

粮食真菌 DNA 快速高通量提取方法的建立与应用

崔 华, 王松山, 陈梦泽, 高树青, 朱 琳, 郭宝元*

(国家粮食和物资储备局科学研究院, 粮油质量安全研究所, 北京 102629)

摘 要: **目的** 建立一种高效、快速、高通量的粮食中真菌 DNA 提取和分析方法, 并应用于小麦产脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)镰刀菌污染状况研究。**方法** 基于磁珠纯化技术, 开发了一种粮食基质中真菌 DNA 的快速提取方法—月桂酰肌氨酸钠(sodium lauroyl sarcosine, SLS)磁珠法, 结合前期采用实时荧光定量聚合酶链式反应法(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)和微滴式数字 PCR 法(droplet digital PCR, ddPCR)建立的小麦中 3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyldeoxynivalenol, 3ADON)和 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyldeoxynivalenol, 15ADON)两种产 DON 毒素化学型镰刀菌及禾谷镰刀菌复合群分析方法, 对其提取效果进行了验证并分析了我国 2021 年新收获小麦产 DON 镰刀菌的污染水平。**结果** 与十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法、柱式法试剂盒和磁珠法试剂盒相比较, 本研究建立的 SLS 磁珠法裂解过程无需水浴, 配合自动化提取设备工作, 整个提取时间小于 1 h。对禾谷镰刀菌复合群的提取率最优, 而对 3ADON 和 15ADON 化学型镰刀菌的提取率与经典 CTAB 法、磁珠法试剂盒没有显著性差异, 并且显著优于柱式法试剂盒。在对 2021 年收获的 120 个小麦样品监测结果显示, 产 DON 镰刀菌的生物量与 DON 毒素水平之间具有极显著的相关性($P<0.01$)。**结论** SLS 磁珠法适用于从基质复杂的粮食样品中提取真菌 DNA, 操作简便快速、提取率高, 更易实现大样本量的分子生物学准确定量检测需求。

关键词: 真菌; DNA 提取; 磁珠; 粮食; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 镰刀菌

Establishment and application of a rapid high-throughput extraction method of fungal DNA for grains

CUI Hua, WANG Song-Shan, CHEN Meng-Ze, GAO Shu-Qing, ZHU Lin, GUO Bao-Yuan*

(Institute of Grain and Oil Quality and Safety, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: Objective To establish an efficient, rapid and high-throughput method for the extraction and analysis of fungal DNA in grains and apply to study the contamination status of deoxynivalenol (DON) producing *Fusarium* in wheat. **Methods** Based on the magnetic bead purification technology, a rapid extraction method of

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605200、2019YFC1605202)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(ZX2010)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605200, 2019YFC1605202), and the Fundamental Research Funds for the Academy of National Food and Strategic Reserves Administration (ZX2010)

*通信作者: 郭宝元, 博士, 研究员, 主要研究方向为粮油质量安全检测。E-mail: gby@ags.ac.cn

*Corresponding author: GUO Bao-Yuan, Ph.D, Professor, Institute of Grain and Oil Quality and Safety, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, No.11 Baiwanzhuang Street, Beijing 102629, China. E-mail: gby@ags.ac.cn

fungal DNA from grain substrate—sodium lauroyl sarcosine (SLS) magnetic bead method was developed. Combined with the 3-acetyldeoxynivalenol (3ADON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15ADON) in wheat established by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and droplet digital PCR (ddPCR) 2 kinds of methods for analysis of chemical *Fusarium* producing DON toxin and *Fusarium graminearum* complex, the extraction effect was verified and the contamination level of DON producing *Fusarium* in newly harvested wheat in 2021 in China was analyzed. **Results** Compared with the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method, column method kit and magnetic bead method kit, the SLS magnetic bead method established in this study needed no water bath heating in the cracking process in about 1 h with the automated extraction equipment. The SLS magnetic bead method performed best in the extraction rate of the *Fusarium graminearum* species complex among the DNA extraction methods mentioned above, and the extraction rate of 3ADON and 15ADON chemical types of *Fusarium* had no significant difference from the CTAB method and magnetic bead method kit, and was significantly better than the column method kit. The monitoring results of 120 wheat samples harvested in 2021 showed that there was a very significant correlation between the biomass of DON producing *Fusarium* and the level of DON toxin ($P < 0.01$). **Conclusion** The SLS magnetic bead method is suitable for extracting fungal DNA from grain samples with complex matrix, with simple operation and high extraction rate, which makes it easier to meet the requirements for accurate quantitative detection of molecular biology with large sample size.

