

李晓霞, 贾 森, 金君华, 等. 原料乳中金黄色葡萄球菌环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1171-1175.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.032

原料乳中金黄色葡萄球菌环介导等温扩增(LAMP) 检测方法的建立及应用

李晓霞, 贾 森, 金君华, 张红星, 刘 慧, 谢远红

(北京农学院食品科学与工程学院, 农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室/食品质量与安全北京实验室, 北京 102206)

摘要: 为了建立原料乳中金黄色葡萄球菌的环介导等温扩增(LAMP)检测方法, 本研究根据金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因(*nuc*)在保守区域设计特异性引物, 建立 LAMP 检测方法, 并用于原料乳中金黄色葡萄球菌的快速检测。结果表明, 针对金黄色葡萄球菌的基因组 DNA, 使用设计合成的 4 条引物和建立的 LAMP 方法能够有效检测金黄色葡萄球菌 DNA, 每 25.0 μ l 反应体系的灵敏度为 110.0 fg, 并且此方法针对金黄色葡萄球菌具有良好的特异性。针对原料乳中金黄色葡萄球菌的污染, 建立的 LAMP 检测方法的检测限为 67 CFU/ml。本研究结果为进一步将 LAMP 方法应用于食品中金黄色葡萄球菌的安全检测奠定了基础。

关键词: 环介导等温扩增(LAMP); 金黄色葡萄球菌; 耐热核酸酶基因(*nuc*); 灵敏度; 特异性

中图分类号: TS207.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-1171-05

Establishment and application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of *Staphylococcus aureus* in raw milk

LI Xiao-xia, JIA Miao, JIN Jun-hua, ZHANG Hong-xing, LIU Hui, XIE Yuan-hong

(College of Food Science and Engineering, Beijing Agricultural College/Beijing Key Laboratory of Detection and Control of Spoilage Organisms and Pesticide Residues in Agricultural Products/Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing 102206, China)

Abstract: The loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method was established and applied in the rapid detection of *Staphylococcus aureus* in raw milk according to the conserved sequence of the heat-tolerant nuclease gene(*nuc*). The genomic DNA of *S. aureus* could be detected using the four primers designed and synthesized, and the detection limit was 110.0 fg per 25.0 μ l reaction system. The method was *S. aureus* specific, with the detection limit of 67 CFU/ml in raw milk. This study provided a basis for further application of LAMP method in the safety detection of *S. aureus* in food.

Key words: loop-mediated isothermal amplification(LAMP); *Staphylococcus aureus*; thermostable nuclease gene; sensitivity; specificity

收稿日期: 2017-04-25

基金项目: 北京市长城学者培养计划项目(CIT&TCD20140315); 北京农学院研究生改革与发展项目(2016YJS048)

作者简介: 李晓霞(1990-), 女, 甘肃定西人, 硕士研究生, 主要从事食品生物检测研究。(Tel) 15652319099; (E-mail) lixiaox-ia0154 @ 163.com

通讯作者: 谢远红, (Tel) 010-80761345; (E-mail) xieyuanh@ 163.com

近年来, 由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒是食品卫生的主要问题之一^[1]。很多有关食物中毒的报道都指出, 金黄色葡萄球菌肠毒素在受污染的牛奶及奶制品中会引起食物中毒^[2]。在中国, 由金黄色葡萄球菌引发的食物中毒事件也频繁发生^[3-4]。

同时,金黄色葡萄球菌也是导致奶牛患乳房炎的重要病原菌,给奶牛产业带来了重大影响^[5-6],全球范围内都把金黄色葡萄球菌检测作为食品安全检测的法定检测项目^[7]。

目前对金黄色葡萄球菌的检测方法主要有国标规定的传统分离鉴定方法、免疫检测方法^[8]以及 PCR 或 RT-PCR 方法^[9-10]等。这些检测方法各有优缺点,分离鉴定方法的检出率达 100%,但操作复杂并且检测周期长,达不到快速检测要求。免疫检测方法周期短,但灵敏度不高。PCR 相关检测方法时间短,但需要精细的试验仪器^[11],并且在乳制品检测中的灵敏度较低^[12]。

环介导等温扩增 (LAMP) 是基于 PCR 技术发展得到的一种新型且有效的核酸快速检测技术^[13],这种检测技术相对于上述检测方法有简单、快速、灵

敏度高、特异性好及对设备要求低等优势,目前已经应用于涉及食品卫生质量检测的各个行业^[14-15]。采用 LAMP 方法进行检测时,通过对靶基因的位点设计内外特异性引物,采用链置换活性的 DNA 聚合酶,在恒温条件下反应一定时间即可在体外扩增到核酸靶序列。本研究拟以金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因 (*nuc*)^[16] 为靶序列,设计特异性引物,建立金黄色葡萄球菌的 LAMP 快速检测方法,并对其灵敏度和特异性进行验证,以期为原料乳中金黄色葡萄球菌的快速检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

