

金黄色葡萄球菌 DPO-PCR 快速检测方法的建立与应用

李丹丹¹, 徐义刚^{*2}, 邱索平³, 王昱⁴, 高会江⁵, 高慎阳⁶

(1. 海南出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 海南 海口 570311; 2. 东北农业大学 动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 从化出入境检验检疫局, 广东 从化 510900; 4. 重庆出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 重庆 404100; 5. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 6. 辽宁医学院 畜牧兽医学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 为建立检测金黄色葡萄球菌(SA)的 PCR 方法, 以 SA Sa442 基因为靶基因设计了一对双启动寡核苷酸引物(DPO), 建立了 SA 的 DPO-PCR 快速检测方法。结果显示, 在 45~65 °C 退火温度范围内均能高效地扩增出目的基因, 表明 DPO 引物对退火温度不敏感, 该方法的灵敏度为 2.27×10^2 cfu/mL, 同时 DPO 引物特异性强, 与其他菌株无非特异性扩增反应。利用该方法和行标法分别对采集的 175 份样品进行检测, 均共计检出 13 份 SA 阳性样品, 两者符合率为 100%。作者建立的 DPO-PCR 方法设计简单、特异性强, 具有良好的实用性, 为快速准确检测 SA 提供新的检测手段。

关键词: 金黄色葡萄球菌; Sa442 基因; DPO-PCR

中图分类号: R 37 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)04—0419—05

A DPO- PCR Method for the Rapid Detection of *Staphylococcus aureus*

LI Dandan¹, XU Yigang^{*2}, QIU Suoping³, WANG Yu⁴, GAO Huijiang⁵, GAO Shenyang⁶

(1. Inspection & Quarantine Technology Center of Hainan Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Haikou 570311, China; 2. College of Veterinary Medicine Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; 3. Conghua Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Conghua, 510900, China; 4. Inspection & Quarantine Technology Center of Chongqing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing 404100, China; 5. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 6. Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: A dual-priming oligonucleotide (DPO)-based PCR was developed for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* (SA) using Sa442 of SA as a target gene. DPO primers were able to efficiently amplify the target gene in a temperature range from 45 °C to 65 °C, indicating that the

收稿日期: 2014-11-23

基金项目: 海南省社会发展科技专项(2015SF29); 国家质检总局科技项目(2013IK031, 2013IK051, 2015IK089); 重庆市科技计划项目(cstc2014yykfA80017); 海南省应用技术研究与开发专项项目(ZDXM20130025); 广东检验检疫局科技计划项目(2013GDK04, 2015GDK53)。

作者简介: 李丹丹(1979—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 农学博士, 高级兽医师, 主要从事病原微生物诊断与防治技术研究。

E-mail: 108074182@qq.com

* 通信作者: 徐义刚(1978—), 男, 吉林汪清人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事病原微生物诊断与防治技术研究。

E-mail: esta123@126.com

DPO-PCR method was not sensitive to the annealing temperature. The DPO-PCR sensitivity was 2.27×10^2 cfu/mL. Because of a high specificity of DPO-PCR due to the special structures of DPO primers, no non-specific amplifications were produced in reaction. In addition, 13 positive samples for SA were detected from 175 clinical samples by the DPO-PCR method, which was in accordance with the result by the SN/T 1870-2007 standard detection protocol. Therefore, the DPO-PCR could be used as a sensitive, rapid and simple tool.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Sa442 gene, DPO-PCR

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是一种重要的人畜共患病致病菌, 具有重要的公共卫生意义。在食品微生物检验工作中, 金黄色葡萄球菌是进出口动物性食品必检的食源性致病菌。食物中自带的 SA 主要是由原料带入或在生产、包装和烹调过程中污染, 在通风不良的高温环境中, 易滋生该菌并产生肠毒素, 人类因饮食受其污染的食品而感染^[1-2], 主要引起食物中毒、肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等, 甚至引起败血症、脓毒症等全身性感染^[3-4]。因此, 建立快速、准确而且操作简便的检测方法对预防 SA 的感染和保障食品安全具有重要意义。