KEY WORDS: fungal; DNA extraction; magnetic beads; grain; deoxynivalenol; *Fusarium*

0 引 言

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON), 又称呕吐毒素, 是小麦中检出率最高的真菌毒素^[1], 国内外已将其污染风险列为关注重点, 并对其设定了严格的限量标准^[2], 我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》对谷物及其制品的限量为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。世界上已知的产 DON 真菌包括禾谷镰刀菌复合群(*Fusarium graminearum* species complex, FGSC)^[3]、假禾谷镰刀菌(*F. pseudograminearum*)、黄色镰刀菌(*F. culmorum*)等^[4-6], 其中 FGSC 是我国小麦中主要的产 DON 真菌^[7], 是当前我国小麦 DON 毒素防控研究中应重点关注的产毒真菌。另外, 产 DON 镰刀菌在代谢过程中还会产生 3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyldeoxynivalenol, 3ADON)或 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyldeoxynivalenol, 15ADON)两种化学型的毒素衍生物, 据此又将产 DON 镰刀菌划分为 3ADON 和 15ADON 两种毒素化学型^[8-10], 了解产 DON 镰刀菌化学型的组成, 对小麦的病害控制和 DON 管理具有重要意义^[11]。

相关研究表明, 小麦中产 DON 镰刀菌生物量与 DON 污染水平密切相关^[12-14]。因此, 针对小麦中产 DON 镰刀菌种类和生物量进行监测, 并分析其与 DON 含量的关系, 可以为前置化的毒素干预防控工作提供技术支撑。目前产 DON 镰刀菌的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)定量检测技术已较为成熟, 但研究中多采用常规方法进行 DNA 提取, 根据萃取方法可分为有机萃取法(苯酚/氯仿)、无机萃取法(盐析法)和固相萃取法(固体基质)^[15], 需

要多次离心、移液操作, 效率较低。由于不同样本的基质特性不同, 需要根据其细胞结构、DNA 结合蛋白及杂质情况选择合适的裂解和纯化体系, 才能获得高质量的 DNA。近年来, 基于磁珠的新型 DNA 纯化提取技术已被广泛应用于各个领域, 与常规提取方法相比, 磁珠法无需反复沉淀、离心等繁杂操作, 利用磁珠的磁吸特性可实现自动化批量 DNA 纯化^[16-17]。现有的商品化磁珠法 DNA 提取试剂盒种类繁多, 按提取对象不同可以分为动物组织、植物组织、血液、唾液、尿液、病毒、细菌、真菌、土壤等类型, 各自具有一定的适应性。粮食基质种类多并且样本量大, 要想高效提取获得其携带的全部真菌 DNA 不能单纯使用市面上已有的植物组织或者真菌 DNA 提取试剂盒。因此, 有必要开发一种简单、快速、高效、高通量的 DNA 提取方法, 用于满足粮食真菌大规模分子生物学检测需求。

本研究拟针对粮食基质样品开发简便、高效裂解体系, 同时基于磁珠纯化技术, 建立一种快速、高通量的粮食真菌 DNA 提取方法, 并应用于小麦产 DON 镰刀菌污染状况研究, 为今后开展产 DON 镰刀菌种群结构及污染分布规律等相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦样品为我国小麦主产区—河南、山东和安徽 3 个地区 2021 年收获的小麦, 共计 120 份, 样品研磨过 40 目筛后保存备用。

磁珠法植物基因组 DNA 提取试剂盒、DNA secure 新型

植物基因组 DNA 提取试剂盒、蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris hydrochloride, Tris-HCl, pH 8.0)、核糖核酸酶 A (ribonuclease A from bovine pancreas, RNase A, 10 mg/mL)、1×TE 缓冲液[天根生化科技(北京)有限公司]; 石英砂(20~40 目)(天津市光复精细化工研究所); 月桂酰肌氨酸钠(sodium lauroyl sarcosine, SLS)、十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)、异硫氰酸胍、冰乙酸、异戊醇、三氯甲烷(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 氯化钠、吐温 80、乙二胺四乙酸二钠、无水乙醇(分析纯, 西陇化工股份有限公司); ε-聚赖氨酸(ε-poly-L-lysine, ε-PL)(上海源叶生物科技有限公司); PEG 8000 聚乙二醇(生物技术等级, 北京博奥拓达科技有限公司); DNA 提取酚试剂(索莱宝生物科技有限公司); 乙腈[色谱纯, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; Premix Ex Taq™ Probe qPCR[宝生物工程(大连)有限公司]; ddPCR TM Supermix for Probes (no dUTP)(美国 Bio-Rad 公司); 二氧化硅羧基磁珠悬浮液(苏州海狸生物医学工程有限公司); DON (100 μg/mL), DON 同位素内标 (¹³C₁₅-DON, 20 μg/mL) [ROMER 国际贸易(北京)有限公司]; 全麦粉中 3 种真假毒素成分分析标准物质[GBW(E)100817, DON 标准值 0.97 mg/kg, 不确定度(k=2)为 0.13 mg/kg](国家粮食和物资储备局科学研究院)。