本研究使用的菌株及培养条件如表 1 显示。

表 1 试验菌株和培养条件

Table 1 Experimental strains and culture conditions

菌株名称(编号)	培养条件
金黄色葡萄球菌(CMCC26001)	LB 液体培养基,37 ℃,250 r/min 振荡培养 12 h
金黄色葡萄球菌[CMCC(B)54002]	LB 液体培养基,37 ℃,250 r/min 振荡培养 12 h
大肠杆菌(CMCC44110)	LB 液体培养基,37 ℃,250 r/min 振荡培养 12h
伤寒沙门氏菌(CMCC50071)	BPY 液体培养基,37 ℃,250 r/min 振荡培养 12 h
痢疾志贺氏菌(CMCC51105)	营养肉汁液体培养基,37 ℃,250 r/min 振荡培养 12 h
铜绿芽孢杆菌(ATCC 27853)	营养肉汁液体培养基,37 ℃,250 r/min 振荡培养 12 h
单核增生李斯特氏菌(CMCC54003)	Lis 液体培养基,37 ℃,250 r/min 振荡培养 12 h

1.2 试剂与仪器

所用的仪器和试剂有: Isothermal mix (OptiGene 公司产品)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒 DP302-02 [天根生化科技(北京)有限公司产品]、超微量核酸蛋白测定仪 (Analytikjena 公司产品)、荧光等温扩增仪 GENE II 型 (OptiGene 公司产品)。

1.3 研究方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 的提取

表 1 中各菌株基

因组 DNA 的提取方法参考细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作手册。提取得到的基因组 DNA 用超微量核酸蛋白测定仪进行定量。

1.3.2 LAMP 反应引物设计 根据 GenBank 中金黄色葡萄球菌耐热核酸酶 (DQ507380.1) 基因序列,对 *nuc* 序列进行引物设计,分别设计外引物 F3、B3,内引物 FIP、BIP,引物序列如表 2 显示,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 环介等温扩增 (LAMP) 引物序列

Table 2 Primer sequences for loop-mediated isothermal amplification

引物	引物序列(5'→3')
F3	GTTATGCTAATGTGCTGGATT
B3	GCTATCATCCTTAAATCGAATCC
FIP	AGACGATGATGCTCAGCCAGTTTACCATTTGGATATTGATGAACCTA
BIP	TCTTACATCCTTTGCTGCCGTTTATCCTTGCTAGTTTGCCTC

1.3.3 LAMP 检测体系的建立 以提取的金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板,以设计合成的引物进行 LAMP 扩增反应,建立总体积为 25.0 μl 的反应体系(表 3)。将反应溶液混匀,放入荧光等温扩增仪,设置反应温度 63 $^{\circ}\text{C}$,反应时间为 45 min。

表 3 LAMP 反应体系

Table 3 Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) system

试剂(浓度)	体积(μl)
等温扩增混合液	12.5
FIP 引物溶液(400 pmol/ μl)	1.0
BIP 引物溶液(400 pmol/ μl)	1.0
F3 引物溶液(100 pmol/ μl)	1.0
B3 引物溶液(100 pmol/ μl)	1.0
基因组 DNA(110 ng/ μl)	1.0
双蒸水	7.5

1.3.4 LAMP 反应灵敏度的检测 用去离子水对提取的金黄色葡萄球菌基因组 DNA(110 ng/ μl)进行 10 倍梯度稀释,以稀释的基因组 DNA 为模板,采用 LAMP 方法进行扩增,检测 LAMP 引物以及 LAMP 方法的灵敏度。

1.3.5 LAMP 引物特异性检测 为了验证金黄色葡萄球菌 LAMP 方法的特异性,选取金黄色葡萄球菌(2 株)、大肠杆菌(1 株)、伤寒沙门氏菌(1 株)、痢疾志贺氏菌(1 株)、单核增生李斯特氏菌(1 株)和铜绿芽孢杆菌(1 株),按表 1 的培养条件培养,按材料与方法 1.3.1 中的方法提取细菌基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板,采用建立的 LAMP 方法进行特异性验证。

