

## 产赭曲霉毒素 A 黑曲霉的 PCR 法检测

张健<sup>1,2</sup> 王小霞<sup>1</sup> 朱柳杨<sup>1</sup> 高强<sup>1</sup> 高慧梅<sup>2</sup> 张颖<sup>3\*</sup>

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

(2. 天津实发中科百奥工业生物技术有限公司 天津 300462)

(3. 食品营养与安全教育部重点实验室 天津科技大学食品工程与生物技术学院 天津 300457)

**摘要:**【目的】快速检测产赭曲霉毒素 A (OTA) 的黑曲霉。【方法】根据黑曲霉(*Aspergillus niger*) CBS513.88 中 An15g07920 基因编码聚酮合酶的酰基转移酶(AT)域设计引物, 建立针对产 OTA 黑曲霉的聚合酶链式反应(PCR)检测方法。【结果】对 72 株曲霉属菌株(黑曲霉、炭黑曲霉、赭曲霉、佩特曲霉、寄生曲霉和塔宾曲霉)进行检测, 发现产 OTA 的黑曲霉能够扩增出特异性条带, 而产 OTA 的其它菌株不能扩增出条带; 检测出 3 株假阳性的产 OTA 黑曲霉, 实时定量 PCR 分析此 3 株菌中 An15g07920 的同源基因表达情况, 发现在产毒条件下可正常表达, 排除了因基因无法表达导致假阳性的可能。本方法的检测灵敏度为 25 pg 的 DNA 含量, 在污染所试农产品孢子浓度大于  $4.0 \times 10^4$ – $4.0 \times 10^5$  个/g 时可有效检测出产毒菌株。【结论】本方法虽会产生 4% 的假阳性结果, 但是仍可作为产毒黑曲霉有效的快速检测方法, 并在农产品污染产毒黑曲霉时进行有效预警。

**关键词:** 赭曲霉毒素 A, 黑曲霉, 聚合酶链式反应, 检测

## PCR detection of *Aspergillus niger* producing ochratoxin A

ZHANG Jian<sup>1,2</sup> WANG Xiao-Xia<sup>1</sup> ZHU Liu-Yang<sup>1</sup> GAO Qiang<sup>1</sup> GAO Hui-Mei<sup>2</sup>  
ZHANG Ying<sup>3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin SF-Bio Industrial Bio-Tec Co., Ltd., Tianjin 300462, China)

(3. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** [Objective] Rapid detection of ochratoxin A-producing *Aspergillus niger*. [Methods] A PCR procedure has been developed for the rapid detection of ochratoxin A-producing *A. niger*. Two

**Foundation item:** Tianjin Enterprise Postdoctoral Innovation Project (2015); Tianjin Funded Training Selected Outstanding Postdoctoral Program of Internationalization (2014); National Natural Science Foundation of China (No. 31471725, 31370075, 31201354)

\*Corresponding author: Tel: 86-22-60912431; E-mail: zhangying@tust.edu.cn

**Received:** December 28, 2015; **Accepted:** April 11, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 04, 2016

基金项目: 天津市企业博士后创新项目择优资助计划资助项目(2015); 天津市资助选派优秀博士后国际化培养计划资助项目(2014); 国家自然科学基金项目(No. 31471725, 31370075, 31201354)

\*通讯作者: Tel: 86-22-60912431; E-mail: zhangying@tust.edu.cn

收稿日期: 2015-12-28; 接受日期: 2016-04-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-04

specific primers were designed based on the nucleotide sequence of the acyl transferase (AT) domain of the polyketide synthase encoded by An15g07920 from *A. niger* CBS 513.88. **[Results]** Specificity was confirmed by testing primers towards purified DNA from 72 *Aspergillus* genus strains, including *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. petrakii*, *A. parasiticus* and *A. tubingensis*. Two specific primers can amplify a unique band from OTA-producing *A. niger*, but not from other OTA-producing strains. However, the use of the primer pairs also allowed amplification of the DNA from three OTA-non-producing *A. niger*. The quantitative real-time PCR found that the part of AT homeotic gene of An15g07920 can be normally expressed under the OTA-producing condition in OTA-non-producing *A. niger*. Therefore, the reason of false positive was not the gene can not express. The detection limit of the developed PCR protocol was 25 pg for DNA templates and about  $4.0 \times 10^4$ – $4.0 \times 10^5$  spores/g when it was evaluated directly on artificially inoculated food. **[Conclusion]** The developed PCR procedure could be used for rapid detection of OTA-producing *A. niger* and is a promising tool in the prediction of potential ochratoxigenic risk for *A. niger* in foods.