1.2 仪器与设备

JXCL-6K 三维冷冻离心研磨仪(上海净信实业发展有限公司); Auto-Pure208 全自动核酸提取仪(杭州奥盛仪器有

限公司); Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计、UltiMate 3000 快速液相色谱仪、Q-Exactive 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪、QX200 微滴式数字 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司); VX-III 多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司); JXYM-0510 研磨管(上海净信实业发展有限公司); MS3002TS/02 天平(精度 0.01 g, 瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

称取 6.0 g 小麦粉至 50 mL 离心管, 加入 6.0 g 石英砂、30 mL 无菌生理盐水(0.85% NaCl)和 10 μL 吐温 80, 置于涡旋振荡器中高速振荡 4 min; 室温静置 20 min 后, 转移上清液至干净的离心管中, 8000 r/min 离心 15 min, 弃上清; 将含有菌体的沉淀全部转移至 2 mL 研磨管中。

1.3.2 DNA 提取

SLS 磁珠法: 向含有菌体的研磨管中加入 1 mL SLS 裂解液(2% SLS、20 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠、50 mmol/L Tris-HCl、1 mol/L NaCl、20 mmol/L ε-PL), 置于三维冷冻离心研磨仪, 速度 18 M/s, 处理 2×30 s, 间隔 120 s; 12000 r/min 离心 5 min, 将上清全部转移至 DNA 纯化孔板中, 按表 1 所示在各孔位中分别加入相应体积的试剂, 包括结合液(20% PEG 8000, 4 mol/L NaCl)、磁珠悬浮液、清洗液 I (3 mmol/L 异硫氰酸胍, 60%乙醇)、清洗液 II (75%乙醇)和 TE 缓冲液, 然后将纯化孔板置于全自动核酸提取仪中运行净化收集程序(表 2)。

表 1 DNA 纯化孔板中各孔位试剂添加名称与体积

Table 1 Name and volume of reagents added to each well in the DNA purification plate

	孔位 1	孔位 2	孔位 2	孔位 3	孔位 4	孔位 5	孔位 6
试剂	结合液	磁珠悬浮液	清洗液 I	清洗液 II	清洗液 II	清洗液 II	TE 缓冲液
用量	与样品裂解液上清等体积	16 μL	800 μL	1 mL	1 mL	1 mL	100 μL

表 2 全自动核酸提取仪净化收集程序

Table 2 Automatic nucleic acid extractor purification and collection procedure

步骤	名称	孔位	混合时间/min	吸磁时间/s	等待时间/min	容积/μL	混合速度(1~10)	温度/°C
1	混合	1	2	0	0	1600	5	/
2	磁珠转移	2	0	20	0	800	0	/
3	结合(慢)	1	3	0	0	800	5	/
4	结合(快)	1	3	50	0	800	8	/
5	洗涤 1	2	3	20	0	1000	8	/
6	洗涤 2	3	2	20	0	1000	8	/
7	洗涤 3	4	2	20	0	1000	8	/
8	洗涤 4	5	2	20	5	1000	8	/
9	洗脱 1	6	3	0	0	100	5	/
10	洗脱 2	6	5	50	0	100	8	65
11	磁珠回收	2	1	0	0	800	8	/

注: /表示该步骤没有使用此参数。

磁珠法试剂盒: 按照磁珠法植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书要求, 向含有菌体的研磨管中按比例添加相关试剂进行 DNA 提取, 并在全自动核酸提取仪上机运行 DNA 净化收集程序(表 2), 最终用 TE 缓冲液定容 DNA 体积为 100 μ L。

柱式法试剂盒: 按照 DNAsecure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书要求, 向含有菌体的研磨管中按比例添加相关试剂进行 DNA 提取, 最终用 TE 缓冲液定容 DNA 体积为 100 μ L。

CTAB 法: 向含有菌体的研磨管中加入 1 mL CTAB 提取液(2% CTAB、20 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠、0.1 mol/L Tris-HCl、1.4 mol/L NaCl)和 40 μ L 蛋白酶 K 溶液, 置于研磨仪中速度 18 M/s 处理 2 $\times$ 30 s, 间隔 120 s; 65 $^{\circ}$ C 水浴 60 min(期间每隔 10 min 颠倒混匀 1 次)后, 再加入 20 μ L RNase A, 12000 r/min 离心 10 min, 转移上清液; 加入酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, $V:V:V$), 振荡混匀, 12000 r/min 离心 10 min, 重复此步骤 1~2 次, 转移上清; 加入等体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇, 上下颠倒混匀 30 s, 12000 r/min 离心 10 min, 弃掉液体; 用 75% 的乙醇清洗沉淀 2 次, 晾干乙醇, 用 100 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀。

1.3.3 DNA 质量检测

应用 Nano Drop 2000 微量紫外分光光度计测定 DNA 的浓度, 以及在 230、260 和 280 nm 处的吸光度。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测

Premix 12.5 μ L、上下游引物(10 μ mol/ μ L)各 0.75 μ L、探针(10 μ mol/ μ L) 0.5 μ L、DNA 模板 2 μ L, 补水至 25 μ L。反应步骤为 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 循环步骤为 95 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 共 40 个循环。引物和探针序列见表 3。

