DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250919005
引用格式: 方云, 韩笑, 胡慧静, 等. 产毒碳黑曲霉菌双重荧光定量聚合酶链式反应检测技术的建立与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 74–81.
FANG Y, HAN X, HU HJ, *et al*. Establishment and application of dual fluorescence quantitative polymerase chain reaction for the detection of toxin-producing *Aspergillus carbonarius* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 74–81. (in Chinese with English abstract).

产毒碳黑曲霉菌双重荧光定量聚合酶链式反应检测技术的建立与应用

方 云[1], 韩 笑[2,3], 胡慧静[2], 陈倩茜[1], 徐 浩[2], 徐 晶[2], 李 可[2,4], 张晓峰[2,4*]

(1. 杭州海关丝类检测中心, 杭州 311215; 2. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 杭州 310012;
3. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058; 4. 杭州海关技术中心, 杭州 310008)

摘 要: 目的 建立检测产毒碳黑曲霉菌的聚酮合酶(polyketide synthases, *PKS*)基因和非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, *NRPS*)基因的双重荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)方法。**方法** 以产毒碳黑曲霉菌 *PKS* 和 *NRPS* 相对保守基因片段作为靶点, 分别设计并筛选出特异性引物和探针对, 在优化双重荧光定量 PCR 反应条件后,建立双重荧光 PCR 反应标准曲线, 随后验证该方法的特异性、灵敏度和重复性, 最后用该方法对 80 份实际样品和人工侵染不同浓度产毒碳黑曲霉菌孢子的玉米、花生及大豆样品进行检测。**结果** 特异性实验结果表明, 该双重荧光 PCR 对黄曲霉、寄生曲霉等常见产毒真菌均无非特异性反应, 仅特异性扩增产毒碳黑曲霉菌的 *PKS* 基因和 *NRPS* 基因。灵敏度结果显示, 该方法检测下限可达 1×10^2 copies/μL。方法重复性佳, 批内和批间变异系数均小于 1%。模拟样本检测结果表明, 双重荧光定量 PCR 在 3 种人工侵染样品中最低均可检出 1×10^3 spores/mL 的孢子。**结论** 本研究建立的方法具有较高的灵敏性和准确性, 能够为产赭曲霉毒素 A 的产毒碳黑曲霉菌的早期监测和防控提供技术支撑。

关键词: 产毒碳黑曲霉菌; 双重荧光定量聚合酶链式反应; 快速检测

Establishment and application of dual fluorescence quantitative polymerase chain reaction for the detection of toxin-producing *Aspergillus carbonarius*

FANG Yun[1], HAN Xiao[2,3], HU Hui-Jing[2], CHEN Qian-Xi[1], XU Hao[2],
XU Jing[2], LI Ke[2,4], ZHANG Xiao-Feng[2,4*]

(1. *Hangzhou Customs Silk Inspection Center*, *Hangzhou* 311215, *China*; 2. *Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine*, *Hangzhou* 310012, *China*; 3. *College of Animal Sciences*, *Zhejiang University*, *Hangzhou* 310058, *China*; 4. *Hangzhou Customs Technology Center*, *Hangzhou* 310008, *China*)

ABSTRACT: Objective To realize the rapid detection of toxin-producing *Aspergillus carbonarius*, and to establish

收稿日期: 2025-09-19
基金项目: 杭州海关科研项目(2024HZ04)
第一作者: 方云(1982—), 女, 工程师, 主要研究方向为进出境检疫性生物成分检测技术。E-mail: 529453333@qq.com
***通信作者:** 张晓峰(1975—), 男, 研究员, 主要研究方向为进出境检疫性生物成分检测技术。E-mail: zxf@zaiq.org.cn

a dual fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method for detecting the polyketide synthases (*PKS*) gene and nonribosomal peptide synthetase (*NRPS*) gene of *Aspergillus carbonarius*. **Methods** Taking the relatively conserved gene fragments of *PKS* and *NRPS* from toxin-producing *Aspergillus carbonarius* as targets, specific primer-probe sets were designed and screened respectively. After optimizing the reaction conditions of dual qPCR, the standard curve of the assay was established. Subsequently, the specificity, sensitivity, and repeatability of this method were verified. Finally, this method was used to test 80 actual samples and corn, peanut and soybean samples artificially inoculated with different concentrations of toxin-producing *Aspergillus carbonarius* spores. **Results** The specificity test results demonstrated that this dual qPCR assay exhibited no non-specific amplification with common toxin-producing fungi such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, but specifically amplified the *PKS* and *NRPS* genes of toxin-producing *Aspergillus carbonarius*. The sensitivity assay showed that the limit of detection of this method could reach 1×10^2 copies/μL. And the method presented excellent repeatability, with the intra- and inter-batch coefficients of variation both less than 1%. In the simulated sample test, this dual qPCR could detect spores at a minimum concentration of 1×10^3 spores/mL in all 3 kinds of artificially infected samples. **Conclusion** The established dual fluorescence quantitative PCR has high sensitivity and accuracy, it can provide technical support for the early monitoring and control of ochratoxin A-toxin-producing *Aspergillus carbonarius*.

