HDA 法用于检测肉中金黄色葡萄球菌的研究

周巍[1,2]，张薇[2]，吴涛[2]，李永波[2]，田浩[2]，赵勇[2]，张岩[2]，张志胜[1]
（1. 河北农业大学食品科技学院，河北保定 071000）（2. 河北省食品质量监督检验研究院，河北石家庄 050091）

摘要：本文研究了猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉中金黄色葡萄球菌的依赖解旋酶恒温基因扩增检测方法(HDA法)，以金黄色葡萄球菌耐热核酸酶*nuc*基因为目的基因，设计一对特异性引物，优化反应条件UvrD helicase、T4 gp32的浓度，通过赖解旋酶恒温基因扩增方法直接检测猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉中金黄色葡萄球菌，扩增产物通过电泳进行检测。结果表明，HDA法检测肉中金黄色葡萄球菌的特异性强，试验涉及的其它菌株未发生扩增，只有金黄色葡萄球菌得到与设计序列长度一致的216 bp基因片段，检出限为10^1 CFU/g，优化确定UvrD helicase、T4 gp32的终浓度分别为0.1 μg、5.0 μg，该方法用于检测猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉中金黄色葡萄球菌的灵敏度高，耗时短，为猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉中金黄色葡萄球菌的快速检测提供了新的方法，也为其它食品中金黄色葡萄球菌的快速检测奠定了基础。

关键词：解旋酶恒温基因扩增检测方法；肉；金黄色葡萄球菌；检测；*nuc*基因
文章篇号：1673-9078(2014)1-185-189

Detection of *Staphyloccocus aureus* in Meat by Helicase-dependent Isothermal DNA Amplification Assay

ZHOU Wei[1,2], ZHANG Wei[2], WU Tao[2], LI Yong-bo[2], TIAN Hao[2], ZHAO Yong[2], ZHANG Yan[2], ZHANG Zhi-sheng[1]
(1.Agricultural University of Hebei, College of Food Science and Technology, Baoding 071000, China)
(2.Hebei Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: A helicase-dependent isothermal DNA amplification (HAD) method is used for rapid and accurate detection *Staphyloccocus aureus* in pork, beef, mutton and chicken. A pair of oligonucleotide primers exclusively amplified the *nuc* gene of *Staphyloccocus aureus*, thus, *Staphyloccocus aureus* could be directly detected in pork, beef, mutton and chicken. The final concentrations of UvrD helicase and T4 gp32 were optimized. The amplification product was detected by electrophoresis. The results showed that HAD method had high specificity in detection of *Staphyloccocus aureus* in meat, but the other bacteria could not been amplificated. The amplification product had the same 216 bp length as the designed gene fragment, and the detection limit was 10^1 CFU/g. The optimized concentrations of UvrD helicase and T4 gp32 were 0.1 μg and 5.0 μg, respectively. HDA method was faster and more sensitive for detection of *Staphyloccocus aureus* in pork, beef, mutton and chicken, and established the foundation for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* in other foods.

Key words: Helicase-dependent isothermal DNA amplification; meat; *Staphyloccocus aureus*; detection; thermonuclease precursor gene

近年来，随着食品中化学污染的逐步控制，生物污染的食品安全问题逐渐的显现了出来，国内外细菌性食物中毒事件频繁发生，常见的食源性致病菌主要有：沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌等。金黄色葡萄球菌作为最常见的食源性致病菌之一，广泛存在于肉及肉制品、乳及乳制品等主要的食品类别中。金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性菌，自身细胞膜相对致密，存活的几率相对较高，同时，产生的金黄色葡萄球菌肠毒素种类繁多（常见的有SEA、SEB、SEC、SED、SEE）、致病性强，且易溶于水、盐溶液，能够耐受胃液中的蛋白酶，100 ℃ 30 min内仍可存活[1~3]，因此，金黄色葡萄球菌的检验工作就具有重要的意义，在常规生理生化检验方法的基础上，基于特异性蛋白、核酸的各种快速检测方法应运而生。

