基于壳聚糖改性聚乙烯醇水凝胶食品核酸快速提取及分子检测

刘虎[1]，张鑫磊[2]，张勇[2]，夏许寒[2]，许元红[1]，邓锐杰[2]，邓莎[2*]

（1.青岛大学生命科学学院，山东青岛 266071）（2.四川大学轻工科学与工程学院，四川成都 610065）

摘要：核酸提取是快速、精准检测食源性病原分子标志物的重要支撑。为解决传统方法操作繁琐、仪器依赖强及成本高等问题，本研究开发了一种基于壳聚糖（CS）修饰聚乙烯醇（PVA）水凝胶的新型核酸提取材料。通过反复冻融构建水凝胶，PVA 的多孔结构吸附核酸，借助 CS 质子化氨基（$-NH_3^+$）的静电作用，增强对带负电荷核酸的捕获。扫描电镜（SEM）显示CS-PVA微纤维网络提供了丰富的结合位点，傅里叶变换红外光谱（FT-IR）在1 560 cm^{-1}（$-NH_3^+$弯曲振动）和1 651 cm^{-1}（酰胺Ⅰ带）处特征峰证实 CS 成功负载。性能测试表明，CS-PVA 提取核酸的 qPCR Ct 值为 20.60，显著低于传统 PVA（30.98），吸附能力提升 1 351.74 倍；对染菌肉类样品，可在 5 min 内完成从提取至 PCR 检测。相较于离心柱法（耗时 >60 min）和磁珠法（成本 >5 元 / 样），本方案提取时间仅需 5 min，成本降至每个样品 0.5 元。综上，CS-PVA 通过静电－氢键协同作用实现高效吸附，为食品病原体现场快检提供了高效、低成本、免离心的核酸提取方案，在基层检测中具备广泛应用潜力。

关键词：壳聚糖；聚乙烯醇；核酸提取；快速检测

文章编号：1673-9078(2026)10-322-331 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1204

Rapid Extraction and Molecular Detection of Food Nucleic Acids Based on Chitosan-modified Polyvinyl Alcohol Hydrogel

LIU Hu[1], ZHANG Xinlei[2], ZHANG Yong[2], XIA Xuhan[2], XU Yuanhong[1], DENG Ruijie[2], DENG Sha[2*]

(1.College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

(2.College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Nucleic acid extraction offers crucial support for the rapid and accurate detection of molecular markers for foodborne pathogens. To address the problems associated with traditional methods, including their cumbersome operation, strong instrument dependence, and high cost, a novel nucleic acid extraction material was developed based on chitosan (CS)-modified polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel. The hydrogel was prepared via repeated freeze-thaw cycles, and nucleic acids were adsorbed into the porous PVA structure. The capture of negatively charged nucleic acids was enhanced through electrostatic interactions provided by the protonated amino groups ($-NH_3^+$) of CS. Scanning electron microscopy (SEM) revealed abundant binding sites within the CS-PVA microfiber network. Successful loading of CS was confirmed using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), with characteristic peaks detected at 1 560 cm^{-1} ($-NH_3^+$ bending vibration) and 1 651 cm^{-1} (amide I band). Based on performance tests, the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) Ct value of nucleic acids extracted with CS-PVA was 20.60, which was significantly lower than that obtained with traditional PVA (30.98), indicating a 1 351.74-fold increase in adsorption capacity. For contaminated meat samples, the entire process from extraction to PCR detection was completed within 5 min. In contrast to the spin column method (time taken: >60 min) and the magnetic bead method (cost: >RMB 5 per sample), the present method required only 5 minute for extraction and the cost was reduced to RMB 0.5 per sample. In conclusion, efficient adsorption is achieved through the

收稿日期：2025-08-21；修回日期：2025-10-06；接受日期：2025-10-16

基金项目：国家重点研发计划项目 (2022YFF1103000)

作者简介：刘虎（1999-），男，硕士研究生，研究方向：食品安全，E-mail：tzzp163@163.com

通讯作者：邓莎（1990-），女，博士，实验师，研究方向：食品分析检测，E-mail：dengsha@scu.edu.cn

synergistic effect of electrostatic and hydrogen bonds in CS-PVA, providing an efficient, low-cost, and centrifuge-free nucleic acid extraction solution for on-site rapid detection of foodborne pathogens. This technique offers broad application prospects in grassroots testing.

Key words: chitosan; polyvinyl alcohol; nucleic acid extraction; rapid detection

引文格式：

刘虎,张鑫磊,张勇,等.基于壳聚糖改性聚乙烯醇水凝胶食品核酸快速提取及分子检测[J].现代食品科技,2026,42(10):322-331.

LIU Hu, ZHANG Xinlei, ZHANG Yong, et al. Rapid extraction and molecular detection of food nucleic acids based on chitosan-modified polyvinyl alcohol hydrogel [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 322-331.

食源性致病微生物污染是全球食品安全面临的重大挑战。其中，大肠杆菌（*Escherichia coli*）和沙门氏菌（*Salmonella enterica*）因其广泛分布、强致病性和高发病率，成为引发食源性疾病的主要病原体[1,2]。它们通过污染水源、肉类、乳制品及果蔬等食品链环节，可导致严重的肠胃炎、败血症甚至死亡[3,4]。传统微生物培养法虽为金标准，但存在耗时长、步骤繁琐等不足[5,6]，难以满足基层检测机构对污染源快速筛查、及时预警和精准控制的迫切需求。核酸分子检测通过特异性识别病原菌基因，可以实现高灵敏度、高特异性的致病菌定量检测[6,7]，其中二代测序（NGS）具有高通量的优势，但是依赖大型测序平台，成本高且时效性低，在快速筛查应用中受到限制。实时荧光定量聚合酶链式反应（qPCR）可显著降低检测周期和成本，普及率高，目前被各级检测机构作为致病菌定量检测的常用方法。然而，基于 qPCR 检测体系的分析速度和检测灵敏度高度依赖于样本前处理中的核酸提取效率。

目前，样本前处理主要利用离心柱吸附或磁珠分离手段进行核酸提取[8]。离心柱法涉及多步离心操作，通量低且易造成气溶胶污染[9-12]；磁珠法虽易于自动化，但需昂贵的磁性材料和精密仪器，试剂成本高[12-14]。此外，复杂的裂解、结合、洗涤和洗脱等分离步骤不仅耗时，也增加了操作误差与交叉污染风险[15]。先前的研究尝试利用纤维素滤纸提取核酸，虽具无需设备、操作简单、成本低廉的优势，但经壳聚糖等化合物改性后常出现高结合－零释放的问题[16]，且存在非特异性吸附强、洗脱效率低及机械稳定性不足等缺陷。在资源有限的现场快速筛查场景下，亟需开发成本低廉、操作简便、快速高效且无需复杂仪器的核酸提取新材料。