KEY WORDS: toxin-producing *Aspergillus carbonarius*; dual fluorescence quantitative polymerase chain reaction; rapid detection

0　引　言

赭曲霉毒素是由曲霉属和青霉属真菌产生的一类次级代谢产物, 这类毒素通过异香豆素结合 *L*-苯丙氨酸作为其基本结构, 并以此为基础衍生出了 20 多种化合物[1]。其中赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)最为常见且毒力最强[2–3], 已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为IIB类潜在致癌物, 曲霉属真菌中OTA主要由赭曲霉菌(*Aspergillus ochraceus*)、黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)、碳黑曲霉菌(*Aspergillus carbonarius*)产生[4], 也有研究表明碳黑曲霉菌是食品市场 OTA 污染的常见菌株[5], 因此监测食源性黑曲霉菌具有重要意义。随着分子生物学研究的深入, 已证实聚酮合酶(polyketide synthase, *PKS*)基因、非核糖体多肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, *NRPS*)基因、细胞色素酶 P450 (cytochrome P450, *CYP450*)基因和卤代脱氢酶(halogenase, *HAL*)基因参与 OTA 的生物合成及代谢调控[6]。*PKS*能够催化羧酸类物质发生缩合, 完成多步聚酮反应, 促使五分子的乙酰辅酶A生成OTA的基本结构骨架二氢异香豆素[7]。研究发现曲霉属真菌敲除 *NRPS* 基因后完全丧失产 OTA 能力[4], 表明 *NRPS* 也是曲霉属物种 OTA 生物合成的必须基因。

食品中检测赭曲霉毒素的常见方法有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)[8]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)[9–14]、气相色谱法(gas chromatography, GC)[15]、胶体金免疫层析法(colloidal gold immunochromatographic assay, GICA)[16]、时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)[17]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)[18–19]和电化学传感器法[20]等。传统色谱法和质谱法灵敏度高, 选择性好, 能够实现微量样品中残留真菌毒素的定量分析, 但这类方法操作复杂, 依赖大型分析设备, 检测周期较长, 无法满足食品行业中日益增长的快速监测需求。传统 ELISA 和胶体金等快速检测方法则普遍存在假阳性问题。ALSHANNAQ 等[20]研究发现, 与检测真菌毒素相比, 靶向检测产毒真菌技术可相对降低对人及动物的暴露风险, 实现污染事件的早期预警, 该策略有助于食品生产加工等环节及时实施防控干预手段, 从源头抑制产毒真菌的产生与污染。

目前对于 OTA 产生菌的分子生物学检测和研究多集中于赭曲霉菌[21]和黑曲霉菌[22], 对碳黑曲霉菌的分子学检测技术研究则相对较少。荧光定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)是分子生物学领域关键核心检测技术, 其能基于生物核苷酸多样性在基因水平实现对多种食源性病原体的精准识别, 且凭借检测周期短、特异性好、灵敏度高等技术优势, 成为当前临床诊断与食品微生物检测等领域的主流方法之一。本研究将通过建立一种双重荧光定量 PCR 方法实现对产毒碳黑曲霉中的 *PKS* 基因和 *NRPS* 基因的同步靶向检测方法, 通过优化反应条件参数, 以期提升检测体系的效率与准确性, 最终为农产品及食品中产毒碳黑曲霉的日常监测与风险预警提供新的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株

寄生曲霉 CGMCC30124 由广东拱北海关技术中心提供; 赭曲霉菌 CGMCC3.4520、黑曲霉菌 CGMCC3.3927 购自河南省工业微生物菌种工程技术研究中心; 产毒黄曲霉菌 NRRL3357、碳黑曲霉菌 ITEM5010 由浙江工业大学提供。镰刀菌 F-21 由本实验室分离保存。

1.2 材料与试剂

26 份玉米、20 份黄豆和 34 份花生样本均由浙江省检验检疫科学技术研究院提供。

DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit[德国凯杰(Qiagen)公司]; Premix EX TaqTM (Probe qPCR)(日本 TaKaRa 公司); DEPC 处理 H_2O、DNA 稀释液、1×三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液[Tris (hydroxymethyl) aminomethane-ethylene diamine tetraacetic acid buffer, Tris-EDTA]、1×磷酸盐缓冲液(10 mmol/L phosphate buffer saline, PBS)(上海生工生物技术有限公司); 无水乙醇(分析纯, 杭州双林化工试剂有限公司); 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、氯化钠(分析纯, 广东环凯微生物科技有限公司); 0.4~0.6 mm 酸洗玻璃珠(德国默克公司)。

1.3 仪器与设备

LightCycler 480II实时荧光定量 PCR 仪(德国 Roche 公司)。

1.4 引物的设计与合成

依据 GenBank 数据库中已公开的产毒碳黑曲霉菌 *PKS* 和 *NRPS* 基因序列, 使用 Primer3 软件在基因序列相对保守区域分别设计两对特异性引物和探针(表 1)。以 GenBank 登录号为 MG701890.1 的产毒碳黑曲霉菌基因序列为模板, 将产毒碳黑曲霉菌 *PKS* 和 *NRPS* 分别克隆至 pUC57 空载体质粒中, 将质粒标准品命名为 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS*, 测得标准质粒 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 的质量浓度均为 50 μg/μL。根据公式: 拷贝数=(质粒浓度×阿伏伽德罗常数×10^{-9})/(660×基因片段碱基数)计算出标准质粒 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 的初始拷贝量均为 1.6×10^{10} copies/μL。引物、探针和标准质粒均由上海生工公司合成。