**Keywords:** Ochratoxin A, *Aspergillus niger*, Polymerase chain reaction, Detection

赭曲霉毒素(Ochratoxin)是某些曲霉属和青霉属真菌产生的一类次级代谢产物。该类物质以异香豆素交联 L-苯丙氨酸为基本结构,在此基础上可衍生出 20 多种化合物,赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)是其中含量最高、分布最广且毒性最强的一种,已被国际癌症研究机构(IARC)认定为“2B”类致癌物<sup>[1]</sup>。由于 OTA 产生菌广泛分布于自然界,同时 OTA 理化性质较稳定,不易降解。因此,OTA 的污染在全球范围内都比较严重,在干腌肉制品、粮食、饲料和粮谷类食物中均有检出。鉴于 OTA 污染的严重性和广泛性,欧盟对食物中 OTA 的含量进行了限定,规定谷物原料中 OTA 含量不超过 5 ng/g,谷物加工物中 OTA 含量不超过 3 ng/g,婴幼儿及有特殊医疗目的的食物中 OTA 含量不超过 0.5 ng/g,葡萄酒中 OTA 的含量不超过 2 μg/L<sup>[2]</sup>。我国目前只规定谷物和豆类中 OTA 含量不得超过 5 ng/g<sup>[3]</sup>,饲料中不得超过 100 ng/g<sup>[4]</sup>,对其它原料和食品中 OTA 的限量标准还没有明确规定。

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是一种重要的食品发酵菌株,广泛应用于柠檬酸发酵生产、30 多种酶制剂制备及重要蛋白的异源表达<sup>[5]</sup>。早在 1987 年,黑曲霉就被美国食品药品监督管理局(FDA)列为食品安全菌种(Generally Recognized as Safe, GRAS)<sup>[6]</sup>,但是近年来,陆续在葡萄、葡萄酒、咖啡豆和多种谷物中发现了可以产生 OTA 的黑曲霉<sup>[7-8]</sup>,其安全性开

始受到质疑。本课题组在前期的工作中也筛选到多株产 OTA 的黑曲霉,其中 1 062 菌株在诱导培养基中,25 °C 培养 5 d 后,产毒水平可达 500 μg/g 干菌丝以上<sup>[9]</sup>。由此可见,黑曲霉产毒株确实存在,且产毒量对动物和人类具有潜在的威胁。

为了确保发酵制品的安全,同时对产毒黑曲霉污染农产品进行风险预警,有必要建立一种快速检测产毒黑曲霉的方法。传统的黑曲霉分类和鉴定方法是基于菌落形态和分子特征的多相鉴定<sup>[10]</sup>,但该方法难以区分产毒和不产毒的黑曲霉,因此无法做到对 OTA 污染的有效预警。随着分子生物学的发展,已有不少运用 PCR 相关技术检测 OTA 产生菌的报道<sup>[11-15]</sup>。然而,针对产毒黑曲霉的相关检测方法却鲜有报道。为此本文拟结合已公布的黑曲霉基因组序列,找到 OTA 生物合成的关键基因,并针对此基因的保守区设计引物,建立产 OTA 黑曲霉的分子检测方法,并对方法的特异性、准确性和灵敏度进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

如表 1 所示,选择 72 株曲霉属菌株,包括赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)、黑曲霉、炭黑曲霉(*Aspergillus carbonarius*)、佩特曲霉(*Aspergillus petrakii*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)、塔宾曲

表 1 供试曲霉菌株的引物特异性评价  
Table 1 *Aspergillus* strain used to evaluate the primers specificity