分子生物学技术作为21世纪快速发展的高新科学技术，具有速度快、灵敏度高、特异性强等优点，已经广泛的应用到了医疗、卫生、防疫、军事、食品工业等各个领域，具有良好的发展前景与空间，食源性

收稿日期：2013-07-30
基金项目：河北省质量技术监督局科技计划项目(100108)
作者简介：周巍(1983-)，男，工程师，研究方向为农产品加工及贮藏工程
通信作者：张志胜(1970-)，男，博士，教授，研究方向为畜产品加工原理及技术研究；张岩(1979-)，男，博士，正高级工程师，研究方向为食品安全。

致病菌的分子生物学检测技术在近年来也有了长足的进步，常见的技术有：聚合酶链式反应（PCR）技术、实时荧光PCR技术、酶联免疫技术、核酸杂交技术[4]。依赖解旋酶恒温基因扩增方法（HDA法）[5~6]是以PCR法为基础发展起来的体外等温基因扩增方法，主要是利用解旋酶在恒温下解开DNA双链，同时DNA单链结合蛋白稳定解开的单链为引物提供结合模板，然后由DNA聚合酶催化合成互补链，新合成的双链在解旋酶的作用下又形成单链，并作为下一轮合成的模板进入循环扩增反应，最终实现靶序列的指数增长。该方法具有仪器设备简单、时间短及特异性强等优点。

本研究意将赖解旋酶恒温基因扩增方法应用到肉中金黄色葡萄球菌的检测中，利用HDA法自身的优势，结合金黄色葡萄球菌检测的重要性，开发出肉中金黄色葡萄球菌的HDA快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株

本项实验中所采用的菌株均购自于中国工业微生物菌种保藏中心：金黄色葡萄球菌（10001、10384、10201、22478）；缓慢葡萄球菌（23459）；表皮葡萄球菌（10398）；腐生葡萄球菌（22941）；科氏葡萄球菌（23431）；乙型溶血性链球菌（10373）；蜡样芽孢杆菌（10041）；肠炎沙门氏菌（21482）；福氏志贺氏菌（21534）。

1.1.2 试验样品

猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉，购自于当地超市及农贸市场。

1.1.3 生化试剂

DNA Marker、ATP、dNTPs，均购自大连宝生物工程公司；海藻糖购自Sigma公司；大肠杆菌UvrD解旋酶购自上海富众生物科学有限公司；Bst polymerase，MutL protein，T4 gp32均购自New England公司；引物（正向引物，反向引物）由大连宝生物工程公司合成；Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒购自生物工程（上海）有限公司。

1.1.4 实验仪器

电泳仪为北京市六一厂生产DXY-33A型电泳仪，凝胶成像系统为美国伯乐公司Bio-rad Gel Doc XR凝胶成像系统，金属浴为上海东升仪器有限公司生产的6400型恒温金属浴。

1.2 试验方法

1.2.1 肉中模板DNA的提取[7]

将25 g肉加入225 mL生理盐水中均质，取10 mL匀浆以500 r/min离心10 min。吸取上清液加入另一灭菌离心管中以14000 r/min，离心10 min，沉淀用500 μL生理盐水悬浮，加入0.25倍体积的乙酸乙酯，震荡器混匀2 min，然后以17000 r/min离心10 min。去掉上清液，沉淀用20 μL生理盐水悬浮，加入直径2.00 mm滤膜片，然后56 ℃干燥，干燥后的滤膜片，加入10% SDS溶液200 μL煮沸10 min，用滤膜专用缓冲液洗涤两次，然后再用TE缓冲液洗涤两次，56 ℃干燥后，可作为PCR反应的模板。

1.2.2 引物设计

通过对金黄色葡萄球菌不同亚种基因序列的同源性分析，筛选出保守性极强的金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因 *nuc*，以其作为引物设计靶标序列，利用Primer Premier 5.0设计引物，并通过Oligo 6.0进行验证，再进行BLAST在线比对后，经PCR试验验证，最终确定检测引物（表1）。