1.5 引物探针有效性筛选

以产毒碳黑曲霉菌 ITEM5010 基因组 DNA 为模板, 分别用 PKS 和 NRPS 两对引物探针单独进行单重荧光定量 PCR 扩增, 以此筛选 *PKS* 和 *NRPS* 最优引物探针对, 每次荧光定量 PCR 反应均设置 3 次重复,反应条件为: 95 ℃预变性 60 s; 95 ℃变性 10 s, 60 ℃退火 30 s, 退火同时收集对应的 FAM/HEX 荧光, 共 40 个循环。

表 1 引物探针序列

Table 1 Sequences of the primers and probes

引物名称		序列(5′→3′)	参考序列
PKS-1	F	CTTGTTCGAGTAGCTTGGTG	MG701890.1
	R	TGGAGGGGATGTATCTGAC	
	P	FAM-AAGGCTGCATGGACGTTCGG-BHQ1	
PKS-2	F	ATTAACTCACCCCTGGATCT	
	R	GACGACGGATGGTAGTAGAA	
	P	FAM-TATCAACAGGTCATGGCTGC-BHQ1	
NRPS-1	F	CAGATTCCGATGGTAGGTTG	MG701890.1
	R	TCCACCGTACTAGCCACATT	
	P	HEX-TTGTGTATGGATGGGTCGGA-BHQ2	
NRPS-2	F	AGACTGATCGAAGACGACTG	
	R	GGACAAACTCTGTGTGGAGT	
	P	HEX-CATTATCGCATCCACGTCCA-BHQ2	

1.6 反应条件的优化

本研究基于上述单重荧光定量 PCR 的反应条件, 分别以标准质粒 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 作为阳性模板, 通过矩阵法对 *PKS* 和 *NRPS* 两组引物和探针的浓度组合进行系统性优化, 以确定本研究双重荧光 PCR 的最优反应体系。

1.7 标准曲线的建立

基于优化后的双重荧光定量 PCR 反应体系, 将初始浓度为 1×10^{10} copies/μL 的标准质粒 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 按 10 倍比稀释至理论浓度为 1×10^{3}~1×10^{8} copies/μL 共 6 个梯度浓度, 每个梯度浓度反应重复 3 次, 最终得到标准质粒梯度浓度对应的 PCR 反应循环阈值(cycle threshold, Ct)。将质粒浓度的对数值作为 *X* 轴, 以反应 Ct 值作为 *Y* 轴, 使用 Numbers 14.3 软件分别绘制出 *PKS* 和 *NRPS* 的标准扩增曲线, 并计算出 PCR 反应扩增效率。

1.8 特异性实验

将真菌菌株保菌液涂布于 PDA 培养基上, 28 ℃恒温培养 7 d 后收集培养基表面的菌丝体, 采用真菌 DNA 提取试剂盒分别提取产毒碳黑曲霉菌 ITEM5010、产毒黄曲霉菌 NRRL3357、寄生曲霉菌 CGMCC30124、赭曲霉菌 CGMCC3.4520、黑曲霉菌 CGMCC3.3927 及镰刀菌 F-21 的基因组 DNA, 以各菌株的基因组 DNA 为模板, ddH_2O 作为阴性对照, 对本研究建立的双重荧光定量 PCR 方法的特异性进行验证。

1.9 敏感性实验

将初始浓度为 1×10^{10} copies/μL 标准质粒 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 按 10 倍比稀释至理论浓度为 1×10^{1}~1×10^{5} copies/μL 共 5 个梯度浓度, 每组浓度重复 10 次, 以此验证该方法的敏感性。

1.10　重复性实验

以浓度为 1×10^2~1×10^6 copies/μL 的 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 标准质粒混合物作为模板, 展开组内重复性和组间重复性验证。组内重复实验: 对同一浓度标准质量进行 10 次平行反应; 组间重复实验: 选择不同时间点进行 3 次独立反应。计算重复实验组内与组间 Ct 值的标准差和变异系数, 以此验证该方法的重复性。

1.11　实际样品与人工模拟侵染样品的检测

本研究共检测来自全国不同产区的 26 份玉米、20 份黄豆和 34 份花生样品, 对其进行总 DNA 提取后, 对这些样品进行双重荧光定量 PCR 检测。为人工模拟受污染样品, 称取重量为 5 g 的玉米、小麦和大豆样品进行高压灭菌处理, 经血球计数板计数后, 依次选取浓度为 1×10^1~1×10^5 spores/mL 的产毒碳黑曲霉菌 ITEM5010 孢子悬浮液, 分别加入到对应的已灭菌处理的不同食品样品中, 使各样品的接种浓度达到 5、4、3、2 和 1 log cfu/g, 接种完成后置于 28 ℃恒温摇床中充分振荡混匀, 再对不同接种浓度的不同样本进行核酸提取, 使用本研究建立的方法对上述侵染样品的核酸进行双重荧光定量 PCR 检测, 每一侵染浓度下的核酸样品均进行 3 次重复, 以评估本方法在食品样品中的敏感性及有效性。

1.12　数据处理

研究结果均独立重复 3 次。Primer Premier 5 软件分析引物和探针序列的特异性和保守性; Numbers 14.3 软件对 qPCR 方法的标准曲线、扩增效率、标准差和变异系数进行计算分析和绘图; 图片由 GIMP 3.0.2 排版编辑; 表格由 WPS Office 12.1.0 绘制。