表 3 引物和探针序列 Table 3 Primer and probe sequences		
基 因	序 列	参考 文献
禾谷镰刀菌复合群 (FGSC)	F: ATCCGACATGGCAAAC TTAT	[18]
	R: AACAGTCGGTTAAGGATAATA	
	探针: (HEX)-AGTGCAGTTATATGT GCC-(MGB)	
3-ADON 化学型镰刀菌	F: CATGCGGGACTTTGATCGAT	[11]
	R: TTTGTCCGCTTCTTTCTATCATA AA	
	探针: (FAM)-CTCACCGATCATGTTC -(MGB)	
15-ADON 化学型镰刀菌	F: TCCAATCATTGCCAGCCTCTA	
	R: TGATGCGGAACATGGTCTGT	
	探针: (FAM)-ATGAGGGACTTTGACC AAT-(MGB)	

1.3.5 微滴式数字 PCR 检测

Supermix 10 μ L、上下游引物(10 μ mol/ μ L)各 1.8 μ L、探针(10 μ mol/ μ L) 0.5 μ L、DNA 模板 2 μ L, 补足水至 20 μ L。

反应步骤为 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 循环步骤为 95 $^{\circ}$ C, 5 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 共 40 个循环。引物和探针序列同实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测。

1.3.6 毒素检测

称取 5 g(精确至 0.01 g)小麦粉样品至 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈-水-冰乙酸提取液(70:29:1, $V:V:V$), 涡旋振荡 30 min 后 6000 r/min 离心 10 min; 将 0.5 mL 上清液与等体积水混匀, 在 4 $^{\circ}$ C 下 12000 r/min 离心 10 min; 使用 0.22 μ m 聚四氟乙烯滤膜过滤上清液; 吸取 180 μ L 滤液与 20 μ L 脱氧雪腐镰刀菌烯醇同位素内标混匀后进行检测^[19], 并采用全麦粉中 3 种真假毒素成分分析标准物质作为质控。

1.4 数据分析

采用 SPSS 20 软件进行单因素方差分析, 确定 4 种提取方法所得 DNA 相关检测结果的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 SLS 磁珠法 DNA 提取效果验证

2.1.1 提取浓度

不同方法提取获得的 DNA 浓度和纯度不同, 进而会影响 PCR 扩增等后续的分子生物学分析结果的准确性^[20]。为了验证 SLS 磁珠法对小麦中真菌 DNA 的提取效果, 采用该方法对 3 种不同污染水平的产 DON 镰刀菌小麦样品进行 DNA 提取, 同时采用经典 CTAB 法、商品化柱式法试剂盒和磁珠法试剂盒进行对比。紫外分光光度计检测结果显示(表 4), 4 种方法对不同样品获得的 DNA 浓度均差异显著, 其中 CTAB 法最高, 3 种样品的平均质量浓度约为 9037.33 ng/ μ L; 其次是磁珠法试剂盒, 平均质量浓度约 6134.89 ng/ μ L; 柱式法试剂盒最低, 平均质量浓度仅约为 783.07 ng/ μ L。本研究建立 SLS 磁珠法 DNA 提取量处于中间水平, 平均质量浓度约为 2046.53 ng/ μ L。

虽然本研究已通过石英砂振荡富集法对小麦样品进行了前处理, 扩大样品检测量的同时减少了小麦基质的干扰, 但获得的菌体沉淀中仍不可避免地存在小麦基质残留, 最终提取获得的 DNA 中不仅包含微生物 DNA, 还含有一定量的小麦 DNA。因此, 获得 DNA 浓度的高低只能代表该方法对全部基质的提取能力, 而不能代表其对真菌 DNA 的提取能力。SLS 磁珠法的裂解纯化体系针对微生物基质做了优化, 通过添加一定量的 ϵ -PL, 能够尽可能多地提取菌体 DNA, 因为 ϵ -PL 是一种阳离子聚合多肽, 不仅能通过静电吸附作用有效破坏微生物细胞壁(膜)结构, 致使细胞裂解, 还能在进入细胞后与带负电荷的 DNA 相结合, 从而彻底释放 DNA^[21-23]。在 SLS 裂解体系中, 不需要加热辅助, 在常温下 5 min 内即可充分完成 DNA 释放。

表 4 4 种提取方法获得的 DNA 浓度和纯度比较
Table 4 Comparison of DNA concentration and purity obtained by 4 kinds of extraction methods