针对上述挑战，本研究通过冻融循环构建聚乙烯醇（PVA）三维物理交联网络，提供高比表面积与优异机械稳定性[17-19]；同时引入壳聚糖（CS）的质子化氨基（$-NH_3^+$）[20,21]，通过强静电作用高效靶向吸附核酸。研究表明，CS 在复杂提取液环境中仍能维持优异的电荷富集能力，其性能显著优于纯 PVA 及魔芋葡甘聚糖、季铵化壳聚糖、海藻酸钠、聚丙烯酸（KGM、QCS、SA、PAA）等改性材料。结合扫描电子显微镜（SEM）和傅里叶变换红外光谱（FT-IR）表征，证实了 CS-PVA 复合材料的微纤维界面结构及功能基团分布。该方法中，吸附核酸后的水凝胶可直接用于 PCR 扩增，样本提取处理用时不足 5 min，且在实际染菌样品中仍保持高效捕获性能。本研究开发的 CS-PVA 核酸提取材料，为食源性致病菌的现场快速、低成本核酸检测提供了一种新型工具，在简化样品前处理流程、提升 PCR 兼容性方面展现出良好潜力。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

沙门氏菌 *S.enterica*（ATCC 14028）、大肠杆菌 *Escherichia coli*（ATCC 43889）等，中国工业微生物菌种保藏管理中心；食品样品，当地超市；寡核苷酸，北京擎科生物科技股份有限公司、杭州有康生物科技有限公司；质粒，Addgene 公司，详细序列信息如表 1 所示，所购买的寡核苷酸均经过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。

表 1 寡核苷酸序列

Table 1 Oligonucleotide sequences

名称	序列（5′→3′）
ZL-F1	CCTGTCAAGGTATCCCCACG
ZL-R1	CAGGCCCAGTATGATGCAGT
ZL-F2	GGCCGCTAATACGACTCACT
ZL-R2	TCGTAAAGCAGGCAGGTCTC
DC-F	CCGTTTGCCAGCCATTTTCA
DC-R	CAGGCAATAGGGCAACTGGA
SM-F	AAAAGCAGGCATGTCCACCG
SM-R	ATCCCGCAGCGTAAAGCAAC

聚乙烯醇，上海国药集团化学试剂有限公司；壳聚糖、壳聚糖季铵盐、海藻酸钠、魔芋胶、聚丙烯酸，上海麦克林生化科技股份有限公司；吐温-20，上海生工生物工程股份有限公司；盐酸胍，成都科隆化学品有限公司。

QuantStudio 3 实时定量荧光 PCR 仪，中国赛默飞世尔仪器有限公司；Proflex 3×32 三槽梯度 PCR 仪，中国赛默飞世尔仪器有限公司；DYY-6C 电泳仪，北京六一生物科技公司；Champ Gel 7000 凝胶成像仪，北京赛智创业科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制

提取液：1.5 mol·L^{-1} 盐酸胍、50 mmol·L^{-1} NaCl、1 wt.% 吐温-20、50 mmol·L^{-1} Tris-HCl（pH 值 7.0）、5 mmol·L^{-1} EDTA，使用超纯水定容。

洗涤液：10 mmol·L^{-1} Tris-HCl（pH 值 8.0）、0.1 wt.% 吐温-20，使用超纯水定容。

1.2.2 水凝胶制备

（1）PVA 水凝胶的制备：5 wt.% PVA 溶液，95 ℃溶解 3 h；注入模具，静置 1 h；−20 ℃冷冻 6~12 h，室温解冻 3 h，循环 3 次；超纯水透析至中性。

（2）CS-PVA 水凝胶的制备：2 wt.% CS 醋酸溶液，60 ℃溶解 2 h；与 5 wt.% PVA 溶液按质量比 2:1 混合，60 ℃搅拌 1.5 h；其余步骤同 PVA。

（QCS-PVA、SA-PVA、KGM-PVA、PAA-PVA 等制备方法基本同 CS-PVA）。

1.2.3 核酸提取流程

（1）裁剪 10 mg 水凝胶，加入 50 μL 含靶标核酸的提取液；

（2）室温振荡 1 min，弃液，加入 50 μL 洗涤液清洗 1 min；

（3）水凝胶直接用于 PCR 扩增。

1.2.4 提取条件测试

将提取时间设置为振荡 30 s、1、10、30 min，提取液中 Tris-HCl 设置为醋酸（pH 值 6.0）、Tris-HCl（pH 值 7.0、8.0、9.0），氯化钠浓度设置为 0、50、100、200 mmol·L^{-1}，以探索时间、pH 值、盐离子浓度对水凝胶提取核酸的影响。

1.2.5 表征与性能评价

结构表征：SEM、FT-IR。

实际样本测试：人工污染大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌的猪肉样品。

1.3 数据分析

本文涉及的所有试验均重复测定 3 次，数据处理采用 Microsoft Office 和 Origin 2022 软件进行。

2 结果与讨论

2.1 水凝胶提取核酸原理及流程

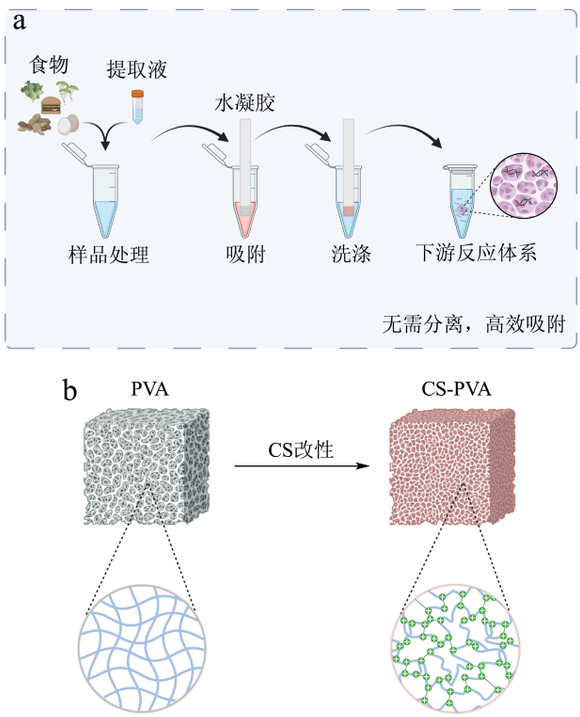


图 1 水凝胶核酸提取流程与吸附机制示意图

Fig.1 Schematic diagram of the water gel nucleic acid extraction process and adsorption mechanism

