DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260104005
引用格式: 李云霞, 张锐, 韩芳, 等. 酵母菌 mRNA 提取技术及实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应检测方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(9): 314–323.
LI YX, ZHANG R, HAN F, *et al*. Study on the extraction of yeast mRNA and the detection method of reverse transcription real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(9): 314–323. (in Chinese with English abstract).

酵母菌 mRNA 提取技术及实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应检测方法研究

李云霞, 张　锐, 韩　芳, 马生龙, 聂莹莹, 马莉萍*
(甘肃省科学院传感技术研究所, 兰州　730000)

摘　要: 目的　探究一种高效的酵母菌信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)提取方法, 并建立相应的酵母菌基因实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)特异检测方法。**方法**　采用自主研发的高性能二氧化硅磁珠为 mRNA 捕获载体, 通过链霉亲和素磁珠(SM)-Oligo(dT)联合 Trizol 裂解捕获的方法, 优化磁珠浓度、磁吸附时间等, 建立高效的酵母菌 mRNA 提取技术。根据酵母菌几丁质合成酶基因 2 (chitin synthase 2, *CHS2*)设计引物, 建立一种酵母菌特异性的 RT-qPCR 检测方法, 对该方法的特异性、稳定性进行验证。**结果**　在优化提取条件下, 本研究可以实现不同浓度酵母菌的 mRNA 提取, 低浓度菌液(2×10^3 cfu/mL)也能提取 2.13 μg mRNA。本研究建立的酵母菌检测方法检出线性范围为 2×10^3~2×10^7 cfu/mL, 线性方程 Y=–1.69X+33.412 (r^2=0.9966), 该方法对目标酵母菌表现出高度的特异性。**结论**　本研究建立了酵母菌特异性磁珠法 mRNA 提取技术及 RT-qPCR 检测方法, 该方法有较好的特异性、灵敏度, 为食品及科研中酵母菌的定量检测提供新技术。

关键词: 酵母菌; mRNA 提取; 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应; 几丁质合成酶基因 2

Study on the extraction of yeast mRNA and the detection method of reverse transcription real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

LI Yun-Xia, ZHANG Rui, HAN Fang, MA Sheng-Long, NIE Ying-Ying, MA Li-Ping*
(*Institute of Sensing Technology*, *Gansu Academy of Sciences*, *Lanzhou* 730000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To explore an efficient method for extracting messenger RNA (mRNA) from yeast and establish a specific detection method by reverse transcription real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Methods**　A high-performance silica magnetic beads by self-developed were used as carrier, an

收稿日期: 2026-01-04
基金项目: 甘肃省科技厅项目(23JRRA1345, 25CXGA043); 甘肃省科学院项目(2023ZDYF-04); 兰州市科技局项目(2023-3-26); 甘肃省知识产权计划资助项目(25ZSCQG02044)
第一作者: 李云霞(1974—), 女, 副高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 864315576@qq.com
***通信作者:** 马莉萍(1973—), 女, 硕士, 研究员, 主要研究方向为生物传感技术。E-mail: 957065826@qq.com

efficient yeast mRNA extraction technique was developed by combining streptavidin magnetic beads (SM) conjugated with Oligo(dT) and Trizol lysis, followed by optimization of magnetic bead concentration and magnetic adsorption time. Primers based on the yeast chitin synthase 2 (*CHS2*) gene, established a yeast-specific RT-qPCR assay, and its specificity and stability were validated. **Results** Under optimized extraction conditions, the method enabled extraction yeast mRNA from various concentration, yielded 2.13 μg mRNA even from a low-concentration (2×10^3 cfu/mL). This yeast detection methodexhibited a wide linear range from 2×10^3 to 2×10^7 cfu/mL, with a linear equation of Y=–1.69X+33.412 (r^2=0.9966), the method exhibited high specificity for the target yeast. **Conclusion** This study successfully establish a mRNA extraction technique by yeast-specific magnetic bead-based and a RT-qPCR detection method, exhibits good specificity and sensitivity, provide a new technology for the detection of yeast contamination in food and scientific research.

KEY WORDS: yeasts; mRNA extraction; reverse transcription real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; chitin synthase 2

0　引　言

酵母菌是人类利用最早的微生物, 也是经典的真核模式生物, 在基础生命科学与工业生物技术中扮演着核心角色[1]。酵母菌是一把双刃剑: 在食品工业中不可或缺, 却也因其污染而导致食品腐败, 危害人体健康[2–5]。GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌与酵母菌计数》规定了各类食品中霉菌和酵母菌的计数方法, 对食品及科研样本中的酵母菌进行准确检测, 是保障其安全性的关键。

目前, 酵母菌的检测方法主要分为两类: (1)传统的培养及生化检测方法, 如平板计数法、代谢检测法、生化检测法等; (2)基于核酸的分子生物学技术[6–7]。平板计数法操作步骤烦琐, 检测周期长, 检测过程受技术人员水平、检测环境的影响[8]。代谢检测法利用微生物产生代谢产物的量及种类实现鉴别, 但培养基、食品配方等会影响检测结果[9]。生化检测法利用微生物对底物的特异性代谢实现鉴别, 但因检测材料和特异性致使计数结果存在不准确问题[10]。分子生物学技术是以核酸为检测目标, 为食品安全监测提供了新路径。其中聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是将微量的 DNA 片段通过指数级扩增, 琼脂糖凝胶检测实现微生物鉴定, 无法实现定量[11–12]。实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)通过监测荧光基团的累积, 实现对目标核酸的精准定量, 该方法具有快速、无需电泳、无交叉污染等优点, 已被广泛用于微生物检测等研究[13–14]。

RT-qPCR 技术高度依赖于高质量信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)的获取, 然而 mRNA 丰度低(仅占细胞总 RNA 的 1%~5%)、稳定性差, 对提取方法的特异性和富集效率提出了较高要求[15–16]。酵母菌坚韧的细胞壁及其胞内丰富的多糖, 在提取过程中易与 mRNA 共沉淀, 使得高质量 mRNA 的获取尤为困难[17–19]。为克服上述挑战, 研究人员研发了多种 mRNA 提取方法, 目前酵母菌 mRNA 提取方法较少, 离心柱纯化法虽简化了操作流程, 但存在柱结合容量限制、易堵塞等弊端, 提取效率容易受影响[20–21]。相较与离心柱法, 生物磁珠法因比表面积大、核酸结合效率高、操作简便等优点, 克服了柱结合容量限制和易堵塞的问题, 成为新一代核酸提取的有效工具[20]。朱青等[22]将全自动免疫磁珠纯化法应用于大米、小麦制品、花生制品中黄曲霉毒素 B_1 的检测, 结果表明效率更高、成本更低, 进一步印证了磁珠纯化法在食品检测领域的应用潜力。