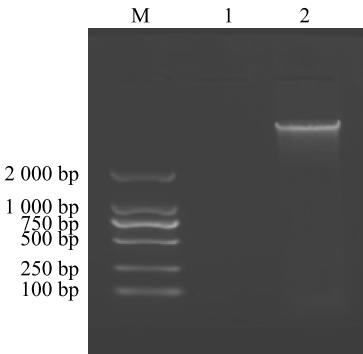
1.3.6 原料乳中金黄色葡萄球菌的检测 对原料乳进行不同数量级的金黄色葡萄球菌人工污染,采用国标方法(GB 4789.10-201X)对金黄色葡萄球菌的菌落进行计数。取 1.0 ml 人工污染金黄色葡萄球菌的原料乳,10 000 r/min 离心 5 min,使用材料与方法 1.3.1 的方法提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA,采用建立的 LAMP 引物进行 LAMP 扩增。

2 结果与分析

2.1 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取

采用细菌基因组提取试剂盒提取金黄色葡萄球菌基因组,检测纯度并确定提取量。结果(图 1)显

示,提取的基因组 DNA 条带单一,经检测 $A_{260/280}$ 为 1.96,纯度符合试验要求,提取量达到 110 ng/ μl 。



M:DL2000 marker;1:空白对照;2:金黄色葡萄球菌基因组 DNA。

图 1 金黄色葡萄球菌基因组 DNA

Fig.1 Genomic DNA of *Staphylococcus aureus*

2.2 金黄色葡萄球菌 LAMP 方法的建立

以金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因 *nuc* 为靶基因,设计 LAMP 反应的 4 条引物,以提取的金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板,63 $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增 45 min。结果(图 2)显示,检测到金黄色葡萄球菌的 LAMP 扩增曲线,且溶解曲线单一,表明合成的引物及建立的方法能够有效检测金黄色葡萄球菌基因组 DNA。

2.3 LAMP 方法检测金黄色葡萄球菌的灵敏度

采用去离子水对提取的金黄色葡萄球菌基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释,采用 LAMP 方法扩增稀释的基因组 DNA。结果(图 3)显示,建立的 LAMP 方法对不同稀释度基因组 DNA 每 25.0 μl 反应体系的灵敏度为 110.0 fg,表明建立的 LAMP 检测方法对金黄色葡萄球菌具有良好的灵敏度。

2.4 LAMP 方法检测金黄色葡萄球菌的特异性

在荧光等温扩增仪上对 2 株金黄色葡萄球菌以及其他 5 株常见致病菌的基因组 DNA 进行特异性扩增。结果(图 4)显示,2 株金黄色葡萄球菌基因组 DNA 均出现明显的扩增曲线,而大肠杆菌、伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、单核增生李斯特氏菌、铜绿芽孢杆菌株都没有特异性扩增曲线,表明根据金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因 *nuc* 设计的引物具有较高的特异性。