2　结果与分析

2.1　引物对有效性筛选

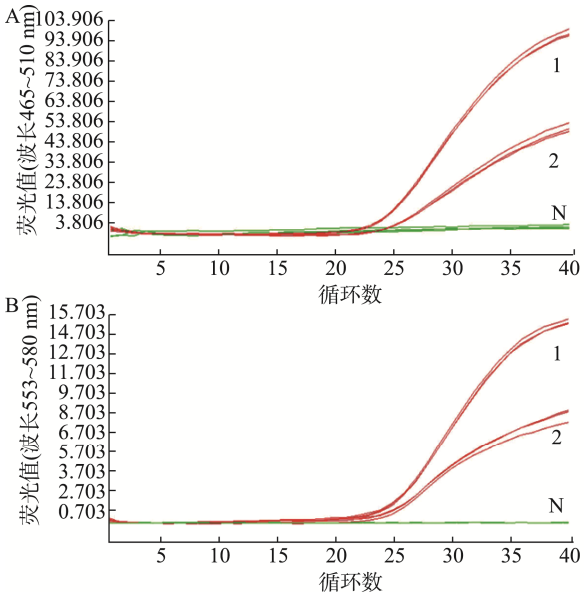
荧光定量 PCR 在扩增 *PKS* 基因中, PKS-1 引物/探针的 Ct 平均值为 24.26, 略低于 PKS-2 引物/探针的 Ct 平均值(24.7), 且前者荧光强度显著高于后者(图 1A)。荧光定量 PCR 在扩增 *NRPS* 基因中, NRPS-1 引物/探针的 Ct 平均值(25.31)高于 NRPS-2 引物/探针(24.68), 且后者荧光强度更优(图 1B)。以上实验平行间重复性好, 阴性对照均无扩增, 综合 Ct 值和荧光强度指标, 最终将 PKS-1 和 NRPS-2 两组引物/探针组合用于建立双重荧光定量 PCR 方法。

2.2　双重荧光定量 qPCR 反应条件优化

对反应体系采用矩阵法进行系统优化后, 最终确定了 *PKS* 和 *NRPS* 双重荧光定量 PCR 的最优反应体系(表 2)。

2.3　qPCR 标准曲线

经计算, pUC57-*PKS* 的线性关系方程为 $Y=-3.361X+38.16$, 相关系数 $r^2=0.9994$, 扩增效率约为 98.40%(图 2A)。pUC57-*NRPS* 的线性关系方程为 $Y=-3.304X+37.19$, 相关系数 $r^2=0.9994$, 扩增效率约为 100.75%(图 2B)。pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 的线性回归方程的斜率均在 3.1~3.5 范围内, 相关系数 r^2 均为 0.9994, 大于 0.99, 扩增效率位于 98%~101%区间内, 且 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 各组质粒浓度所对应的 Ct 值的标准偏差均小于 0.1, 表明本研究所建立的方法具有很好的重复性和扩增效率, 且反应的 Ct 值与相对应质粒浓度对数值之间有良好的线性关系。



注: A. PKS 引物探针组; 1. PKS-1; 2. PKS-2; N. 阴性对照 B. NRPS 引物探针组; 1. NRPS-2; 2. NRPS-1; N. 阴性对照。

图 1　PKS 和 NRPS 引物探针的荧光定量 PCR 扩增结果

Fig.1　Amplification results of fluorescence quantitative PCR of the PKS and NRPS primers and probes

表 2　双重荧光定量 PCR 反应体系

Table 2　Reaction system of the dual fluorescence quantitative PCR

组成		体积/μL
Premix EX Taq™ (Probe qPCR)		10.0
PKS-1-F	各引物终浓度为 10 μmol/L	0.6
PKS-1-R		0.6
PKS-1-P		0.6
NRPS-2-F		0.4
NRPS-2-R		0.4
NRPS-2-P		0.4
ddH_2O		3.0
标准质粒(pUC57-PKS+pUC57-NRPS)		2.0+2.0
总体积		20.0

2.4 qPCR 特异性

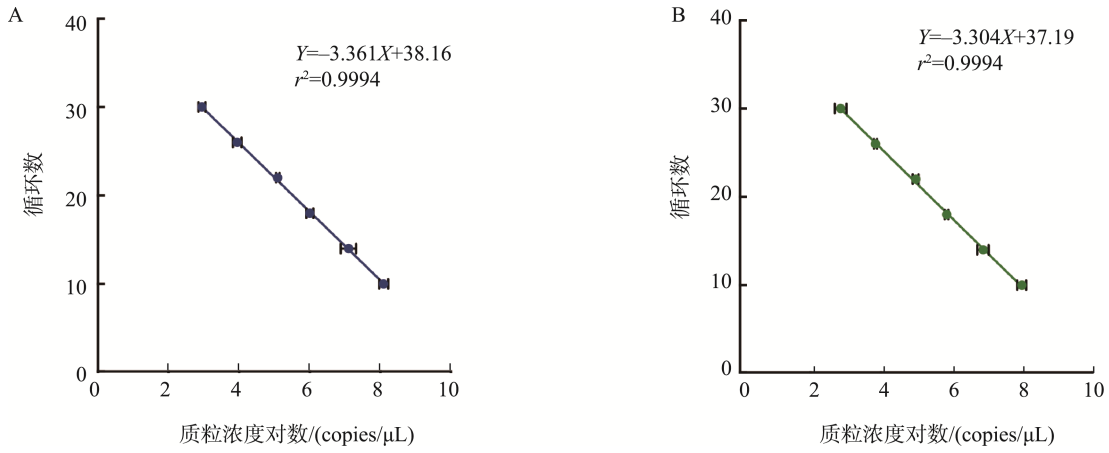
分别以产毒黑曲霉菌及其他产毒真菌基因组 DNA 模板进行扩增，结果显示产毒黄曲霉素等其他受试产毒真菌均无非特异性扩增，仅产毒碳黑曲霉菌呈特异性阳性扩增曲线(图 3)，上述结果表明，本研究所建立的双重荧光定量 PCR，可对赭曲霉毒素 A 合成相关的 *PKS* 基因及 *NRPS* 基因实现特异性扩增，可有效用于样品中的产毒碳黑曲霉菌的鉴定筛选。