检测项目	提取方法	样品			平均值
		1	2	3	
质量浓度 (ng/μL)	CTAB 法	10628.30±781.79 ^a	7387.40±773.22 ^a	9096.3±854.57 ^a	9037.33
	柱式法试剂盒	1325.87±23.67 ^d	530.23±42.43 ^d	493.10±50.22 ^d	783.07
	磁珠法试剂盒	6356.63±46.93 ^b	6211.77±306.58 ^b	5836.27±114.13 ^b	6134.89
	SLS 磁珠法	2311.73±173.27 ^c	2222.73±199.12 ^c	1605.13±79.81 ^c	2046.53
A_{260}/A_{280}	CTAB 法	2.05±0.01	1.93±0.09	2.01±0.01	2.00
	柱式法试剂盒	2.10±0.02	1.94±0.01	1.94±0.05	1.99
	磁珠法试剂盒	1.96±0.08	1.89±0.03	1.91±0.01	1.92
	SLS 磁珠法	1.97±0.01	1.96±0.01	1.95±0.02	1.96
A_{260}/A_{230}	CTAB 法	2.08±0.03	1.90±0.10	1.99±0.02	1.99
	柱式法试剂盒	2.34±0.01	2.26±0.05	2.34±0.01	2.31
	磁珠法试剂盒	1.95±0.08	1.76±0.11	1.83±0.05	1.85
	SLS 磁珠法	2.05±0.07	2.03±0.07	1.98±0.03	2.02

注：不同字母(a~d)表示不同方法间的差异显著($P<0.05$)，样品 1~3 分别表示高、中、低污染浓度；下同。

2.1.2 提取纯度

DNA 纯度通过计算在 260 与 280 nm 处吸光度比值(A_{260}/A_{280})来进行评估， A_{260}/A_{280} 应该在 1.7~2.0，低于 1.7 表示有蛋白质等杂质污染，而大于 2.0 则表示有 RNA 污染。而 260 与 230 nm 处吸光度比值(A_{260}/A_{230})是衡量相对纯度的关键指标，由于许多杂质在 230 nm 处具有吸收峰，例如残留的盐离子、多糖、多酚等，它们会抑制 PCR 反应，所以 A_{260}/A_{230} 应该大于 2.0^[24]。由表 4 可以看出，各提取方法获得的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 平均值均在 1.7~2.0 范围内，而对于 A_{260}/A_{230} ，磁珠法试剂盒提取的 3 种样品 DNA 均小于 2.0，说明该方法对样品中多糖或盐离子的去除能力欠佳，该情况同样存在于 CTAB 法的样品 2、3 及 SLS 磁珠法提取的样品 3 中。

2.1.3 目的 DNA 提取率

应用 qPCR 对各方法提取的 DNA 分别检测 FGSC、3ADON 化学型及 15ADON 化学型镰刀菌的生物量(表 5~7)。其中，SLS 磁珠法对高污染浓度小麦中 FGSC 的提取率均显著性优于其他 3 种方法；对中、低污染浓度小麦中 FGSC 的提取率显著性优于 CTAB 法和柱式法试剂盒，优于磁珠法试剂盒；对高、中、低污染浓度小麦中 3ADON

表 5 4 种方法提取的 DNA 对 FGSC qPCR 检测结果比较(n=3)
Table 5 Comparison of qPCR detection results of DNA extracted by 4 kinds of methods for FGSC (n=3)

样品	Ct 值			
	CTAB 法	柱式法试剂盒	磁珠法试剂盒	SLS 磁珠法
1	18.82±0.43 ^c	20.39±0.16 ^d	18.36±0.17 ^b	17.81±0.30 ^a
2	24.29±1.32 ^c	22.42±1.03 ^b	21.38±0.10 ^a	21.29±0.41 ^a
3	31.13±0.32 ^b	31.19±1.01 ^b	30.12±1.36 ^a	29.48±0.58 ^a

表 6 4 种方法提取的 DNA 对 3ADON 型镰刀菌 qPCR 检测结果比较(n=3)

Table 6 Comparison of qPCR detection results of DNA extracted by 4 kinds of methods for 3ADON *Fusarium* (n=3)

样品	Ct 值			
	CTAB 法	柱式法试剂盒	磁珠法试剂盒	SLS 磁珠法
1	19.00±0.09 ^a	21.72±0.17 ^b	19.44±0.53 ^a	19.01±0.26 ^a
2	23.24±0.43 ^a	24.78±0.03 ^b	23.31±0.34 ^a	23.47±0.40 ^a
3	33.430±0.39 ^a	35.14±0.74 ^b	34.05±0.56 ^a	32.67±0.58 ^a

表 7 4 种方法提取的 DNA 对 15ADON 型镰刀菌 qPCR 检测结果比较(n=3)

Table 7 Comparison of qPCR detection results of DNA extracted by 4 kinds of methods for 15ADON *Fusarium* (n=3)

样品	Ct 值			
	CTAB 法	柱式法试剂盒	磁珠法试剂盒	SLS 磁珠法
1	22.13±0.28 ^a	23.50±1.09 ^b	21.40±0.36 ^a	21.53±0.49 ^a
2	23.82±0.61 ^a	26.26±0.12 ^b	23.60±0.20 ^a	23.40±0.30 ^a
3	28.48±0.60 ^a	31.65±0.14 ^b	28.32±0.19 ^a	28.63±0.52 ^a