然而, 现有研究多集中于提取环节本身, 缺乏将高效提取与下游定量检测进行系统整合; 同时, 商品化磁珠成本较高, 且针对酵母菌的特异性 RT-qPCR 检测靶标仍有待拓展。本研究的二氧化硅羧基磁珠为本课题组前期自主研发的磁性纳米材料, 具有粒径均一(0.2~0.3 μm)、羧基密度高、分散性良好等优点[23–24]。以此羧基磁珠为链霉亲和素偶联及 Oligo(dT)的固相载体, 利用真核生物 mRNA 3’末端的标志性 poly(A)尾结构[25–26], 通过与表面修饰 Oligo(dT)的磁珠特异性结合, 实现 mRNA 与杂质的快速分离, 获取高质量 mRNA。在此基础上, 本研究进一步以几丁质合成酶基因 2 (chitin synthase 2, *CHS2*)为靶标, 设计特异性引物, 建立高特异性、高灵敏度的 RT-qPCR 检测方法, 为食品生产过程中酵母菌的实时监控、污染溯源提供了新方法。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

本研究所用菌株中, 酿酒酵母菌株及用于特异性验证的其余 2 种酵母菌、2 种细菌和 2 种霉菌则购自中国工业微生物菌株保藏管理中心。表 1 为本研究所用菌种类别。

Trizol(纯度≥99%, 北京普利莱基因技术有限公司); NaCl、Tris、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,

EDTA)、2-吗啉乙磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES]、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、无水乙醇、异丙醇(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 50×TAE Buffer(分子生物学级, 上海碧云天生物技术股份有限公司); 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC]、N-羟基琥珀酰亚胺、焦碳酸二乙酯、琼脂粉、RNase-free ddH_2O(分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 11123ES60 反转录试剂盒、11188ES08 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒(翌圣生物科技股份有限公司); Oligo(dT)、*CHS2*-F/R 引物序列(上海生工生物工程股份有限公司); 二氧化硅羧基磁珠(质量浓度 10 mg/mL, 粒径 0.2~0.3 μm, 自主研发); 2×BW 缓冲液(自配)。

表 1 菌种列表
Table 1 List of strains

菌种类型	菌种	菌株编号
酵母菌	酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)	CICC 1270
	巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)	CICC 1958
	路德类酵母(*Saccharomycodes ludwigii*)	CICC 32322
细菌	大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)	CICC 10003
	金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)	CICC 10001
霉菌	黑曲霉(*Aspergillus niger*)	CICC 40048
	淀粉酶链霉菌(*Streptomyces diastaticus*)	CICC 24766

1.2 仪器与设备

CR22G 低温高速离心机(Hitachi 日立科学仪器有限公司); Eppendorf D30 超微量分光光度(艾本德中国有限公司); SYS-I 实验室超纯水机(成都渗源科技有限公司); DHG-9013A 实验室小型烘箱(上海一恒科学仪器有限公司); FQD-96X 荧光定量聚合酶链反应检测系统(杭州博日科技股份有限公司); Bio-Rad Gel Doc XR+凝胶成像分析系统(上海伯乐生命医学产品有限公司)。

1.3 实验方法

本研究选取酵母菌中酿酒酵母为标准菌株进行 mRNA 提取及检测方法的研究。

1.3.1 酵母菌 mRNA 提取

(1)磁珠连接链霉亲和素并连接生物素化 DNA。取 10 mg/mL 羧基磁珠 250 μL(磁珠 2.5 mg), 磁分离。加入 900 μL 活化剂 0.05 mol/L EDC (pH=6)和 200 μL 50 mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺, 室温混匀下活化 1.5 h。在活化后的磁珠中加入 500 μL 链霉亲和素(1 mg/mL), 振荡反应 2 h, 静置 1 h, 磁分离弃上清。用 500 μL 2×BW 缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L NaCl]悬浮磁珠, 终质量浓度为 5 μg/μL。加入 500 μL 生物素化的 Oligo(dT) DNA 水溶液, 室温下轻轻旋转混合 30 min, 磁分离, 用 1×BW 缓冲液/0.1%焦碳酸二乙酯水清洗 2~3 次, 得到链霉亲和素-生物素化 DNA 磁珠。由于制备过程中存在转移损失, 后续实验均以初始羧基磁珠投料量为基准进行标准化使用, 其理论质量浓度相当于初始的 10 mg/mL。

(2)裂解。酿酒酵母培养基选用马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 30 ℃、150 r/min 振荡培养 3~5 d, 形成菌丝球。取 2 mL 菌液, 12000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 取沉淀; 沉淀加入 1 mL Trizol 溶液, 盖紧管盖, 激烈振荡 30 s, 室温静置 5 min; 4 ℃ 12000 r/min 离心 10 min, 于冰上吸取上清转移至另一干净的离心管中(切忌不能吸出白色的中间层)。

(3)磁吸附。物理分离 mRNA。向上清液中加入等体积的异丙醇, 并取适量链霉亲和素-生物素化 DNA 磁珠加入其中, 上下颠倒离心管充分混匀后, 冰上静置, 磁分离弃上清。

(4)清洗。加入 1 mL 75%乙醇, 轻轻上下颠倒洗涤, 磁分离, 此步骤重复 2 次。

(5) mRNA 洗脱。弃乙醇, 磁珠干燥 10 min, 加入 50 μL RNase-free ddH_2O, 轻柔吸吹混匀; 孵育 2 min, 洗脱收集上清液(含 mRNA)。

(6)优化磁珠用量、磁吸附时间等, 探索最佳酵母菌 mRNA 提取方法。

1.3.2 mRNA 质量检测

(1)超微分光光度计检测。分别取酵母 mRNA 产物 1 μL 样品进行纯度和浓度的检测。

(2)琼脂糖凝胶电泳检测。根据电泳图初步判断提取的完整性及效率。

1.3.3 建立 qRT-PCR 检测方法

为评估所提取酵母菌 mRNA 的完整性及功能性, 建立高特异性、高灵敏度的 RT-qPCR 检测方法。通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)查找 *CHS2* 核酸序列, 并设计特异性引物(表 2), 对提取的 mRNA 进行反转录(表 3), 产物于–80 ℃保存; 并进行荧光定量 PCR 扩增(表 4)(反应条件: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 15 s, 55 ℃退火 20 s, 采集荧光信号, 共 40 个循环)。