2.5 qPCR 敏感性

将 10 次重复均能检出的质粒标准品的最低拷贝数定义为双重荧光定量 PCR 方法的最低检出限(limit of detection，LOD)。实验结果显示(表 3)，当质粒浓度为 10^1 copies/μL 时，10 次重复 *PKS* 未检出 7 次，*NRPS* 未检出 1 次；当质粒浓度等于或大于 10^2 copies/μL 时，该方法 10 次重复均能检出 *PKS* 和 *NRPS* 标准质粒。故该体系对 pUC57-*PKS* 和 pUC57-*NRPS* 这两种标准质粒的 LOD 均为 1×10^2 copies/μL。

2.6 qPCR 重复性

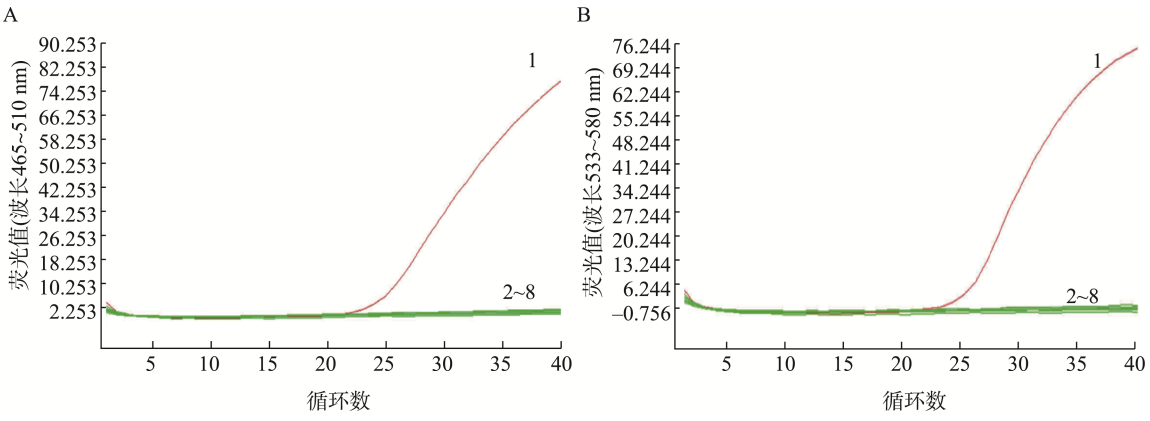
重复性实验结果表明，pUC57-*PKS* 的批内变异系数为 0.09%~0.55%(图 4A)，批间变异系数为 0.23%~0.79%(图 5A)；pUC57-*NRPS* 的批内变异系数为 0.07%~0.39%(图 4B)，批间变异系数为 0.38%~0.98%(图 5B)，3 次不同批次实验的检测结果无显著性差异，提示本研究建立的双重荧光定量 PCR 方法具备良好的重复性。



注：A. *PKS* 标准曲线；B. *NRPS* 标准曲线，图 3 同。

图 2 双重荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.2 Standard curves of dual fluorescence quantitative PCR



注：A. *PKS* 基因扩增曲线，B. *NRPS* 基因扩增曲线；1~6. 产毒碳黑曲霉菌 ITEM5010、产毒黄曲霉菌 NRRL3357、寄生曲霉菌 CGMCC30124、赭曲霉菌 CGMCC3.4520、黑曲霉菌 CGMCC3.3927、镰刀菌 F-21；7、8. ddH_2O。

图 3 双重荧光定量 PCR 特异性实验

Fig.3 Specificity experiments of dual fluorescence quantitative PCR

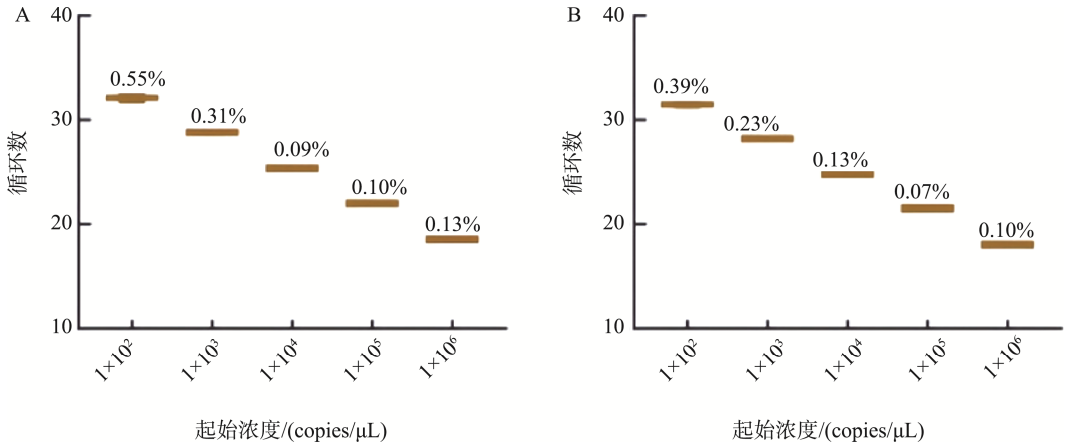
表 3　双重荧光定量 PCR 敏感性实验
Table 3　Sensitivity experiments of the dual fluorescence quantitative PCR