菌株 Strains	OTA	扩增引物 AT-F/R	Primers ITS1/4	菌株 Strains	OTA	扩增引物 AT-F/R	Primers ITS1/4
<i>A. niger</i> 1062	+	+	+	<i>A. niger</i> 4	+	+	+
<i>A. niger</i> A14	+	+	+	<i>A. carbonarius</i> C14	+	-	+
<i>A. carbonarius</i> 3.146	+	-	+	<i>A. carbonarius</i> 3.147	+	-	+
<i>A. niger</i> ATCC1015	-	+	+	<i>A. niger</i> A1	-	-	+
<i>A. niger</i> A2	-	-	+	<i>A. niger</i> A3	-	-	+
<i>A. niger</i> A4	-	+	+	<i>A. niger</i> A5	-	+	+
<i>A. niger</i> A6	-	-	+	<i>A. niger</i> A7	-	-	+
<i>A. niger</i> A8	-	-	+	<i>A. niger</i> A9	-	-	+
<i>A. niger</i> A10	-	-	+	<i>A. niger</i> A11	-	-	+
<i>A. niger</i> A12	-	-	+	<i>A. niger</i> A13	-	-	+
<i>A. niger</i> A15	-	-	+	<i>A. niger</i> B1	-	-	+
<i>A. niger</i> B2	-	-	+	<i>A. niger</i> B3	-	-	+
<i>A. niger</i> B4	-	-	+	<i>A. niger</i> B5	-	-	+
<i>A. niger</i> B6	-	-	+	<i>A. niger</i> B7	-	-	+
<i>A. niger</i> B8	-	-	+	<i>A. niger</i> B9	-	-	+
<i>A. niger</i> B10	-	-	+	<i>A. niger</i> B11	-	-	+
<i>A. niger</i> B12	-	-	+	<i>A. niger</i> B13	-	-	+
<i>A. niger</i> B14	-	-	+	<i>A. niger</i> B15	-	-	+
<i>A. niger</i> C1	-	-	+	<i>A. niger</i> C2	-	-	+
<i>A. niger</i> C3	-	-	+	<i>A. niger</i> C4	-	-	+
<i>A. niger</i> C5	-	-	+	<i>A. niger</i> C6	-	-	+
<i>A. niger</i> C7	-	-	+	<i>A. niger</i> C8	-	-	+
<i>A. niger</i> C9	-	-	+	<i>A. niger</i> C10	-	-	+
<i>A. niger</i> C11	-	-	+	<i>A. niger</i> C12	-	-	+
<i>A. niger</i> C13	-	-	+	<i>A. niger</i> C15	-	-	+
<i>A. niger</i> C16	-	-	+	<i>A. niger</i> C17	-	-	+
<i>A. niger</i> C18	-	-	+	<i>A. niger</i> P1	-	-	+
<i>A. niger</i> P2	-	-	+	<i>A. niger</i> P3	-	-	+
<i>A. petrakii</i> K1	-	-	+	<i>A. niger</i> P6	-	-	+
<i>A. petrakii</i> K2	-	-	+	<i>A. niger</i> P7	-	-	+
<i>A. petrakii</i> K3	-	-	+	<i>A. niger</i> P8	-	-	+
<i>A. tubingensis</i> 03	-	-	+	<i>A. niger</i> P11	-	-	+
<i>A. tubingensis</i> 08	-	-	+	<i>A. parasiticus</i> V1	+	-	+
<i>A. tubingensis</i> 09	+	-	+	<i>A. parasiticus</i> V2	-	-	+
<i>A. tubingensis</i> 11	+	-	+	<i>A. parasiticus</i> S1	-	-	+
<i>A. tubingensis</i> 12	-	-	+	<i>A. parasiticus</i> S2	-	-	+

Note: +: Positive test results; -: Negative test results.

从 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中调出已知的与 OTA 合成相关的聚酮合酶(PKS)的氨基酸序列,利用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>)及 DNAMAN 多序列分析软件,对其进行多重比对分析,找出黑曲霉 PKS 的 AT 结构域特异的一段序列区(图 1),以黑曲霉 CBS 513.88 的 PKS 的 AT 域序列(GenBank 登录号 CAK42679)为模板,将这段



序列提交到引物设计软件 Primer Premier 5.0 中,设计引物 15AT-F (5'-CGGATGACCTCTAAAGCAG-3') 和 15AT-R (5'-TCTCGTTTGCCTGTCGTT-3'), 同时使用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增真菌的 ITS 序列作为对照。

对扩增产物进行测序并与黑曲霉 CBS 513.88 菌株的 *pks* 基因 AT 域序列 (GenBank 登录号 CAK42679) 进行比对。在此基础上设计其特异性定量引物 md-F (5'-CGGATGACCTCTAAAGCAG-3') 和 md-R (5'-GAAGAATGTCCACACC-3'), 目标扩增片段长度 134 bp。b-tubulin 为内参基因, 引物 b-tubulin-F (5'-CTTCTGACACGCAGGATAG-3') 和 b-tubulin-R (5'-ACGGCACGAGGAACATAC-3')。

### 1.5 DNA 的提取与 PCR 扩增

将斜面保藏的菌株活化后, 接种于 100 mL PDA 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 1–2 d。利用纱布收集过滤菌丝体, 用蒸馏水清洗除去菌丝表面的培养基。菌丝加液氮研磨成细粉, 用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。PCR 反应体系 25  $\mu$ L, 含 1  $\mu$ L DNA 模板、2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR 缓冲液、2  $\mu$ L 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.5  $\mu$ L 10 mmol/L dNTPs、上下游引物(20 mmol/L)各 0.5  $\mu$ L 和 0.5  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L), 用无菌超纯水补足总体积。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s; 54 °C 45 s; 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像仪成像并观察结果。使用 PCR 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。将目的 DNA 片段与 pMD18-T Easy 载体连接后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 鉴定阳性转化子, 送北京奥克鼎盛公司测序。

