

论著

产 B 类伏马菌素黑曲霉菌株基因水平鉴定研究

韩小敏,张靖,韩春卉,赵熙,张宏元,江涛,李凤琴

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 建立基于基因水平的产 B 类伏马菌素黑曲霉菌株的鉴定方法。方法 通过聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和反转录-PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 对产 B 类伏马菌素黑曲霉基因簇中 8 个关键基因的 DNA 和 mRNA 提取方法、扩增条件等进行优化,并对其表达产物进行分析。结果 检测的 19 株黑曲霉菌株均携带与 B 类伏马菌素合成相关的 8 个关键基因的 DNA。其中与产毒量相关性较强的基因为 *fum6*、*fum14* 和 *fum19*, 但不同产毒水平黑曲霉菌株中 8 个关键基因的 mRNA 表达量各异。结论 DNA 水平不足以鉴别黑曲霉菌株 B 类伏马菌素的产毒能力,需要结合 mRNA 表达水平综合分析。

关键词:黑曲霉; B 类伏马菌素; 产毒基因; 菌株鉴定; 霉菌毒素; 食品安全

中图分类号: R155; Q7; R379 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)02-0105-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.02.001

Genetic identification of B-type fumonisin-producing *Aspergillus niger*

HAN Xiao-min, ZHANG Jing, HAN Chun-hui, ZHAO Xi, ZHANG Hong-yuan, JIANG Tao, LI Feng-qin

(Key Lab of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To develop a method for identification of B-type fumonisin-producing *Aspergillus niger* at genetic level. **Methods** The DNA and mRNA extraction method, conditions for amplification of eight key genes of B-type fumonisin-producing gene cluster of *Aspergillus niger* by polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription-PCR (RT-PCR) were optimized. The expression products were analyzed. **Results** The DNA of eight key genes related to B-type fumonisin biosynthesis were detected in all 19 strains of *Aspergillus niger*. *fum6*, *fum14*, *fum19* were the most predominant genes in *Aspergillus niger* in association with fumonisin production, but the mRNA expression level of the 8 key genes were different which led to different B-type fumonisin production ability. **Conclusion** B-type and non-B-type fumonisin-producing *Aspergillus niger* could not be distinguished at DNA level. DNA in combination with mRNA expression level was needed to identify B-type fumonisin-producing *Aspergillus niger*.

Key words: *Aspergillus niger*; B-type fumonisin; toxin producing gene; strain identification; mycotoxin; food safety

伏马菌素 (fumonisin) 是 Gelderblom 等^[1] 于 1988 年首次从串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 培养液中发现的一组水溶性真菌毒素。迄今为止,已发现 28 种伏马菌素,分为 A、B、C 和 P 族。其中 B 族伏马菌素中的 FB₁ (fumonisin B₁)、FB₂、FB₃ 是主要毒性成分,对动物有急性毒性及潜在的致癌性,严重危害人类和动物健康^[2-6]。有关 B 族伏马菌素对农作物和食品的污染及对动物毒性的报道已引

起国际社会的关注,使其成为继黄曲霉毒素之后研究的新热点。近二十年来,国内外对 B 族伏马菌素的主要产生菌串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 和再育镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*) 的产生条件、产毒基因、代谢机制、食品中毒素污染状况等进行了全面研究^[7-8],但关于黑曲霉产 B 类伏马菌素的研究我国尚处于起步阶段。

黑曲霉是食品发酵工业的常用菌种,自 1987 年美国食品与药品管理局 (FDA) 将其列入一般认为是安全的菌种 (generally recognized as safe, GRAS) 进行管理以来,已广泛用于淀粉酶、柠檬酸等几十种食品添加剂的生产。然而,2007 年 Frisvad 等^[9]首次从黑曲霉发酵液中检测到 FB₂, 使黑曲霉发酵产品的安全性引起人们的关注。国外研究发现,从葡萄、葡萄干、葡萄醪和咖啡等食

收稿日期:2014-01-03

基金项目:国家自然科学基金(81072307);国家自然科学基金(31301489)

作者简介:韩小敏 女 助理研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: hanxiaomin@cfsa.net.cn