和 15ADON 化学型镰刀菌的提取率均与经典 CTAB 法和磁珠法试剂盒没有显著性差异，并且显著性优于柱式法试剂盒。由此说明，SLS 磁珠法对于各类型产 DON 镰刀菌均具有较高的 DNA 提取率，能够满足定量 PCR 检测结果准确性需求。

2.2 4 种 DNA 提取方法过程比较

通过对比 4 种 DNA 提取方法的提取过程中所涉及的条件发现(表 8)，本研究建立的 SLS 磁珠法试剂成本高于 CTAB 法和柱式法试剂盒法，但时间成本低(<60 min)，且可实现自动化；与现有磁珠法试剂盒相比，时间成本接近，试剂成本略低，但 SLS 磁珠法裂解过程无需水浴，这不仅减少了操作步骤、节省了提取时间，将更加有利于全过程

自动化提取的实现, 从而进一步减少人工干预和操作误差, 使 DNA 提取更加准确高效。

表 8 不同方法提取过程条件比较
Table 8 Comparison of extraction process conditions of different methods

方法	成本/元	耗时/min	裂解水浴	实现全自动化
SLS 磁珠法	18	<60	不需要	可以
磁珠法试剂盒	24	<60	需要	可以
柱纯化试剂盒	16	>60	不需要	不可以
CTAB 法	5	>90	需要	不可以

2.3 小麦样品产 DON 镰刀菌污染水平分析

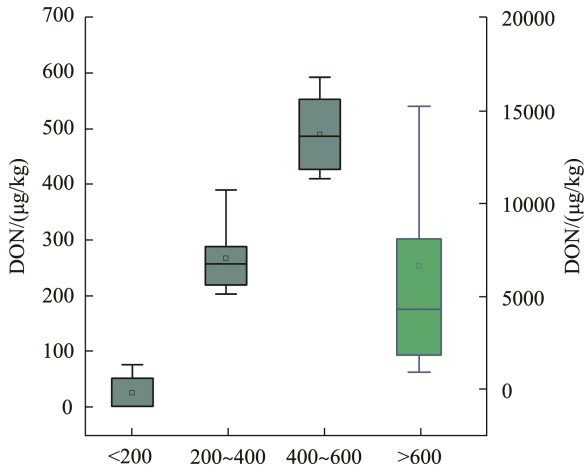
应用本研究建立的 DNA SLS 磁珠提取法和产 DON 镰刀菌微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 分析方法, 对我国 2021 年收获的 120 个小麦样品中 FGSC、3ADON 化学型及 15ADON 化学型镰刀菌的污染生物量进行了检测。

按照样品中的 DON 毒素污染含量分为 4 组, 分别为 <200、200~400、400~600、>600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (图 1)。FGSC 的生物量与 DON 污染量的变化趋势一致(图 2A), 并且二者之间具有极显著的相关性($r=0.848$, $P<0.01$), 其中低浓度样品(<200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)中检出的 FGSC 生物量的范围较宽, 而中间浓度(200~400 和 400~600 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的则较窄, 这可能与样品数量及代表性有关。同样, 该规律也在 3ADON 及 15ADON 化学型镰刀菌的生物总量检测结果显示(图 2B), 这两种化学型镰刀菌的生物总量与 DON 污染量的变化趋势也是一致的, 并且二者之间也具有极显著的相关性($r=0.942$, $P<0.01$)。

ddPCR 技术是一种主流的数字 PCR 检测方法^[25], 通过把样本 DNA 分割至近 2 万个微滴中, 每个微滴大多数包含 0 或 1 个 DNA 分子, 然后通过 PCR 扩增后读取荧光信号, 根据泊松分布计算出样本中的目的 DNA 分子数量, 检测过程不需要使用标准品建立标准曲线, 以绝对定量为核心^[26-27], 其检测结果能够准确反映出样品中目标检测物的真实生物量, 能够实现真正意义上的绝对定量^[28-30]。该技术已应用于多个检测领域, 在食品领域主要应用于食源性致病菌、转基因、食品掺假等方面的检测^[31-32]。结果表明, 本研究建立的 SLS 磁珠法对小麦样品中产 DON 镰刀菌 DNA 具有可靠的提取率, 其定量 PCR 检测结果能够准确反映出样品中污染的产 DON 真菌生物量。

