

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241023005

引用格式: 崔华, 陈梦泽, 高树青, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染风险现场快速检测系统的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 17–24.

CUI H, CHEN MZ, GAO SQ, *et al.* Establishment of an on-site rapid detection system for the risk of deoxynivalenol contamination [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 17–24. (in Chinese with English abstract).

# 脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染风险现场 快速检测系统的建立

崔 华, 陈梦泽, 高树青, 王松山, 李 森, 吴 宇, 李 丽, 叶 金\*, 王松雪

(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** 建立一种基于多酶恒温核酸快速扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)技术的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)污染风险现场快速检测系统。**方法** 通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)基因序列查询比对, 获取了我国主要产 DON 镰刀菌(包括禾谷镰刀菌、亚洲镰刀菌、假禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌)的 *Tri* 产毒基因簇高度同源序列, 设计特异性荧光探针并筛选引物, 建立了产 DON 镰刀菌的 MIRA 快速检测方法, 同时结合纸基 DNA 快速提取技术, 构建了一套现场快速检测系统。**结果** 该检测系统对质粒模版的检出限为  $1.95 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L, 对基因组 DNA 的检出限为 15 fg/ $\mu$ L, 对小麦灌浆期(穗)部样品的检测结果(共 27 个阳性)与实时荧光定量聚合酶链式反应技术(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)结果高度相关( $r=0.820$ ,  $P=0.000$ )。将 MIRA 检测的阈值线设定在第 43 个扫描点(起峰时间为 7 min)时, 对 89 个小麦样品的高 DON 污染风险( $DON > 1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ )与低 DON 污染风险( $DON < 1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ )的综合判别准确率为 87.15%。**结论** 该检测系统快速、经济、实用, 且试剂和仪器便携, 能够有效实现现场快速检测。这将有助于实施田间小麦 DON 污染风险早期预警, 指导干预, 防止或减少损失。

**关键词:** 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 镰刀菌; 多酶恒温核酸快速扩增技术; 现场检测

## Establishment of an on-site rapid detection system for the risk of deoxynivalenol contamination

CUI Hua, CHEN Meng-Ze, GAO Shu-Qing, WANG Song-Shan, LI Sen,  
WU Yu, LI Li, YE Jin\*, WANG Song-Xue

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

**ABSTRACT: Objective** To establish an on-site rapid detection system for the risk of deoxynivalenol (DON) contamination based on multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) technology. **Methods** Highly

收稿日期: 2024-10-23

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作项目(2022YFE0137500); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(ZX2406)

第一作者: 崔华(1986—), 女, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为粮食质量安全检测。E-mail: ch@ags.ac.cn

\*通信作者: 叶金(1988—), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为粮油质量安全。E-mail: yj@ags.ac.cn

homologous sequences of *Tri* toxin-producing gene clusters from the major DON-producing *Fusarium* species (including *Fusarium graminearum*, *Fusarium asiaticum*, *Fusarium pseudograminearum* and *Fusarium culmorum*) in China were obtained through gene sequence query and comparison by the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) of the United States of America. By designing specific fluorescent probes and screening primers, a MIRA detection method for DON-producing *Fusarium* was established, and an on-site rapid detection system was constructed by combining the rapid paper-based DNA extraction technique. **Results** The limit of detection of this assay system was  $1.95 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  for plasmid templates and 15 fg/ $\mu\text{L}$  for genomic DNA. The results of 27 positive wheat samples at the filling stage (spike) showed a highly significant correlation with those of the quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) method ( $r=0.820$ ,  $P=0.000$ ). When the MIRA detection threshold line was set at the 43rd scan point (peak onset time of 7 min), the combined discrimination accuracy between high (DON>1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and low (DON<1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) DON contamination risk for 89 wheat samples was 87.15%. **Conclusion** The detection system demonstrates speed, economy, practicality, and portability in terms of reagents and instrumentation, and is capable of effectively achieving the objective of rapid on-site detection. This will facilitate early warning of the risk of DON contamination in wheat production in the field, thereby guiding interventions to prevent or minimise losses.

**KEY WORDS:** deoxynivalenol; *Fusarium*; multienzyme isothermal rapid amplification technique; on-site detection

## 0 引言

镰刀菌是一类常见的植物病原菌,能够侵染小麦、玉米和水稻等禾本科作物,并产生真菌毒素,严重影响谷物的产量和质量。真菌毒素是威胁粮食质量安全的主要风险因素,其中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON),也称为呕吐毒素,是小麦中检出率最高的真菌毒素之一<sup>[1-2]</sup>,对人类和动物的免疫系统及生殖功能造成损害,甚至可能导致动物死亡。小麦中 DON 污染在全球范围内普遍存在<sup>[3]</sup>。目前已知的 DON 产生菌主要包括禾谷镰刀菌复合群(*Fusarium graminearum* species complex, FGSC)、黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)和假禾谷镰刀菌(*Fusarium pseudograminearum*)<sup>[4]</sup>。其中,FGSC 包含了 16 个目前已确认的系统发育种类<sup>[5]</sup>,而在我国,以禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*, *F. graminearum*)和亚洲镰刀菌(*Fusarium asiaticum*)为主<sup>[6-7]</sup>。因此,控制禾谷镰刀菌、亚洲镰刀菌、假禾谷镰刀菌<sup>[8]</sup>和黄色镰刀菌污染是我国小麦 DON 防控的关键。