通讯作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

品中分离到的黑曲霉菌株中,分别有 77%、77%、50% 和 76% 可产生 FB_2 [10-13]。2011 年 Frisvad [14] 发现约 83% 的食品工业用黑曲霉菌株(包括国际上常用的黑曲霉菌株 NRRL337、NRRL3112 和 NRRL3122)具有产 FB_2 能力 [14-15]。本实验室前期对国内食品工业用黑曲霉产 FB_2 能力的调查结果表明,30 株黑曲霉中产毒株占 70% (21/30),这与国外研究结果一致 [14-15]。

为确保我国食品工业用黑曲霉菌株的使用安全性,需要建立灵敏、可靠、快速简便的产 B 类伏马菌素黑曲霉菌株鉴定方法,为准确评价黑曲霉的生物安全性提供依据。本研究拟在 DNA 水平、mRNA 表达水平上,建立产 B 类伏马菌素黑曲霉菌株的分子生物学鉴定方法,为筛选安全的食品工业用黑曲霉菌株提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本试验使用 19 株黑曲霉。其中 14 株购自中国科学院微生物研究所:黑曲霉 CGMCC 3.3927、3.877、3.0421、3.0040、3.4627、3.316、3.3150、3.795、3.3147、3.315、3.3287、3.503、3.3289 和 3.4304;4 株购自中国农业微生物菌种保藏管理中心:黑曲霉 ACCC 30557、30134、30159 和 30171;黑曲霉 ATCC 16404 购自美国国家标准菌种保藏中心。所有菌株均在麦麸培养基上经过产毒试验确认,其中 17 株为 FB_2 产毒株,2 株为非产毒株。

1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 扩增仪、自动凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad,紫外分光光度计,离心机,生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),生物安全柜(北京东方照生科技有限公司)。

沙保琼脂培养基、改良 LB 液体培养基均购自美国 BD,马铃薯葡萄糖琼脂培养基(北京三药科技开发公司),DL2000 DNA Ladder(大连 TaKaDa 公司),*Taq* PCR Mastermix(天根生化科技(北京)有限公司),TransStart™ FastPfu DNA Polymerase(北京全式金生物技术有限公司),琼脂糖、Chelex、SDS 均购自美国 AMRESCO,Gel Red 核酸染料(北京艾克美医学科技有限公司),Tween80、NP40 均购自美国 Sigma,RT-PCR 反转录试剂盒(加拿大 Fermentas),DNeasy Plant Mini 试剂盒(美国 QIAGEN),RNase 抑制剂、RNase A 均购自碧云天生物技术公司,焦碳酸二乙酯水(美国 DEPC、Promega),Trizol 试剂

(美国 Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 黑曲霉基因组 DNA 提取

将待鉴定黑曲霉菌株接种于沙保琼脂斜面,(28 ± 1) °C 培养 5~7 d 后,用接种针挑取少许培养物,接种于 4 ml 改良 LB 液体培养基中,(28 ± 1) °C 振荡培养 24 h 后分别用改良 Chelex 法和试剂盒法提取黑曲霉基因组 DNA。改良 Chelex 法:取 1 ml 菌液于 1.5 ml 离心管中,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀部分用 1 ml 无菌蒸馏水洗 1 次,弃上清,沉淀加蒸馏水至总体积为 300 μ l,混匀后加 100 μ l 10% Chelex 溶液,置 95 °C 加热 30 min、冰浴 5 min、10 000 r/min 离心 5 min 后收集上清液,取 1 μ l 作为 PCR 反应扩增模板,剩余上清液于 -80 °C 保存。试剂盒法:取 (28 ± 1) °C 振荡培养 24 h 后的菌悬液,按 DNeasy Plant Mini 试剂盒说明书进行黑曲霉基因组 DNA 的提取。

1.2.2 引物序列

根据 GeneBank 数据及相关文献报道 [16-17],对黑曲霉 B 类伏马菌素生物合成基因簇中 8 个关键基因分别进行扩增,引物序列及扩增片段大小见表 1。