传统的增菌、分离和生化鉴定方法, 特异性差、灵敏度低且耗时长、操作繁琐、受环境及主观因素影响大。通常情况下, 鉴定一种细菌需要 5~7 d, 严重影响检测效率^[5-6]。聚合酶链反应 (PCR) 技术具有快速、特异性强和灵敏度高等特点, 是目前病原微生物检测主要采用的检测技术之一。引物设计是建立有效 PCR 方法的关键。但是, 在设计引物时, 为了防止非特异性扩增, 不仅需要对引物进行筛选还要优化退火温度, 因此引物设计工作量加大, 检测效率不高。

双启动寡核苷酸引物 (dual -priming oligonucleotide, DPO) 是一种新型的引物设计方法, DPO 引物设计简单且对退火温度不敏感, 引物设计过程中不需要对引物进行筛选以及对退火温度进行优化, 简化了普通 PCR 方法引物设计和反应条件优化步骤^[7-10]; 另外, DPO 引物与模板发生错配的几率小, 因为只要有 3 个以上碱基发生错配, 就不会成功扩增^[11-12], 比常规 PCR 引物的特异性更强, 所以利用 DPO 引物建立的 PCR 方法, 其检测结果比常规 PCR 方法更为精确。作者利用该技术, 建立了 SA DPO-PCR 快速检测方法, 为快速准确检测 SA 提供新的检测手段。

1 材料与方法

1.1 菌株

标准菌株来自美国典型菌种保藏中心 (ATCC), 分离株由海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心实验室和黑龙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心实验室分离保存 (见表 1)。细菌培养基购于北京陆桥技术有限公司。

表 1 试验用菌株

Table 1 Bacteria stains

细菌	来源	数量
空肠弯曲菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	1
肠出血性大肠埃希菌 O ₁₅₇ :H ₇ <i>Escherichia coli</i> O ₁₅₇ :H ₇	ATCC 35150	1
单核细胞增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	1
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	分离株 Isolate	13
阪崎肠杆菌 <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 51329	1
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	1
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1
产肠毒素大肠埃希菌 <i>Enterotoxigenic E. coli</i>	ATCC 35401	1
志贺菌 <i>Shigella</i>	ATCC 12022	1
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	1
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	分离株 Isolate	3
小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	1
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	1
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 51394	1
创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	1
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 33787	1
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 27519	1

1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN

公司,增菌培养基 BPW 购自北京兰伯瑞公司,TaqDNA 聚合酶、dNTP、MgCl₂ 均购自 TaKaRa 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 以 SA 高度保守的 Sa442 基因为靶基因,经BLAST 分析,选取 Sa442 基因保守区域

设计 DPO 引物,详见表 2,引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3.2 细菌 DNA 提取 将表 1 中的菌株分别接种于 5 mL BPW 培养基中,培养过夜,取 1 mL 菌液,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA,-

表 2 引物序列

Table 2 Primers used in this study

引物类型	名称	引物序列	产物大小/bp
常规引物	S442-CGF	5'-TCAATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACGACTA-3'	434
	S442-CGR	5'-TCATTTTACGGTGACTTCTTAGAAGATTCACATCGTTG-3'	
DPO 引物	S442-DPOF	5'-TCAATCTTTGTCGGTACACGATAIIIIHCACGACTA-3'	434
	S442-DPOR	5'-TCATTTTACGGTGACTTCTTAGAAGIIIIHCATCGTTG-3'	

20 ℃保存备用。试剂盒法提取细菌。

1.3.3 DPO-PCR 反应 25 μL 反应体系:10×PCR Buffer(Mg²⁺ free)2.5 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.1 μL,Mg²⁺(25 mmol/L)2.5 μL,dNTP(2.5 mmol/L)1.5 μL,上/下游 DPO 引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,DNA 模板 1.0 μL,去离子水补充至 25 μL。

反应程序:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s、59 ℃ 45 s、72 ℃ 45 s,30 个循环;72 ℃终延伸 10 min,经琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.3.4 DPO-PCR 退火温度不敏感性试验 退火温度范围设为 45~65 ℃,以常规引物 PCR 方法作为参照,进行 DPO-PCR 扩增试验,经琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.3.5 DPO-PCR 灵敏度实验 将菌体浓度约为 2.27×10⁸ cfu/mL 的 SA 进行 10 倍梯度稀释,经试剂盒提取每级稀释度细菌 DNA,以此作为模板进行 DPO-PCR 反应,经琼脂糖凝胶电泳检测确定其检测灵敏度。