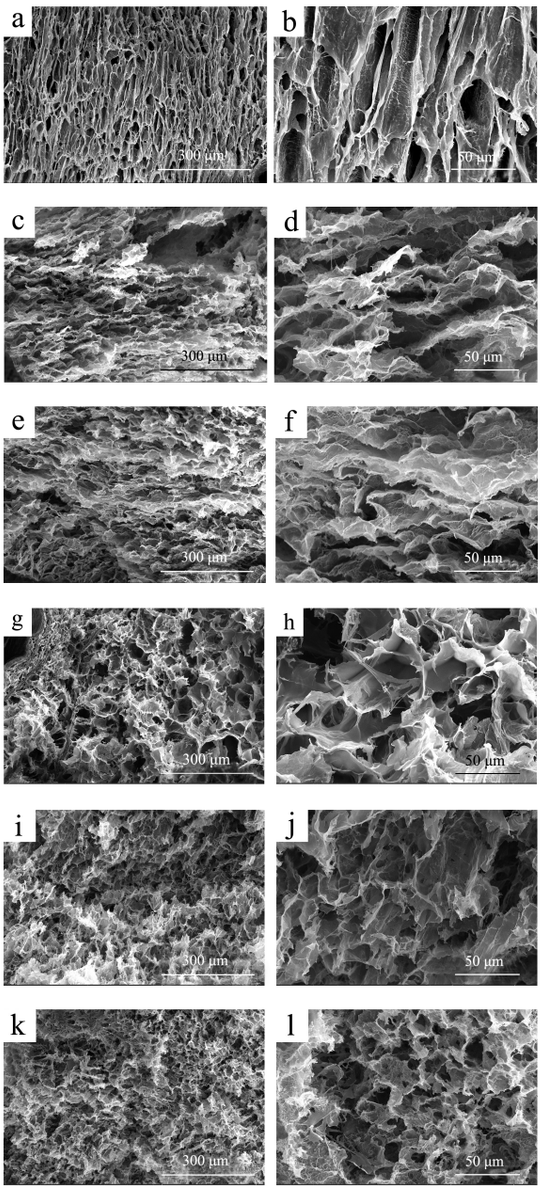
注：a 为水凝胶核酸提取流程；b 为改性水凝胶静电吸附核酸原理。

本研究基于“静电－氢键协同吸附”机制实现核酸高效捕获与富集，其核心流程如下（图 1a）。在核酸捕获阶段，将 CS-PVA 水凝胶置于含目标核酸的提取液中，于室温下振荡孵育。在此过程中，PVA 骨架经冻融循环形成的三维多孔网络[22,23]，为核酸提供了大量物理截留位点；CS 链上质子化的氨基（-NH_3^+）通过强静电引力，特异性结合带负电荷的核酸磷酸骨架（图 1b）；同时，提取液中的盐酸胍解离核酸高级结构，使其暴露更多被吸附位点[24]，表面活性剂吐温-20 则通过疏水作用促进核酸向水凝胶界面迁移[25]。上述过程实现了“化学结合－物理富集”双模协同捕获，提升核酸吸附效率。完成吸附后，直接移去提取液上清，使用洗涤缓冲液清洗，以去除非特异性吸附

杂质，最终将载有核酸的水凝胶整体转移至 PCR 体系进行扩增。该流程省去了传统方法中的洗脱步骤，不仅将操作时间缩短，也避免了洗脱过程中的核酸损失，为快速现场检测提供了可靠、低耗的新方案。

2.2 微观结构分析

材料的微观结构直接决定其功能特性，为系统解析 CS-PVA 水凝胶的微观结构特征及其对核酸提取性能的增强机制，本研究采用扫描电子显微镜（SEM）观察材料形貌，通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）分析化学组成与键合作用，同时引入纯 PVA 及其他改性水凝胶（QCS-PVA、SA-PVA、KGM-PVA、PAA-PVA）作为对照，明确 CS 改性对 PVA 微观结构的调控机制，为后续核酸吸附性能提供结构层面的支撑。



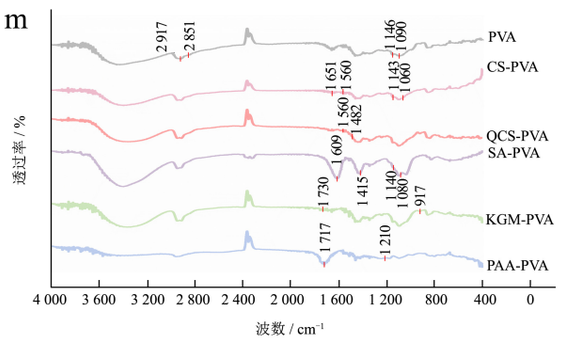


图 2 不同改性 PVA 水凝胶的微观结构与化学组成表征

Fig.2 Characterization of the microstructure and chemical composition of different modified PVA hydrogels

注：a~b 为 PVA 水凝胶 SEM 图像；c~d 为 CS-PVA 水凝胶 SEM 图像；e~f 为 QCS-PVA 水凝胶 SEM 图像；g~h 为 SA-PVA 水凝胶 SEM 图像；i~j 为 KGM-PVA 水凝胶 SEM 图像；k~l 为 PAA-PVA 水凝胶 SEM 图像；m 为水凝胶红外光谱对比。

通过 SEM 对不同水凝胶的断面形貌进行观察，纯 PVA 经冻融循环形成孔径均一的三维多孔网络（图 2a、2b），为截留核酸提供物理空间，但单一多孔结构缺乏特异性吸附位点，难以实现高效核酸捕获；而 CS 改性后（图 2c、2d）呈现显著结构重构——PVA 大孔骨架表面密集覆盖纤维状壳聚糖，形成“PVA 大孔 -CS 纳米纤维”的微纳分级结构，其优势在于，大孔骨架保障传质效率，纳米纤维提供高比表面积与大量吸附位点，为“空间富集－静电锚定”双机制协同奠定结构基础。在与多种改性材料的对比中，CS-PVA 展现出显著优势，QCS-PVA 因季铵盐基团强亲水性导致 CS 纤维过度溶胀，阻塞孔道（图 2e、2f）；SA-PVA 的海藻酸钙交联网络致密化，比表面积下降，难以实现核酸的有效截留与迁移（图 2g、2h）；KGM-PVA 中，魔芋葡甘聚糖的刚性链束阻碍 PVA 冻融过程中的冰晶生长，形成非贯通闭孔，传质效率降低（图 2i、2j）；PAA-PVA 则因聚丙烯酸链缠结，产生无序厚壁结构，丧失传输通道（图 2k、2l）。FT-IR 光谱进一步佐证改性机制（图 2m）：CS 特征氨基峰（1 560 cm^{-1}）及酰胺 I 带（1 651 cm^{-1}）证实其成功负载；PVA 结晶区特征峰（1 141 cm^{-1}）向 1 140 cm^{-1} 低频偏移，表明 CS 通过氢键破坏 PVA 有序晶区，增强网络柔性。这种结构优势协同功能基团（-NH_3^+）作用，微纳分级结构提供高比表面积与定向传质通道，且 CS 质子化氨基在含离液盐环境中仍保持强静电，实现“空间富集－静电锚定”双机制协同捕获。