2.5 原料乳中金黄色葡萄球菌的检测

原料乳人工污染不同菌数的金黄色葡萄球菌,菌数分别达到 51 CFU/ml、67 CFU/ml、95 CFU/ml 和

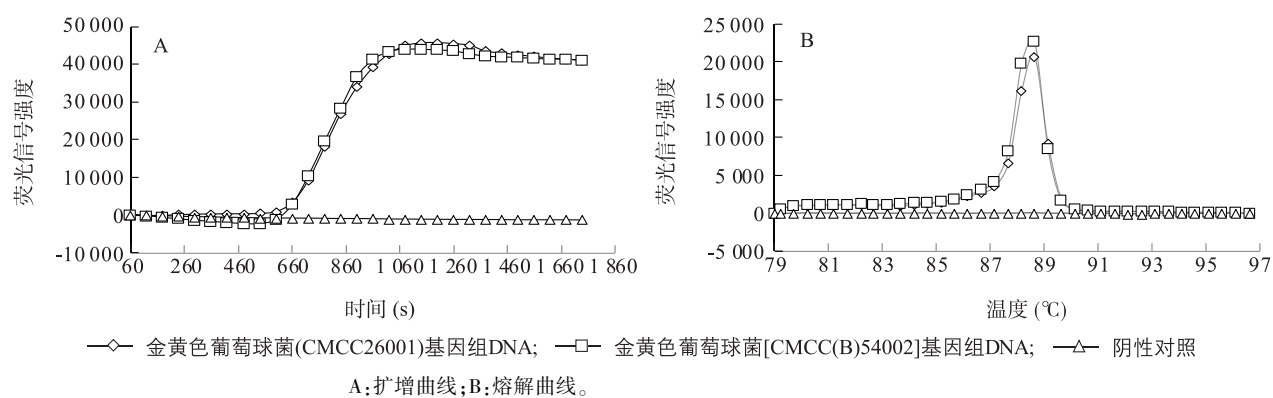


图2 金黄色葡萄球菌 LAMP 扩增曲线

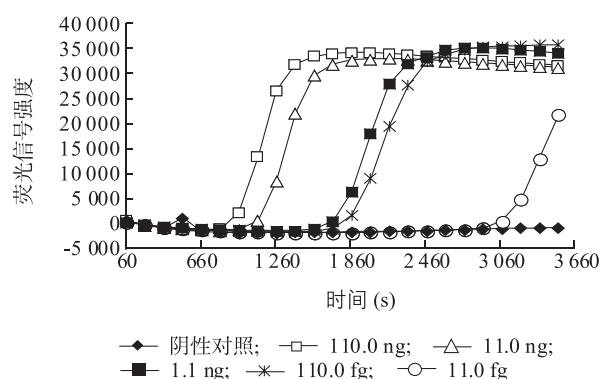
Fig.2 Intercropping isothermal amplification curve of *S. aureus*

图3 金黄色葡萄球菌检测 LAMP 方法的灵敏度

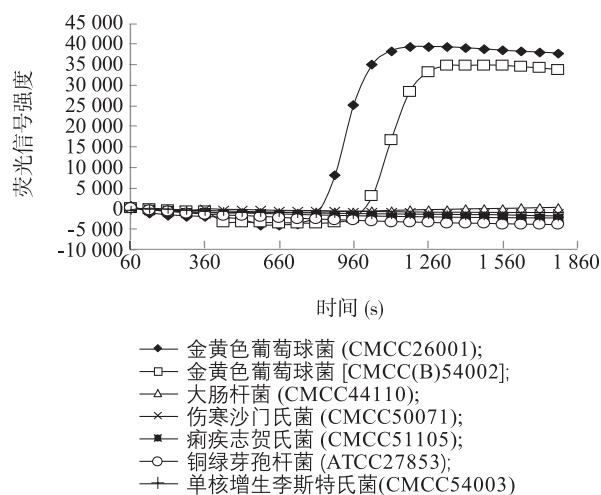
Fig.3 Sensitivity of LAMP for detection of *S. aureus*

图4 LAMP 方法的特异性

Fig.4 Specificity of LAMP for detection of *S. aureus*

110 CFU/ml, 以建立的 LAMP 法进行检测。结果 (图 5) 表明, 当污染的金黄色葡萄球菌菌数达到 67

CFU/ml, 95 CFU/ml 和 110 CFU/ml 时均能够得到阳性扩增曲线, 而污染菌数为 51 CFU/ml 时没有检测到阳性扩增曲线。因此, 采用本研究建立的 LAMP 法检测金黄色葡萄球菌, 在原料乳中对金黄色葡萄球菌的检测限约为 67 CFU/ml。

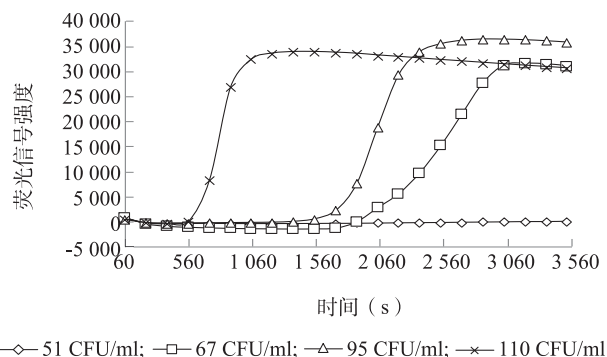


图5 原料乳中金黄色葡萄球菌 LAMP 方法检测结果

Fig.5 Detection of *S. aureus* in raw milk by LAMP

3 讨论

近年来, 由于金黄色葡萄球菌的检测受到检测时间和灵敏度等的限制, 如传统方法检测需要 48 h, PCR 方法受到乳制品中脂肪成分的影响使得检测限为 1×10^5 CFU/ml^[12], 而 LAMP 技术可检测到小于 10 个拷贝数的靶基因, 与其他检测方法相比, 其在检测的灵敏度上有很大的优势^[17-19]。本研究结果表明, LAMP 方法与国标方法的检测准确性^[20]相似。因此, 目前很多研究集中于通过 LAMP 技术或将其与其他技术相结合在基因水平上检测食品中食