1.2.3 单重 PCR 反应条件

PCR 反应体系:12.5 μ l 2 × *Taq* 聚合酶混合物,上、下游引物各 1 μ l,模板 DNA 1 μ l,用无菌蒸馏水补足至 25 μ l。充分混匀后,进行 PCR 扩增,同时设立无模板 DNA 的阴性对照。PCR 扩增反应条件:预变性 94 °C 3 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,最终 72 °C 延伸 5 min,30 个循环。

1.2.4 多重 PCR 反应条件

将黑曲霉的 8 个产 B 类伏马菌素基因分为 A 和 B 两组,A 组包括 *fum19*、*fum13*、*fum6* 和 *fum8*;B 组包括 *fum1*、*fum7*、*fum14* 和 *fum9*。在优化的单重 PCR 条件基础上,分别采用 *Taq* DNA 聚合酶和 TransStart™ FastPfu DNA Polymerase 对不同引物浓度(0.05、0.1、0.2 μ mol/L)进行优化。

1.2.5 黑曲霉 mRNA 的提取及 RT-PCR 扩增

活化后的黑曲霉接种至 2 ml 改良 LB 培养基中,(28 ± 1) °C、150 r/min 振荡培养 48~72 h 后,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 DEPC 水清洗 2 次,弃上清;将水洗后的菌丝体放入经 DEPC 水处理并用液氮预冷的研钵中,加入 1.0 ml Trizol 试剂,研磨使其充分裂解,此后按 Trizol 试剂盒说明书进行 mRNA 的提取。以总 RNA 为模板、Oligo(dT)18 为引物进行逆转录合成 cDNA,PCR 扩增条件同 1.2.3。

表 1 产 B 类伏马菌素黑曲霉菌株关键基因扩增用引物序列及片段长度

Table 1 Specific primers nucleotide sequences and amplified fragments for B-type fumonisin-producing key genes of *Aspergillus niger*

基因	引物	引物序列	片段大小/bp	参考文献	用途
β -tubulin	Bt-2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	—	[16]	内参
β -tubulin	Bt-2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	—	[16]	内参
<i>fum1</i>	<i>fum1</i> F. 4pl	TGGCGATTGGTCCGTCAGGTCT	452	[17]	产毒基因
<i>fum1</i>	<i>fum1</i> R. 4pl	GCCACCGATGTCCACAAGCGAA	452	[17]	产毒基因
<i>fum6</i>	<i>fum6</i> F. 4pl	GAAATGGGCGGCTCTGGGGAA	374	[17]	产毒基因
<i>fum6</i>	<i>fum6</i> R. 4pl	CGCTCAACCGCTCTCCCGTTTT	374	[17]	产毒基因
<i>fum8</i>	<i>fum8</i> F. 4pl	CCGGGACTTGAAAGCATGGCGT	272	[17]	产毒基因
<i>fum8</i>	<i>fum8</i> R. 4pl	TGACAACCTCTCGTTCGGGCA	272	[17]	产毒基因
<i>fum19</i>	<i>fum19</i> F. 4pl	TAGATGGCGAGTTCGGGTGGCA	479	[17]	产毒基因
<i>fum19</i>	<i>fum19</i> R. 4pl	TTCGGTATCAGCCTCGAGGCCA	479	[17]	产毒基因
<i>fum7</i>	<i>fum7</i> F. 4pl	TACAGACGGCGAACGCTCCAGA	238	[17]	产毒基因
<i>fum7</i>	<i>fum7</i> R. 4pl	GCCTFCAGCAACGCCTCCTGTT	238	[17]	产毒基因
<i>fum9</i>	<i>fum9</i> F. 4pl	AGAACCGCAGACCCCTCACCCT	173	[17]	产毒基因
<i>fum9</i>	<i>fum9</i> R. 4pl	CACGCTCACTGAACGCCACTT	173	[17]	产毒基因
<i>fum13</i>	<i>fum13</i> F. 4pl	TGCGCCAACCTGCCAAGGAACC	168	[17]	产毒基因
<i>fum13</i>	<i>fum13</i> R. 4pl	TGGCGGTGGGTTGTGCAATGG	168	[17]	产毒基因
<i>fum14</i>	<i>fum14</i> F. 4pl	TTTGGGCTGTGTCGGCATGGTC	321	[17]	产毒基因
<i>fum14</i>	<i>fum14</i> R. 4pl	ACGCCGTGTAACCATTCCGCAG	321	[17]	产毒基因

