

# 恒温实时荧光法检测金黄色葡萄球菌

刘羽霏<sup>1</sup>, 叶蕾<sup>2</sup>, 孟赫诚<sup>3</sup>, 闫鹤<sup>3</sup>, 石磊<sup>3</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广州迪澳生物科技有限公司, 广东广州 510663)

(3. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 5106403)

**摘要:** 恒温实时荧光技术是目前最新颖的核酸扩增方法。本文创建了恒温实时荧光法快速检测微生物技术方法并应用于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的快速检测。本研究针对金葡菌特异序列 *nuc* 设计 6 条引物, 选取常见病原菌标准株为对照品进行引物特异性检测; 选取金葡菌标准菌株进行灵敏度检测; 并且利用食品中分离的金葡菌, 同时进行 LAMP 反应和荧光 PCR 实验, 验证 LAMP 反应的检出率, 结合 ESEQuant tube scanner 进行实时检测。结果显示: 所建立的恒温荧光扩增法具有扩增效率高、特异性强、灵敏度高(灵敏度为  $10^2$  CFU/mL)等优点。对 50 食品中分离的金葡菌进行检测, 恒温荧光法检测出 50 株, 荧光 PCR 的方法检测出 50 株, 两种方法的检出率都为 100%。本文引入的 ESE Quant tube scanner 平台结合恒温实时荧光法检测金葡菌不仅操作简单, 便于携带, 同时实现检测过程的数据化及自动化, 适合金葡菌的现场检测和大规模监控。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; 环介导等温扩增

文章编号: 1673-9078(2013)9-2262-2266

## Detection of *Staphylococcus aureus* by Real Time Fluorescence Isothermal Amplification

LIU Yu-fei<sup>1</sup>, YE Lei<sup>2</sup>, MENG He-cheng<sup>3</sup>, YAN He<sup>3</sup>, SHI Lei<sup>3</sup>

(1. South China Agriculture University, GuangZhou 510642, China) (2. GuangZhou Deaou Biotechnology CO., LTD, GuangZhou 510663, China) (3. South China University of Technology, GuangZhou 5106403, China)

**Abstract:** Isothermal real-time fluorescence technology is one of the most novel nucleic acid amplification method. 6 primers targeting the *nuc* gene of *Staphylococcus aureus* was applied to detect *S. aureus* with ESEQuant tube scanner; Specificity of the primers was examined using stander strains of *S. aureus* and non-*S. aureus* strains. *S. aureus* isolated from food was detected by LAMP based assay and by real time PCR. The results showed that the real time fluorescence isothermal amplification had good efficiency, high specificity and high sensitivity ( $10^2$  CFU/mL). 50 *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples were selected for stability tests. 50 strains was detected as *Staphylococcus aureus* with LAMP and 50 strains were identified with real time PCR. The results in this study suggested that the ESE tube scanner platform has great potential as a field usable molecular tool for diagnosis of *Staphylococcus aureus*. In addition, it provide an alternative diagnostic methods for field set, and for detection in developing area.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; Loop mediated isothermal amplification

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是人类的一种重要的病原菌, 常存在于奶、肉、蛋、鱼、虾及其制品等食品中, 人通过食用这类被金黄色葡萄球菌污染的食品而引发感染, 在临床上表现为腹泻或呕吐等中毒症状; 同时金葡菌也是医院临床感染导致肺炎及伤口感染的主要病原菌, 占医院感染病例的 10%,

收稿日期: 2013-06-13

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2012ZZ0083); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31201363); 广州市科技计划项目(11C12080718)

通讯作者: 石磊(1961-), 男, 教授, 博导, 研究方向为食品安全及微生物快速检测

因此找到一种简单、快速、经济的金葡菌检测方法成为当前研究的热点问题之一<sup>[1]</sup>。

目前, 我国常规检测方法有生化培养鉴定, 包括: 血浆凝固酶试验、免疫学实验、耐热核酸酶活性试验及各种糖、醇发酵实验及新生霉素敏感实验等, 其优点是操作简便, 所需设备简单, 但一般都存在耗时长、灵敏性差等缺点<sup>[2-3]</sup>。随着分子生物学技术的快速发展和广泛应用, 对金葡菌的检测方法也从传统生化培养方法转移到以 PCR、杂交探针、基因芯片等为主的现代分子生物学技术手段<sup>[4-5]</sup>。PCR 检测技术是在 DNA 聚合酶、引物以及模板 DNA/RNA 存在的情况下对离体核酸进行扩增的一种方法, 其主要是针对特异性靶