综上，SEM 与 FTIR 表征证实 CS-PVA 水凝胶具有“PVA 大孔-CS 纳米纤维”微纳分级结构，以及

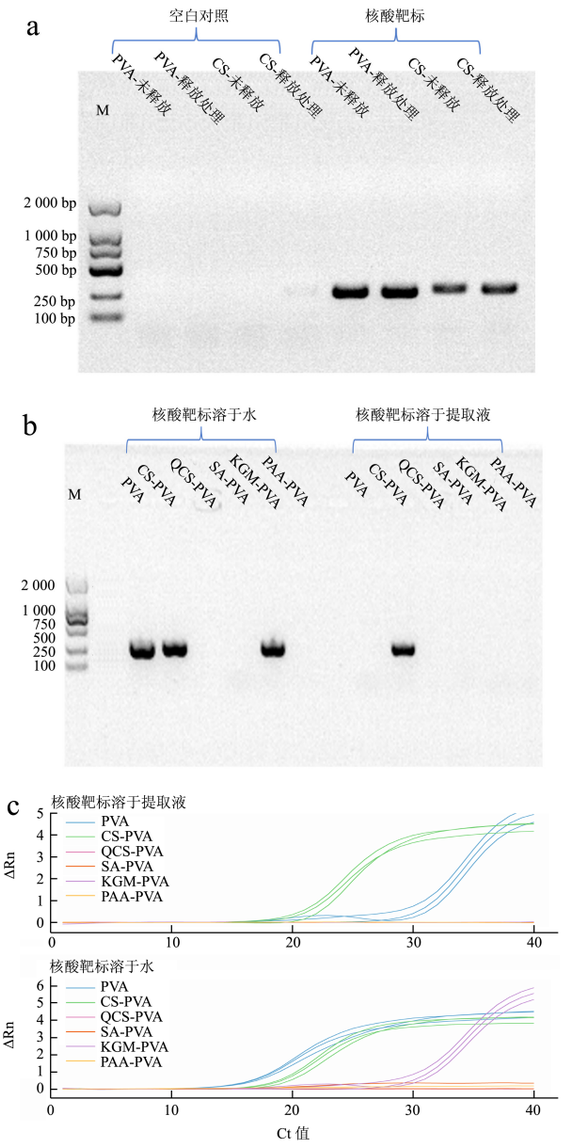
CS-PVA 间强氢键作用，这种结构特征赋予材料高比表面积、高孔隙率与适宜柔性，协同 CS 的静电吸附位点，为“空间富集－静电锚定”双机制协同捕获核酸提供结构支撑，且各项性能指标均优于现有同类材料，显著提升了核酸吸附容量与环境适应性，为快速核酸提取材料的发展提供了新思路。

2.3 水凝胶提取核酸验证

核酸提取材料的吸附效率与特异性是决定下游分子检测准确性的核心前提[26]，为验证 CS-PVA 水凝胶的核酸提取效能，本研究首先以合成质粒 DNA（质量浓度 10 ng·μL^{-1}，靶标片段 259 bp）为模型靶标进行验证。如图 3a 所示，经捕获－洗涤－直接 PCR 流程后，PVA 与 CS-PVA 组均在电泳图中呈现清晰的 259 bp 目的条带，证实该材料体系具备基础核酸提取能力。值得注意的是，本研究优化传统核酸提取流程中的“洗脱步骤”，将吸附核酸的水凝胶经洗涤后，直接用于 PCR 扩增，不仅缩短操作时间，将时间从常规方法的 30 min 以上缩短至 5 min，而且有效避免了常规硅胶柱或磁珠法中因洗脱不完全导致的回收率低（通常仅为 60%~80%）的问题，充分体现了“直接扩增”设计的技术优势。

为进一步探究不同改性材料对 PVA 性能的影响，选取食品核酸提取领域常用的 4 种改性剂——壳聚糖季铵盐（QCS）、海藻酸钠（SA）、魔芋葡甘聚糖（KGM）及聚丙烯酸（PAA），分别与 PVA 复合制备改性水凝胶，对比不同修饰剂对 PVA 核酸吸附性能的影响。首先将质粒 DNA 靶标溶于超纯水，模拟理想无干扰环境，按上述流程检测，电泳结果如图 3b、3c 所示，PVA 组、CS-PVA 组及 KGM-PVA 组均扩增出有效目的条带，表明 QCS 与 PAA 修饰会显著抑制 PVA 的核酸吸附能力，推测为 QCS 过量修饰易导致材料表面电荷过强，引发核酸非特异性脱附。考虑到实际食品样品提取时，体系中常含蛋白质（如肉类中的肌红蛋白）、多糖（如蔬菜中的果胶）及酚类物质（如水果中的单宁酸）等干扰成分，本研究将 DNA 靶标溶于提取液中，重复上述实验。琼脂糖凝胶电泳结果显示（图 3d 左），仅 CS-PVA 组保留显著的目的条带，其余材料组（PVA、QCS-PVA、SA-PVA、KGM-PVA、PAA-PVA）均未观察到清晰条带，表明仅 CS-PVA 材料在复杂基质中仍具备稳定的核酸吸附能力。为量化验证不同材料的提取效能差异，进一步采用 qPCR 技术进行检测，CS-PVA 新材料提取核酸后的 qPCR 数值为 20.60，传统 PVA 材料提取核酸后的 Ct 值为 30.98，而 QCS-PVA、SA-PVA、KGM-PVA 及 PAA-PVA 组均未检测到有效扩增信号（图 3d），表明仅 CS-PVA 材料在复杂环境中仍具备稳定的核酸吸附能力。