注:—为未进行序列测定

1.2.6 PCR 及 RT-PCR 产物的检测

以 $0.5 \times$ TAE 缓冲液配置 12 g/L 琼脂糖凝胶, 每孔上样 $5 \mu\text{l}$, 同时以 DL2000 DNA Ladder 为分子量对照, 110 V 电泳 20 min, 经 Gel Red 染色后进行凝胶成像并观察、扫描、储存和作电泳结果分析。

2 结果

2.1 改良 Chelex 法和试剂盒法提取 DNA 质量分析

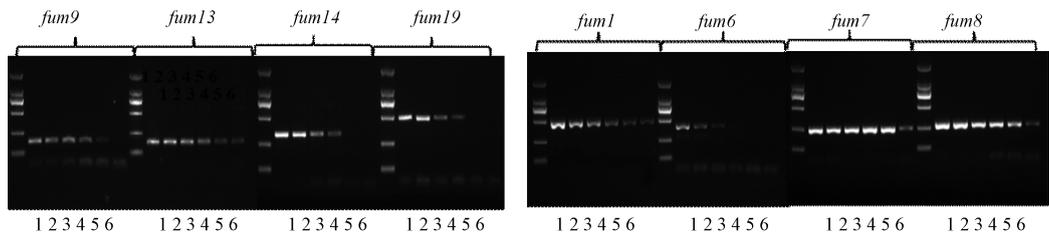
改良 Chelex 法对 19 株黑曲霉 DNA 的提取结果表明, 所提取 DNA 浓度较高, 均在 $150 \sim 250 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 之间, 其中 12 株黑曲霉的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$, 7 株黑曲霉的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} > 1.9$, 提示存在 RNA 污染; 而试剂盒法提取的 19 株黑曲霉 DNA 浓度均在 $1.5 \sim 3.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 之间, 含量虽低, 但 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 均为 1.8,

表明 DNA 纯度较高。

PCR 扩增结果显示, 试剂盒法提取的 DNA 条带清晰、非特异性条带少。而改良 Chelex 法由于缺少纯化步骤, 未将蛋白、色素等杂质除去, 干扰了某些产毒基因的扩增, 这在产毒能力较弱的菌株尤为突出, 从而影响结果的正确判断。因此, 后续研究采用试剂盒法提取黑曲霉的 DNA。

2.2 DNA 模板浓度优化

PCR 反应体系中 DNA 模板浓度的优化结果见图 1。由图 1 可知, 8 个产毒基因反应体系所需 DNA 模板的最低浓度分别为: *fum1*、*fum7*、*fum8* 和 *fum13* 均为 $1 \text{ pg}/\mu\text{l}$, *fum9* 为 $5 \text{ pg}/\mu\text{l}$, *fum14* 和 *fum19* 均为 $10 \text{ pg}/\mu\text{l}$, *fum6* 为 $50 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 。因此为保证 8 个产毒基因均扩增出特异性条带, 反应体系中 DNA 的终浓度应不低于 $50 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 。



注: 1~2 DNA 模板浓度: 0.2、0.1 $\text{ng}/\mu\text{l}$; 3~6 DNA 模板浓度: 50、10、5、1 $\text{pg}/\mu\text{l}$

图 1 黑曲霉产 B 类伏马菌素关键基因 DNA 模板浓度的优化

Figure 1 The optimization of DNA concentration for amplification of B-type fumonisin-producing key genes of *Aspergillus niger*

2.3 引物浓度的优化

PCR 反应体系中引物浓度的优化结果见图 2。由图 2 可知, 引物浓度在 $0.1 \sim 0.05 \mu\text{mol}/\text{L}$ 范围内, *fum6*、*fum8*、*fum14*、*fum1*、*fum7*、*fum9*、*fum19* 七个