序列的检测。通过 PCR 技术可以简便快速地从微量生物材料中以体外扩增的方式获得大量的特定核酸, 具有很高的灵敏度和特异性。目前, 国内外许多临床机构已经将 PCR 技术应用于金葡菌的快速检测<sup>[1]</sup>。但是 PCR 检测技术所需仪器昂贵, 大大提高了检测成本。PCR 法的检测需要依托 PCR 仪进行, 对于基层单位而言, 目前 PCR 仪的售价相对较高, 因此研究开发一种不倚赖贵重仪器、快速而准确的分子检测方法, 是非常有必要的。

环介导恒温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 为新一代快速检测方法。该方法主要是利用 4 条特异性引物识别靶基因上的 6 个特定区域和具有链置换活性的 DNA 聚合酶, 在恒温条件进行扩增反应, 扩增效率可达  $10^8 \sim 10^{10}$  拷贝, 反应扩增产物是一系列反向重复的靶序列构成的茎环结构和多环花椰菜结构的双链 DNA 片段混合物<sup>[6]</sup>。

本研究结合 ESEQuant Tube Scanner 仪器将 LAMP 技术应用于金黄色葡萄球菌的检测, 避免使用价格高昂的 PCR 仪, 为金葡菌的诊断提供一种快速、准确、简单、经济的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 标准菌株

单核增生李斯特氏菌 ATCC19115/413, 沙门氏菌 ATCC14028, 金黄色葡萄球菌 ATCC6538, 大肠杆菌 O157ATCC43889, 阪崎肠杆菌 ATCC29544, 绿脓杆菌 ATCC9027, 大肠杆菌 ATCC25922, 大肠杆菌 CMCC44102, 阪崎肠杆菌 ATCC12868, 副溶血性弧菌 ATCC17802, 创伤弧菌 ATCC27562, 金黄色葡萄球菌 CMCC26003, 鲍氏志贺氏菌 CMCC51346, 宋内氏志贺氏菌 N1CP51334, 普通变形杆菌 N1CPB490059, 奇异变形杆菌 HB7131, 克雷伯氏菌 CMCC(B)46117, 藤黄微球菌 CMCC28001。

### 1.2 野生菌株

本实验室从食品 (海鲜, 禽肉, 即食食品等) 中分离的金黄色葡萄球菌, 实验室保存。上述菌株菌种保藏于脑心脑 (BHI) 琼脂培养基中。

### 1.3 主要试剂和仪器

超纯水, Bst DNA 聚合酶大片段 (购自 New England Biolabs), LA Taq 酶 (购自 TakaRa) 恒温摇床, 三角瓶, 金属浴, 移液器, 离心机, 超净工作台, ESEQuant Tube Scanner, 实时荧光 PCR 仪 (Applied

Biosystems 7500) 等。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 DNA 模板的制备

将金葡菌接种入含有 7% 氯化钠肉汤后放入 35 °C 培养箱过夜培养。

DNA 模板的制取参照 SNT 2754.1-2011。取过夜培养的细菌纯培养物 1 mL, 1,2000 r/min 离心 5 min, 加入 1 mL 生理盐水, 洗涤沉淀, 1,2000 r/min 离心 5 min, 加入 100  $\mu$ L 超纯水, 充分悬浮菌液, 于 100 °C 煮沸 10 min, 于 1,2000 r/min 离心 5 min, 立即冰浴 2 min, 取上清储存于 -20 °C 作为 DNA 模板备用。

### 1.4.2 引物设计与合成

针对金葡菌的特异性基因 nuc, 应用 Primer Explorer V4 software (Eiken Chemical; <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 软件设计 LAMP 引物, 设计好的引物序列利用 NCBI 网站进行序列特异性的比对 (Blast), 引物序列如表 1, 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.4.3 引物的检测