小麦遭受产 DON 镰刀菌侵染的途径多种多样,其中最常见的是土壤污染,其次是通过雨水和风力传播<sup>[9-10]</sup>。该类病原菌通常在扬花期开始入侵,灌浆期出现症状,并在成熟期引发严重损害<sup>[11]</sup>,如果错过了防治的关键“窗口期”,感染将导致小麦产量下降、品质降低,甚至产生有害毒素,威胁食品安全<sup>[12]</sup>。DON 的生物合成途径已被广泛研究,该生物合成涉及超过 15 个不同的生化步骤,并受到许多调控和转录基因的调控,包括 *TRI4*、*TRI5*、*TRI6*、*TRI10*、*TRI12*、*TRI13* 和可能的 *TRI14*,其中 *TRI5* 基因是 DON 生物合成的第一步,被认为是所有产毒素镰刀菌中 DON 生

物合成过程中最重要的关键基因之一<sup>[13]</sup>。相关研究表明,小麦样品中 *TRI5* 基因拷贝数与 DON 毒素含量成正相关,基于毒素基因拷贝数与毒素产量存在的相关性<sup>[14]</sup>。目前基于 *TRI5* 基因核酸扩增的实验室检测技术,如:实时荧光定量聚合酶链式反应技术(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)<sup>[15]</sup>、数字 PCR (digital PCR, dPCR)<sup>[16]</sup> 等已广泛应用于镰刀菌的检测<sup>[17]</sup>。然而,这些方法对人员和设备的要求较高,耗时耗力。此外,田间样品在采集和运输过程中,病菌易发生变化,可能导致检测结果不准确。因此,亟需开发一种现场快速检测方法,以便及时监控小麦产 DON 镰刀菌的污染风险,采取干预措施,保障小麦的产量和质量。

等温扩增技术因其仅需单一恒温条件,能够在简单的设备如水浴锅、金属浴,甚至保温杯中运行,从而彻底摆脱了核酸扩增对复杂精密变温设备的依赖。这项技术具有特异性强、灵敏度高、操作简单、无需专业技术人员等优点,非常适合资源匮乏地区和现场检测等应用场景<sup>[18]</sup>。常用的等温扩增技术包括链置换扩增(strand displacement amplification, SDA)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)、重组酶介导扩增(recombinase-aid amplification, RAA)、多酶恒温核酸快速扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)等<sup>[19-20]</sup>。其中, LAMP 法因其仅需一种酶且扩增效率高,是目前应用最为广泛的等温扩增技术之一,相关论文发表量也最大。但该方法存在引物设计复杂、假阳性率较高、试剂价格昂贵等缺点<sup>[21]</sup>,并且由于日本知识产权的保护, LAMP 法在中国的转化和应

用受到限制。RPA、RAA 和 MIRA 是同源技术<sup>[22-23]</sup>, 其中, RPA 由英国 TwistDx 公司开发, 成本较高且供货周期长, 推广应用存在困难。相比之下, RAA 和 MIRA 是纯国产技术, 主要区别在于它们所用功能酶的来源和生产工艺不同。MIRA 的成品试剂抗干扰能力和稳定性更强<sup>[24-26]</sup>。MIRA 技术近年来发展迅速, 依靠 DNA 聚合酶、单链 DNA 结合蛋白和重组酶的协同作用, 实现快速高效的扩增。该技术的引物设计简单, 检测试剂成本相对较低, 还可以根据需求进行个性化定制, 供货周期短, 有效提高了检测的准确性和时效性<sup>[27]</sup>。

对于现场检测, 另一个关键限制是基因组 DNA 的提取。传统 DNA 提取方法通常需要多种设备, 这在检测现场通常难以实现。然而, 基于纸基纯化的快速 DNA 提取方法使得现场 DNA 提取成为可能<sup>[28-29]</sup>。这些方法可以从多种生物材料中分离出粗的基因组 DNA, 并且对设备需求较低。然而, 使用这些方法提取的粗 DNA 可能含有一些会干扰扩增反应的成分。因此, 在选择 DNA 提取方法时, 还需考虑其与后续扩增系统的兼容性。

本研究基于 MIRA 检测技术和 DNA 纸基纯化技术, 建立了一套适用于现场应用的 DON 污染风险快速检测系统。该系统操作简便, 设备便携, 检测结果直观易读, 能够满足粮食生产和收获等现场检测的需求, 有助于实现 DON 污染风险早期预警, 从而指导及时干预, 减少甚至避免损失。此外, 本研究还为产 DON 镰刀菌污染发生机制及产毒影响因素的研究提供了数据支持, 助力构建精准的产前小麦 DON 污染预测模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