### 1.6 RNA 提取及实时定量 PCR

菌株在 PDA 液体培养基中, 25 °C 培养 4 d 后经过离心收集菌体, 用无菌滤纸吸干水分, 液氮研磨, 然后用 RNA 提取试剂盒抽提样品总 RNA, OD 值检测合格后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性和降解情况, 再用逆转录试剂盒进行

反转录。得到的 cDNA 样本于 -20 °C 保存, 用于实时荧光定量 PCR。目的基因和内参基因的扩增引物分别为 md-F/R 和 b-tubulin-F/R, 均采用 25  $\mu$ L 反应体系: SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>™</sup> II 12.5  $\mu$ L, PCR Forward primer (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, PCR Reverse primer (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 模板(100 ng) 2  $\mu$ L, 无菌水 8.5  $\mu$ L。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 在延伸阶段检测荧光强度, 收集信号, 40 个循环; 绘制融解曲线, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  法计算目的基因相对表达量。

### 1.7 特异性评价

利用设计的特异性引物, 对表 1 中列出的 72 株曲霉基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 以真菌的 ITS 序列为对照, 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

### 1.8 灵敏度评价

纯培养条件下的灵敏度评价: 以不同浓度黑曲霉 1062 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

干扰菌存在时的灵敏度评价: 将 50 ng 的黑曲霉 A3 基因组 DNA 与不同含量的黑曲霉 1062 基因组 DNA 混合后进行 PCR 扩增。

### 1.9 在人工污染食品样品检测中的应用

利用 3 点接种法将产毒的黑曲霉 1062 菌株接种到 PDA 培养基上, 25 °C 静置培养 5 d 后制备孢子悬液, 利用生理盐水将孢子悬液梯度稀释成 2.0 $\times 10^2$ –2.0 $\times 10^7$  个/mL。称取苹果、花生、葡萄、杏仁样品各 5 g, 每个样品 7 份, 每个样品其中的 6 份加入 1 mL 不同浓度的孢子悬液, 余下的一份样品作为空白对照。混合吸附 2 h 后, 向每份样品中加入 10 mL 的生理盐水, 洗脱样品中的孢子, 收集洗脱液, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 500  $\mu$ L TE 缓冲液, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。向离心管中加入 50  $\mu$ L 无菌水, 95 °C 水浴 10 min 后放于冰上 10 min。再利用前面所述的方法提取孢子的基因组, 利用引物 15AT-F/R 进行 PCR 扩增。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测特异性

OTA 生物合成途径中的相关基因是快速检测产毒黑曲霉的最佳靶标基因。虽然 OTA 的生物合成途径尚未阐明, 但已确认 OTA 的形成至少涉及 3 个关键酶, 分别催化 3 个关键的反应: 聚酮合酶(PKS)催化形成异香豆素聚酮化合物, 非核糖体多肽合成酶(NRPS)催化苯丙氨酸部分和二氢异香豆素部分的交联, 氯化物过氧化物酶(CPO)催化加入氯原子<sup>[17]</sup>。AT 域是 PKS 中相对保守的结构域部分, 在该区域针对产毒黑曲霉设计特异性引物, 有可能只对产毒的黑曲霉扩增出特异性条带。黑曲霉 CBS 513.88 可以合成 OTA, 它的基因组已经公布, 预测其中 An15g07920 基因编码的聚酮合酶可能参与了 OTA 的生物合成<sup>[18]</sup>; 而在其它曲霉中, 也有一些与 OTA 相关的聚酮合酶基因被克隆或部分克隆<sup>[19-21]</sup>。通过多重比对分析, 以黑曲霉 CBS 513.88 中 An15g07920 基因的 AT 域序列为模板, 设计了 15AT-F/R 特异性引物, 对供试的 72 株真菌进行了 PCR 扩增。结果如图 2 和图 3 所示。

由图 2、图 3 和表 1 可知产 OTA 的 3 株黑曲霉菌株都能扩增出一条约 698 bp 的特异性条带, 另外 3 株不能产毒的黑曲霉也扩增出了此条带; 其它菌株, 无论产毒与否, 均不能扩增出此条带。所有 72 株菌

均能扩增出 ITS 目的条带且结果良好。15AT-F/R 特异性引物扩增出条带, 说明菌株是有产毒风险的黑曲霉, 而 ITS1/4 扩增出条带则证明了真菌的存在。

