

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.

环介导等温扩增技术快速检测金黄色葡萄球菌

张涛涛¹,王 兰¹,龚 频¹,陈福欣²

(1. 陕西科技大学生命科学与工程学院,陕西西安 710021; 2. 西安科技大学化学与化工学院,陕西西安 710054)

摘要:研究了用环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测金黄色葡萄球菌的方法。首先根据金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因 *nuc* 中的保守序列设计特异性引物,建立并优化反应条件,然后通过对金黄色葡萄球菌及其他菌种的对比试验,验证引物的特异性并确定方法的检测限。结果表明:在用加环引物的条件下,LAMP 反应体系于 60 ℃ 反应 35 min 即可扩增成功,而用未加环的引物则需 45 min 才能看到白色絮状沉淀。对 2 株金黄色葡萄球菌、3 株大肠杆菌、1 株醋酸杆菌、1 株沙门氏菌进行同步检测,结果发现 2 株金黄色葡萄球菌均显示阳性,而其他菌株均显示阴性。研究确定了 LAMP 检测纯培养的金黄色葡萄球菌的最低检测限为 100 fg,比 PCR 的最低检测限低 2 个数量级。由研究结果可以看出,LAMP 法检测金黄色葡萄球菌操作简便,有较高的特异性、灵敏度,为快速检测食品中的致病菌提供了较好的技术平台。

关键词:环介导等温扩增技术;金黄色葡萄球菌;耐热核酸酶基因 *nuc*;快速检测

中图分类号:TS207.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)02-0238-03

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是食品中的三大致病菌之一^[1],在自然界中广泛存在。随着抗生素的广泛使用,出现了大量的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,这些金黄色葡萄球菌均可以产生导致人们食物中毒的 SEs、TSST 等毒力因子^[2]。据美国疾病控制中心显示,美国在近年来由于金黄色葡萄球菌而导致的食品中毒事件占 33%,居世界第二位^[3],而我国由金黄色葡萄球菌引起的食品中毒事件更是屡见不鲜。

目前我国对于金黄色葡萄球菌包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的检测方法以微生物培养法为主,但其检测时间长、灵敏度相对不高;而传统的核酸扩增技术,如 PCR、实时 PCR 及链置换扩增法等,虽然检测时间相对较短,但在实际操作中仍然存在仪器昂贵、误差大等诸多缺陷^[4],从而限制了这些传统的检测技术在基层的广泛推广。因此,目前亟需建立一种高效、快速且特异性强、灵敏度高的检测方法。

环介导等温扩增方法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种由日本科学家 Notomi 开发的新型核酸扩增技术,其原理是在 Bst 酶作用下进行的一种自动式链置换合成 DNA 的反应^[5]。LAMP 法在 65 ℃ 左右的恒温条件下反应约 50 min 即可明显观察到白色絮状沉淀,相比 PCR 技术,无需 DNA 变性,不需要长时间的热循环及电泳检测,是一种高效、特异性强、灵敏度高的分子检测技术。张琳等将

LAMP 结合荧光技术应用于 IBV 病毒检测^[6],李永刚等对金黄色葡萄球菌的产肠毒素基因 *fem* 进行了检测^[7],唐梦君等以金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶 *nuc* 基因作为靶基因设计了 2 对引物,即外引物、内引物^[8]。本研究以金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因为靶基因设计了 3 对特异性引物,即外引物、内引物、环引物,在此基础上进行 LAMP 反应条件的优化,并进行引物的特异性鉴定及检测限的确定。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器与试剂

主要仪器有 PCR 扩增仪(MJ Research),凝胶成像系统,冷冻高速离心机,DDC-10C 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),水浴锅等。

主要生化试剂有 Bst 聚合酶, *Taq* 聚合酶, dNTPs, DNA marker 等,均购自宝生物工程(大连)有限公司;无水乙醇购自天津天力化学试剂有限公司;培养基牛肉膏、酵母膏、蛋白胨等均购自北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 试验菌种