表1 引物序列与目的扩增产物大小

Table 1 The sequence of the primers and the size of the PCR products

靶基因	序列（5’→3’）	目的扩增产物大小
nuc 序列	上游引物：AATGTTTCGAAAGGGCAATA 下游引物：AATCGCTTTAATTAATGTCGC	216 bp

1.2.3 HDA反应体系的建立

采用一步法HDA反应体系：

反应体系为：5 μL 10×buffer（100 mM二硫苏糖醇、350 mM Tris-HAc、100 mM $MgSO_4$、1 mg/mL BSA），0.04 μmol dNTPs，0.16 μmol ATP，10U Bst ploymerase，0.1 μg UvrD helicase，6.0 μg T4 gp32，25 μM海藻糖，2 μL模板DNA，20 pmol引物，用ddH_2O补至50 μL。

将反应体系放入65 ℃恒温水浴中2 h。2%的琼脂糖凝胶电泳（100 V）45 min检测产物。

1.2.4 HDA法检测金黄色葡萄球菌的特异性

将表1中所列的常见的革兰氏阳性菌和食源性致病菌利用Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒提取基因组DNA，按照1.2.3建立的反应体系进行HDA法检测，经琼脂糖凝胶电泳（2%）100 V、45 min检测扩增产物，利用凝胶成像系统成像分析结果。

1.2.5 HDA法检测金黄色葡萄球菌的产物分析

将提取后金黄色葡萄球菌基因组DNA加入到1.2.3建立的反应体系中，HDA法扩增后，将扩增产物纯化，由专业的基因测序公司进行测序，测序结果通过美国州立生物技术信息中心（NCBI）生物信息平台进行在

线BLAST，验证产物的同源性。

1.2.6 HDA法检测肉中金黄色葡萄球菌的检出限

猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉，购自于当地超市及农贸市场，在人工污染金黄色葡萄球菌前，经“食品安全国家标准食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验”GB 4789.10-2010（第一法）检验证实不含有金黄色葡萄球菌。将金黄色葡萄球菌（CICC10001）人工污染到肉中，使肉中金黄色葡萄球菌的浓度依次为10^0 CFU/g→10^6 CFU/g，按照1.2.1的方法直接提取人工污染肉中金黄色葡萄球菌的基因组DNA进行HDA法检测。

2 结果与讨论

2.1 HDA法检测金黄色葡萄球菌的特异性结果

金黄色葡萄球菌的特异性目的基因很多，均能够满足金黄色葡萄球菌的快速检验要求。李一松等[11]针对sea基因完成了SYBR Green I荧光定量PCR检测乳中携带sea基因金黄色葡萄球菌的研究。Astrid L等[12]针对不同的肠毒素基因，设计了多重PCR检测引物，建立了金黄色葡萄球菌肠毒素基因的快速检测方法。钱志伟等[13]针对耐热核酸酶*nuc*基因，完成了食品中3种致病菌多重PCR检测体系的建立及初步应用。本研究选用金黄色葡萄球菌耐热核酸酶*nuc*基因，设计特异性引物，对1.1.1中所有菌种按照HDA法进行检测，验证该方法的特异性，通过图1可以看出，4种不同菌种编号的金黄色葡萄球菌均产生位置在216 bp左右的DNA电泳条带，同属于葡萄球菌属的缓慢葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、科氏葡萄球菌没有产生相应位置的电泳条带，同为革兰氏阳性菌的乙型溶血性链球菌、蜡样芽胞杆菌也没有产生相应位置的电泳条带，同为常见食源性致病菌的肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌亦没有产生相应位置的电泳条带，因此，可以证明HDA法检测金黄色葡萄球菌的特异性较好。