### 2.2 检测假阳性结果分析

黑曲霉 1015、A4、A5 菌株能够扩增出目的条带, 但其代谢产物中检测不到 OTA 的存在。为了分析原因, 利用 RT-PCR 技术研究了产毒条件下, An15g07920 的 AT 域同源基因在 3 株菌株中的表达情况。1062 菌株为对照组, 设其基因表达量为 1, 结果见图 4。

AT 域同源基因均能表达, 且在黑曲霉 A4、A5 中的表达量明显高于黑曲霉 1062 中。由此可知, 黑曲霉 1015、A4、A5 菌株不能合成 OTA 并非 An15g07920 的 AT 域同源基因不能表达。OTA 的生物合成通常由以 *pks* 为核心的基因簇共同作用, 假阳性的结果可能与这些菌株缺失 OTA 代谢途径中其他相关基因或这些基因未能表达有关。

### 2.3 检测灵敏度

本实验包括两部分: 一是纯培养条件下, 供试菌不同浓度基因组 DNA 的 PCR 扩增; 二是在干扰菌存在的条件下, 供试菌不同浓度基因组 DNA 的 PCR 扩增。供试菌选用产毒黑曲霉 1062, 干扰菌选用不产毒的黑曲霉 A3。利用引物 15AT-F/R 进行 PCR 特异性目的条带扩增, 结果见图 5。

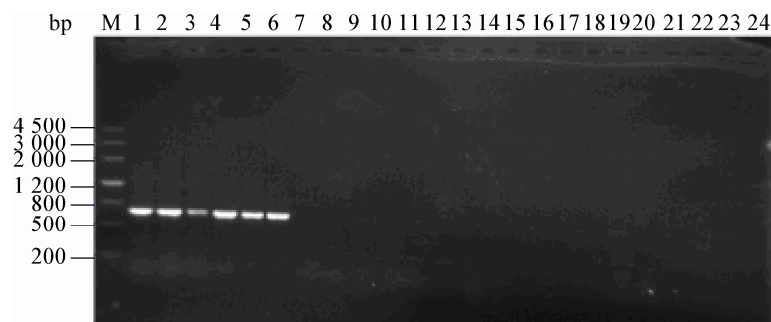


图 2 引物 15AT-F/R 对部分菌株 DNA 的 PCR 扩增图谱

Figure 2 The electrophoresis image of PCR amplification with primers 15AT-F/R

注: M: DNA marker III; 1-6: 黑曲霉 1062、4、A4、A5、A14 和 ATCC1015; 7-9: 碳黑曲霉 C14、3.146 和 3.147; 10-24: 黑曲霉 A1、A2、A3、A6、A7、A8、A9、A10、A11、A12、A13、A15、B1、B2 和 B3。

Note: M: DNA marker III; 1-6: *A. niger* 1062, 4, A4, A5, A14, ATCC1015; 7-9: *A. carbonarius* C14, 3.146, 3.147; 10-24: *A. niger* A1, A2, A3, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A15, B1, B2, B3.



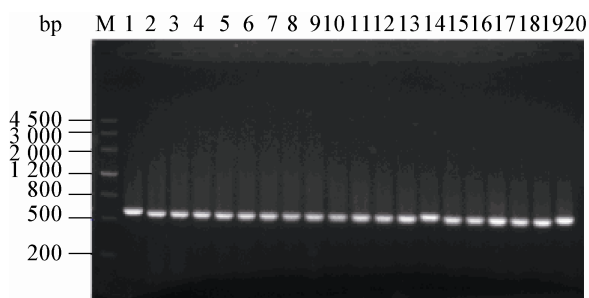


图3 引物 ITS1/4 对部分菌株 DNA 的 PCR 扩增图谱  
Figure 3 The electrophoresis image of PCR amplification with primers ITS1/4

注：M：DNA marker III；1-20：分别为黑曲霉 1062、4、1015、A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A10、A11、A12、A13、A14、A15、B1 和 B2。

Note: M: DNA marker III; 1-20: *A. niger* 1062, 4, 1015, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, B1, and B2.

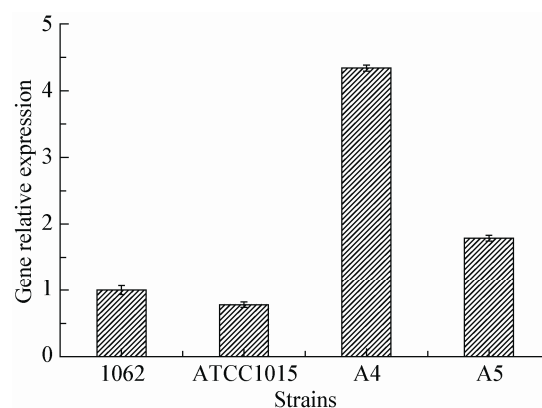


图4 An15g07920 的 AT 域同源基因在不同黑曲霉菌株中的相对表达量

Figure 4 Relative expression of the part of AT homeotic gene of An15g07920 in different *A. niger* strains