表 2 引物序列
Table 2 List of the primers

	引物序列(5'-3')
CHS2-F	CCAGTTGCTCCGAACAGGTATGC
CHS2-R	TTGCTGGGGTGATAGATGGTAGGG

表 3 反转录体系
Table 3 Reverse transcription system

步骤	组分	使用量	反应程序
步骤一	RNase-free H_2O	至 10 μL	42 ℃孵育 2 min
	5×gDNA digester Buffer	2 μL	
	gDNA digester	1 μL	
	mRNA	1~500 ng	
步骤二	步骤一的反应液	10 μL	25 ℃ 5 min, 42 ℃ 30 min, 85 ℃ 5 min
	2×Hifair® II SuperMix plus	10 μL	

表 4　荧光定量 PCR 扩增体系
Table 4　Real-time quantitative PCR amplification system

组分	体积/μL	终浓度
预混液	10	1x
正向引物(10 μmol/L)	0.5	0.25 μmol/L
反向引物(10μmol/L)	0.5	0.25 μmol/L
模板 cDNA(稀释 10 倍)	适量	-
无菌超纯水	至 20 μL	-

注: 互补脱氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA); 1x 表示 1 倍浓度; -表示此处无固定浓度值; cDNA 加入体积可根据实际浓度调整。

1.3.4　提取 mRNA 与总 RNA 的反转录效率比较

为评估本方法提取的 mRNA 在反转录效率上的优势, 进行反应效率对比实验。从 2×10^7 cfu/mL 酿酒酵母菌液(2 mL)中分别提取 mRNA 及总 RNA, 均使用 50 μL 的 RNase-free ddH_2O 洗脱。分别取 1 μL 的 mRNA 溶液和 1 μL 的总 RNA 溶液, 加入各自的反转录体系即可。实验重复 3 次以上, 比较两组 cDNA 的循环阈值(cycle threshold, CT)差异:

(1)实验组。使用本研究构建的链霉亲和素磁珠 SM-Oligo(dT)法提取 mRNA。

(2)对照组。使用传统 Trizol 法提取总 RNA。

1.3.5　检测方法的特异性、灵敏度测定

(1)特异性。按照建立的方法对表 1 菌种进行 RT-qPCR 特异性验证。

(2)灵敏度。通过菌液梯度稀释法构建 mRNA 浓度与检测信号的量化验证, 进行 RT-qPCR 灵敏度验证。

1.4　日间精密度实验

通过连续 3 d 对同一样本(2×10^7 cfu/mL 酿酒酵母菌液 2 mL)进行独立重复实验(每天 3 次, n=3)进行评估, 结果以均值±标准偏差及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示。

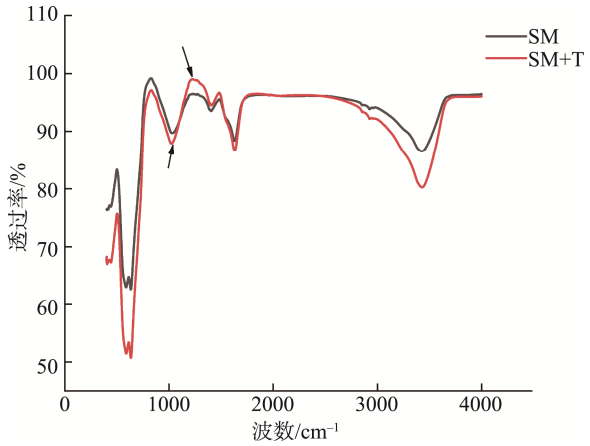
1.5　数据处理

本研究所有定量实验均设置 3 次独立重复(n=3)。采用 SPSS Statistics 23.0 进行统计学分析, 使用 Origin 2018 进行绘制及非线性拟合。多组间比较前, 采用 Levene 检验进行方差齐性检验, 若 P>0.05 则认为各组方差齐性。采用单因素方差分析进行差异检验, 采用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)法进行多重比较, 以不同字母标注组间差异显著性(P<0.05)。两组间比较采用独立样本 t 检验, 以 P<0.05 为差异统计, P<0.01 为差异显著, P<0.001 为差异极显著, 图中误差棒表示标准误差, 柱上不同小写字母表示组间差异显著(P<0.05), *表示与对照组相比的显著性水平。

2　结果与分析

2.1　制备生物素化的链霉亲和磁珠

傅里叶红外光谱能通过测量样品在红外光下的吸收, 分析分子振动模式, 推断出样品中的化学键和官能团[27]。Oligo(dT)是由脱氧胸腺嘧啶核苷酸组成的寡核苷酸链, 其对应的吸收峰可能在 1240 cm^{-1}(不对称 PO_2 伸缩)和 1080 cm^{-1}(对称 PO_2 伸缩)[28–29]。本研究对连接前后的磁珠进行了傅里叶变换红外光谱表征: 与未连接的链霉亲和素磁珠(SM)相比, 连接生物素化 Oligo(dT)后的复合物(SM+T)在 1240 cm^{-1}(磷酸二酯键的不对称 PO_2 伸缩振动)和 1080 cm^{-1}(对称 PO_2 伸缩振动)处出现了明显的吸收峰位移(图 1)。这种吸收峰发生的位移源于 Oligo(dT)核苷酸链中磷酸骨架与磁珠表面官能团偶联后, 引起的局部化学环境改变与电子云密度重排。这表明, 生物素化的 Oligo(dT)已成功固载于链霉亲和素磁珠表面。



注: 箭头所指分别为 1240 cm^{-1} 和 1080 cm^{-1} 处吸收峰。
图 1　链霉亲和磁珠连接 Oligo(dT)前后的傅里叶红外光谱图
Fig.1　Fourier transform infrared spectroscopy spectra of streptavidin magnetic beads and beads conjugated with Oligo(dT)

2.2　磁珠法酵母菌 mRNA 提取优化

2.2.1　优化磁珠用量

为提高磁珠的吸附率, 在其他条件不变, 对磁珠用量梯度设置为 10、20、30、40、50、60、80、100、120、140 μL, 在菌液浓度为 2×10^7 cfu/mL 的条件下, 本研究对磁珠用量进行了优化。不同磁珠用量对 mRNA 得率具有统计学意义: 经 Levene(采用 SPSS Statistics 23.0)检验, 各组方差齐性(P=0.386), 因此采用单因素方差分析进行组间比较(LSD 事后检验), 随着磁珠用量从 10 μL 增加至 50 μL, mRNA 得率呈显著上升趋势(P<0.05); 当磁珠用量达到 60~140 μL 各组之间无显著差异(P>0.05)。在磁珠用量为 10 μL 时, mRNA 提取水平最低, 这是因为磁珠用量过少, 其提供的总表面积不足以完全吸附裂解液中的所有 mRNA