通过软件根据设计的引物, 通过 ESEQuant Tube Scanner 进行 LAMP 实验, 观察出峰的时间及假阳性的出现情况。

表 1 LAMP 的反应体系

反应液(2 $\times$ )	12.5 $\mu$ L
Bst DNA 聚合酶大片段(8 U/ $\mu$ L)	1.0 $\mu$ L
外引物 F3	0.2 $\mu$ mol/L (终浓度)
外引物 B3	0.2 $\mu$ mol/L (终浓度)
内引物 FIP	1.6 $\mu$ mol/L (终浓度)
内引物 BIP	1.6 $\mu$ mol/L (终浓度)
环引物 LoopF	0.8 $\mu$ mol/L (终浓度)
环引物 LoopB	0.8 $\mu$ mol/L (终浓度)
染料	0.5 $\mu$ L
DNA	2.0 $\mu$ L
超纯水	8.0 $\mu$ L
总计	25.0 $\mu$ L

### 1.4.4 LMAP 反应条件

参照 DNA 扩增试剂盒 (恒温扩增法 SR01-24, 广州迪澳生物科技有限公司) 说明书的要求进行 LAMP 反应, 反应过程在 ESEQuant Tube Scanner 中进行, 反应温度为 63 °C, 反应时间为 45 min。每次检验分别设置灭菌双蒸水为阴性对照。荧光通道选择 FAM。

### 1.4.5 特异性实验

选取常见的病原菌的标准株为对照品 (见表 3),

验证该引物的特异性。

### 1.4.6 灵敏度实验

取过夜培养的细菌 2 mL, 用生理盐水进行 10 倍的梯度稀释, 直至  $10^{-7}$  次方, 取最后 3 个梯度的菌液 100  $\mu$ L 涂布 Baird-Parker 平板, 平板放入 35  $^{\circ}$ C 培养箱培养 45~48 h 后进行菌落计数, 同时取每个梯度的菌液 1 mL 按上述方法提取 DNA, 取 2  $\mu$ L 作为模板, 分别进行 LAMP 实验和荧光 PCR 实验。

荧光 PCR: 参照 LA Taq 酶 (购自 TakaRa) 说明书上的方法和反应组分配制反应体系 25  $\mu$ L, 取各梯度的 DNA 2  $\mu$ L 作为模板, 反应条件为: 荧光 PCR 仪 ABI7500 扩增反应条件设为预变性 94  $^{\circ}$ C 4min; 94  $^{\circ}$ C 30 s 变性; 55  $^{\circ}$ C 1 min 退火及延伸, 35 个循环; 68  $^{\circ}$ C 保温 10 min。观察扩增曲线, 验证引物 (见表 2) 对金葡菌的检测灵敏度。

表 2 荧光PCR引物及探针序列

Table 2 Sequence for real-time PCR

引物名称	引物序列 (5'-3')
PF	TTCTTCACGACTAAATAAACGCTCA
PR	GGTACTACTAAAGATTATCAAGACGGCT
Taqman探针 $\Delta$	CAGAACACAATGTTTCCGATGCAACGT

注:  $\Delta$  Taqman探针5'端用FAM标记, 3'端用TAMARA标记。

### 1.4.7 稳定性实验

为了验证恒温荧光法对金葡菌检测的稳定性, 于食品中分离到的被生化鉴定为金葡菌50株, 同时进行 LAMP 反应和荧光PCR实验, 验证 LAMP 反应的检出率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 引物反应效率的检测

食源性致病菌的检验技术目前主要根据国标 GB/T4789-2010进行, 需要增菌、转种、分离培养、生化鉴定等试验, 耗时长, 实验结果也常受到多种因素的影响, 因此建立食源性病原微生物的快速诊断方法对实现食源性传染病的预警与预测, 提高预防和控制食源性疾病的应急能力至关重要。本研究针对金葡菌的nuc基因设计特异性的LAMP引物, 从图1可看出, 该引物对金葡菌的靶标基因具有很好的扩增效率, 在ESEQuant tube scanner仪器上的出峰时间为11 min左右, 并且未出现假阳性, 说明该引物序列适合进行下一步分析。