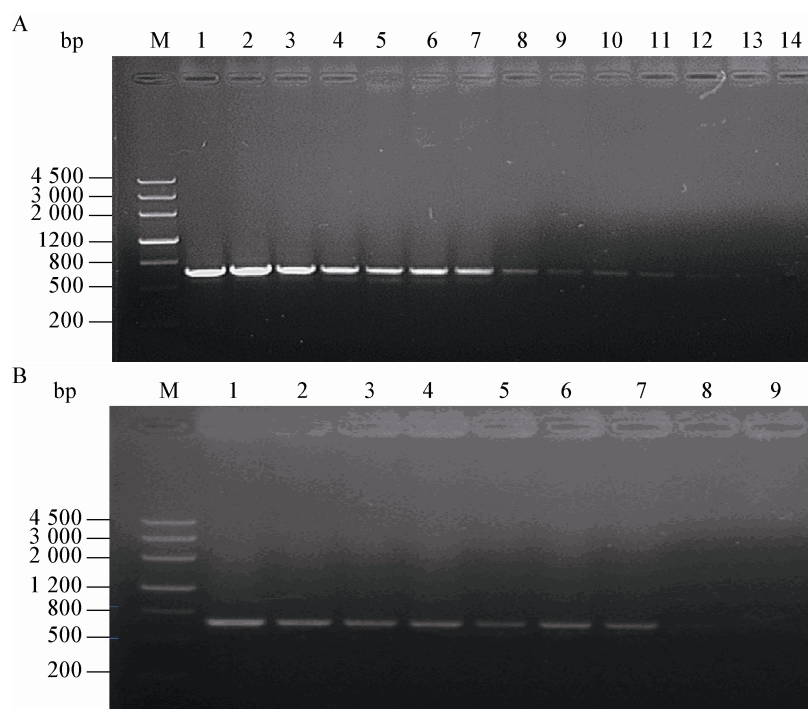


图5 纯培养(A)和干扰菌存在(B)条件下的灵敏度检测图谱

Figure 5 Detection sensitivity of genome DNA under the pure culture (A) and the presence of interfering strain (B)

注：M：DNA marker III；A：1-13：50、25、10、5、1、0.5 和 0.25 ng，0.1、50、25、15、5 和 1 pg 的黑曲霉 1062 基因组 DNA；14：50 ng 的黑曲霉 A3 基因组 DNA。B：1-8：50 ng 的黑曲霉 A3 基因组 DNA 与 5、2.5、1、0.5 和 0.1 ng，50、25 和 15 pg 的黑曲霉 1062 基因组 DNA 混合样品；9：50 ng 的黑曲霉 A3 基因组 DNA。

Note: M: DNA marker III; A: 1-13: 50, 25, 10, 5, 1, 0.5, 0.25, and 0.1 ng, 50, 25, 15, 5, and 1 pg of *A. niger* 1062 DNA; 14: 50 ng DNA from *A. niger* A3. B: 1-8: 50 ng of DNA from *A. niger* A3 were mixed with 5, 2.5, 1, 0.5 and 0.1 ng, 50, 25, and 15 pg of *A. niger* 1062 DNA; 9: 50 ng DNA from *A. niger* A3.

从图 5 中可以看出,对于黑曲霉 1062 纯基因组,当 DNA 含量高于 15 pg 时,以引物 15AT-F/R 进行 PCR 特异性目的条带扩增,电泳图中能够看到明显的条带,因此认为 PCR 的检测限为 15 pg。将不同含量的黑曲霉 1062 菌株的 DNA 与 50 ng 黑曲霉 A3 的 DNA 混合时,发现当 1062 菌株的 DNA 含量高于 25 pg 时,采用引物 15AT-F/R 扩增后,从电泳图中能够明显得到目的条带,可初步认为 PCR 体系中当混合基因组中产毒黑曲霉菌株的 DNA 含量高于 25 pg 时,能够利用此方法检测到产毒菌株。

## 2.4 人工污染农产品中产毒菌株的检测

为了验证 PCR 方法能否快速检测出农产品中污染的产毒黑曲霉,将不同浓度黑曲霉 1062 菌株的孢子悬液分别接种到 5 g 不同的农产品中,从农产品中提取污染菌的基因组 DNA,利用引物 15AT-F/R 进行 PCR 特异性目的条带扩增,琼脂糖凝胶电泳验证。以纯培养基中提取的 DNA 为模板进行 PCR 作为阳性对照,以不接菌的食物利用相同方法处理后进行 PCR 扩增作为阴性对照,结果见图 6。