模板	质粒浓度/(copies/μL)	检出比	Ct 均值	SD
pUC57-*PKS*	1×10^5	10/10	21.863	0.06
	1×10^4	10/10	25.243	0.15
	1×10^3	10/10	28.738	0.24
	1×10^2	10/10	32.144	0.65
	1×10^1	3/10*	/	/
pUC57-*NRPS*	1×10^5	10/10	21.285	0.1
	1×10^4	10/10	24.623	0.42
	1×10^3	10/10	28.038	0.17
	1×10^2	10/10	31.352	0.64
	1×10^1	9/10*	/	/

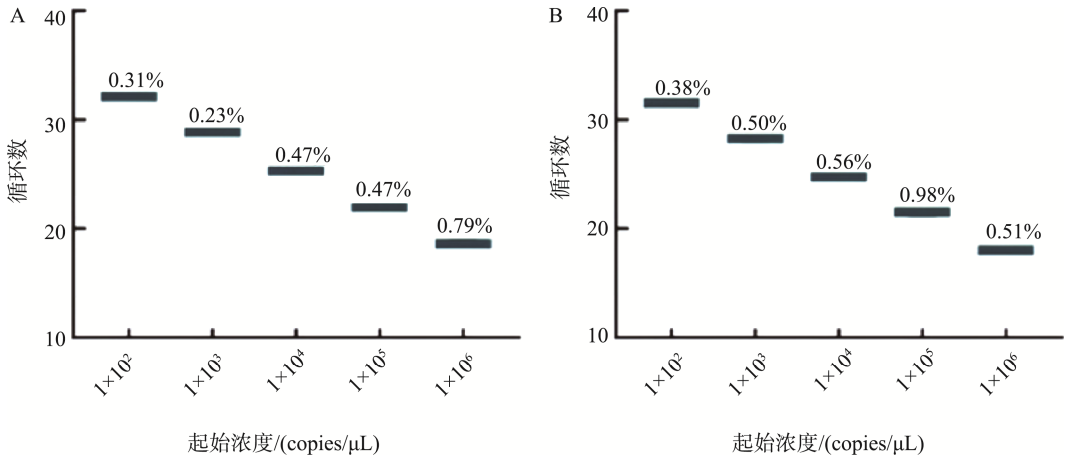
注：*表示 Ct 值小于等于 35 时判定为阳性，/表示未检出，标准差(standard deviation, SD)。

2.7　qPCR 检测实际样品与人工模拟侵染样品

选择产毒碳黑曲霉菌双重荧光定量 PCR 中 *PKS* 基因及 *NRPS* 基因扩增 Ct 值均小于等于 35 的样品判定为阳性，80 份实际样品的检测结果显示，所提取的样品 DNA 均为阴性，且两种基因的检测值均大于 35，故初步判断这些食品样品中未检出产 OTA 毒素的产毒碳黑曲霉菌。对人工模拟不同侵染浓度(1×10^1~1×10^5 spores/mL)的玉米、小麦和大豆样品进行核酸抽提，用双重荧光定量 PCR 方法进行检测，每一样品重复 3 次并计算其 Ct 平均值。结果发现，本研究建立双重荧光定量检测方法在不同侵染浓度的玉米、小麦及大豆样品 DNA 的最低检出孢子浓度均为 1×10^3 spores/mL(表 4)。



注：A. pUC57-*PKS* 批内重复性实验；B. pUC57-*NRPS* 批内重复性实验。
图 4　双重荧光定量 PCR 批内重复性实验
Fig.4　Batch-to-batch repeatability for dual qPCR



注：A. pUC57-*PKS* 批间重复性实验；B. pUC57-*NRPS* 批间重复性实验。
图 5　双重荧光定量 PCR 批间重复性实验
Fig.5　Inter-batch repeatability for dual qPCR

表 4 双重荧光定量 PCR 检测人工污染样品的检测结果

Table 4 Results of dual fluorescence quantitative PCR for artificial contaminated samples

接种浓度/(spores/mL)	玉米		小麦		大豆	
	PKS	*NRPS*	*PKS*	*NRPS*	*PKS*	*NRPS*
1×10^5	23.690	23.687	23.247	23.167	23.465	23.433
1×10^4	27.306	27.257	27.506	27.323	27.310	27.373
1×10^3	32.231	32.093	32.030	31.940	32.125	32.058
1×10^2	*	*	*	*	*	*
1×10^1	*	*	*	*	*	*

注: *表示 3 次重复检测结果 Ct 值均小于等于 35 时判定为阳性, 否则判定为阴性。

3 讨 论

检测食品中产毒真菌对维护公共卫生安全具有重要意义, 传统的分离培养法仍作为检测行业金标准, 其缺点在于鉴定产毒真菌耗时较长, 检测结果依赖于多种生化实验, 对于操作人员的技能和经验要求较高, 同时, 该方法涉及病原微生物的培养过程, 存在潜在的生物安全隐患。基于 ELISA 的检测技术, 需要克服食品复杂基质引起的假阳性问题, 并面临因产毒真菌毒素未表达或表达量低于检出限导致的漏检风险。GEISEN 等[23]利用串联质谱技术, 靶向 *β-tubulin* 基因和钙调蛋白基因从而对曲霉属真菌进行检测, 该方法需要使用质谱等精密设备, 对于基层实验室检测的普适性不足。