3 结 论

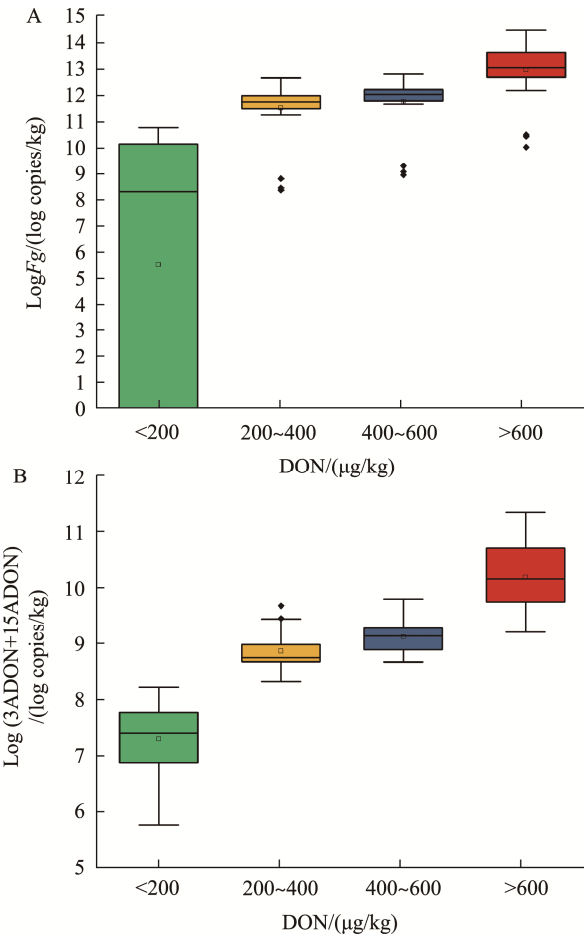
本研究基于磁珠纯化技术针对粮食基质真菌建立了一种无需加热裂解的 DNA 提取方法, 能够在 1 h 内高效、快速、高通量地提取出粮食品中的真菌 DNA, 提取率普遍优于经典 CTAB 法、柱式法试剂盒和磁珠法试剂盒。结合前期建立的产 DON 镰刀菌 ddPCR 分析方法对小麦实际样品的定量检测结果显示, 产 DON 镰刀菌的生物量与 DON 毒素污染含量趋势一致, 证实 SLS 磁珠法适用于从基质复杂的粮食品中提取真菌 DNA, 更容易实现大样本量的分子生物学定量检测需求。



注: <200、200~400、400~600 对应值为左侧纵坐标轴;
>600 对应值为右侧纵坐标轴。

图 1 120 个小麦样品 DON 毒素污染水平箱线图

Fig.1 Boxplot of DON toxin contamination level in 120 wheat samples



注: A 表示 FGSC; B 表示 3ADON 化学型及 15ADON 化学型镰刀菌总量。

图 2 不同 DON 毒素污染水平下的小麦中产 DON 镰刀菌生物量分布箱线图

Fig.2 Box plots of biomass distribution of DON producing *Fusarium* in wheat under different DON toxin contamination levels