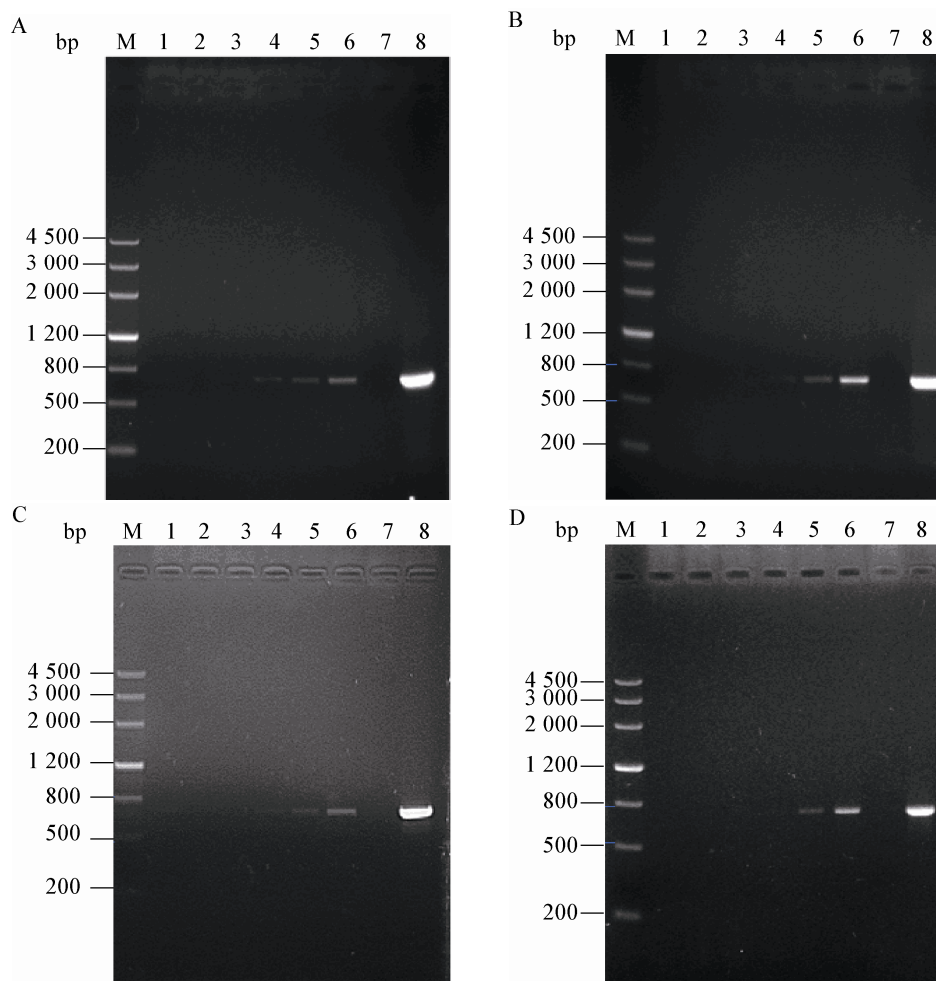


图 6 引物 15AT-F/R 对样品基因组 DNA 的 PCR 扩增图谱

Figure 6 The electrophoresis image of PCR amplification with primers 15AT-F/R in different samples

注: A: 苹果; B: 葡萄; C: 花生; D: 杏仁。M: DNA marker III; 1-6: 分别为添加  $2.0 \times 10^2$ – $2.0 \times 10^7$  个/mL 的黑曲霉 1062 孢子悬液的样品基因组; 7: 不接孢子悬液的食物基因组; 8: 纯培养基中提取的黑曲霉 1062 基因组。

Note: A: Apple; B: Grape; C: Peanut; D: Almond. M: DNA marker III; 1-6: DNA from food inoculated with  $2.0 \times 10^2$ – $2.0 \times 10^7$  spores/mL of *A. niger* 1062, respectively; 7: DNA from food without inoculation *A. niger* 1062; 8: DNA from *A. niger* 1062.