基于引物特异性靶向扩增病原核酸的 PCR 技术, 其反应时间较上述方法显著缩短, 检测成本相对较低, 便于在基层开展快速筛查, 因而 PCR 方法已成为检测产毒真菌的主流技术, 例如 PCR 电泳法、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)法、荧光定量 PCR 法等。李慧等[24]建立的多重 PCR 方法可以同时检出多种产毒真菌, 该方法优点在于成本低, 但 PCR 反应加上琼脂糖凝胶电泳过程总时间相对较长, 电泳结果依赖人工经验判断, 不适用于大规模样品快速筛查。反应温度恒定的 LAMP 法适用于现场快速检测产毒真菌[25–26], 其反应通常在 30 min 内完成, 反应设备较 PCR 仪和荧光 PCR 仪便携, 试剂成本较低, 但引物结构复杂、假阳性风险高[27]。多重荧光 PCR 方法耗时短, 特异性强, 且能同时检测两种及两种以上的真菌, 例如, 张庆[28]建立的多重荧光 PCR 体系实现了黄曲霉毒素真菌、赭曲霉、青霉和镰刀菌共 4 种真菌共检, 但多重荧光 PCR 反应可能随引物对增多而降低检测灵敏度, 该方法对目标基因的最低检出限为 1×10^3 copies/μL, 较本研究方法灵敏度(1×10^2 copies/μL)低 1 个数量级, 可能与荧光 PCR 引物在反应体系中非特异竞争结合模板有关。针对同一病原进行双基因验证可提高结果的准确性[28–29], 例如 XIONG 等[31]在 64 份鼻咽拭子样本中同时检测 SRAS-CoV 的膜蛋白基因和开放阅读框 *1ab* 基因, 结果显示阴性结果与预期一致性为 100%, 有效避免了假阳性; GOMEZ 等[32]利用双靶标检测弓形虫, 其阴性吻合率达 99.1%, 有效避免单一靶点突变导致的假阴性。本研究基于产毒碳黑曲霉菌 OTA 生物合成基因簇中的 *PKS* 基因和 *NRPS* 基因, 建立起一种能够检测产毒碳黑曲霉菌的双重荧光定量 PCR 方法, 首先利用单重荧光定量 PCR 反应筛选出了 PKS-1 和 NRPS-2 两组引物/探针, 为双重荧光 PCR 反应体系特异性提供保障, 该检测方法的 LOD 低至 1×10^2 copies/μL, 重复实验中批内和批间变异系数均小于 1%, 体现了该方法灵敏度高、可重复性强的技术优势。本方法检测实际样本均为阴性结果, 提示目前市场上此类食品风险把控良好。为进一步验证本方法的有效性, 设计了人工模拟侵染实验, 样品侵染实验结果显示, 本方法在玉米、小麦及花生样品中最低可检出的孢子浓度为 1×10^3 spores/mL, 表明本方法在实际检测中具有可行性。综上所述, 本研究建立的双重荧光定量 PCR 方法通过双基因靶向策略, 在保证特异性的同时提升了检测灵敏度, 可用于食品样品感染早期的筛查与防控, 对受污染农副产品的早期预警具有一定参考价值。

4 结 论

本研究建立的双重荧光定量 PCR 方法可实现对产毒碳黑曲霉菌 *PKS* 基因和 *NRPS* 基因的同步检测, 在降低核酸检测假阴性率的同时, 提升了反应体系的敏感性和检测效率。模拟样本结果表明, 该双重检测体系能精准识别样品中潜在的产毒碳黑曲霉菌。因此, 该方法适用于食品生产、运输与储存等全链条中产毒碳黑曲霉的快速筛查、敏感识别, 可实现对该产毒真菌污染的早期预警与动态监测, 为食品产业中产毒真菌带来的微生物风险防控提供技术支撑。

参考文献

[1] AYENI K I, JAMNIK T, FAREED Y, *et al*. The austrian children's biomonitoring survey 2020 Part B: Mycotoxins, phytotoxins, phytoestrogens and food processing contaminants [J]. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2023, 182: 114173.

[2] CHEN Y, CHEN J, ZHU Q, *et al*. Ochratoxin A in dry-cured ham:

OTA-producing fungi, prevalence, detection methods, and biocontrol strategies-a review [J]. Toxins, 2022, 14(10): 693.

[3] MUBARIK Y, BOYETEY ST, AIKINS AR, *et al*. Effect of ochratoxin A (OTA) on the immune system: A systematic review [J]. Toxins, 2025, 17(5): 256.

[4] GALLO A, BRUNO KS, SOLFRIZZO M, *et al*. New insight into the ochratoxin a biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8208–8218.

[5] ABARCA ML, ACCENSI F, BRAGULAT MR, *et al*. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market [J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(3): 504–506.

[6] WU Q, DOHNAL V, HUANG L, *et al*. Metabolic pathways of ochratoxin A [J]. Current Drug Metabolism, 2011, 12(1): 1–10.

[7] HARRIS JP, MANTLE PG. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus* [J]. Phytochemistry, 2001, 58(5): 709–716.