根据浊度判定LAMP检测结果主要借助肉眼观察, 如果LAMP反应效率不佳, 产物量少, 极易出现弱阳性结果造成判断的不准确; 为避免弱阳性不易判断的缺

点, SYBR Green I等荧光染料在LAMP反应结束后被添加入反应中, 但由于此步骤需要开盖加入荧光染料, 此举易造成LAMP扩增产物扩散所引起的实验室污染, 并且此法也存在易产生假阳性结果的缺点<sup>[7-9]</sup>。近年, 研究人员开始将实时荧光定量仪做为LAMP反应的平台 (如ABI7500系统), 仪器的引入实现了可实时观测检测的过程, 提高了检测的灵敏度, 并且通过溶解曲线的制作提高了检测的特异性。然而这种方式同样存在着对仪器和人员要求比较高的局限性, 不适合基层或现场快速诊断。2010年Lucchi等人首次报道了利用ESE Quant tube scanner系统进行LAMP扩增的数据采集过程, 成功将这种方法用于疟疾的检测, 文章指出, ESEQuant tube scanner系统简单易携带, 十分适用于不发达地区和现场检测<sup>[10]</sup>。

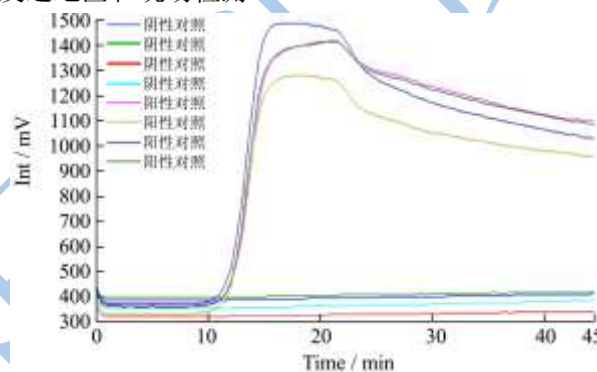
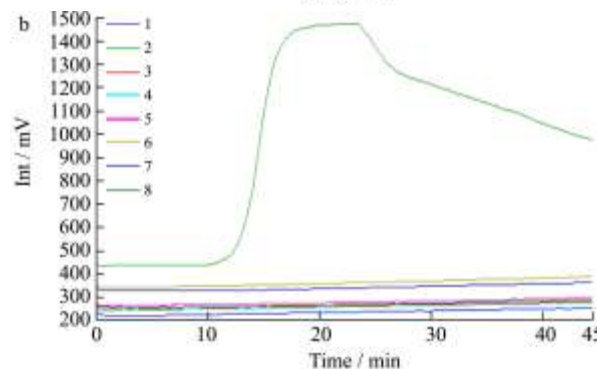
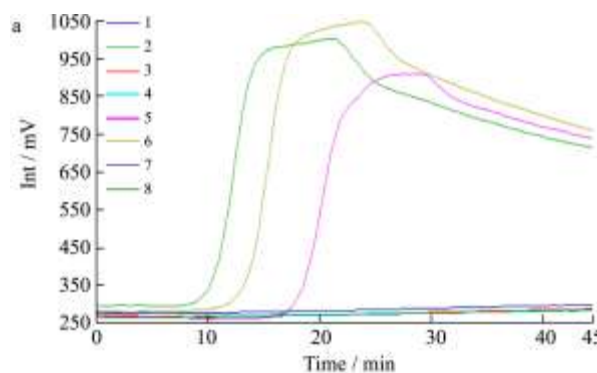