产毒基因扩增后均产生单一的特异性条带, 扩增片段大小与文献报道相吻合, 因此后续单基因扩增时这七个基因扩增用引物终浓度范围为 $0.1 \sim 0.05 \mu\text{mol}/\text{L}$; 而 *fum13* 扩增时虽在上述引物浓度范围内

虽然易产生非特异性扩增,但由于非特异性片段与特征条带差别较大,并不影响结果分析,所以 *fum13*

基因扩增用引物浓度范围也为 0.1 ~ 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 。

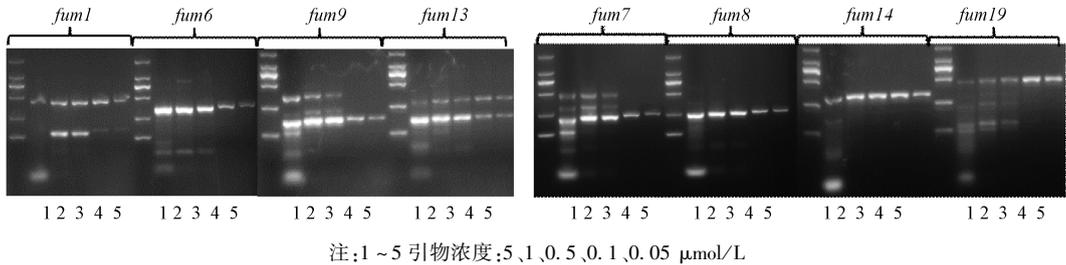


图2 黑曲霉 B 类产伏马菌素关键基因扩增体系中引物浓度优化

Figure 2 The optimization of primer concentration for B-type fumonisin-producing key genes of *Aspergillus niger*

2.4 DNA 聚合酶的优化

利用 2.2 和 2.3 优化的试验条件,分别采用 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ 与 $2 \times \text{TransStart}^{\text{TM}}$ FastPfu DNA Polymerase 对 8 个产毒基因进行扩增,结果见图 3。由图 3 可知,采用 PCR MasterMix 扩增时, *fum1*、*fum13*、*fum19* 均产生非特异性条带;而 TransStartTM FastPfu DNA Polymerase 扩增时 8 个产毒基因多产生单一的特异性条带,仅 *fum9*、*fum13* 在极个别情况下产生非特异性扩增。因此为了最大限度地避免非特异性扩增,后续研究中采用高保真的 DNA 聚合酶。

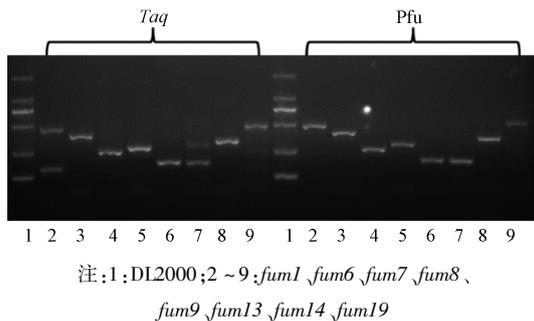


图3 不同 DNA 聚合酶对黑曲霉产 B 类伏马菌素关键基因 PCR 扩增结果的影响

Figure 3 PCR amplification for B-type fumonisin-producing key genes of *Aspergillus niger* using different DNA polymerase

2.5 多重 PCR 条件优化

由图 4 可知,普通的 *Taq* DNA 聚合酶在引物浓度为 0.05 ~ 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 范围内扩增时,虽可扩增出目的条带但强度均较弱,当引物浓度增至 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时, A、B 两组的 4 条特异性条带均被扩增;而引物浓度为 0.0、0.1 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,采用高保真的 Pfu DNA 聚合酶可将 8 个产毒基因全部扩增,且条带亮度一致,优于普通 *Taq* DNA 聚合酶扩增效果。

2.6 食品工业用黑曲霉菌株产 B 类伏马菌素关键基因携带情况

本试验采用特异性引物可分别扩增到黑曲霉菌株产 B 类伏马菌素 8 个产毒基因的目的片段,大小与文献[17]报道一致。通过构建的 8 个重组克隆质粒验证显示,插入片段 DNA 序列均与