[8] TKACZYK A, JEDZINIAK P. Dilute-and-shoot HPLC-UV method for determination of urinary creatinine as a normalization tool in mycotoxin biomonitoring in pigs [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(10): 2445.

[9] ESCRIVÁ L, FONT G, MANYES L, *et al*. Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: An overview [J]. Toxins, 2017, 9(8): 251.

[10] CARBALLO D, FONT G, FERRER E, *et al*. Evaluation of mycotoxin residues on ready-to-eat food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry in tandem [J]. Toxins, 2018, 10(6): 243.

[11] DENG Y, WANG Y, DENG Q, *et al*. Simultaneous quantification of aflatoxin B_1, T-2 toxin, ochratoxin a and deoxynivalenol in dried seafood products by LC-MS/MS [J]. Toxins, 2020, 12(8): 488.

[12] DE-SANTIS B, RAGGI ME, MORETTI G, *et al*. Study on the association among mycotoxins and other variables in children with autism [J]. Toxins, 2017, 9(7): 203.

[13] CHAN HH, HWANG TL, REDDY MVB, *et al*. Bioactive constituents from the roots of *Panax Japonicus* Var. major and development of a LC-MS/MS method for distinguishing between natural and artifactual compounds [J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(4): 796–802.

[14] BRODAL G, AAMOT HU, ALMVIK M, *et al*. Removal of small kernels reduces the content of *Fusarium mycotoxins* in oat grain [J]. Toxins, 2020, 12(5): 346.

[15] MAN Y, LIANG G, LI A, *et al*. Recent advances in mycotoxin determination for food monitoring via microchip [J]. Toxins, 2017, 9(10): 324.

[16] MAO X, WU Y, CHEN H, *et al*. A mix-and-detect method based on colloidal gold immunochromatographic assay for on-site detection of zearalenone in edible oils [J]. Analytical Methods: Advancing Methods and Applications, 2020, 12(46): 5628–5634.

[17] ZHU Y, LI W, YANG J, *et al*. Photonic microbead array digital time-resolved fluorescence ultrasensitive platform for simultaneous detection of multiple mycotoxins [J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(42): 16842–16853.

[18] DONG G, PAN Y, WANG Y, *et al*. Preparation of a broad-spectrum anti-zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food Chemistry, 2018, 247: 8–15.

[19] WANG Y, WANG X, WANG S, *et al*. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody based on indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of zearalenone in food and feed samples [J]. Toxins, 2022, 14(3): 220.

[20] ALSHANNAQ A, YU JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food [J]. International journal of environmental research and public health, 2017, 14(6):632.

[21] PALUMBO JD, SARREAL SBL, KIM JH. Simultaneous detection of mycotoxigenic *Aspergillus* species of sections circumdati and flavi using multiplex digital PCR [J]. Letters in Applied Microbiology, 2023, 76(12): ovad142.

[22] 茶绍桢, 杨双艳, 陆淑林, 等. 环介导等温扩增法可视化快速检测玉米中的黑曲霉[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 301–307.
CHA SZ, YANG SY, LU SL, *et al*. Visual rapid detection of *Aspergillus niger* in *Zea mays* L. by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 301–307.

[23] GEISEN R, SCHMIDT-HEYDT M, TOUHAMI N, *et al*. New aspects of ochratoxin A and citrinin biosynthesis in *Penicillium* [J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 23: 23–31.

[24] 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.
LI H, CAI J, HU ML, *et al*. established a multiplex PCR method for rapid and high sensitivity detection of aflatoxigenic fungi [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(1): 125–129.

[25] LI Y, FAN P, ZHOU S, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107: 54–61.

[26] ZHU Z, LI R, ZHANG H, *et al*. PAM-free loop-mediated isothermal amplification coupled with CRISPR/Cas12a cleavage (Cas-PfLAMP) for rapid detection of rice pathogens [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 204: 114076.

[27] SULEMAN E, MTSHALI MS, LANE E. Investigation of false positives associated with loop-mediated isothermal amplification assays for detection of *Toxoplasma gondii* in archived tissue samples of captive felids [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 2016, 28(5): 536–542.

[28] 张庆. 基于 qPCR 和 ddPCR 技术的食品中产毒真菌快速检测方法研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2021.
ZHANG Q. Research on rapid detection methods for mycotoxin-producing fungi in food based on qPCR and ddPCR technologies [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2021.

[29] JIN L, RICHARDS A, BROWN DW. Development of a dual target-PCR for detection and characterization of measles virus in clinical specimens [J]. Molecular and Cellular Probes, 1996, 10(3): 191–200.

[30] DE-KNEGT VE, KRISTIANSEN GQ, SCHØNNING K. Evaluation of dual target-specific real-time PCR for the detection of *Kingella kingae* in a Danish paediatric population [J]. Infectious Diseases (London, England), 2018, 50(3): 200–206.

[31] XIONG E, JIANG L, TIAN T, *et al*. Simultaneous dual-gene diagnosis of SARS-CoV-2 based on CRISPR/Cas9-mediated lateral flow assay [J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2021, 60(10): 5307–5315.

[32] GOMEZ CA, SAHOO MK, KAHN GY, *et al*. Dual-target, real-time PCR for the diagnosis of intraocular *Toxoplasma gondii* infections [J]. The British Journal of Ophthalmology, 2019, 103(4): 569–572.

(责任编辑: 蔡世佳　安香玉)