源性致病微生物^[18-19]。本研究采用 LAMP 技术,使用荧光等温扩增仪在 63 ℃ 恒温下反应 45 min,检测纯金黄色葡萄球菌基因组 DNA,每 25.0 μl 反应体系的灵敏度为 110.0 fg,远低于传统的 PCR 和 Real time-PCR 检测方法,但能够满足快速检测的要求。

针对 LAMP 方法检测金黄色葡萄球菌,关于靶基因的选择,多集中在肠毒素基因以及与致病性有关的基因^[12]。经 Brakstad 等^[16]、高正琴等^[21]研究发现,耐热核酸酶基因可以作为特异性检测金黄色葡萄球菌的靶基因。本研究针对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因设计 4 条引物^[22],建立快速检测金黄色葡萄球菌的 LAMP 反应体系,在原料乳中的检测限为 67 CFU/ml,这与已有文献报道的结果^[18-19]基本相符,并且其检测时间低于国标中的传统分离鉴定方法的检测时间,为安全、快速检测食品中金黄色葡萄球菌奠定了基础。

参考文献:

- [1] HEIN I, LEHNER A, RIECK P, et al. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(7): 3122-3126.
- [2] ALTEKRUSE S F, TIMBO B B, MOWBRAY J C, et al. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers [J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(10): 1405-1407.
- [3] 宋涛平,邱华丽,王淑娟,等.金黄色葡萄球菌 LAMP 可视化快速检测方法的建立[J].食品与机械,2015(5):55-58.
- [4] 刘晓慧,郭凤柳,贾月梅,等.金黄色葡萄球菌在蔬菜中生长状况分析[J].江苏农业科学,2015,43(8):304-307.
- [5] VINTOV J, AARESTRUP F M, ZINN C E, et al. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 95(1): 133-147.
- [6] 王军,彭永帅,霍军,等.郑州市奶牛隐性乳腺炎病原菌的分离与鉴定[J].江苏农业科学,2016,44(9):254-256.
- [7] 刘景武.PCR 技术检测肉及肉制品中金黄色葡萄球菌研究[D].保定:河北农业大学,2006.
- [8] 吕琦,赵凤,毕宇涵,等.原料乳中多种致病菌的快速过滤富集及多重 PCR 检测[J].食品与发酵工业,2008,34(12): 155-159.
- [9] 田静,计融,杨军,等.PCR 方法快速检测食品中的金黄色葡萄球菌[J].卫生研究,2007,36(2):183-186.
- [10] SABET N S, SUBRAMANIAM G, NAVARATNAM P, et al. Detection of *mecA* and *ermA* genes and simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* using triplex real-time PCR from Malaysian *S. aureus* strain collections[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, 29(5): 582-585.
- [11] 曾冰冰,肖凯军,石磊,等.LAMP 方法在食品微生物检测中的应用[J].现代食品与药品杂志,2007,17(1):22-25.
- [12] 陈文秀,张伟.实时荧光环介导等温扩增技术检测婴幼儿奶粉中阪崎肠杆菌的研究[D].保定:河北农业大学,2014.
- [13] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [14] 苑学霞,张树秋,冯静,等.用环介导等温扩增方法检测牛奶中致病微生物[J].农产品质量与安全,2015(5):41-44.
- [15] JAYAWARDENA S, CHEUNG C Y, BARR I, et al. Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1) virus[J]. Emerging Infectious Diseases, 2007, 13(6): 899-901.
- [16] BRAKSTAD O G, AASBAKK K, MAELAND J A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30(7): 1654-1660.
- [17] 于颖.实时荧光 LAMP 技术检测牛乳中金黄色葡萄球菌的研究[D].保定:河北农业大学,2015.
- [18] SOWMYA N, THAKUR M S, MANONMANI H K. Rapid and simple DNA extraction method for the detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* directly from food samples: comparison of PCR and LAMP methods[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(1): 106-113.
- [19] 张涛涛,王兰,龚频,等.环介导等温扩增技术快速检测金黄色葡萄球菌[J].江苏农业科学,2014,42(2):238-241.
- [20] 唐梦君,周生,葛庆联,等.应用 LAMP 快速检测金黄色葡萄球菌的研究[J].现代食品科技,2011,27(6):719-722.
- [21] 高正琴,邢华,李厚达.PCR 技术在检测鼠金黄色葡萄球菌中的应用研究[J].中国实验动物学报,2003,11(1):26-28.
- [22] 陆扁,朱水荣,丁水军.环介导等温扩增 PCR 技术检测金黄色葡萄球菌毒素基因的研究[J].中国卫生检验杂志,2010,20(5):1088-1089.

(责任编辑:王妮)