与原始材料对比分析，在理想水环境中，CS-PVA 组的核酸提取率高于 KGM-PVA 水凝胶；而在含干扰成分的模拟提取液中，现有研究材料的提取率普遍消失，而本研究 CS-PVA 组在无洗脱条件下仍保持较高提取率，这一优势主要源于 CS 分子链上的氨基可通过静电作用与磷酸集团作用，同时排斥蛋白质、多糖等带负电杂质，实现核酸的特异性吸附。此外，本研究 CS-PVA 组的 qPCR Ct 值（20.60）显著低于传统 PVA 材料（30.98），进一步证实 CS-PVA 材料在复杂环境中提取高质量核酸的优越性，凸显 CS 在提升 PVA 基材料核酸提取特异性与抗干扰性中的不可替代性。



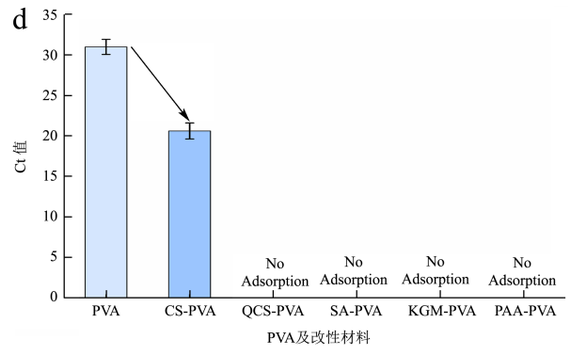


图 3 不同改性水凝胶核酸吸附效果验证

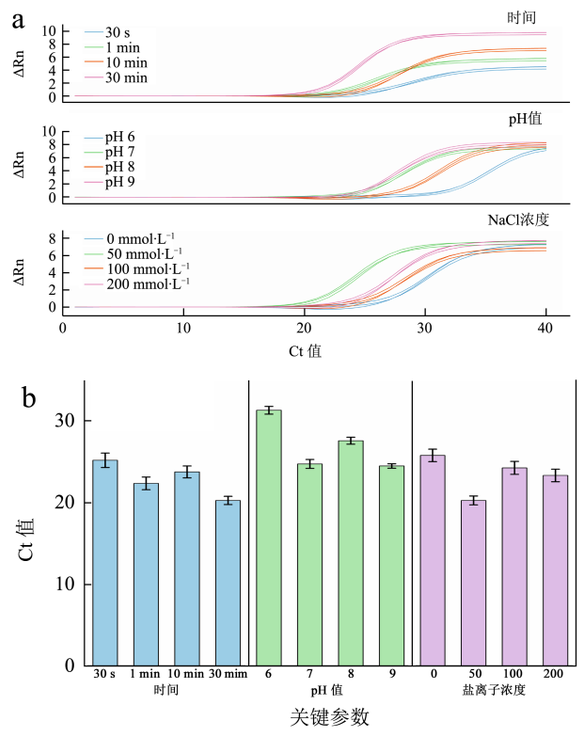
Fig.3 Verification of nucleic acid adsorption effects of different modified hydrogel materials

注：a 为核酸提取初步验证；b 为核酸吸附 PCR 电泳图；c 为 qPCR 扩增曲线；d 为提取液中核酸吸附 Ct 值对比。

2.4 核酸提取性能优化

核酸提取过程中，吸附时间、提取液 pH 值及盐离子浓度会通过影响水凝胶与核酸的相互作用及核酸稳定性，显著改变提取效率。为最大化 CS-PVA 复合水凝胶的核酸捕获能力，本研究采用单因素变量法，对上述三个关键参数进行系统优化，以合成核酸 DNA 为检测对象，通过琼脂糖凝胶电泳条带与 qPCR 评估提取效果，确立 CS-PVA 水凝胶的最优提取条件。

吸附时间直接决定核酸提取的效率与操作便捷性[27]，本研究设置 4 个吸附时间梯度：30 s、1、10、30 min，其余条件统一。实验结果如图 4 所示，振荡 30 s 即可实现有效核酸捕获，琼脂糖凝胶电泳可见清晰的 259 bp 目的条带，其 qPCR Ct 值为 25.21，证实 CS-PVA 水凝胶对核酸的吸附动力学速率较快，短时间内即可完成初步捕获；时间为 1 min 与 30 min 时扩增效率趋同，条带强度相似，Ct 值差距较小，分别为 22.37 与 20.28，表明 1 min 时水凝胶即可实现高效吸附；而 10 min 组出现核酸丢失，条带灰度值降低，推测这是在吸附－解吸动态平衡下，部分核酸脱离水凝胶所致。提取液 pH 值通过调控壳聚糖氨基的质子化程度与核酸结构稳定性，影响 CS-PVA 水凝胶的吸附性能[28]。本研究设置 pH 值 6.0、7.0、8.0、9.0 四个梯度，其余条件统一。在 pH 值 6.0 时，接近壳聚糖氨基 pKa（6.3~6.7），其质子化程度下降，核酸结合力不足，导致条带消失，同时 Ct 值增高为 31.34；pH 值 7.0 时吸附效率达峰值，条带最为明显，Ct 值为 24.76，此时 CS 氨基质子化程度高且核酸结构稳定，二者强静电引力实现高效捕获；pH 值＞ 8.0 时，电泳条带较为明显，虽氨基质子化率仍高，但核酸易发生碱催化水解，且高 pH 值削弱盐酸胍离液能力，故未采用。提取液中 NaCl 浓度通过“盐离子屏蔽效应”影响核酸与水凝胶的静电相互作用[29]，本研究设置 0、50、100、200 mmol·L^{-1} 四个浓度梯度，吸附时间 1 min、pH 为 7.0。0 mmol·L^{-1} NaCl 组中，无盐离子屏蔽时，带负电的杂蛋白与核酸竞争，其结合水凝胶表面正电荷位点的能力增强，条带减弱，Ct 值增至 25.81；50 mmol·L^{-1} NaCl 为最优离子强度，电泳条带最为明显，Ct 值最低为 20.28，此时低浓度盐离子可轻微削弱核酸分子间的排斥力，促进其与水凝胶表面结合，同时可使蛋白发生轻微沉淀，减少蛋白与吸附位点的结合；100 mmol·L^{-1} 与 200 mmol·L^{-1} NaCl 组，电泳条带减弱，Ct 值分别增加为 24.27、23.35，高浓度盐离子会显著屏蔽核酸磷酸骨架的负电荷，削弱其与水凝胶的静电引力，均抑制靶标捕获。综合上述三个关键参数的优化结果，确立 CS-PVA 水凝胶的最优核酸提取条件为，吸附时间 1 min（平衡提取效率与操作便捷性）、提取液为含 50 mmol·L^{-1} NaCl 的 Tris-HCl（pH 值 7.0）缓冲液（保障 CS 氨基质子化程度与核酸稳定性，同时抑制杂质竞争吸附），可满足后续实际食品样品检测的需求。