分子，导致部分 mRNA 游离于体系外，导致提取效率低。在 20~50 μL 磁珠量下，随着磁珠用量的增多，提取 mRNA 的效率提升，在磁珠用量为 60 μL 时，拟合曲线达到峰值，磁珠用量继续增大(≥80 μL)，提取 mRNA 的浓度没有变化，得率非线性拟合变化符合方程 Y=5.8549–7.17509×0.96092X (r^2=0.98639)(图 2)。此现象符合磁珠-核酸结合的动力学特征：在低浓度下，增加磁珠量可提高 mRNA 的结合效率，在 60 μL 磁珠下，生物素化的链霉亲和磁珠对 mRNA 的结合达到饱和阈值。因此，本研究选择 60 μL 磁珠用量为最佳。

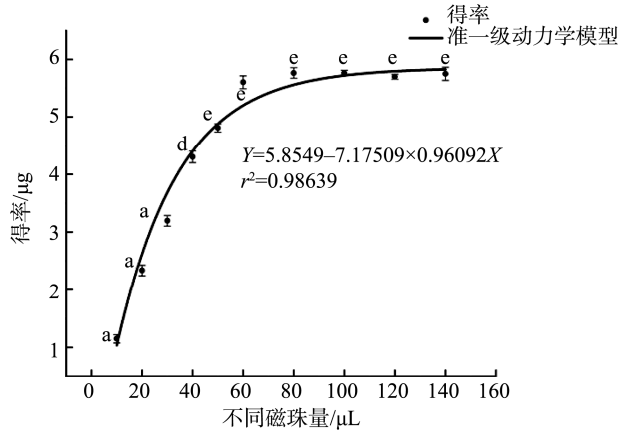


图 2 链霉亲和素-生物素化磁珠用量对 mRNA 提取得率的影响(n=3)

Fig.2 Effects of streptavidin biotinylated magnetic bead on mRNA extraction yield (n=3)

2.2.2 优化磁吸附时间

在优化磁珠用量下，本研究进一步对磁珠于 mRNA 的吸附时间差异对效率的影响。使用 60 μL 的最佳磁珠用量，对 2×10^7 cfu/mL 的酿酒酵母进行吸附时间优化(1、2、3、4、5、6、7 min)。结果如图 3 所示，1~5 min 的吸附下，mRNA 的提取浓度随着吸附时间的增加呈现递增趋势，在 5 min 时达到峰值；当吸附时间延长到 6~7 min 时吸附浓度未见显著提升。因此，本研究选择 5 min 为最佳结合时间。

2.3 酵母菌 mRNA 提取验证

2.3.1 微量样本的提取分析

为验证优化方法对微量样本的提取适用性，选择浓度 2×10^7(对照组 CK)、2×10^6、2×10^5、2×10^4、2×10^3 cfu/mL 菌液进行梯度提取，超微量分光光度计对产物进行浓度与纯度检测。采用 SPSS Statistics 23.0 进行数据分析，不同浓度酵母菌的 mRNA 得率差异具有统计学意义(F=64.143，P<0.001)，采用 LSD 事后检验进行多重比较，mRNA 得率均随着浓度梯度变化而显著变化，低浓度 2×10^3 cfu/mL 菌液能够提取 2.13 μg mRNA。超微分光光度计分析 A_{260}/A_{230} 比值均在 1.8~2.0 之间，提取的 mRNA 纯度符合后续分子生物学要求(图 4)。这说明，本研究方法适用于低浓度微量样本的 mRNA 提取。

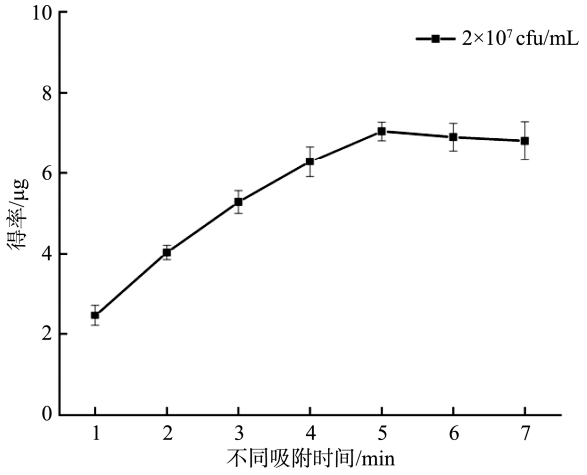


图 3 磁珠吸附时间对提取效率的影响(n=3)

Fig.3 Effects of magnetic bead adsorption time on mRNA extraction efficiency (n=3)

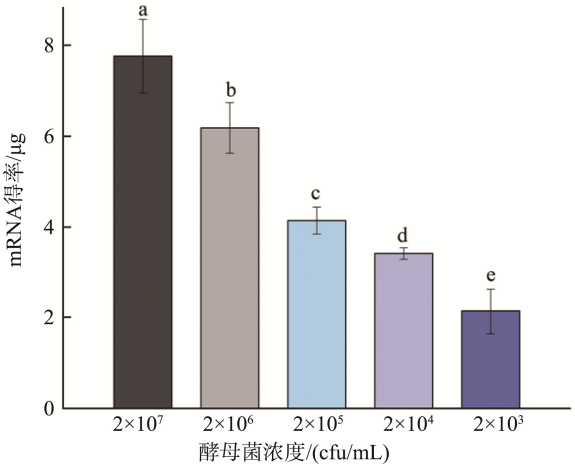


图 4 不同酵母菌浓度的 mRNA 提取效率(n=3)

Fig.4 mRNA extraction efficiency under different yeast concentrations (n=3)

2.3.2 不同酵母菌 mRNA 提取分析

选取浓度均为 2×10^7 cfu/mL 的 3 种不同酵母菌进行提取分析，超微量分光光度计对产物进行浓度与纯度检测(每种酵母菌进行了 3 次重复验证)。如表 5 所示，本研究对 3 种不同种属的酵母菌都能够有效提取 mRNA，纯度较好，所有样本的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.82~2.00 之间，表明蛋白质污染水平较低；A_{260}/A_{230} 比值介于 1.65~1.86 之间，显示样品中盐类或有机溶剂等小分子杂质得到有效去除，能够满足后续酵母菌检测及分子生物学实验要求。

在真核生物(包括酿酒酵母)中，成熟 mRNA 通常会含有多聚腺苷酸[poly(A)]尾[20,22]。为评估 mRNA 样品的完整性，取 5 μL 上述 3 种不同酵母菌 mRNA 产物，1%琼脂糖凝胶电泳鉴定不同酵母菌 mRNA。电泳结果显示(图 5)，在高

分子量区均可见连续分布的拖尾片状条带, 此为真核生物 mRNA 的典型电泳形貌。该区域信号较强、分布均匀, 且主体集中于高分子区域(1.5 kb 的区域), 表明成功富集到的 mRNA 片段完整, 降解程度较低。

