素 B-1 及圆弧偶氮酸毒素污染调查[J]. 中国油脂,2020,45(9):



A. 特异性 B. 灵敏性

注:图 A 中,1-11 分别为黄曲霉、寄生曲霉、土曲霉、杂色曲霉、红曲霉、烟曲霉、毛霉、链格孢霉、青霉、黑曲霉、构巢曲霉;图 B 中 1-6 分别为 0.1, 1, 10, 100 pg/μL, 1, 10 ng/μL。

图 8 多重 PCR 检测各菌株基因组基因特异性与灵敏性检测

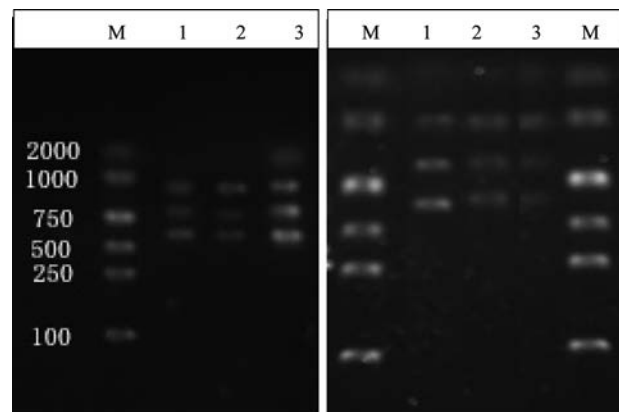
A. Specificity B. Sensitivity

Note: In Fig. A, 1-11 respectively represent *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Monascus*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*; In Fig. B, 1-6 respectively represent 0.1 pg/μL, 1 pg/μL, 10 pg/μL, 100 pg/μL, 1 ng/μL, 10 ng/μL.

Fig. 8 Multiplex PCR detection of gene specificity and sensitivity of each strain genome

34-37.

- [4] 杨成雷, 黄 桑, 莫来铭, 等. 肝癌细胞蛋白磷酸酶 2A 催化亚基在过氧化氢和黄曲霉毒素 B₁ 诱导慢性肝癌细胞损伤模型中的表达及其对肝癌细胞的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2730-2735.
- [5] 管飘萍, MUNKHBAYAR E, 黄紫贝, 等. 茶叶中 23 株真菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(16): 285-286.
- [6] 周永强, 易国莲, 王宇婷, 等. 苗药小花清风藤叶内生真菌 *Alternariaenuissima* 的鉴定[J]. 科学技术创新, 2020(23): 25-26.
- [7] 马 荣, 王利磊, 郭秀霞, 等. 一株病原真菌的分离鉴定及对淡色库蚊幼虫的致病性测定[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(6): 678-681.
- [8] 孙长坡, 常晓娇, 伍松陵, 等. 利用 PCR-RFLP 方法鉴别黄曲霉毒素产毒菌株[J]. 中国农业科学, 2014, 47(18): 3675-3683.
- [9] MAHMOUD MA. Detection of *Aspergillus flavus* in stored peanuts using realtime PCR and the expression of aflatoxin genes in toxigenic and atoxigenic *A. flavus* isolates [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015, 12(4): 289-296.
- [10] AHMAD MM, AHMAD M, ALI A, et al. Detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from aflatoxin-contaminated peanuts and their differentiation using PCR-RFLP [J]. Animals of Microbiology, 2014, 64(4): 1597-1605.
- [11] 张明明, 梁美丹, 黄志深, 等. 6 类致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测体系的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4667-4672.



A. 重复性 B. 稳定性

注:图 A 中,1-3 分别表示平行提取的 3 份黄曲霉 DNA 样品,图 B 中,1-3 分别表示第 1、4、7 天用同一份 DNA 进行多重 PCR。

图 9 多重 PCR 检测的重复性与稳定性

A. Repeatability B. Stability

Note: In Fig. A, 1-3 respectively represent the three *Aspergillus flavus* DNA samples extracted in parallel, and in Fig. B, 1-3 respectively represent the multiplex PCR with the same DNA on day 1, 4 and 7.

Fig. 9 Repeatability and stability of multiplex PCR detection

- [12] 陈 琛, 王炳彦, 钟兴文, 等. ELISA 与 HPLC-MS 检测玉米中黄曲霉毒素 B₁ 的比较分析[J]. 中国饲料, 2019(9): 87-92.
- [13] 邵 坤. 基于适配体纳米磁珠的黄曲霉毒素 B₁ 萃取及检测方法研究[D]. 成都: 西华大学, 2019.
- [14] 郝燕茹. 利用荧光定量技术检测生鲜乳中黄曲霉毒素 M1[J]. 农家参谋, 2019(17): 151.
- [15] KUMEDA Y, ASAO T. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section Flavi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(8): 2947-2952.
- [16] 李 慧, 蔡 军, 胡梦龙, 等. 产黄曲霉毒素真菌多重 PCR 检测体系的建立[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(1): 125-129.
- [17] 刘亚娜, 周喆麒, 王 芳, 等. 酵母细胞壁多糖提取纯化鉴定技术及其应用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(12): 3607-3616.
- [18] 赵 磊, 吴明宸, 于亚楠, 等. 酶联免疫和薄层层析法检测茶叶中黄曲霉毒素 B₁ 的评价[J]. 黑龙江医药, 2018, 31(6): 1190-1194.
- [19] 于世成. 多重 PCR 技术在快速检测食源性致病菌中的研究进展[J]. 食品安全导刊, 2020(15): 156.
- [20] 程 浩, 查 勇, 高丹丹, 等. 不同动物肌肉组织中 DNA 提取方法研究[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2020, 41(2): 73-79.
- [21] 何山文, 雷 琼, 马立安. 2 种提取野生蕈菌 DNA 方法的比较及其应用[J]. 长江大学学报(自科版), 2018, 15(6): 43-47.

(收稿日期: 2021-07-20)