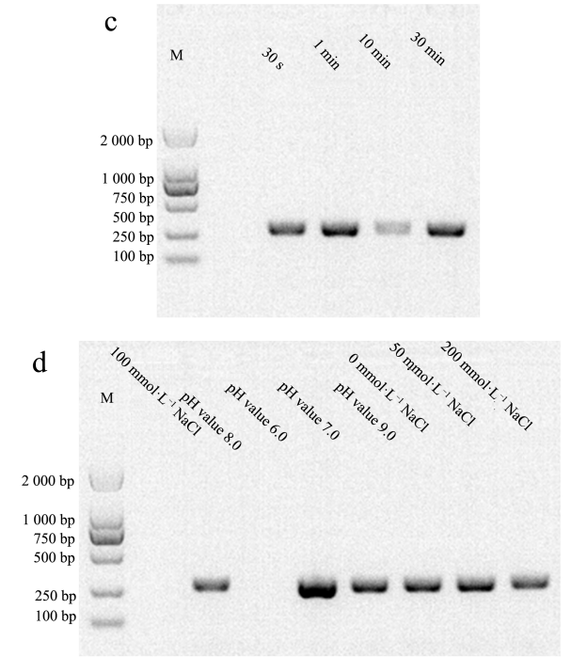
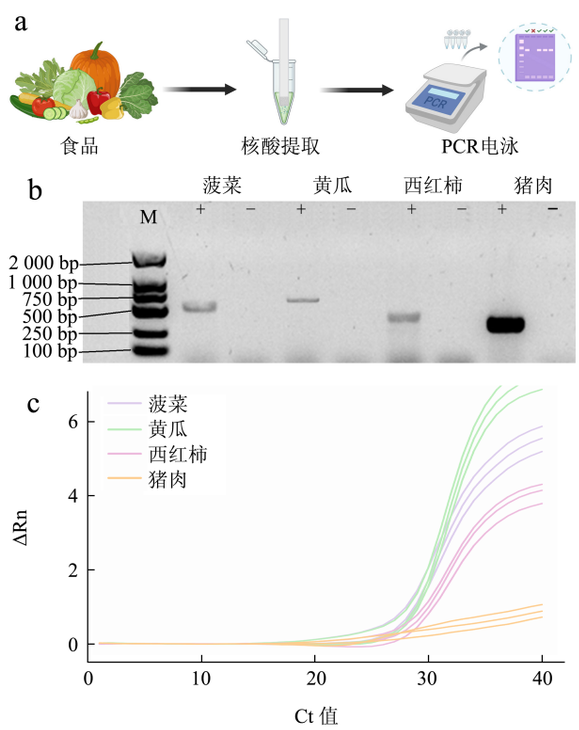


图 4 吸附条件对水凝胶核酸提取性能的影响

Fig.4 The influence of adsorption conditions on the extraction performance of water-based gel nucleic acids

注：a~b 为 qPCR 扩增曲线与 Ct 值表征吸附时间、pH 值及盐浓度的影响；c~d 为电泳图谱验证参数优化效果。



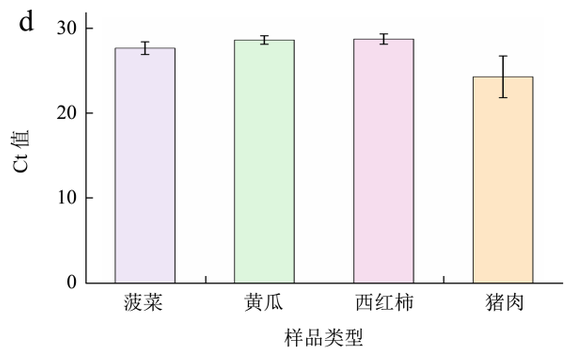


图 5 食品样品核酸提取效果评价

Fig.5 Evaluation of the nucleic acid extraction effect of food samples

注：a 为食品样品核酸提取流程；b 为核酸提取电泳验证；c 为 qPCR 扩增曲线；d 为 Ct 值结果分析。

2.5 实际食品评估

聚合酶链式反应（PCR）技术依托特异性热循环体系驱动 DNA 的指数级扩增，在食品安全检测领域具有不可替代的应用价值。该技术可通过转基因作物成分筛查、肉类掺假分子鉴定及过敏原溯源分析等关键场景，为食品工业的病原微生物监控与原料成分真实性验证提供分子水平的技术支撑[30,31]。因此，为了测试本方法在实际食品中的适应性，本研究选取四类典型基质进行验证——绿叶蔬菜（菠菜）、瓜果（黄瓜）、浆果（西红柿）及动物组织（猪肉）（图 5a）。取 20 mg 的蔬菜或肉类样本加入 200 μL 优化裂解液，放入研钵中研磨约 30 s。取 50 μL 样品进行水凝胶吸附，首先通过 PCR 对提取样品进行鉴定，成功扩增菠菜叶绿体 AT-hook 基因（515 bp）、黄瓜 PP2C 基因（637 bp）、西红柿 CLC 基因（388 bp）及猪肉线粒体 COX 基因（306 bp）的特异性条带（图 5b），同时阴性对照组无扩增，证实提取物无外源核酸污染。进一步 qPCR 分析（图 5c、5d），所有样品 Ct 值均小于 30，其中猪肉为 24.27，菠菜为 27.63；黄瓜为 28.59，西红柿为 28.70；与电泳结果相符，猪肉组虽然核酸得率最高，但其荧光扩增曲线斜率显著降低，推测为肉类脂质诱发荧光淬灭。

综合上述实验结果可知，本研究制备的 CS-PVA 复合水凝胶可通过静电吸附与氢键作用，高效去除食品样品中的蛋白质、多糖、脂质等干扰杂质，从菠菜、黄瓜、西红柿及猪肉等不同食品中提取出高质量基因

组 DNA；且提取的 DNA 可直接用于下游常规 PCR 与 qPCR 反应，无明显抑制效应。这一结果充分证明，CS-PVA 水凝胶吸附法在实际食品样品检测中具有良好的通用性与兼容性，为食品安全分子检测领域的样品前处理技术优化提供了有力支撑。