表 5　不同酵母菌 mRNA 提取率的测定

Table 5　Determination of mRNA extraction rates of different yeasts

酵母菌	mRNA 质量浓度/(μg/mL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
CICC 1270	147.10	1.91	1.80
	150.00	1.90	1.80
	140.60	1.89	1.78
CICC 1958	153.20	1.98	1.78
	160.80	1.82	1.65
	163.08	1.98	1.79
CICC 32322	113.50	1.92	1.91
	121.80	1.89	1.83
	98.76	2.00	1.86

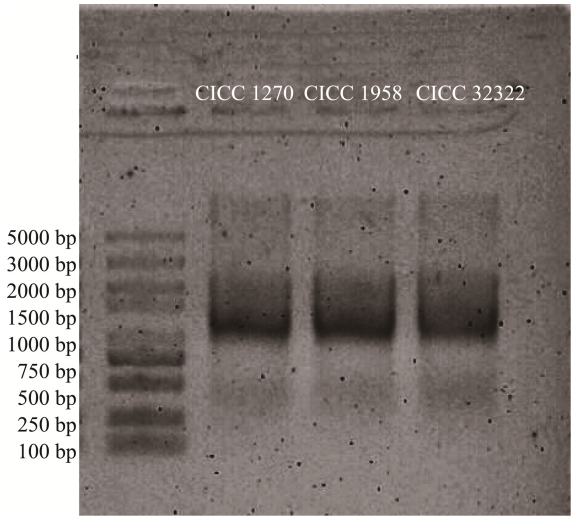


图 5　mRNA 琼脂糖凝胶(1%)电泳图

Fig.5　1% Agarose gel electrophoresis of mRNA

2.4　建立酵母菌检测方法

2.4.1　酵母菌 RT-qPCR 检测方法

将所提取 2×10^7 cfu/mL 菌液的 mRNA 反转录为 cDNA 作为检测对象, 建立一种酵母菌特异性分子生物学检测方法。以酵母菌细胞壁特有的核心成分几丁质为检测对象, 其合成受 *CHS2* 基因调控, 由于 *CHS2* 基因在酵母菌中高度保守, 故可作为理想的检测靶标[30–31]。以反转录 cDNA 为模板, 利用设计的 *CHS2* 特异性引物进行 RT-qPCR 扩增。图 6A 扩增呈现典型的 S 形平滑曲线, 具有清晰的指数增长期与平台期, 对数期界限清晰, 平台期荧光曲线稳定, 这表明反应扩增符合动力学特征, 扩增效率良好。图 6B 熔解曲线显示, 扩增产物均呈单一、尖锐的溶解峰, 峰型对称, 无非特异性扩增峰或引物二聚体峰出现, 表明扩增产物高度一致, 无非特异性产物, 空白对照无溶解峰出现。综上可知, 本研究所用 *CHS2* 引物在 RT-qPCR 分子检测中有良好的反应性能, 适用于后续酵母菌的定量检测。

2.4.2　mRNA 的效能检测

总 RNA 中 95%以上是核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)和转运 RNA (transfer RNA, tRNA), 在反转录时, 这些非编码 RNA 会与 mRNA 竞争有限的反转录酶、dNTPs 和引物等, 导致目标 cDNA 的合成效率降低。市售试剂盒中常见为总 RNA 提取试剂盒, 对比 3 种酵母菌(2×10^7 cfu/mL 菌液)在两种市售竞品(总 RNA 提取试剂盒)和本方法(提取 mRNA)的提取效果, 如表 6 所示, 酵母菌 CICC 1270、CICC 1958、CICC 32322 在浓度上高于竞品的提取效率, 纯度也略优于市售竞品(表 6)。

为验证纯化后的提取产物能否提高检测效率, 以 2×10^7 cfu/mL 酵母菌液为样本, 比较本方法提取的 mRNA 反转录生成的 cDNA(以下简称 mRNA-cDNA)与竞品试剂盒提取的总 RNA 反转录生成的 cDNA(以下简称 RNA-cDNA)在 qPCR 中的扩增效能。以 *CHS2* 基因为靶标,

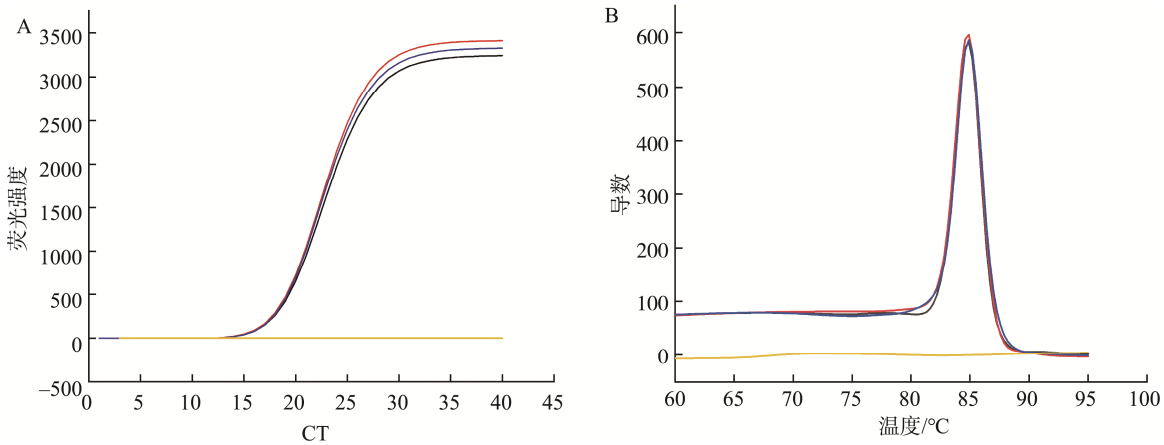


图 6　*CHS2* 引物扩增曲线(A)与熔解曲线(B)

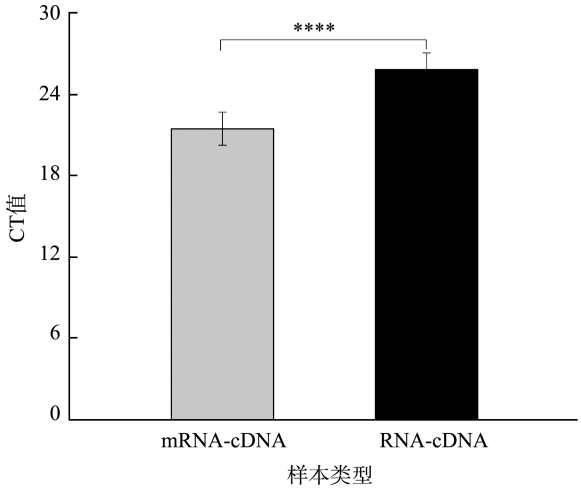
Fig.6　Amplification curve (A) and melting curve (B) of *CHS2* primer