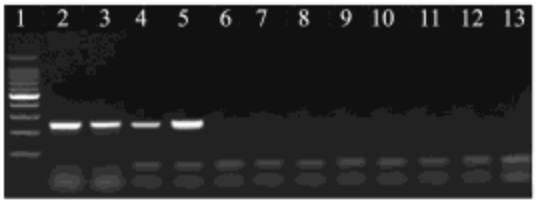


图 1 金黄色葡萄球菌 HDA 法特异性

Fig1. Specificity of HDA system in detection of *Staphyloccocus aureus*

注：泳道 1:100bp ladder marker；泳道 2：金黄色葡萄球菌（CICC 10001）；泳道 3：金黄色葡萄球菌（CICC 10384）；泳道 4：金黄色葡萄球菌（CICC 10201）；泳道 5：金黄色葡萄球菌（CICC 23478）；泳道 6：缓慢葡萄球菌（CICC 23459）；泳道 7：表皮葡萄球菌（CICC 10398）；泳道 8：腐生葡萄球菌（CICC 22941）；泳道 9：科氏葡萄球菌（CICC 23431）；泳道 10：乙型溶血性链球菌（CICC 10373）；泳道 11：蜡样芽胞杆菌（CICC 10041）；泳道 12：肠炎沙门氏菌（CICC 21482）；泳道 13：福氏志贺氏菌（CICC 21534）。

2.2 HDA法检测金黄色葡萄球菌的产物分析结果

由生物工程（上海）有限公司将扩增产物进行DNA测序，通过美国州立生物技术信息中心（NCBI）生物信息平台进行在线BLAST，验证扩增产物的同源性，结果为100%（表2），证明HDA法检测金黄色葡萄球菌的扩增产物为目的扩增产物，符合检测需要。

表 2 HDA 法金黄色葡萄球菌扩增片断的比对结果

Table 2 The blast result of *Staphylococcus aureus* by HDA

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage/%	E vaule	Max ident/%
JX240347.1	*Staphyloccocus aureus* strain KVAFSU-107/11	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100
JX240348.1	*Staphyloccocus aureus* strain KVAFSU-109/11	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100
CP003033.1	*Staphyloccocus aureus* subsp. aureus VC40	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100
CP002643.1	Staphyloccocus aureus subsp. aureus T0131	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100
CP002120.1	*Staphyloccocus aureus* subsp. aureus str. JKD6008	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100
FN433596.1	*Staphyloccocus aureus* subsp. aureus TW20	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100
CP000730.1	*Staphyloccocus aureus* subsp. aureus USA300_TCH1516	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100
AP009351.1	*Staphyloccocus aureus* subsp. aureus str. Newman DNA	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100
EF529589.1	*Staphyloccocus aureus* strain G1 thermonuclease precuesor	399	399	100	$3e\times10^{-8}$	100

转下页

接上页

EF529590.1	*Staphyloccocus aureus* strain G2 thermonuclease precuesor	399	399	100	$3e\times10^{8}$	100
CP000046.1	*Staphyloccocus aureus* subsp. aureus COL	399	399	100	$3e\times10^{8}$	100
CP000253.1	*Staphyloccocus aureus* subsp. aureus NCTC8325	399	399	100	$3e\times10^{8}$	100
CP000255.1	*Staphyloccocus aureus* subsp. aureus USA300_FPR3757	399	399	100	$3e\times10^{8}$	100
EF529593.1	*Staphyloccocus aureus* strain G5 thermonuclease precuesor	399	399	100	$1e\times10^{6}$	99
F529595.1	*Staphyloccocus aureus* strain G7 thermonuclease precuesor	399	399	100	$1e\times10^{6}$	99
GU186372.1	*Staphyloccocus aureus* strain HGZ11 thermonuclease precuesor	388	388	100	$7e\times10^{5}$	99

2.3 HDA法检测肉中金黄色葡萄球菌的检出限

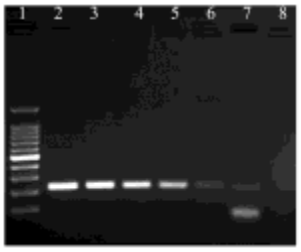


图 2 金黄色葡萄球菌在羊肉中 HDA 法检出限

Fig.2 The sensitivity of detection of *Staphylococcus aureu* by HDA in mutton

注：泳道 1:100 bp ladder marker；泳道 2：10^{6}CFU/g；泳道 3：10^{5} CFU/g；泳道 4：10^{4} CFU/g；泳道 5：10^{3} CFU/g；泳道 6：10^{2} CFU/g；泳道 7：10^{1} CFU/g；泳道 8：10^{0} CFU/g。