阳性菌株: 禾谷镰刀菌、亚洲镰刀菌(*F. asiaticum*)、假禾谷镰刀菌(*F. pseudograminearum*)、黄色镰刀菌(*F. culmorum*); 阴性菌株: 拟轮枝镰刀菌(*F. verticillioides*)、藤仓镰刀菌(*F. fujikuroi*)、层出镰刀菌(*F. proliferatum*)、木贼镰刀菌(*F. equiseti*)、三线镰刀菌(*F. tricinctum*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、枝顶孢(*Acremonium* sp)、互生枝顶孢(*Acremonium alternatum*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*, *A. flavus*)、黑曲霉(*A. niger*)、杂色曲霉(*A. versicolor*)、阿姆斯特丹曲霉(*A. amstelodami*)、交链孢霉(*Alternaria alternata*)、链格孢霉(*Alternaria tenuissima*)、篮状菌(*Talaromyces assiutensis*)、球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)、桔灰青霉(*Penicillium aurantiogriseum*)、产黄青霉(*Penicillium Chrysogenum*)、金灰青霉(*Penicillium aurantiogriseum*), 以上菌株均为本实验室分离鉴定保藏; 十二烷基肌氨酸钠、乙二胺四乙酸二钠、Tween 20(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); Tris-HCl[生物级, 生工生物工程(上海)股份有限公司];  $\epsilon$ -聚赖氨酸(生物级, 上海源叶

生物科技有限公司); DNA 恒温快速扩增试剂盒(荧光型, 潍坊安普未来生物科技有限公司); JXYM-0510 研磨管(上海净信实业发展有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

Tissue-prp-01 快速组织细胞破碎仪(上海净信实业发展有限公司); AmpliFire<sup>®</sup>便携式恒温荧光检测仪(美国 Agdia 公司); CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司); 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)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品采集与前处理

根据种植信息, 在河南、安徽、湖北、江苏等黄淮海小麦主产区选取代表性采样点位, 在小麦灌浆期采集(穗部)样品, 每个采样点选取 2 至 3 块田地, 每块田地随机分散采集 50 个麦穗; 在小麦收获期采集(籽粒)样品, 每个采样点选取 5 家农户, 每家分散采集 500 g 至 1000 g 小麦籽粒, 将 5 份样品混合均匀后, 取 500 g 至 1000 g 磨粉, 用于毒素检测。

#### 1.3.2 样品 DNA 提取

基于 ZOU 等<sup>[30]</sup>报道的纸基 DNA 快速粗提取方法以及实验室前期开发的粮食真菌 DNA 快速高通量提取—SLS 磁珠法<sup>[31]</sup>, 进行样品 DNA 提取。具体操作步骤如下:

小麦穗样品: 每块田地选取 10 个麦穗, 用无菌镊子从每个麦穗上随机摘取 3 片外颖, 收集至研磨管。加入 1.2 mL 裂解液(2%十二烷基肌氨酸钠、20 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠、50 mmol/L Tris-HCl、1 mol/L NaCl、20 mmol/L  $\epsilon$ -聚赖氨酸), 并将管子置于快速组织细胞破碎仪中, 高速处理 2 次, 每次 30 s, 间隔 120 s; 将 DNA 吸附纸基浸入样品裂解液中, 保持 15 s; 转移纸基至含有 200  $\mu$ L 清洗液(10 mmol/L Tris-HCl、0.1% Tween 20)的离心管中, 保持 10 s; 然后, 将纸基转移至含有 50  $\mu$ L TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠, pH=8.0)的离心管中, 保持 5 s 后取出。

纯菌样品: 称取 100 mg 菌丝至研磨管, 加入 1 mL 裂解液, 其余操作步骤与小麦穗样品相同。

#### 1.3.3 引物探针设计及标准质粒构建

在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)基因数据库中检索禾谷镰刀菌、亚洲镰刀菌、假禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌的 *Tri* 产毒基因簇序列, 经基于局部比对算法的搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)比对, 筛选出 4 个菌株的高度同源序列, 并以此为靶标设计探针和引物。如图 1 所示, 探针包含 4 个修饰位点: 第 34 位碱基标记荧光基团(FAM), 第 35 位碱基标记四氢喹啉残基(dSpacer), 第 36 位碱基标记淬灭基团(BHQ1), 3'末端修饰封闭基团(Spacer

C3)。在探针的上下游分别设计了 11 条正向引物和 8 条反向引物。所有引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

针对靶标序列设计引物后,进行 PCR 扩增,回收扩增的序列并将其克隆至 pUC57 载体中。随后,将载体转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中进行富集培养,通过抗性筛选阳性菌落并提取重组质粒。根据质粒浓度计算其拷贝数,计算公式为:拷贝数/(copies/ $\mu$ L)= $6.02 \times 10^{23} \times$ 质粒浓度(ng/ $\mu$ L) $\times 10^{-9}$ /(质粒碱基数 $\times 660$  Da)。

TACTTCTTGAGAGGGATACCCTCTGTGTGCTCGATCCATCGC  
 TCAGGCTTGAAC T T T CGGGCTCGGGAAATCTCTGGGATC  
 GGTGTGCATGAAATAGGTGGACTGAGAAATGGGAGTCTGTGAC  
 AATTGTTAGTACGCATAGATATAGAGAGATAGAAAATAAACCTA  
 CTCCTTAGGGATGACATGCTCCTTGTACTTCAAGTTCTCTCTGA  
 GTAGCCACACGTCCCGAGCGAGAAAT