从图 6 中可以看出苹果和葡萄样品中接种孢子含量大于等于  $2.0 \times 10^5$  个/mL 时, 即样品中孢子浓度大于等于  $4.0 \times 10^4$  个/g 时, 能够用 PCR 的方法检测到样品被有毒菌株所污染。花生、杏仁样品中当接种孢子量大于等于  $2.0 \times 10^6$  个/mL 时, 即样品中孢子浓度大于等于  $4.0 \times 10^5$  个/g 时, 能够检测到目的条带。相比于苹果和葡萄, PCR 检测方法应用在花生和杏仁中的灵敏度偏低, 可能由于干果类食物中存在更多的抑制性物质。

### 3 结论

本文所建立的针对产毒黑曲霉的 PCR 检测方法, 可有效检测出所有产毒黑曲霉, 但也产生了 4% 的假阳性结果, 暴露了普通 PCR 方法存在的准确度偏低的问题, 此问题可通过建立针对 OTA 合成途径的多个基因的多重 PCR 检测方法来解决。本方法的检测灵敏度与被污染的农产品种类有关, 农产品中的成分, 如花生中的油脂、葡萄中的多酚和多糖均可抑制 PCR 反应, 降低检测灵敏度。因此从农产品中提取污染真菌的基因组 DNA 至关重要, 要求所提取真菌基因组 DNA 不但质量高, 而且所含 PCR 反应抑制剂少。采用本方法可在 6 h 内检测出农产品中污染的产 OTA 黑曲霉, 具有操作简便、检验快速的特点, 因此非常适合初筛产毒黑曲霉, 并在农产品污染产毒黑曲霉时进行有效预警。

### 参 考 文 献

- [1] Varga J, Kozakiewicz Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products[J]. Trends in Food Science & Technology, 2006, 17(2): 72-81
- [2] Commission Regulation (EC). No.1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [S]. Official Journal of the European Union L 364, 2006
- [3] The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 2715-2005 Hygienic standard for grains[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2005 (in Chinese)  
中华人民共和国卫生部. GB 2715-2005 粮食卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005
- [4] National Standardization Management Committee. GB 13078.1-2006 Hygienic standard for feeds - Tolerances of ochratoxin A and zearalenone in feeds[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2006 (in Chinese)  
国家标准化管理委员会. GB 13078.1-2006 饲料卫生标准 饲料中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的允许量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006
- [5] Guo YM, Zheng P, Sun JB. *Aspergillus niger* as a potential cellular factory: prior knowledge and key technology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(10): 1410-1418 (in Chinese)  
郭艳梅, 郑平, 孙际宾. 黑曲霉作为细胞工厂: 知识准备与技术基础[J]. 生物工程学报 2010, 26(10): 1410-1418
- [6] Liang ZH, Huang KL, He YL, et al. *Aspergillus niger*: can produce the Ochratoxin A[J]. Food Science and Technology, 2008(10): 191-194 (in Chinese)  
梁志宏, 黄昆仑, 何云龙, 等. 黑曲霉及其食品安全领域的赭曲霉毒素问题[J]. 食品科技, 2008(10): 191-194
- [7] Taniwaki MH, Pitt JI, Teixeira AA, et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 82(2): 173-179
- [8] Lucchetta G, Bazzo I, Dal Cortivo G, et al. Occurrence of black Aspergilli and ochratoxin A on grapes in Italy[J]. Toxins, 2010, 2(4): 840-855
- [9] Zhang J, Wang XX, Zhang Y, et al. Producing strain for OTA (Ochratoxin A): China, 201410577019.2[P]. 2015-03-04 (in Chinese)  
张健, 王小霞, 张颖, 等. 一株赭曲霉毒素 A 的产生菌: 中国, 201410577019.2[P]. 2015-03-04
- [10] Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes[J]. Food Microbiology, 2013, 36(2): 135-141
- [11] Rodríguez A, Rodríguez M, Andrade MJ, et al. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(1/2): 10-18
- [12] Spadaro D, Patharajan S, Kartikeyan M, et al. Specific PCR primers for the detection of isolates of *Aspergillus carbonarius* producing ochratoxin A on grapevine[J]. Annals of Microbiology, 2011, 61(2): 267-272
- [13] Luque MI, Andrade MJ, Rodríguez A, et al. Development of a multiplex PCR method for the detection of Patulin-, Ochratoxin A- and Aflatoxin-producing moulds in foods[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(4): 1113-1121
- [14] Luque MI, Córdoba JJ, Rodríguez A, et al. Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products[J]. Food Control, 2013, 29(1): 270-278
- [15] Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, et al. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 149(3): 226-235
- [16] Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage[M]. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1997: 423-426
- [17] 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
- [18] Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(2): 221-231
- [19] O'Callaghan J, Caddick MX, Dobson ADW. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*[J]. Microbiology, 2003, 149(12): 3485-3491
- [20] Bacha N, Atoui A, Mathieu F, et al. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene "aoks1" is involved in the biosynthesis of ochratoxin A[J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46(1): 77-84
- [21] Gallo A, Knox BP, Bruno KS, et al. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 179: 10-17