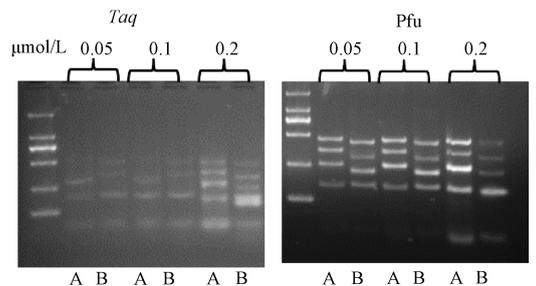


图4 黑曲霉产 B 类伏马菌素关键基因的多重 PCR 条件优化结果

Figure 4 The multiplex PCR optimization for B-type fumonisin-producing key genes of *Aspergillus niger*

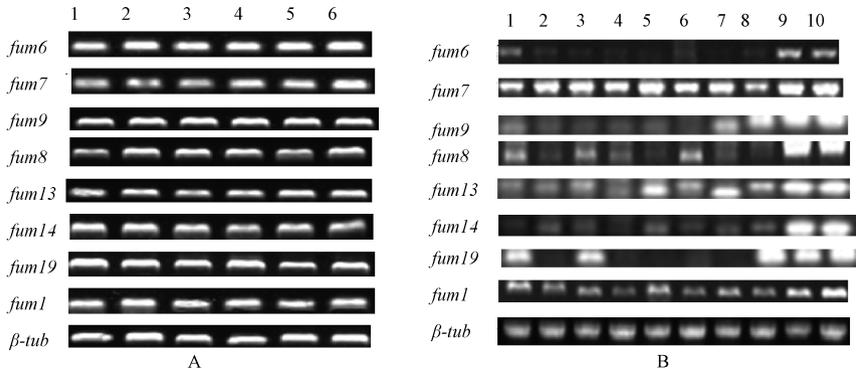
GeneBank 数据库中黑曲霉菌基因组 DNA 序列 GeneBank:AM269971.1 中的 DNA 序列相同,说明本试验成功建立了 B 类伏马菌素 8 个关键基因的 PCR 检测方法。对 19 株前期经产毒试验确证的 B 类伏马菌素的黑曲霉菌株产毒基因携带情况的检测发现,产毒株与非产毒株均携带 8 个产毒基因 *fum1*、*fum6*、*fum7*、*fum8*、*fum9*、*fum13*、*fum14*、*fum19*, 因此仅对 8 个特异性 B 类伏马菌素产毒基因的检测尚不能将黑曲霉 B 类伏马菌素产毒株和非产毒株鉴别开。

2.7 黑曲霉中伏马菌素产毒基因 mRNA 表达量的 RT-PCR 检测

产不同水平 B 类伏马菌素黑曲霉菌株的 8 个产毒基因 mRNA 表达量的 RT-PCR 检测结果见图 5。A 中 6 株高产 B 类伏马菌素黑曲霉菌株产毒基因 mRNA 的表达量均较高,且不同菌株间的 mRNA 表达量无明显差异。而 B 中 10 株黑曲霉中除 CGMCC 3.421(条带 9)和 CGMCC 3.0040(条带 10)为 B 类伏马菌素高产毒株外,其余均为 B 类伏马菌素低产毒株或在本实验室的产毒试验条件下还未检测到毒素的黑曲霉菌株。从图 5 中 B 可知, B 类伏马菌素低产毒株中表达 C-14、C-15 羟基化 P450 氧化还原酶的 *fum6* 基因(8 株检测的黑曲霉中有 7 株黑曲霉)、表达伏马菌素碳骨架(HFB₃/HFB₄)与 TCA 的

酯化的 *fum14* 基因 (8 株检测的黑曲霉中有 7 株黑曲霉)、表达 ABC 转运盒的 *fum19* 基因 (8 株检测的黑曲霉中有 6 株黑曲霉) 的 mRNA 表达量极低, 其余 6 个基因的表达量在不同菌株间的差异并不明显, 由于羟基化 P450 氧化还原酶、HFB₃/HFB₄ 与