● 荧光基团 (FAM)    ■ 四氢呋喃残基 (dSpacer)  
 ● 淬灭基团 (BHQ1)    ○ 封闭基团 (C3-Spacer)

图1 产DON镰刀菌MIRA检测探针序列及修饰位点示意图  
 Fig.1 Schematic diagram of MIRA detection probe sequences and modification sites of DON-producing *Fusarium*

### 1.3.4 实时荧光 MIRA 扩增引物筛选

以禾谷镰刀菌、亚洲镰刀菌、假禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌 4 株阳性菌株 DNA 混合溶液为扩增模版,首先固定一条正向引物,并分别与 8 条反向引物配对进行扩增。通过比较起峰时间、荧光信号强度和峰型,筛选出最优的反向引物;然后,固定该最优反向引物,分别与 11 条正向引物配对扩增,依据相同的标准筛选出最佳正向引物。

采用 DNA 恒温快速扩增试剂盒(荧光型)建立反应体系:首先,将 29.4  $\mu$ L 的 A buffer、10  $\mu$ mol/L 的正向和反向引物各 2  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 的探针 0.6  $\mu$ L,以及 11.5  $\mu$ L 的 ddH $_2$ O 混合均匀,然后转移至冻干酶粉管中,上下颠倒甩动离心管,确保酶粉充分溶解后,6000 r/min 离心 5 s,将溶液

平均分配到两个反应管中,每管加入 1  $\mu$ L 的 DNA 模版,最后在反应管盖子内侧加入 1.25  $\mu$ L 的 B buffer,颠倒混匀 5 次,6000 r/min 离心 5 s,将反应管置于 AmpliFire 恒温扩增仪中,在 42  $^{\circ}$ C 下孵育 20 min,并实时收集 FAM 荧光信号值。

### 1.3.5 特异性验证

分别以禾谷镰刀菌、亚洲镰刀菌、假禾谷镰刀菌、黄色镰刀菌、拟轮枝镰刀菌、藤仓镰刀菌、层出镰刀菌、木贼镰刀菌、三线镰刀菌、尖孢镰刀菌、枝顶孢、互生枝顶孢、黄曲霉、黑曲霉、杂色曲霉、阿姆斯特丹曲霉、交链孢霉、链格孢霉、篮状菌、球毛壳菌、桔灰青霉、产黄青霉、金灰青霉共 23 株菌的 DNA 为模版,采用已建立的实时荧光 MIRA 扩增体系进行检测,验证该方法的特异性。

### 1.3.6 灵敏度检测

质粒检测灵敏度:将标准质粒溶液进行 10 倍梯度稀释,使浓度范围在  $3.9 \times 10^0 \sim 3.9 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L 之间,同时将  $3.9 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的浓度进行 2 倍梯度稀释,直至浓度达到  $1.95 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L。以这些浓度的质粒作为模板,使用无菌双蒸水作为阴性对照,进行实时荧光 MIRA 扩增,以分析该方法的检测灵敏度。

基因组 DNA 检测灵敏度:将阳性菌株 DNA 混合溶液进行 10 倍梯度稀释,使质量浓度范围在  $1.2 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^6$  fg/ $\mu$ L 之间,同时将  $1.2 \times 10^2$  fg/ $\mu$ L 的质量浓度进行 2 倍梯度稀释,最低质量浓度为 15 fg/ $\mu$ L。以这些浓度的 DNA 作为模板,使用无菌双蒸水作为阴性对照,进行实时荧光 MIRA 扩增,分析其检测灵敏度。

### 1.3.7 实际样品检测

以小麦灌浆期(穗部)样品的 DNA 为模版,分别采用新建立的实时荧光 MIRA 扩增检测法(图 2)和实验室先前建立的实时荧光定量 PCR 检测法进行检测<sup>[32]</sup>。对于小麦收获期(籽粒)样品的毒素检测,按照 LS/T 6133—2018《粮油检验 主要谷物中 16 种真菌毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》的操作要求进行。