图 1 引物反应效率的检测

Fig.1 Efficiency of LAMP primers

### 2.2 特异性实验



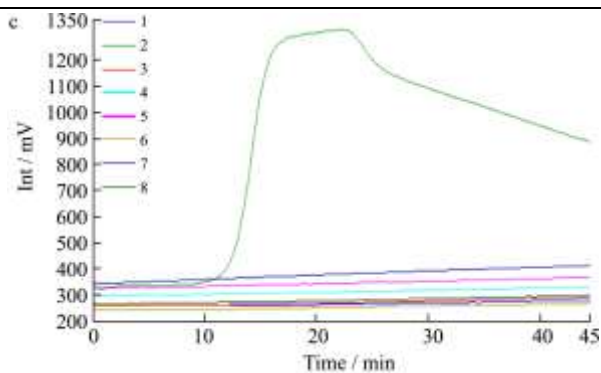


图2 LAMP 引物特异性

Fig.2 Specificity of LAMP reaction

注：a：1. 阴性对照，2. 阳性对照，3. 藤黄微球菌 CMCC28001，4. 鲍氏志贺氏菌 CMCC51346，5. 金黄色葡萄球菌 CMCC26003，6. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538，7. 普通变形杆菌 N1CPB490059，8. 单增李斯特氏菌 ATCC19115/413；b：1. 阴性对照，2. 阳性对照，3. 阪崎肠杆菌 ATCC29544，4. 奇异变形杆菌 HB7131，5. 大肠杆菌 CMCC44102，6. 创伤弧菌 ATCC27562，7. 大肠杆菌 O157ATCC43889，8. 大肠杆菌 ATCC25922；c：1. 阴性对照，2. 阳性对照，3. 宋内氏志贺氏菌 N1CP51334，4. 克雷伯氏菌，5. 沙门氏菌 ATCC14028，6. 副溶血性弧菌 ATCC17802，7. 绿脓杆菌 ATCC9027，8. 阪崎肠杆菌 ATCC12868。

从图2的结果来看，本实验选取的常见的病原菌均未出现扩增，而金葡菌在20 min内被特异性地检测出来，说明该引物对金葡菌检测的特异性较好。

### 2.3 灵敏度实验

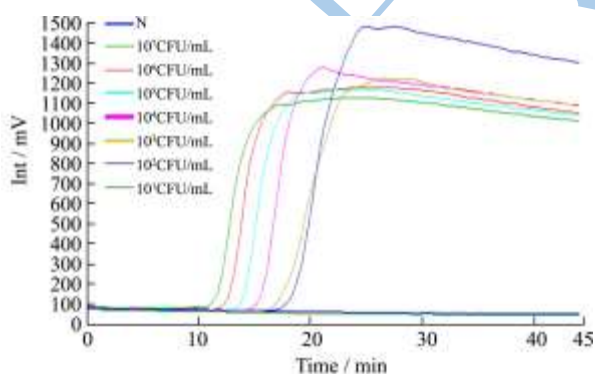


图3 LAMP 引物灵敏度

Fig.3 Sensitivity of LAMP primers

图3显示恒温实时荧光法对金黄色葡萄球菌 ATCC6538，金黄色葡萄球菌CMCC26003检测的灵敏度为100 CFU/mL，图4显示荧光PCR的方法的检测灵敏度约为1000 CFU/mL，两者相比较，恒温实时荧光法比荧光PCR法要高约10倍，可见恒温荧光法的检测灵敏度要更高。

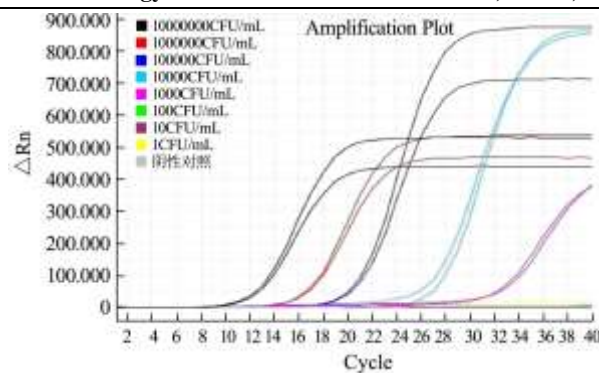


图4 荧光定量 PCR 引物灵敏度

Fig.4 Sensitivity of real time PCR primers

### 2.4 食品中分离的金黄色葡萄球菌的验证

从食品中分离的金葡菌50株，恒温荧光法检出50株为阳性，其检出率为100%；实时荧光PCR法检出50株为阳性，其检出率为100%。

表3 恒温荧光法和实时荧光PCR法对野生金葡菌的检测

Table 3 Detection of wild Staphylococcus aureus with ESEQuant tube scanner and Real-time PCR

菌株	菌株数	LAMP 检测阳性菌株数	荧光定量 PCR 检测阳性菌株数
单核增生李斯特氏菌 ATCC19115/413	1	0	0
沙门氏菌 ATCC14028	1	0	0
大肠杆菌 O157ATCC43889	1	0	0
阪崎肠杆菌 ATCC29544	1	0	0
绿脓杆菌 ATCC9027	1	0	0
大肠杆菌 ATCC25922	1	0	0
大肠杆菌 CMCC44102	1	0	0
阪崎肠杆菌 ATCC12868	1	0	0
副溶血性弧菌 ATCC17802	1	0	0
创伤弧菌 ATCC27562	1	0	0
鲍氏志贺氏菌 CMCC51346	1	0	0
宋内氏志贺氏菌 N1CP51334	1	0	0
普通变形杆菌 N1CPB490059	1	0	0
奇异变形杆菌 HB7131	1	0	0
克雷伯氏菌 CMCC(B)46117	1	0	0
藤黄微球菌 CMCC28001	1	0	0
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	1	1	1
金黄色葡萄球菌 CMCC26003	1	1	1
金黄色葡萄球菌 (食品中分离的野生金黄色葡萄球菌株)	50	50	50