TCA 的酯化、ABC 转运盒等是伏马菌素生物合成中不可或缺的关键物质, 因此上述结果提示, 黑曲霉产伏马菌素能力的差异可能与关键产毒基因的 mRNA 表达量相关。



注: A 中 1~6: CGMCC 3. 795、CGMCC 3. 421、ACCC 30159、ACCC 30171、CGMCC 3. 503、ACCC 30134; B 中 1~10: CGMCC 3. 3927、CGMCC 3. 316、ATCC 16404、CGMCC 3. 3150、CGMCC 3. 3147、CGMCC 3. 315、CGMCC 3. 3287、CGMCC 3. 3289、CGMCC 3. 421、CGMCC 3. 0040

图 5 黑曲霉产 B 类伏马菌素关键基因的 RT-PCR 结果

Figure 5 RT-PCR analysis for B-type fumonisin-producing key genes of *Aspergillus niger*

3 讨论

随着对产毒真菌遗传特征研究的深入, 分子生物学鉴定技术已在产毒真菌分类和产毒能力鉴定中展现出良好的应用前景。Herman 等^[18-19]研究发现, 3 株产 B 类伏马菌素黑曲霉 ATCC 1015、ATCC 9029 和 CBS 513. 88 的基因组序列均含有与串珠镰刀菌类似的 B 类伏马菌素生物合成基因簇, 且其中 10 个基因 *fum1*、*fum8*、*fum6*、*fum15*、*fum13*、*fum3*、*fum19*、*fum10*、*fum7* 和 *fum14* 的功能相同。它们分别编码 B 类伏马菌素合成过程所必须的 Fum1p (聚酮合成酶)、Fum8p (氨基转移酶)、Fum6p (P450 氧化还原酶)、Fum15p (P450 氧化还原酶)、Fum13p (酮基还原酶)、Fum3p (加双氧酶)、Fum19p (ABC 转运盒)、Fum7p、Fum10p 与 Fum14p (Fum7p、Fum10p 与 Fum14p 三个蛋白共同负责活化柠檬酸并将其正确组装到碳骨架侧链)^[19]。

研究发现, 串珠镰刀菌 B 类伏马菌素产毒株均含 *fum1* 基因, 非产毒株均不含 *fum1* 基因, 提示 *fum1* 基因的 DNA 序列信息可以作为鉴定串珠镰刀菌伏马菌素产毒株的有效手段^[20-21]; Susca 等^[22]报道某些黑曲霉非产毒株不含 *fum8* 基因。而本研究所选用的 19 株黑曲霉菌株中, 不论 B 类伏马菌素产毒量高低, 均携带 8 个产毒基因, 说明黑曲霉 B 类伏马菌素合成具有复杂的调控机制, 单一的 *fum1* 或 *fum8* 不足以作为鉴定黑曲霉 B 类伏马菌素产毒株的指示基因。mRNA 分析结果表明, 低产毒株或非产毒株中 *fum6*、*fum14* 和 *fum19* 基因的 mRNA 表达

量均较低, 这与 Palumbo 等^[17]的报道结果一致。同时在串珠镰刀菌中已通过基因敲除和自然突变证实上述基因是串珠镰刀菌合成 B 类伏马菌素的必须基因^[20], 提示 *fum6*、*fum14*、*fum19* 三个基因在黑曲霉 B 类伏马菌素合成过程中具有关键作用, 可将其作为黑曲霉 B 类伏马菌素产毒株产毒能力鉴别的分子生物学指标。鉴于目前黑曲霉伏马菌素生物合成途径尚处于研究阶段, 利用基因敲除并结合体外产毒培养试验进一步明确其代谢途径, 完善黑曲霉产 B 类伏马菌素鉴定方法将是未来研究重点。

参考文献

- [1] Gelderblom W C, Jaskiewicz K, Marasas W F, et al. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(7): 1806-1811.
- [2] Harrison L R, Colvin B M, Greene J T, et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme* [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1990, 2(3): 217-221.
- [3] Gelderblom W, Kriek N, Marasas W, et al. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats [J]. Carcinogenesis, 1991, 12(7): 1247-1251.
- [4] CHU F S, LI G Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(3): 847-852.
- [5] Ross P F, Rice L G, Osweiler G D, et al. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates [J]. Mycopathologia, 1992, 117(1): 109-114.