表 6 酵母菌菌液提取效率对比

Table 6 Comparison the extraction efficiency of yeast culture

菌种类型	方法	质量浓度/(μg/mL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
ICC 1270	自研	145.90	1.90	1.8
	竞品 1	82.60	2.18	1.73
	竞品 2	65.41	2.07	1.61
CICC 1958	自研	159.03	1.92	1.74
	竞品 1	97.32	1.92	1.74
	竞品 2	78.05	2.44	1.86
CICC 32322	自研	111.35	1.93	1.86
	竞品 1	94.14	1.80	1.52
	竞品 2	88.23	1.77	1.65

比较两组 cDNA 的 CT 差异，mRNA-cDNA 的平均 CT (21.50±1.21) 显著低于总 RNA-cDNA 组平均 CT (25.80±1.24) (P<0.0001)，ΔCT=4.3(图 7)。在等量菌液(以 CFU 计)前提下，与总 RNA-cDNA 组相比，本方法获取模板反转录生成 cDNA 模板的效率显著更高。这表明，通过纯化 mRNA 获取的 cDNA 模版能够有效提高 qPCR 检测效能。



注: ****表示差异极高显著, P<0.0001。

图 7 mRNA-cDNA 与 RNA-cDNA 在 qPCR 中灵敏度比较(n=3)

Fig.7 Comparison of qPCR sensitivity betweenmRNA-cDNA and total RNA-cDNA (n=3)

2.4.3 RT-qPCR 检测灵敏性

为验证本研究 RT-qPCR 酵母菌检测方法的灵敏性，通过梯度稀释法检测不同模板浓度下的扩增曲线特征。将酿酒酵母菌液按 10 倍依次稀释(2×10^7、2×10^6、2×10^5、2×10^4、2×10^3 cfu/mL)，以此进行检测灵敏性验证。结果如图 8A，所有浓度梯度的扩增曲线都是典型 S 型平滑曲线，且随着模板浓度的降低，S 型曲线整体向右移，CT 也随之增大。熔解曲线显示，不同浓度梯度下，扩增产物均呈现单一、尖锐的溶解峰，无非特异性扩增峰或引物二聚体峰出现，表明反应特异性高(图 8B)。

以各稀释梯度下的菌液为样本，菌液浓度对数[Lg(cfu/mL)]与 CT 进行线性回归分析，在 2×10^3~2×10^7 cfu/mL 的菌液梯度下，CT 符合与线性方程 Y=–1.69X+33.412 (r^2=0.9966)(图 9)，可实现酵母菌液中的目标检出。这表明构建的 RT-qPCR 分子生物学检测酵母菌方法能够满足酵母菌高灵敏度检测。

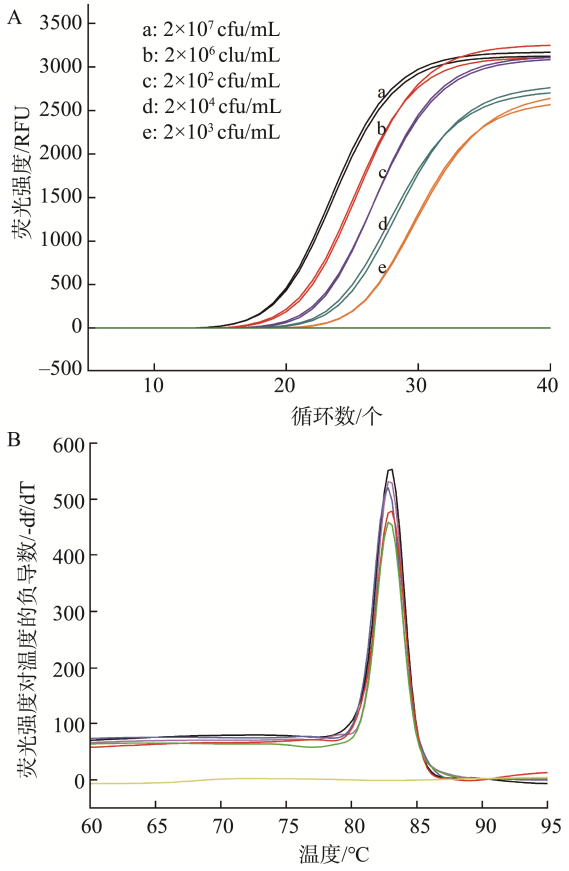


图 8 不同浓度酵母菌液的 RT-qPCR 扩增曲线(A)与熔解曲线(B)

Fig.8 Amplification curves (A) and melting curves (B) of RT-qPCR for yeasts at different concentrations

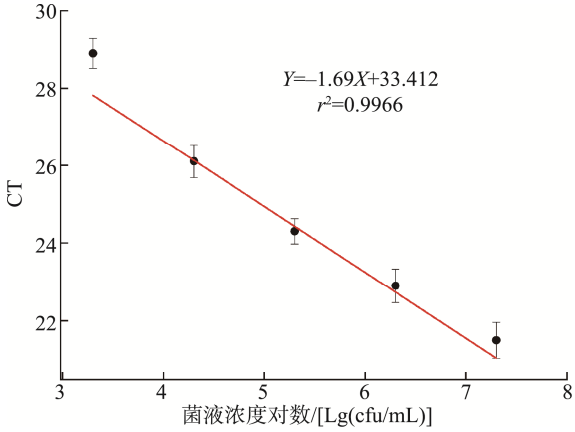


图 9 梯度菌液模板的 RT-qPCR 标准曲线(n=3)

Fig.9 RT-qPCR standard curve of gradient yeast template (n=3)

2.4.4　特异性验证 RT-qPCR 检测法

对常见的 3 种酵母菌、2 种细菌、2 种霉菌进行检测方法特异性验证。如表 7 所示, 3 种酵母菌都能正确通过 CT 反应其检测产物, 而 2 种细菌、2 种霉菌等非酵母属模板均无扩增信号, 不能通过本研究检测到目标分子的检测阈值, 且在扩增范围内未出现 S 型扩增曲线, 这表明 *CHS2* 为检测目标的酵母菌 RT-qPCR 检测法能够实现酵母菌特异性检测。

表 7　特异性验证 RT-qPCR 检测法
Table 7　Verification specificity of RT-qPCR detection method

菌属	菌株	CT			CT 平均值	标准偏差	CV/%
		重复实验 1	重复实验 2	重复实验 3			
酵母	酿酒酵母	21.86	20.98	21.69	21.51	0.47	2.17
	巴斯德毕赤酵母	23.68	23.46	23.77	23.64	0.16	0.68
	巴斯德毕赤酵母	25.52	25.75	25.98	25.75	0.23	0.89
细菌	大肠埃希氏菌	/	/	/	/	/	/
	金黄色葡萄球菌	/	/	/	/	/	/
霉菌	黑曲霉	/	/	/	/	/	/
	淀粉酶链霉菌	/	/	/	/	/	/