1.3.6 DPO-PCR 特异性实验 利用建立的 SA DPO-PCR 检测方法检测表 1 中所示的菌株,以验证本方法的特异性。

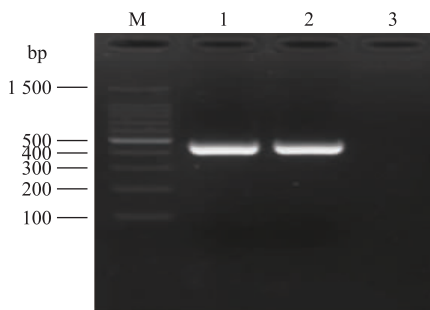
1.3.7 方法验证 将建立的 SA DPO-PCR 检测方法应用于检验检疫实践工作中,其检测结果经传统方法复验,以验证该方法的可靠性。

2 结果

2.1 SA DPO-PCR 检测方法的建立

以 SA 高度保守的 Sa442 基因为靶基因,设计 DPO 引物,经反应体系优化,建立了 SA DPO-PCR

检测方法,经琼脂糖凝胶电泳检测在约 434 bp 处有特异性电泳条带(图 1)。



M:DNA marker 100 ladder;1-2:阳性结果;3:阴性对照

图 1 SA DPO-PCR 检测方法的建立

Fig. 1 Development of DPO-PCR method for *Staphylococcus aureus*

2.2 DPO-PCR 退火温度不敏感性

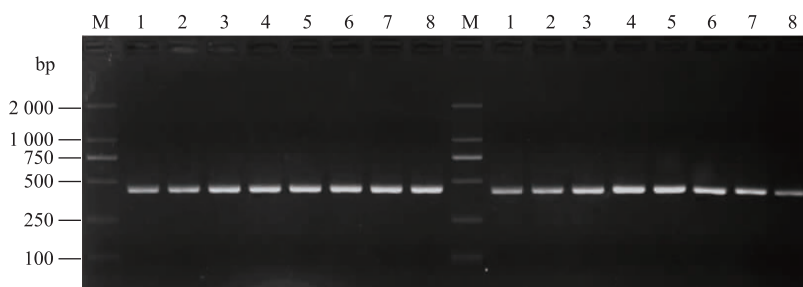
在 45~65 ℃的退火温度范围内,利用设计的 DPO 引物均能高效地扩增出目的基因,说明 DPO 引物对退火温度不敏感,而常规 PCR 引物则存在最适退火温度(图 2)。

2.3 DPO-PCR 方法检测灵敏度

灵敏度试验结果显示,利用建立的 DPO-PCR 方法能够有效地检测出浓度为 2.27×10² CFU/mL 的 SA,即该方法检测 SA 的灵敏度为 2.27×10² CFU/mL (图 3)。

2.4 DPO-PCR 方法检测特异性

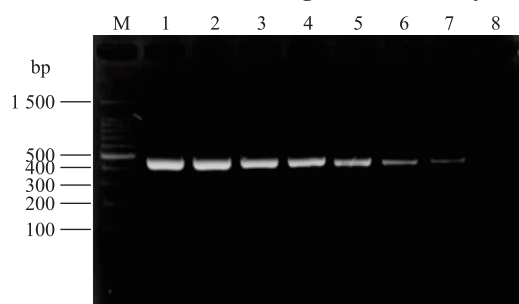
利用建立的 DPO-PCR 方法检测表 1 中所示细菌,仅 SA 为 DPO-PCR 阳性,其它菌株为阴性,且无非特异性扩增(图 4(a)),而常规 PCR 方法特异性较差,存在交叉反应(图 4(b))。



M: DNA marker 2000.1~8:45.3,48.5,53.4,56.1,58.7,61.1,63.1,65.1 °C; 左边 1~8 为 DPO 引物 PCR 扩增结果, 右边 1~8 为常规引物 PCR 扩增结果。