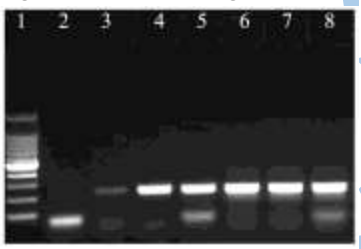


图 3 金黄色葡萄球菌在猪肉中 HDA 法检出限

Fig.3 The sensitivity of detection of *Staphylococcus aureu* by HDA in pork

注：泳道 1：100bp ladder marker；泳道 2：10^{0}CFU/g；泳道 3：10^{1} CFU/g；泳道 4：10^{2} CFU/g；泳道 5：10^{3}CFU/g；泳道 6：10^{4} CFU/g；泳道 7：10^{5} CFU/g；泳道 8：10^{6} CFU/g。

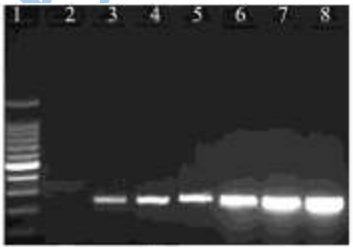


图 4 金黄色葡萄球菌在牛肉中 HDA 法检出限

Fig.4 The sensitivity of detection of *Staphylococcus aureu* by HDA in beef

注：泳道 1:100 bp ladder marker；泳道 2：10^{0} CFU/g；泳道 3：10^{1} CFU/g；泳道 4：10^{2} CFU/g；泳道 5：10^{3}CFU/g；泳道 6：10^{4} CFU/g；泳道 7：10^{5} CFU/g；泳道 8：10^{6} CFU/g。



图 5 金黄色葡萄球菌在鸡肉中 HDA 法检出限

Fig.5 The sensitivity of detection of *Staphylococcus aureu* by HDA in chicken

注：泳道 1:100bp ladder marker；泳道 2：10^{0} CFU/g；泳道 3：10^{1} CFU/g；泳道 4：10^{2} CFU/g；泳道 5：10^{3}CFU/g；泳道 6：10^{4} CFU/g；泳道 7：10^{5} CFU/g；泳道 8：10^{6} CFU/g。

将经“食品安全国家标准食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验”GB 4789.10-2010（第一法）检验证实不含有金黄色葡萄球菌的猪肉匀浆、牛肉匀浆、羊肉匀浆、鸡肉匀浆人工污染金黄色葡萄球菌（CICC10001），使每种肉的匀浆中金黄色葡萄球菌浓度依次为10^{0} CFU/mL→10^{6} CFU/mL，提取基因组DNA后进行HDA法检测，由图2、图3、图4、图5可知，猪肉匀浆、牛肉匀浆、羊肉匀浆、鸡肉匀浆在金黄色葡萄球菌浓度为10^{1} CFU/mL→10^{6} CFU/mL均能产生单一、清晰的目的基因片段，长度约为216 bp，而金黄色葡萄球菌浓度为10^{0} CFU/mL时则无清晰可见的目的电泳条带产生，因此，可以证明HDA法检测肉中金黄色葡萄球菌的检出限为10^{1}CFU/mL。

HDA方法即赖解旋酶恒温基因扩增方法有其自身的优势和劣势，首先，相比较普通PCR和荧光PCR，该方法不需要昂贵的设备，一般实验室就能够满足实验要求，但是HDA法不具备定量检测的能力；其次，相比环介导等温扩增技术，虽然两者均不需要昂贵的仪器设备，在等温的条件下就能够完成实验，但是环介导等温扩增技术对试验设计的要求较高，引物的灵敏度较高，这就很容易造成实验结果的假阳性，而HDA法就不存在这一现象，但是昂贵的UvrD helicase、T4