注: 变异系数(coefficient of variation, CV), CV=(标准差/均值)×100%; /表示未检测到。

3　讨论与结论

本研究建立了一种基于链霉亲和素磁珠-Oligo(dT)的酵母菌 mRNA 提取技术, 并结合 *CHS2* 基因靶标开发了基于 RT-qPCR 的酵母菌特异性检测方法。通过自主研发的链霉亲和磁珠为固相载体, 特异性富集带 poly(A)的 mRNA, 有效避免了总 RNA 中大量 rRNA、tRNA 在反转录过程中与 mRNA 的竞争性抑制, 从而提升了检测的灵敏性, 这一思路与 QU 等[32]、DEWAR 等[33]中 Oligo(dT)亲和层析原理一致。

CAMILLE[34]系统比较了磁珠法、离心柱法、有机溶剂法等对 mRNA 的提取效果, 其中商品化磁珠系统 Qiasymphony 虽可实现高通量自动化, 但在 mRNA 完整性保护方面表现不佳(完整性仅 52%), 且存在磁珠残留问题。这表明, 持续优化磁珠表面修饰[如 Oligo(dT)的特异性捕获]和裂解条件对维持 mRNA 完整性至关重要。朱青等[22]比较了全自动免疫磁珠纯化法与免疫亲和柱法对食品中黄曲霉毒素 B_1 的检测效果, 免疫磁珠法仅需 40 min 即可自动完成 20 批样品处理, 几乎无废液产生, 而免疫亲和柱法处理相同数量样品需 3~4 h, 产生约 1000 mL 废液, 成本可降低约 50%。这表明磁珠法在检测效率、成本控制方面具有显著优势, 与本研究的优化目标一致。与现有的技术相比, 本研究展现出一定的优势, 基于磁珠的固相载体, 同样具备自动化的潜力。本研究采用链霉亲和素磁珠-Oligo(dT)策略, 通过特异性富集 poly(A)的 mRNA, 所提取的 mRNA 在浓度、纯度、完整性上均优市售竞品 RNA 磁珠法提取试剂盒, 实现不同酵母浓度均可获得较高产量的 mRNA, 且能实现低浓度的微量样本的提取(2×10^3 cfu/mL 酵母样本中仍可获得 2.13 μg mRNA, 且 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间)。本研究虽未直接测定磁珠的动态结合容量, 但提取效率随磁珠用量增加而提升, 这表明自研磁珠的比表面积和结合位点密度对 mRNA 捕获具有重要影响。

此外, 本研究构建了 RT-qPCR 酵母菌特异性检测方法, 且灵敏度高, 检测效能高于总 RNA 传统检测, 可实现同时多酵母菌样本检测, 本方法对酵母菌检测的线性范围在 2×10^7~2×10^3 cfu/mL, 线性方程为 $Y=-1.69X+33.412$, 相关系数 $r=0.9966$, 这为酵母菌的定量检测提供了一种新的分子生物学检测组合方法。

但本研究仍然存在一定的局限性, 首先依赖 mRNA 的 poly(A)尾结构, 因此不适用于原核生物[无 poly(A)尾]及部分真核非编码 RNA 的提取, 应用范围受限。其次, 链霉亲和素磁珠成本较高, 相较市售试剂盒, 本研究每样本的成本约 6~7 元, 成本能达到市售试剂盒的一半, 仍存在一定的应用优势, 但在大规模高通量应用中仍需进一步优化。目前本研究仍基于单管模式, 高通量模式需要进一步探究, DEWAR 等[34]表明新型 Oligo(dT)材料可在短时间下实现高动态结合容量, 且可重复使用多达 250 次循环而未见容量下降, 这为本研究的磁珠回收与循环使用提供了可行方向。

未来将从成本、通量、临床验证等方向进一步研究, 以推动本研究的应用。将探索价格更低的链霉亲和素磁珠载体, 以降低单次检测成本; 同时, 参考 DEWAR 等[34]的多循环策略, 研究磁珠的回收与再生工艺, 以期进一步降低成本。将优化提取流程, 适配自动化核酸提取仪, 实现高通量操作, 以满足大规模样本筛查的需求。本研究未包

含与酿酒酵母同属的近缘非目标酵母[如贝酵母(*Saccharomyces bayanus*)]，也未在复杂食品基质中进行验证，未来实际食品样本(如酸奶、饮料、发酵食品)加标回收实验的开展，可以进一步评估本方法在复杂基质中的稳定性和抗干扰能力。通过这些研究，本研究有望在食品安全监测中实现更广泛的实际应用。

综上，本研究提供了一种优化的磁珠 Oligo(dT) mRNA 富集流程，可在实验室条件下用于低浓度酵母样品的快速检测，能够精准检测酵母菌，其特异性保障了检测结果的准确性，以高特异性和高灵敏度为食品、工业中酵母菌的检测提供可靠的技术手段。

参考文献

[1] 谢心瑶, 刘晨, 柴迎楠, 等. 酵母菌高密度发酵的研究进展[J]. 中国饲料, 2025(19): 21–28, 39.
XIE XY, LIU C, CHAI YN, *et al*. Research progress of yeast high-density fermentation [J]. China Feed, 2025(19): 21–28, 39.

[2] BUEHLER AJ, MARTIN NH, BOOR KJ, *et al*. Evaluation of biopreservatives in Greek yogurt to inhibit yeast and mold spoilage and development of a yogurt spoilage predictive model [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(12): 10759–10774.

[3] 牟志勇, 杨昳津, 王光强, 等. 酵母菌的益生功能及在食品中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 309–318.
MOU ZY, YANG YJ, WANG GQ, *et al*. Beneficial effects of yeasts and applications in foods [J]. Food Science, 2021, 42(15): 309–318.

[4] NIELSEN J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast advances through metabolic engineering [J]. Bioengineered, 2013, 4(4): 207–211.

[5] 王欢, 陈素明, 李霞, 等. 侵袭性酵母菌感染的临床特征及抗生素敏感性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49(10): 1095–1100.
WANG H, CHEN SM, LI X, *et al*. Clinical characteristics and antibiotic sensitivity analysis of the invasive yeast infection [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2024, 49(10): 1095–1100.

[6] 曲连海, 许冉冉, 赵宇, 等. 快速测试片法在粮食制品霉菌和酵母菌检测中的应用研究[J]. 食品安全导刊, 2025(12): 77–80.
QU LH, XU RR, ZHAO Y, *et al*. Application of the count plate method in the detection of yeast and mold of grain products [J]. Journal Food Safety Guide, 2025(12): 77–80.