2.6 染菌样本评估

实际食品样品中致病菌的快速、精准检测是保障食品安全的关键环节[32]，而猪肉等动物源性样品中富含的蛋白质（如肌红蛋白、胶原蛋白，含量约 10~20 g/100 g）、脂质（如甘油三酯，含量约 5~25 g/100 g）及多糖（如糖原，含量约 0.5~1 g/100 g）等杂质，易与核酸竞争吸附位点或抑制 Taq 酶活性，导致传统核酸提取方法的检测灵敏度下降，甚至出现假阴性结果[33]。为系统评估本方法在实际样品中致病菌检测的抗干扰能力与检测效能，本研究选取大肠杆菌及鼠伤寒沙门氏菌作为模式致病菌，构建人工污染猪肉样本模型开展验证实验（图 6a）。取 10 g 无菌猪肉匀浆样本，加入 1 mL 上述致病菌菌液，充分混匀后静置 10 min 以模拟实际污染场景；吸取 40 μL 菌液，加入 160 μL 提取液中，晃动混匀以裂解细菌，之后取 50 μL 进行水凝胶吸附。

结果如图 6b~6d 所示，在合成核酸靶标样品中，优化提取液体系组与原始提取液体系组均有扩增曲线，但优化组 Ct 值（18.90）显著低于原始体系组（28.92）；在实际致病菌污染样本中，两组均成功扩增大肠杆菌及鼠伤寒沙门氏菌特异性基因片段，但扩增效能存在差异，原始组因猪肉中残留的脂质、蛋白等抑制物影响较大，导致 Ct 值较高，且干扰 SYBR Green 荧光染料与 DNA 的结合，使荧光信号减弱，其中鼠伤寒沙门氏菌为 21.51，大肠杆菌为 29.79；而优化组的 Ct 值相对降低，其中伤寒沙门氏菌为 20.17，大肠杆菌为 27.78。以原始体系组为对照。通过 2^(-ΔCt) 法计算两组核酸提取效率，优化体系对鼠伤寒沙门氏菌的核酸提取效率提升 2.55 倍，对大肠杆菌的提取效率提升 4.23 倍，这一差异可能与两种致病菌的细胞壁结构及 CS-PVA 对不同细菌裂解产物的吸附选择性相关。综合上述实验结果可知，CS-PVA 可通过静电吸附与疏水作用，高效去除猪肉基质中的扩增抑制物，显著提升致病菌核酸的提取纯度与回收率，且操作耗时仅 5 min，无需复杂仪器。该方法有效解决了传统核酸提取技术在实际食品样品中“抗干扰性差、检测耗时长”的关键问题，为食品中致病菌的现场快速检测提供了一条高效、可行的技术途径。

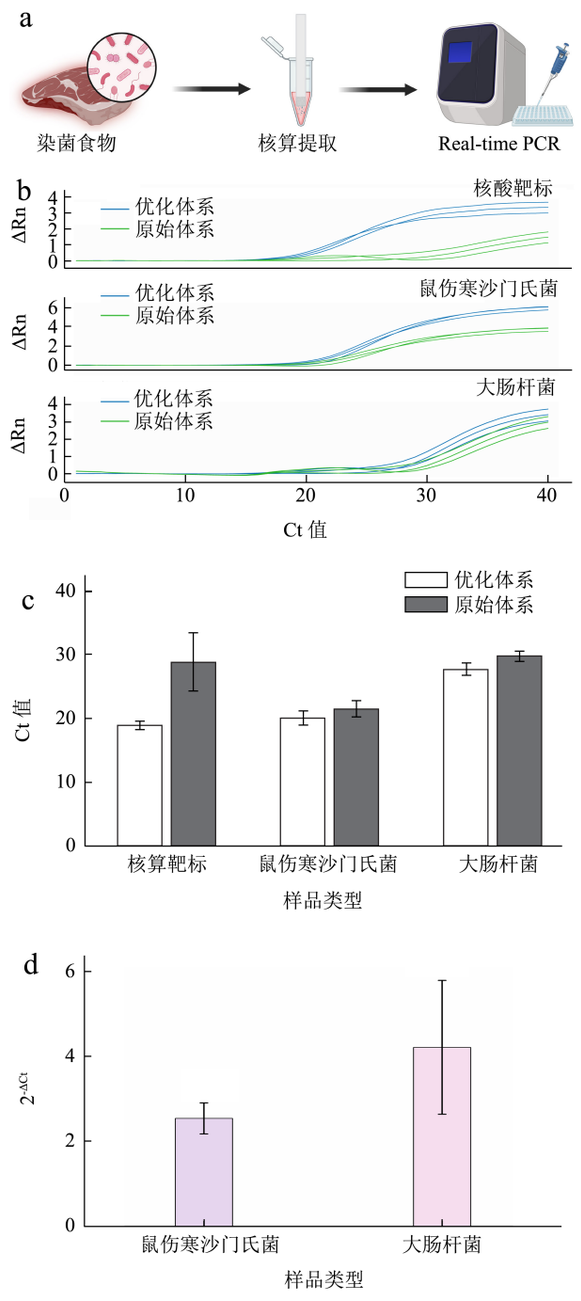


图 6 染菌猪肉样品核酸提取评估

Fig.6 Evaluation of nucleic acid extraction from contaminated pork samples

注：a 为染菌猪肉核酸提取流程；b 为 qPCR 扩增曲线；c 为 Ct 值结果；d 为优化后提取效率提升对比。

3 结论

综上所述，本研究开发了一种基于壳聚糖－聚乙烯醇（CS-PVA）复合水凝胶的核酸提取新材料，实现了食源性致病菌基因组 DNA 的高效、免分离式快速

捕获。通过冻融循环构建的 PVA 三维物理交联网络提供高机械稳定性，而 CS 形成的微纳分级界面，显著提升比表面积与传质效率。在含离液剂的复杂提取液中，壳聚糖质子化氨基通过强静电作用克服电荷屏蔽效应，特异性锚定核酸磷酸骨架，而纯 PVA、KGM-PVA 等材料因缺乏有效质子化位点失效；经过优化，提取时间缩短至 5 min，对实际样本，如大肠杆菌及鼠伤寒沙门氏菌污染肉类的检出，全程耗时小于 1 h；相较传统离心柱 / 磁珠法，该技术具备超快速、低成本、强环境适应性，且首次将 CS-PVA 的“静电－氢键协同吸附”机制应用于病原体核酸提取。该材料为食源性致病菌现场快检提供了设备非依赖性的前处理工具，尤其适用于基层场景。未来可拓展至李斯特菌、空肠弯曲杆菌等更多病原体，并开发冻干工艺实现室温存储运输。本工作提出的“天然多糖－合成聚合物界面工程”策略，为核酸高效提取和现场检测方法的开发提供了有效工具。

参考文献

[1] DÍAZ-GAY M, SANTOS D W, SARAH M, et al. Geographic and age variations in mutational processes in colorectal cancer [J]. Nature, 2025, 643(8070): 230-240.