gp32确是成为制约该方法推广的主要因素，当然随着现代化工业生产的推进，HDA法的应用前景还是非常广泛的，其能够成为现代分子生物学检测技术中的重要组成部分。

3 结论

本研究根据金黄色葡萄球菌耐热核酸酶*nuc*基因设计特异性引物，通过赖解旋酶恒温基因扩增方法(HDA法)直接检测肉中金黄色葡萄球菌，扩增产物电泳检测，最终建立快速准确检测肉中金黄色葡萄球菌的HDA方法。该方法检出限为10^1 CFU/g，反应条件UvrD helicase、T4 gp32的终浓度分别为0.1 μg、5.0 μg。HDA法用于检测肉中金黄色葡萄球菌的灵敏度高，耗时短，不仅为肉中金黄色葡萄球菌的快速检测提供了新的方法，也为其它食品中金黄色葡萄球菌的快速检测奠定了基础。

参考文献

[1] 刘飞,李永明,金伯泉.金黄色葡萄球菌肠毒素检测方法的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(5):511-513
LIU Fei, LI Yong-ming, JIN Bo-quan. Advance in detecting methods of *Staphylococcus aureus* enterotoxin [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2010, 26(5): 511-513

[2] Labib M, Hedström M, Amin M. A capacitive biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B [J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2009, 393(5): 1539-1544

[3] Dinges M M, Orwin P M, Schlievert P M. Exotoxins of Staphylococcus aureus [J]. Clinical microbiology reviews, 2000, 13(1): 16-34

[4] 焦振泉,郭云昌,裴晓燕,等.食源性致病菌检测方法研究进展-Ⅱ.分子生物学检测方法[J].中国食品卫生杂志,2007,19(2):153-157
JIAO Zhen-quan, GUO Yun-chang, PEI Xiao-yan, et al. Current Progress in Methods for Detection of Foodborne Pathogens Part Ⅱ: Molecular Biological Detection Methods [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2007, 19(2): 153-157

[5] 刘洵,程天印,常小斌,等.赖解旋酶恒温基因扩增技术的原理、应用和展望[J].长沙大学学报,2007,21(2):29-31
LIU Xun, CHENG Tian-yin, CHANG Xiao-bin, et al. The principle, application and prospect of helicase -dependent isothermal DNA amplification technology. [J]. Journal of Changsha University, 2007, 21(2): 29-31

[6] Collins R, Mccarthy T V. Purification and characterization of Thermus thermophilus UvrD [J]. Extremophiles, 2003, 7(1): 35-41

[7] LIU Jing-wu, ZHANG Wei, HE Jun-ping, et al. Filter-based Template Preparation for Rapid and Sensitive PCR Detection of Staphylococcus aureus in Meat [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(6): 157-161

[8] SN/T1869-2007,食品中多种致病菌快速检测方法:PCR 法[S]
SN/T1869-2007,Rapid detection methods for pathogens in foods-PCR method[S]

[9] SN/T 1870-2007,食品中致病菌检测方法实时 PCR 法[S]
SN/T 1870-2007, Detectionof pathogens in food- Real-time PCR method [S]

[10] SN/T 2754.1-2011,出口食品中致病菌环介导恒温扩增(LAMP)检测方法[S]
SN/T 2754.1-2011, Loop-mediated isothermal amplification detection method for pathogens in export food [S]

[11] 李一松,王明娜,吕琦,等.SYBR GreenI 荧光定量 PCR 检测乳中携带 sea 基因金黄色葡萄球菌的研究[J].食品科学,2008,7:235-239
LI Yi-song, WANG Ming-na, LV Qi, et al. Quantitative Detection of Staphylococcus aureus Harboring sea gene in Milk by SYBR Green I Real-time PCR [J]. Food Science, 2008, 7: 235-239

[12] Løvseth A, Loncarevic S, Berdal K G. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8): 3869-3872

[13] 钱志伟,孙新城.食品中 3 种致病菌多重 PCR 检测体系的建立及初步应用[J].食品科学,2011,32(16):236-239
QIAN Zhi-wei, SUN Xin-cheng. Establishment and Application of a Multiplex PCR Assay for Detection of Three Pathogenic Bacteria in Food [J]. Food Science, 2011, 32(16): 236-239