[7] WASITO H, HERMANN G, FITZ V, *et al*. Yeast-based reference materials for quantitative metabolomics [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414(15): 4359–4368.

[8] 胡梦灵. 基于qPCR的低浓度乳杆菌和双歧杆菌定量检测方法研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2025.
HU ML. Research on quantitative detection methods for low-concentration *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* based on qPCR [D]. Yangzhou: YangZhou University, 2025.

[9] 孙皖如, 马玉帅, 许向华, 等. 食源性霉菌和酵母菌检测技术进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2019, 35(3): 48–52.
SUN WR, MA YS, XU XH, *et al*. Research advances in detection technology for foodborne molds and yeasts [J]. Journal of Hebei North University (Natural Science Edition), 2019, 35(3): 48–52.

[10] MONOD M, BONTEMS O, ZAUGG C, *et al*. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses [J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55(9): 1211–1216.

[11] LIU D, COLOE S, BAIRD R, *et al*. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi [J]. Journal of Medical Microbiology, 2000, 49(6): 493–497.

[12] DHARMARAJ K, MREEALL AM, PATTEMORE JA, *et al*. A new real-time PCR assay for detecting fungi in genus ceratocystis [J]. Plant Disease Journal, 2022, 106(2): 661–668.

[13] WEI YT, LIN YX, ZHAO JY, *et al*. Development of a TaqMan probe-based multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of four clinically important filamentous fungi [J]. Microbiology Spectrum, 2024,12(9): e0063424.

[14] YAWEEN S, HANANO A. Quantitative PCR (qPCR) reveals that the aflatoxin-free pistachio samples can be potentially contaminated with fungal materials [J]. Food Analytical Methods, 2022, 15: 2703–2711.

[15] GILERT W. Origin of life: The RNA world [J]. Nature, 1986, 6055(319): 618.

[16] SUMIYA K, IZUMI H, SAKURAI K, *et al*. Structural analysis of polysaccharide/antisense DNA complexes during cytoplasmic target mRNA hybridization [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2023, 94: 129457.

[17] DENIZ GK, GULSAH K, MOHAMMADIAN F, *et al*. Production of yeast cell wall polysaccharides-*β*-glucan and chitin by using food waste substrates: Biosynthesis, production, extraction, and purification methods [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2025, 24(3): e70161.

[18] VERTA JP, JONES F. mRNA extraction from gill tissue for RNA-sequencing [J]. Bio-protocol, 2020, 10(5): e3539.

[19] HANEUI B, COLLER J. Codon optimality-mediated mRNA degradation: Linking translational elongation to mRNA stability [J]. Molecular Cell, 2022, 82(8): 1467–1476.

[20] ADAMS NM, BORDELON H, WANG KA, *et al*. Comparison of three magnetic bead surface functionalities for RNA extraction and detection [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(11): 6062–6069.

[21] BAI YL, CUI Y, SUO YJ, *et al*. A rapid method for detection of *Salmonella* in milk based on extraction of mRNA using magnetic capture probes and RT-qPCR [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 770.

[22] 朱青, 曹美萍, 任兴发, 等. 全自动免疫磁珠纯化法与免疫亲和柱法对食品中黄曲霉毒素B_1检测结果的影响比对[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 93–99.
ZHU Q, CAO MP, REN XF, *et al*. Effection and comparison of detection results of aflatoxin B_1 in foods by fully automated immunomagnetic bead purification method and immunoaffinity column method [J]. Journal of

Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 93–99.

[23] 王焱, 冯治棋, 左显维, 等. 基于“种子-生长”的液相法制备的 $CoFe_2O_4$ 纳米颗粒及磁性能[J]. 磁性材料及器件, 2024, 55(3): 21–26.
WANG Y, FENG ZQ, ZUO XW, *et al*. Preparation of $CoFe_2O_4$ nanoparticles based on the liquid phase method from “seed-growth” and its magnetic properties [J]. Journal of Magnetic Materials and Devices, 2024, 55(3): 21–26.

[24] 冯治棋, 左显维, 刘一丹, 等. Fe_3O_4@SiO_2@COOH@NTA-Ni的制备及其对生物分子荧光检测的研究[J]. 功能材料, 2020, 51(5): 5111–5117.
FENG ZQ, ZUO XW, LIU YD, *et al*. Preparation of the magenetic nano-assembly structure and its study of fluorescence detection in biomolecules [J]. Journal of Functional Materials, 2020, 51(5): 5111–5117.

[25] PASSMORE LA, COLLER J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23(2): 93–106.

[26] GOTE V, BOLLA PK, KOMMINENI N, *et al*. A comprehensive review of mRNA vaccines [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2700.

[27] 魏王慧, 任逸尘, 刘旺旺, 等. 傅里叶变换红外光谱法测定氧化亚氮中氮氧化物的研究[J]. 低温与特气, 2025, 43(1): 37–40.
WEI WH, REN YC, LIU WW, *et al*. Determination of nitrogen oxides in nitrous oxide by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. Low Temperature and Specialty Gases, 2025, 43(1): 37–40.

[28] SVOBODA M, ROBERT-FROST H, BOSCO G. Internal Oligo(dT) priming introduces systematic bias in bulk and single-cell RNA sequencing count data [J]. NAR Genomics and Bioinformatics, 2022, 4(2): 035.

[29] 谭远志, 张鹏程, 孙艳娜, 等. Oligo(dT)亲和层析介质的载量比较和机制分析[J]. 高校化学工程学报, 2024, 38(2): 243–252.
TAN ZY, ZHANG PC, SUN YN, *et al*. Binding capacity and mechanism analysis of four Oligo(dT) affinity chromatography resins [J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2024, 38(2): 243–252.

[30] LU Y, SONG YY, ZHU J, *et al*. Potential application of CHS and 4CL genes from grape endophytic fungus in production of naringenin and resveratrol and the improvement of polyphenol profiles and flavour of wine [J]. Food Chemistry, 2021, 347: 128972.

[31] 余以刚, 万松华, 胡双芳, 等. 通用型酵母菌实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 215–225.
YU YG, WAN SH, HU SF, *et al*. Establishing a universal fluorescence real-time PCR method for the detection of yeast in food [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 215–225.

[32] QU JX, ADITHYA N, GEORGE WM, *et al*. Quality by design for mRNA platform purification based on continuous oligo-dT chromatography [J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2024, 35(4): 102333.

[33] DEWAR EA, EMILY A. Improved mRNA affinity chromatography binding capacity and throughput using an oligo-dT immobilized electrospun polymer nanofiber adsorbent [J]. Journal of Chromatography A, 2024(1717): 464670.

[34] CAMILLE MALBURT. mRNA extraction from lipid nanoparticles [J]. Journal of Chromatography A, 2024(1714): 464545.

(责任编辑: 蔡世佳　韩晓红)