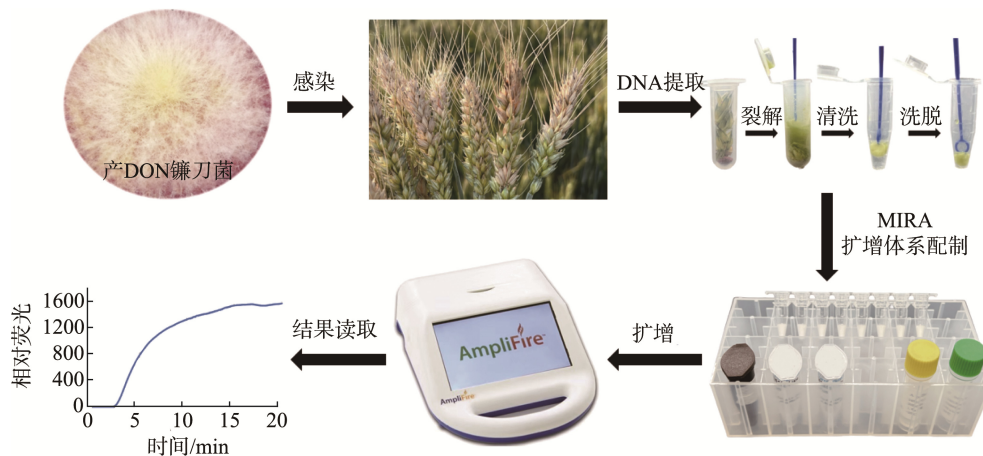


图2 小麦田间样品检测示意图

Fig.2 Schematic diagram of field wheat samples testing

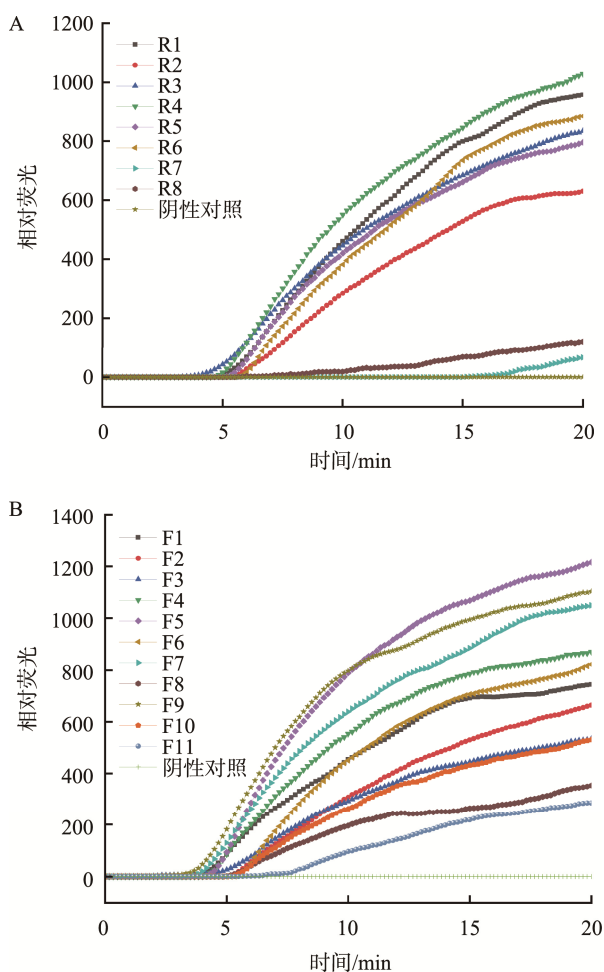
### 1.4 数据处理

采用实时荧光 MIRA 扩增法对不同浓度的标准质粒或 DNA 重复检测 3 次, 使用 Origin 2018 软件进行数据分析作图, 同时使用该软件对实时荧光 MIRA 与 qPCR 检测结果进行 Pearson 相关性分析, 并进行线性拟合。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选结果

不同引物的实时荧光 MIRA 扩增结果(图 3)显示, 大多数引物均能扩增出典型的荧光曲线, 与其他反向引物相比, R4 的起峰时间最早, 且荧光信号整个过程中始终最强。因此, R4 被确定为最佳反向引物。正向引物中, F9 的起峰时间最早, 前期荧光信号最强, 虽然其后期信号略弱于 F5, 但综合分析后确认 F9 为最佳正向引物。最终, 用于检测产 DON 镰刀菌的引物组合 F9/R4 扩增获得的基因片段大小为 87 bp(表 1)。



注: A为反向引物筛选; B为正向引物筛选。

图3 实时荧光MIRA引物筛选

Fig.3 MIRA primer screening of real-time fluorescent

表 1 MIRA 扩增引物探针及片段序列  
Table 1 MIRA amplification primer, probes, and fragment sequences

名称	序列(5'-3')	碱基数/ bp
MIRA-Fus-F9	CTGTTGTGCCTCGATCCATCGC TCAGGCTTGAAC	35
MIRA-Fus-R4	CAGTCCACCTATTTCATGCACA CCGATCCAAGA	34
MIRA-Fus-Pro	GTTGTGCCTCGATCCATCGCTCA GGCTTGAAC /i6FAMdT/idSp/iBHQ1dT/CGGGCT CGGGGAAA/C3-Spacer	51
扩增片段	CTGTTGTGCCTCGATCCATCGCTCA GGCTTGAACTTTCGGGCTCGGGGA AATTCTTGGGATCGGTGTGCATGA AATAGGTGACTG	87

### 2.2 特异性验证结果

采用建立的实时荧光 MIRA 扩增体系对分离自全国各地粮食样品的 23 株代表菌种进行扩增反应, 结果(图 4)显示, 4 株阳性菌株均出现了有显著扩增, 而其他菌株均未出现非特异性扩增, 表明该检测体系具有良好的特异性。