- [6] Sydenham E W, Thiel P G, Marasas W F, et al. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38(10):1900-1903.
- [7] Patharjan P, Saravanakumar P, Siva M, et al. PCR based detection of fumonisin producing strains of *Fusarium verticillioides* and gene related to toxin production [J]. *Current Botany*, 2011, 2(3):34-37.
- [8] Ross P F, Nelson P E, Richard J L, et al. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(10):3225-3226.
- [9] Frisvad J C, Smedsgaard J, Samson R A, et al. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(23):9727-9732.
- [10] Logrieco A, Ferracane R, Haidukowsky M, et al. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must [J]. *Food Additives and Contaminants*, 2009, 26(11):1495-1500.
- [11] Knudsen P B, Mogensen J M, Larsen T O, et al. Occurrence of fumonisins B2 and B4 in retail raisins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 59(2):772-776.
- [12] Abrunhosa L, Calado T, Venâncio A. Incidence of fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger* in Portuguese Wine Regions [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13):7514-7518.
- [13] Noonim P, Mahakarnchanakul W, Nielsen K F, et al. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans [J]. *Food Additives and Contaminants*, 2009, 26(1):94-100.
- [14] Frisvad J C, Larsen T O, Thrane U, et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):e23496.
- [15] Varga J, Kocsubé S, Suri K, et al. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 143(3):143-149.
- [16] Glass N L, Donaldson G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4):1323-1330.
- [17] Palumbo J D, O'Keeffe T L, Gorski L. Multiplex PCR analysis of fumonisin biosynthetic genes in non-toxicogenic *Aspergillus niger* and *A. awamori* strains [J]. *Mycologia*, 2013, 105(2):277-284.
- [18] Butchko R A, Plattner R D, Proctor R H. Deletion analysis of *fum* genes involved in tricarballic luster formation during fumonisin biosynthesis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(25):9398-9404.
- [19] Pel H J, de Winde J H, Archer D B, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(2):221-231.
- [20] Baird R, Abbas H K, Windham G, et al. Identification of select fumonisin forming *Fusarium* species using PCR applications of the polyketide synthase gene and its relationship to fumonisin production in vitro [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9(4):554-570.
- [21] 王晓英, 刘秀梅. 串珠镰刀菌伏马菌素产毒株聚合酶链反应检测方法的研究 [J]. *卫生研究*, 2003, 32(3):228-232.
- [22] Susca A, Proctor R H, Mule G, et al. Correlation of mycotoxin fumonisin B2 production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum8* in *Aspergillus niger* from grape [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(16):9266-9272.

国家食品安全风险评估中心关于申请新食品原料安全性评估意见的公告

有关申请人:

《新食品原料安全性审查管理办法》(国家卫生和计划生育委员会令第1号)于2013年10月1日正式实施。根据《新食品原料申报与受理规定》和《新食品原料安全性审查程序》的要求,申请人在申报新食品原料时应提交由风险评估技术机构出具的安全性评估意见。国家卫生计生委委托国家食品安全风险评估中心制定相关申请材料要求指南。为落实具体工作的实施,我中心组织专家制定了《新食品原料安全性评估意见申请材料指南》(试行),见附件。

申请人如需申请由我中心出具的新食品原料安全性评估意见,请联系国家食品安全风险评估中心风险评估部门工作人员。

联系人:

风险评估二部 宋雁 电话:010-52165571 email:songyan@cfsa.net.cn
风险评估二部 雍凌 电话:010-52165570 email:yongling@cfsa.net.cn
风险评估一部 王晔茹 电话:010-52165451 email:wangyeru@cfsa.net.cn
风险评估一部 高芃 电话:010-52165557 email:gaopeng@cfsa.net.cn

附件:新食品原料安全性评估意见申请材料指南(试行)

(相关链接:<http://www.cfsa.net.cn/Article/News.aspx?id=5DF707CFB74C2E41877723B9D6F6CA777A7A2ABBB6D09244>)

国家食品安全风险评估中心

二〇一四年二月二十八日