参考文献

- [1] BINDER EM, TAN LM, CHIN LJ, *et al.* Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2007, 137(3): 265–282.
- [2] CHELI F, BATTAGLIA D, GALLO R, *et al.* EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins [J]. *Food Control*, 2014, 37: 315–325.
- [3] AMARASINGHE C, SHARANOWSKI B, FERNANDO WGD. Molecular phylogenetic relationships trichothecene chemotype diversity and aggressiveness of strains in a global collection of *Fusarium graminearum* species [J]. *Toxins*, 2019, 11(5): 263.
- [4] 杨美欣. 中国南方小麦赤霉菌群体遗传结构与初侵染源分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- YANG MX. Population structure and primary inoculum of pathogen of fusarium head blight on wheat in southern China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [5] KHANEGHAH AM, MARTINS LM, VONHERTWIG AM, *et al.* Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing-A review [J]. *Trend Food Sci Technol*, 2018, 71: 13–24.
- [6] FRANCESCO P, MARTA G, GIOVANNI B, *et al.* Comparative studies about fungal colonization and deoxynivalenol translocation in barley plants inoculated at the base with *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium pseudograminearum* [J]. *Agric Food Sci*, 2018, 27(1): 74–83.
- [7] LEE TVD, ZHANG H, DIEPENINGEN AV, *et al.* Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: A review [J]. *Food Addit Contam A*, 2015, 32(4): 453–460.
- [8] BNNIGHAUSEN J, SCHAUER N, SCHFER W, *et al.* Metabolic profiling of wheat rachis node infection by *Fusarium graminearum*-decoding deoxynivalenol-dependent susceptibility [J]. *New Phytol*, 2019, 221(1): 459–469.
- [9] WANG Q, CAI Y, HE Y, *et al.* Droplet digital PCR (ddPCR) method for the detection and quantification of goat and sheep derivatives in commercial meat products [J]. *Eur Food Res Technol*, 2018, 244(4): 767–774.
- [10] NICOLLI CP, MACHADO FJ, SPOLTI P, *et al.* Fitness traits of deoxynivalenol and nivalenol-producing *Fusarium graminearum* species complex strains from wheat [J]. *Plant Dis*, 2018, 102(7): 1341–1347.
- [11] WANG SS, CUI H, CHEN MZ, *et al.* Simultaneous quantitation of 3ADON and 15ADON chemotypes of DON-producing *Fusarium* species in Chinese wheat based on duplex droplet digital PCR assay [J]. *J Microbiol Meth*, 2021, 190: 106319.
- [12] 封薇, 刘太国, 张敏, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)在小麦籽粒中的积累分析[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(1): 25–31.
- FENG W, LIU TG, ZHANG M, *et al.* Analysis of deoxynivalenol (DON) accumulation in wheat grains [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2012, 42(1): 25–31.
- [13] GOTSCH D. Development of a triplex assay for the simultaneous detection of *Trichothecene* and *Fumonisin* producing *Fusarium* strains by real-time PCR [Z]. 2011.
- [14] 戴宝玲, 杨华, 戴贤君, 等. 小麦真菌结构分析及其与呕吐毒素含量的关系[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(12): 228–232.
- DAI BL, YANG H, DAI XJ, *et al.* Structural analysis of wheat fungi and its relationship with vomiting toxin content [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2019, 47(12): 228–232.
- [15] NASR IA, EL-ASHRAM S, XUN S. Nucleic acid protocols: Extraction and optimization [J]. *Biotechnol Rep*, 2016, 12(C): 33–39.
- [16] ERNST C, BARTEL A, ELFERINK JW, *et al.* Improved DNA extraction and purification with magnetic nanoparticles for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 230: 45–48.
- [17] 许朋, 郑春辉, 孙智勇, 等. 磁珠法快速提取基因组 DNA 的实验研究 [J]. *生物信息学*, 2018, 16(3): 190–195.
- XU P, ZHENG CH, SUN ZY, *et al.* Rapid extraction of genomic DNA by magnetic beads method [J]. *Chin J Bioinform*, 2018, 16(3): 190–195.
- [18] WANG SS, CUI H, CHEN MZ, *et al.* Quantitative PCR assays for the species-specific detection of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium asiaticum* in winter wheat growing regions in China [J]. *Int J Food Microbiol*, 2023, 387(16): 110061.
- [19] 叶金, 吴宇, 辛媛媛, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速精准测定粮食中多种真菌毒素[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(4): 449–456.
- YE J, WU Y, XIN YY, *et al.* Determination of mycotoxins in cereals by UPLC-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *J Instr Anal*, 2023, 387(16): 110061.
- [20] ORLANDO V, EDWARDS SG, NEILSON R, *et al.* Comparing the efficiency of six common methods for DNA extraction from root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) [J]. *Nematology*, 2021, 23(4): 415–423.
- [21] TAN Z, BO T, GUO F, *et al.* Effects of ϵ -poly-L-lysine on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* and its involved antimicrobial mechanism [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118: 2230–2236.
- [22] TAN Z, SHI Y, XING B, *et al.* The antimicrobial effects and mechanism of ϵ -poly-lysine against *Staphylococcus aureus* [J]. *Biores Bioproc*, 2019, 6: 2–10.
- [23] LIU F, LIU M, DU L, *et al.* Synergistic antibacterial effect of the combination of ϵ -polylysine and nisin against *Enterococcus faeca-lis* [J]. *J Food Protect*, 2015, 78(12): 2200–2206.
- [24] BOESENBERG-SMITH KA, PESSARAKLI MM, WOLK DM. Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR

- troubleshooting [J]. Clin Microbiol Newsl, 2012, 34(1): 1–6.
- [25] 尹居鑫. 数字 PCR 微流控芯片的一体化及多重化方法的开发及应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- YIN JX. Development and application of integration and multiplex methods of digital PCR microfluidic chips [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [26] BASU AS. Digital assays part I: Partitioning statistics and digital PCR [J]. SLAS Technol, 2017, 22(4): 369–386.
- [27] YANG R, PAPARINI A, MONIS P, *et al.* Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium oocysts* in faecal samples [J]. Int J Parasitol, 2014, 44(14): 1105–1113.
- [28] ZHANG B, XU CW, SHAO Y, *et al.* Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(4): 1383–1388.
- [29] SUO T, LIU X, FENG J, *et al.* ddPCR: A more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens [J]. Emerg Microb Inf, 2020, 9(1): 1259–1268.
- [30] HE L, SIMPSON DJ, GÄNZLE MG. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in food by droplet digital PCR to detect simultaneous virulence factors in a single genome [J]. Food Microbiol, 2020, 90: 103466.
- [31] XU WJ, ZHU PY, XIN TY, *et al.* Droplet digital PCR for the identification of plant-derived adulterants in highly processed products [J]. Phytomedicine, 2022, 105: 154376.
- [32] GRELEWSKA-NOWOTKO K, URAWSKA-ZAJFERT M, MIJEWSKA E, *et al.* Optimization and verification of droplet digital PCR even-specific methods for the quantification of GM maize DAS1507 and NK603 [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2018, 185(1): 207–220.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



崔 华, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为粮食真菌检测。
E-mail: ch@ags.ac.cn



郭宝元, 博士, 研究员, 主要研究方向为粮油质量安全检测。
E-mail: gby@ags.ac.cn