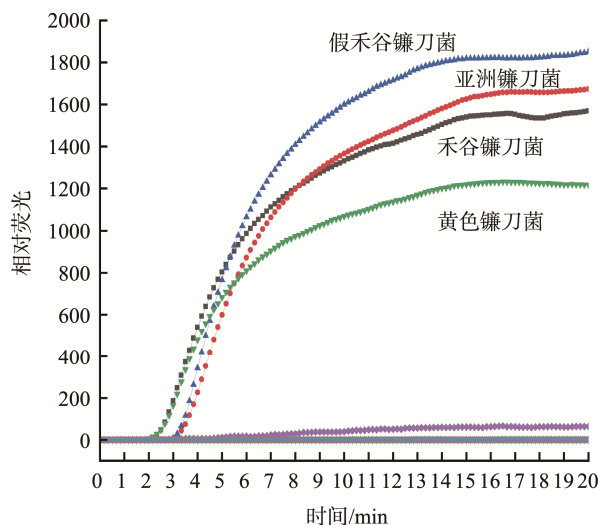
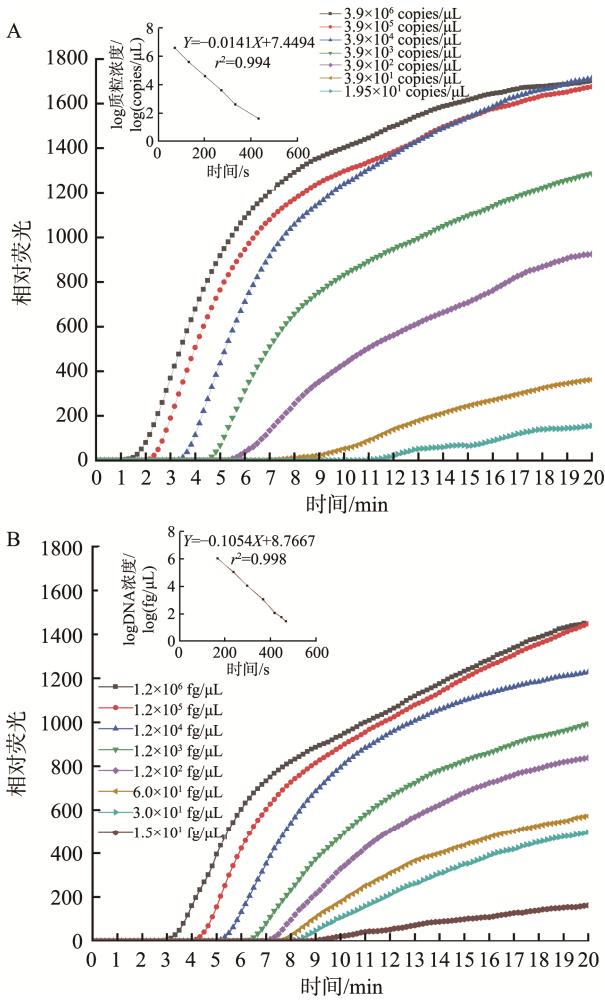


图4 实时荧光MIRA特异性验证扩增结果

Fig.4 Results of the specificity validation of the real-time fluorescence MIRA assay

### 2.3 灵敏度检测结果

实时荧光 MIRA 扩增体系对不同浓度的质粒模版进行检测, 如图 5, 结果显示检出限最低可达  $1.95 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L, 对不同浓度的 DNA 模版进行检测, 检出限最低可达 15 fg/ $\mu$ L, LIANG 等<sup>[33]</sup>针对玉米中的禾谷镰刀菌建立了侧流量纸重组酶聚合酶扩增现场检测方法, 检出限为 20 fg/ $\mu$ L, 本研究建立的检测方法灵敏度更高一些。



注: A. 质粒检测; B. 基因组DNA检测。

图5 实时荧光MIRA灵敏度检测结果

Fig.5 Sensitivity validation results of real-time fluorescence MIRA assay

## 2.4 实际样品检测结果

为了便于统计分析,根据 AmpliFire 恒温扩增仪扫描频率(10 s/次),将 MIRA 对小麦灌浆期(穗部)样品检测的起峰时间值换算为扫描点阈值(整个 20 min 检测过程共计 121 个扫描点阈值)。Pearson 相关性分析结果显示(图 6),MIRA 与 qPCR 两种方法对小麦灌浆期(穗部)样品的检测结果具有极显著的相关性( $r=0.820$ ,  $P=0.000$ )。

为了确认 MIRA 检测法对小麦灌浆期(穗部)样品检测结果用于判别收获后小麦籽粒 DON 污染风险的阈值线(表 2),首先,通过设定不同的 MIRA 检测值来进行判别,大于该检测值的样品划为高 DON 污染风险组,小于该检测值的样品划为低 DON 污染风险组;然后,根据我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》的规定,将  $\text{DON} > 1000 \mu\text{g}/\text{kg}$  的收获期小麦样品划分

为高风险(共 19 个样本),将  $\text{DON} < 1000 \mu\text{g}/\text{kg}$  的收获期小麦样品划分为低风险(共 70 个样本);最后,对比确认不同 MIRA 检测值的判别准确率,最终筛选出综合判别率最佳的值,即为风险阈值线。分析结果显示,不同的阈值线在判别高风险和低风险样本时的准确率存在差异,当 MIRA 的阈值线设定为 43 时( $< 43$  为高风险;  $> 43$  为低风险),高风险判别准确率达到 100%,且综合判别准确率最高,达 87.15%。