恒温实时荧光检测方法是实时荧光和LAMP技术结合的一种简便、快速、高度特异性的基因扩增系

统。本文的研究内容是将ESE恒温实时荧光仪器与LAMP检测方法结合,并引入荧光染料,实现检测结果的数据化、自动化。恒温实时荧光检测技术结合了LAMP及实时荧光技术的优点。利用恒温实时荧光检测系统ESE-Quant Tube Scanner 实现对核酸扩增的实时监测。实时荧光LAMP技术相对于常规LAMP技术而言,具有的优势为:实时荧光LAMP检测的是荧光信号,因此比传统的检测浊度的LAMP技术更加灵敏和快速,通常10~30 min即可完成检测;实时荧光LAMP技术采用全程闭管检测,避免了传统LAMP中因开盖导致的交叉污染,避免了假阳性结果的产生;并且本研究中所采用的实时荧光检测系统ESEQuant Tube Scanner具有轻便、易携带和易操作等优点,并且仪器含有备用干电池,因此可以实现现场快速检测。

### 3 结论

本研究针对金葡菌的nuc基因设计特异性的LAMP引物在ESEQuant tube scanner仪器上的出峰时间为11 min左右,对金葡菌的靶标基因具有很好的扩增效率。对非金葡菌进行LAMP的扩增,均未出现非特异性的扩增,说明该引物对金葡菌有较好的扩增能力。LAMP方法灵敏度高,该引物对纯培养物中的金葡菌的检测限可以达到1000 CFU/反应。在完成实验室的筛选、优化工作后,进行稳定性试验,结果显示具有很好的稳定性,对金葡菌的检出率可达到100%。总的来说,本研究建立的金葡菌的恒温荧光检测的方法具有特异性强、灵敏度高、操作简单、成本低等特点,为食品中金葡菌的检测提供了新的发展方向。这对我国的食品卫生、进出口食品安全具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] 姜延龙,张宇,田波,等.PCR 技术检测金黄色葡萄球菌进展[J].食品科学,2006,27(5):265-269  
Jiang Y L, Zhang Y, Tian B, et al. Review on Progress of *Staphylococcus aureus* Assay by PCR [J]. Food Science. 2006, 27(5): 265-269
- [2] Gabriela Na, Jera-Sa, Ncheg, et al. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods [J]. Journal of Food Protection.2003, 66(6): 1055-1062
- [3] Francis Msrtineau, Franc Oisj, Picard, et al. Species-specific and ubiquitous- DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Clinical Microbiology. 1998, 3: 618-623
- [4] 封莉,黄继超,刘欣,等.食源性致病菌快速检测技术研究进展[J].食品科学,2012,33(21):332-339  
Feng L, Huang J C, Liu X, et al. Research Progress on Rapid Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens [J]. Food Science, 2012, 33(21): 332-339
- [5] 杜艳艳.生物芯片技术在食品安全检测中的应用前景[J].现代仪器,2009,4:10-12  
Du Y Y. Application Prospects of Biochip Technology in Food Safety Testing [J]. Modern Instruments, 2009, 4: 10-12
- [6] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research. 2000, 28 (12): 63-68
- [7] Zheng C, Xie P, Chen Y. Recombinant Mycobacterium bovis BCG producing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum FCC-1/HN strain induces strong immune responses in BALB/c mice [J]. Parasitology International, 2002, 51: 1-7
- [8] Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, et al. Detection of four Plasmodium species by genus- and species-specific loop mediated isothermal amplification for clinical diagnosis [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45: 2521-2528
- [9] Paris DH, Inwong M, Faiz AM, et al. Loop mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria [J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2007, 77: 972-976
- [10] Lucchi NW, et al. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria [J]. PloS one, 2010, 5(10): e13733