图 2 DPO 引物退火温度不敏感性

Fig. 2 Insensitivity of DPO primers for the annealing temperatures



M: DNA marker 100 Ladder; 1: 2.27×10^8 cfu/mL; 2: 2.27×10^7 cfu/mL; 3: 2.27×10^6 cfu/mL; 4: 2.27×10^5 cfu/mL; 5: 2.27×10^4 cfu/mL; 6: 2.27×10^3 cfu/mL; 7: 2.27×10^2 cfu/mL; 8: 2.27×10^1 cfu/mL

图 3 SA DPO-PCR 检测方法灵敏度

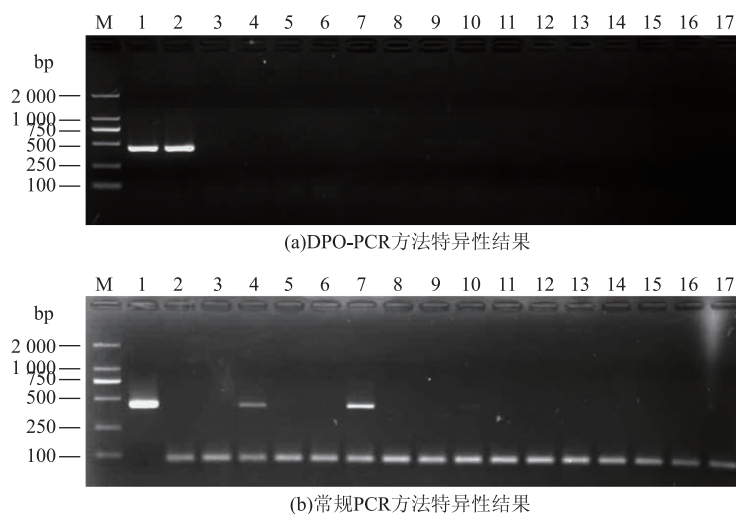
Fig. 3 Detection sensitivity of DPO –PCR for *Staphylococcus aureus*

2.5 方法实践应用

利用建立的金黄色葡萄球菌 DPO-PCR 方法对 175 份肉类、果蔬类、鲜牛奶和鸡蛋等样本进行检测, 共检出 13 份 SA 阳性样本, 经行标法(SN/T 1870-2007)复检, 两者检测结果一致, 显示出良好的实用性和可靠性。

3 结 语

目前, 包括中国在内的绝大多数国家针对食源性致病菌的检测仍主要依靠传统细菌分离鉴定的方法, 即首先利用选择性培养基增菌, 进而结合生化及血清学方法进行鉴定。传统检测方法存在检测效率低、灵敏度低且耗时长、操作繁琐等不足。通常情况下, 鉴定一种细菌需要 5~7 d, 而针对一些生化



(a)DPO-PCR方法特异性结果

(b)常规PCR方法特异性结果

注: M: DNA marker 2000. 1-17 依次为: SA ATCC 29213, SA 分离株、沙门氏菌 ATCC 10708、嗜水气单胞菌 ATCC 7966、溶血性链球菌 CMCC 32121、单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 19111、空肠弯曲菌 ATCC 33560(图 4-B:2)、志贺氏菌 ATCC 12022、小肠结肠炎耶尔森氏菌 ATCC 9610、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 ATCC 35150、粘质沙雷菌 ATCC 14756、嗜水气单胞菌 ATCC 7966、变形杆菌 ATCC 49027 霍乱弧菌 ATCC 14035、副溶血弧菌 ATCC 27519、创伤弧菌 ATCC 33149、阪崎肠杆菌 ATCC 51329。

图 4 SA DPO-PCR 检测方法的特异性

Fig. 4 Specificity of DPO-PCR for *Staphylococcus aureus*

特性复杂的细菌,如单增李斯特氏菌的检测周期可长达 20 d 之久,严重影响了检测鉴定的周期,很难适应现代化食品安全快速检测的需要。SA 作为一种重要的食源性致病菌亦是进出口动物性食品必检微生物。因此,建立快速、准确的检测方法对防止 SA 的感染和提高 SA 的检测效率具有重要意义。