MIRA 检测法的阈值与 qPCR 的 Ct 值相比,变异性较大,其主要原因在于 MIRA 扩增是在等温条件下进行的,如果反应体系未充分混匀,尤其是在模板数量较少时,容易影响反应结果。随着模板数量的减少,阈值时间的变异会增加。因此,通常建议在 MIRA 反应开始后的 4 min 内取出反应管进行混匀,以提高检出率。由于 MIRA 反应启动迅速,可在室温下立即开始,因此操作人员的熟练程度对阈值时间有显著影响,这对模板数量较少的样品尤为重要。此外,国外研究表明,将反应体积缩小至  $5 \mu\text{L}$  可以提高检测的敏感性,同时节约成本。相比之下,qPCR 在变温条件下进行(包括变性、退火和延伸),每个循环中的反应液都能得到充分混匀,因此 Ct 值的标准差相对较小。

目前建立的 MIRA 检测系统对于小麦 DON 污染综合判别准确率最高仅为 87.15%,这主要是由于产 DON 镰刀菌在小麦生长期间的生命活动受多种因素的影响(如天气、农药使用、品种等)<sup>[30]</sup>,因此在后续研究中,需综合这些相关影响因子,建立更加完善的预警模型,以进一步提高判别的准确率。另一方面,需继续优化纸基 DNA 粗提取方法,提高 DNA 的提取效率和质量,以增加目的基因的检出率。

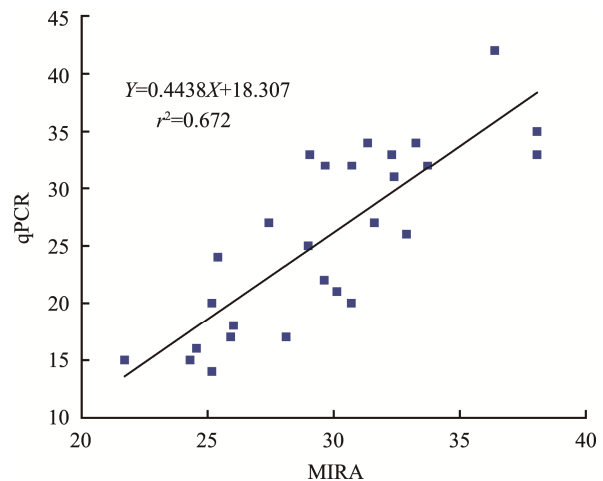


图6 MIRA与qPCR对小麦灌浆期(穗部)样品检测结果相关性分析

Fig.6 Correlation analysis of MIRA and qPCR for detection of wheat samples at the filling stage (spike)

表2 小麦灌浆期(穗部)样品 MIRA 检测 DON 污染风险判别  
Table 2 Risk discrimination of DON contamination by MIRA test in wheat samples at the filling stage (spike)

检出性质	检出率/%	风险类型	数量	风险划分阈值线			
				43	34	32	25
阳性	86.96	高风险 (DON>1000 μg/kg)	样品数量	19			
			判别准确数量	19	18	16	14
			判别准确率/%	100.00	94.74	84.21	73.68
阴性	100.00	低风险 (DON<1000 μg/kg)	样品数量	70			
			判别准确数量	52	55	53	62
			判别准确率/%	74.29	78.57	75.71	88.57
综合判别准确率/%			87.15	86.66	79.96	81.13	

### 3 结 论

本研究基于 MIRA 快速检测技术, 结合纸基 DNA 纯化技术和便携式仪器设备, 建立了一套小麦 DON 污染风险快速检测系统。该检测系统具有操作简单、灵敏度高、特异性强等优点, 并且不需要大型仪器, 非常适用于小麦生产现场或基层实验室等检测场景。应用该检测系统对灌浆期小麦样品进行 DON 污染风险判定, 结果与成熟期小麦样品的实际 DON 污染风险具有显著正相关性, 这为我国小麦生产中防控 DON 污染策略的提出提供了关键技术支持和参考依据。