[2] HE B, ZHU T T, YIN L, et al. Adaptive evolution in asymptomatic host confers MDR Salmonella with enhanced environmental persistence and virulence [J]. Science of the Total Environment, 2024, 908: 168340.

[3] THAKUR K B, MALAISE Y, CHOUDHURY R S, et al. Dietary fibre counters the oncogenic potential of colibactin-producing *Escherichia coli* in colorectal cancer [J]. Nature Microbiology, 2025, 10(4): 855-870.

[4] ZHOU H Y, JIA C H, SHEN P, et al. Genomic census of invasive nontyphoidal Salmonella infections reveals global and local human-to-human transmission [J]. Nature Medicine, 2025, 31(7): 2325-2334.

[5] SOGORE T, GUO M M, NA S, et al. Microbiological and chemical hazards in cultured meat and methods for their detection [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(4): 13392.

[6] 王丹.城市饮用水中微生物检测方法比较研究[J].中国高新科技,2024,15:137-139.

[7] LI M, YIN F F, LU S, et al. Nucleic acid tests for clinical translation [J]. Chemical Reviews, 2021, 121 (17): 10469-10558.

[8] NASIR A, RAMPAZZO D C P R, COSTA D T A, et al. Current nucleic acid extraction methods and their implications to Point-of-Care diagnostics [J]. Biomed Research International, 2017, 2017(1): 9306564.

[9] B V, D G. Preparative and analytical purification of DNA from agarose [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979, 76(2): 615-619.

[10] HUDLOW R W, ROBERT K, MARKUS M, et al. The NucleoSpin® DNA Clean-up XS kit for the concentration and purification of genomic DNA extracts: an alternative to microdialysis filtration [J]. Forensic Science International: Genetics, 2011, 5(3): 226-230.

[11] 赵雅楠,王颖,张东杰,等.食品中植物基因组DNA提取方法的分类及其研究进展[J].现代农业科技,2015,22:275-277.

[12] YE X J, LEI B. The current status and trends of DNA extraction [J]. Bioessays, 2023, 45(8): 2200242.

[13] TSUYOSHI T, RIRIKO S, RYOSUKE K, et al. Contributions of phosphate to DNA adsorption/desorption behaviors on aminosilane-modified magnetic nanoparticles [J]. Langmuir, 2009, 25(5): 2956-2961.

[14] HE H, LI R Q, YI C, et al. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 45199.

[15] 周磊,杜荣胜,张海玫,等.磁珠法和柱提法从天然麝香仁中提取基因组DNA的比较[J].经济动物学报,2025:1-5.

[16] ZOU Y P, MICHAEL G M, WANG Y L, et al. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds [J]. PLOS Biology, 2017, 15(11): e2003916.

[17] XU J, WANG J, WAN Y C, et al. High-Yield of nucleic acid adsorption via poly(Vinyl Alcohol-co-Ethylene) nanofiber-based anion-exchange chitosan aerogel membrane with controllable porosity [J]. Advanced Materials Interfaces, 2022, 9 (20): 2200613.

[18] ZHONG R B, SEPEHR T, BÁRBARA B M, et al. Hydrogels for RNA delivery [J]. Nature Materials, 2023, 22(7): 818-831.

[19] 明贺娜,刘福琛,郭肖青,等.聚乙烯醇/海藻酸钠复合纳米纤维膜的制备及性能[J].产业用纺织品,2025,43(1):7-15.

[20] KOHKI M, YUICHI M, YURY S, et al. DNA-Chitosan hydrogels: Formation, properties, and functionalization with catalytic nanoparticles [J]. Acs Applied Bio Materials, 2021, 4(2): 1823-1832.

[21] 陆黛玲,陈文斌,冯燕萍,等.多孔聚乙烯醇缩醛固载改性壳聚糖用于高效吸附水中的亚硝酸盐[J].广东化工,2025,52(8):5-8.

[22] ENOCH K, C.S R, SOMASUNDARAM A A. Improved mechanical properties of Chitosan/PVA hydrogel-A detailed Rheological study [J]. Surfaces and Interfaces, 2023, 41: 103178.

[23] ZHANG W L, KHAN A, EZATI P, et al. Advances in sustainable food packaging applications of chitosan/polyvinyl alcohol blend films [J]. Food Chemistry, 2024, 443: 138506.

[24] ZHAO X Y, HUANG Y X, LI X, et al. Full integration of nucleic acid extraction and detection into a centrifugal microfluidic chip employing chitosan-modified microspheres [J]. Talanta, 2022, 250: 123711.

[25] WANG S Y, DUAN H, LIN J H. A centrifugal microfluidic platform for rapid detection of pathogens based on chitosan nucleic acid extraction and RAA-T7-CRISPR/Cas13a nucleic acid detection [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2023, 393: 134223.

[26] FU L L, LIU K, YANG J Y, et al. Adsorption behaviors of ctDNA and biological activities based on polyvinyl alcohol/polyethylene

glycol/quaternized chitosan composite hydrogel [J].Molecules (Basel, Switzerland), 2024, 29(23): 5770.

[27] 王莫凡,臧垚,曹一康,等.凹凸棒土作为食源性致病菌核酸提取材料的可行性研究[J].食品安全质量检测学报,2023,14(9):128-136.

[28] 李华安,李志扬,林博涵,等.壳聚糖作为核酸递送载体在基因治疗中的研究进展[J].中国新药杂志,2025,34(7):713-719.

[29] WEI X Q, DUAN J J, XU X J, et al. Highly efficient One-Step purification of sulfated polysaccharides via chitosan microspheres adsorbents [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5(4): 3195-3203.

[30] SARLAK Z, REZVANI N, PARANDI E, et al. Species identification in meat products using quantitative and qualitative PCR techniques, with emphasis on chicken detection [J]. Food Bioscience, 2025, 68: 106568.

[31] HU C X, KALSI S, ZEIMPEKIS I, et al. Ultra-fast electronic detection of antimicrobial resistance genes using isothermal amplification and Thin Film Transistor sensors [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 96: 281-287.

[32] GUO B Y, ZHAO Y, ZHOU C Y, et al. The detection of Salmonella in food based on PCR combined with *Pyrococcus furiosus* Argonaute [J]. Microchemical Journal, 2024, 206: 111311.

[33] 王晶,杨彤,芦云等.不同核酸提取方法用于检测明胶动物源性成分的比较分析[J].食品科技,2024,49(3):312-319.