PCR 技术具有快速、特异性强和灵敏度高等特点,是目前食源性致病菌检测主要采用的检测技术之一。在此基础之上,又相继发展了 DNA 探针技术、实时荧光 PCR 技术以及 PCR 结合变性高效液相色谱(DHPLC)技术等,虽然能够满足快速检测的需求,但是对引物设计的要求很高,不仅需要对引物进行筛选,而且需要优化退火温度,增加了试验操作步骤,费时又费力。作者引入一种新颖的 dual priming oligonucleotide (DPO) 引物设计方法,DPO 引物结构特殊,具有比常规 PCR 引物更强的特异性,并且引物自身以及引物间难形成二级结构且对

退火温度不敏感,试验过程中不需要对引物进行筛选以及对退火温度进行优化,简化了操作步骤,提高了检测效率。

基于 DPO 引物的设计方法建立了 SA 的 DPO-PCR 特异性检测方法。试验结果显示,利用设计的 DPO 引物在 45~65 °C 的退火温度范围内均可实现 SA 靶基因的高效扩增,不需要对退火温度进行优化,而常规 PCR 引物则存在最适退火温度。灵敏度试验结果显示,利用建立的 DPO-PCR 方法能够有效地检测出浓度为 2.27×10^2 CFU/mL 的 SA。特异性结果显示,利用设计的 DPO 引物能够准确地检测出目标菌 SA,与其它菌株无交叉反应和非特异性扩增,而常规 PCR 方法特异性较差,存在交叉反应。临床样品检测结果表明,利用建立的 SADPO-PCR 检测方法能够对实际样品中的 SA 进行准确检测,与行标法(SN/T 1870-2007)的检测结果一致,具有良好的实用性。

参考文献:

- [1] 刘金华,王蓓蕾,马路遥,等. 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157、普通变形杆菌和副溶血弧菌多重 PCR 检测体系的构建[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(12):1120-1124.
LIU Jinhua, WANG BeiLei, MA Luyao, et al. Development and application of the multiplex PCR method for the detection of *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157, *Proteus vulgaris* and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. **Chinese Journal of Immunology**, 2012, 28(12): 1120-1124. (in Chinese)
- [2] Sagoo S K, Little C L, Greenwood M, et al. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom[J]. **Food Microbiology**, 2013, 26: 39-43.
- [3] 索玉娟,于宏伟,凌巍,等. 食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究[J]. 中国食品学报,2008,8(3):88-93.
SUO Yujuan, YU Hongwei, LING Wei, et al. Analysis on the contamination of *Staphylococcus aureus* in food [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2008, 8(3): 88-93. (in Chinese)
- [4] Rall V L, Vieira F P, Rall R, et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk[J]. **Veterinary Microbiology**, 2008, 132(3-4): 408-413.
- [5] 徐晓可,吴清平,张菊梅,等. 食品中金黄色葡萄球菌多重 PCR 检测方法的研究[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(1):84-89.
XU Xiaoke, WU Qingping, ZHANG Jumei, et al. Studies on Detection of *Staphylococcus aureus* in Foods by Multiplex PCR[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(1): 84-89. (in Chinese)
- [6] Altekruze S F, Stern N J, Fields P I, et al. *Campylobacter jejuni* an emerging food borne pathogen [J]. **Emerging Infectious Diseases**, 2012, 5(1): 28-35.
- [7] Ryan M M. Guillain-Barre syndrome in childhood[J]. **Journal Paediatrics and Child Health**, 2011, 41: 237-241.
- [8] Colwell R R. Global climate and infectious diseases; the cholera paradigm[J]. **Science**, 2011, 274: 2025-031.
- [9] Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrio [J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2012, 68(3): 403-431.
- [10] 王娜,陶妍. 水产品三种致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(3):397-402.
WANG Na, TAO Yan. Establishment of a multiplex PCR for detection of three types of pathogen in aquatic foods[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3): 397-402. (in Chinese)
- [11] Chun J Y, Kim K J, Hwang I T, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene[J]. **Nucleic Acids Res**, 2013, 35(6): 4046.
- [12] WOO H Y, PARK H, KIM B I, et al. Evaluation of dual priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR for detection of HBV YMDD mutants[J]. **Archives of Virology**, 2013, 153(11): 2019-2025.