#### 参考文献

- [1] KHODAEI D, JAVANMARDI F, KHANEGHAH AM. The global overview of the occurrence of mycotoxins in cereals: A three-year survey [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2021, 39: 36–42.
- [2] TOLOSA J, RODRIGUEZ-CARRASCO Y, RUIZ MJ, *et al.* Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 158: 112661.
- [3] RAMU AG, KANNAN M, DURAIRAJ RK, *et al.* Distribution, toxicity, interactive effects, and detection of ochratoxin and deoxynivalenol in food: A review [J]. *Food Chemistry*, 2021, 378: 131978.
- [4] CHEN Y, KISTLER HC, MA ZH. *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: Biosynthesis, regulation, and management [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2019, 57: 15–39.
- [5] WATANABE M, YONEZAWA T, LEE K, *et al.* Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes [J]. *Bmc Evolutionary Biology*, 2011, 11: 1–16.
- [6] EMERSON PD, MOREIRA-GLAUCIA M, TODD W, *et al.* *Fusarium graminearum* species complex: A bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes [J]. *Phytopathology*, 2021, 112(4). DOI: 10.31219/osf.io/sbwwh
- [7] 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]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 387(16): 110061.
- [8] DENG YY, LI W, ZHANG P, *et al.* *Fusarium pseudograminearum* as an emerging pathogen of crown rot of wheat in eastern China [J]. *Plant Pathology*, 2020, 69(2): 240–248.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] MARKELL SG, FRANCL LJ. *Fusarium* head blight inoculum: Species prevalence and, Gibbe spore type [J]. *Plant Disease*, 2003, 87(7): 814–820.
- [12] TRAIL F, XU JR, MIGUEL SP, *et al.* Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*) [J]. *Fungal Genetics & Biology*, 2003, 38(2): 187–197.
- [13] 张昊, 陈万权. 小麦赤霉菌群体结构和病害监控技术研究进展[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(1): 250–262.
- [14] ZHANG H, CHEN WQ. Research progresses on population structure of pathogen and monitoring and controlling technology of *Fusarium* head blight in wheat [J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49(1): 250–262.
- [15] THERESA L, SEUNG-HO L, YOUNG JS, *et al.* Comparison of trichothecene biosynthetic gene expression between *Fusarium graminearum* and *Fusarium asiaticum* [J]. *The Plant Pathology Journal*, 2014, 30(1): 33–42.
- [16] SCHNERR H, NIESSE L, VOGEL RF. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LighCycler™-PCR using SYBR®GreenI for continuous fluorescence monitoring [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 71(1): 53–61.
- [17] STRAUSBAUGH CA, OVERTURF K, KOEHN AC. Pathogenicity and realtime PCR detection of *Fusarium* spp. in wheat and barley roots [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2005, 27: 430–438.
- [18] 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]. *Journal of Microbiological Methods*, 2021, 190: 106319.
- [19] GONG L, JIANG YM, CHEN F. Molecular strategies for detection and quantification of mycotoxin-producing *Fusarium* species: A review [J].

- Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(9): 1767–1776.
- [18] 王帅, 杨艳歌, 吴古文, 等. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 297–305.
- WANG S, YANG YG, WU ZW, *et al.* A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens [J]. Food Science, 2023, 44(9): 297–305.
- [19] GUPTA S, SAHARAN SM, GURJAR SM, *et al.* Molecular detection of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat by loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay [J]. Indian Phytopathology, 2020, 73(4): 1–6.
- [20] LIANG XY, ZHANG X, ABDUL HH, *et al.* Development and evaluation of a novel visual and rapid detection assay for toxigenic *Fusarium graminearum* in maize based on recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 372: 109682.
- [21] JAMES A, MACDONALD J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics [J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2015, 15(11): 1475–1489.
- [22] HENG P, LIU J, SONG Z, *et al.* Rapid detection of *Staphylococcus aureus* using a novel multienzyme isothermal rapid amplification technique [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13, 1027785.
- [23] TAN M, LIAO C, LIANG L, *et al.* Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 1744.
- [24] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(10): 983–988.
- LV B, CHENG HR, YAN QF, *et al.* Recombinase-aid amplification: A novel technology of *in vitro* rapid nucleic acid amplification[J]. Scientia Sinica (Vita), 2010, 40(10): 983–988.
- [25] 汤赛君, 于小兰, 王秀东, 等. 等温核酸扩增反应试剂及等温核酸扩增方法: 中国, CN102816756A[P]. 2012-12-12.
- TANG SJ, YU XL, WANG XD, *et al.* Isothermal nucleic acid amplification reaction reagents and isothermal nucleic acid amplification methods: China, CN102816756A [P]. 2012-12-12.
- [26] 于继彬, 李俊, 马陈翠, 等. 一种常温核酸扩增反应: 中国, CN109971834A[P]. 2019-07-05.
- YU JB, LI J, MA CC, *et al.* A room temperature nucleic acid amplification reaction: China, CN109971834A [P]. 2019-07-05.
- [27] PARK BS, ZHANG Y. Development of multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) combined with lateral-flow dipstick (LFD) assay to detect species-specific *trh* and *tdh* Genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Pathogens, 2024, 13(1): 57.
- [28] MARENGO A, CAGLIERO C, SGORBINI B. Development of an innovative and sustainable one-step method for rapid plant DNA isolation for targeted PCR using magnetic ionic liquids [J]. Plant Methods, 2019, 15: 23.
- [29] WANG X, CHEN Y, CHEN X, *et al.* A highly integrated system with rapid DNA extraction, recombinase polymerase amplification, and lateral flow biosensor for on-site detection of genetically modified crops [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1109: 158–168.
- [30] ZOU YP, MASON MG, WANG YL, *et al.* Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds [J]. PLoS Biology, 2017, 15(11): e2003916.
- [31] 崔华, 王松山, 陈梦泽, 等. 粮食真菌 DNA 快速高通量提取方法的建立与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(5): 114–121.
- CUI H, WANG SS, CHEN MZ, *et al.* Establishment and application of a rapid high-throughput extraction method of fungal DNA for grains [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(5): 114–121.
- [32] DONG F, QIU J, XU J, *et al.* Effect of environmental factors on *Fusarium* population and associated trichothecenes in wheat grain grown in Jiangsu province, China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 230: 58–63.
- [33] LIANG X, ZHANG X, HASEEB HA, *et al.* Development and evaluation of a novel visual and rapid detection assay for toxigenic *Fusarium graminearum* in maize based on recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 372: 109682.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)