金黄色葡萄球菌(ATCC14458)、酿脓链球菌(ATCC19615)、沙门氏菌(ATCC14028)由中国普通微生物菌种保藏中心提供;金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠杆菌(ATCC35218)由中国药品生物制品检定所提供;大肠杆菌(CMCC44752)由中国医学细菌保藏管理中心提供;大肠杆菌(O157:H7)为实验室保藏。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中公布的金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的保守序列,采用引物设计软件 Primer Explore 3.0 进行引物设计,筛选得到一套引物,包括外引物、内引物、环引物,详见表 1。设计完成后委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 DNA 的提取

取 1.5 mL 菌液于 EP 管中,于 12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液;加入 50 μL TE 混悬沉淀,加入 30 μL SDS

收稿日期:2013-06-27

项目基金:陕西省自然科学基金(编号:2012JQ2011);陕西省教育厅自然科学基金(编号:12JK0712、12JK0623);西安市未央区项目(编号:201112、201209)。

作者简介:张涛涛(1984—),女,山西孝义人,硕士研究生,主要从事食品安全快速检测技术的研究。E-mail:zt2008523220302@126.com。

通信作者:王 兰,女,教授,主要从事药物与功能性食品研究工作。E-mail:wanglan1963@126.com。

表1 设计的3对引物

名称	引物序列(5'→3')
FIP	CGCTTGGCTTGTATGTCGGGGCGCATATAACGTAACAACACATG
BIP	CAACGTACAACACATGCAAATGGGCGTTTGTTCGCTTGGC
F3	GCTGGCCCAACACAAAACAAG
B3	GTCGCAGTACCATCTGCATG
LF	GGTCAAGTATCATAACGG
LB	CATATGGCGCTCGCCCGACAC

(10%)、15 μL 蛋白酶 K 温育 30 min;再加入 100 μL NaCl (5 mol/L)、80 μL CTAB/NaCl (5%, *w/v*), 剧烈振荡后于 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min;加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 轻轻颠倒混匀后于 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清;加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 再次去除蛋白质, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清于一新的 EP 管中;加入 0.6 倍体积的异丙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 后于 8 000 r/min 离心 10 min, 即得白色沉淀;加入 20 μL TE (含有 1 μL 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase), 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 LAMP 扩增及条件的优化

LAMP 反应体系为 25 μL , 包括:各 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ F3、B3, 各 2.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ FIP、BIP, 各 1.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ LF、LB, 8 U Bst 酶, 2.8 mmol/L dNTP, 0.8 mol/L 甜菜碱, 2 μL buffer, 2 μL DNA 模板, 剩余的用 ddH₂O 补齐。

LAMP 反应体系建立后, 对反应温度、反应时间、引物进行优化。反应温度设 50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间设 30、35、40、45、50、55、60 min, 针对有环、无环引物进行研究检测。反应完成后, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 得出最佳反应体系。

1.6 LAMP 特异性试验

本试验选取金黄色葡萄球菌 (ATCC14458)、金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)、大肠杆菌 (ATCC35218)、大肠杆菌 (CM-CC44752)、大肠杆菌 (O157:H7)、酿脓链球菌 (ATCC19615)、沙门氏菌 (ATCC14028) 作为 LAMP 研究对象, 用以评价金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因引物的特异性。

1.7 LAMP 灵敏度试验

将本试验提取的金黄色葡萄球菌 (ATCC14458) DNA 用生理盐水稀释 10 倍及以上, 并用蒸馏水作为阴性对照, 观察 LAMP 检测金黄色葡萄球菌的最低检测限。

2 结果与分析

2.1 LAMP 检测结果

本研究以金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因来设计特异性引物并进行 LAMP 扩增检测, 其扩增结果见图 1, 可以看出金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因用 LAMP 扩增后出现典型的梯状条带, 而以蒸馏水代替 DNA 的阴性对照未出现梯状条带。另外发现, 在扩增完成并且离心后, EP 管底部出现白色沉淀, 而阴性对照组未出现白色沉淀。

2.2 LAMP 检测条件优化结果

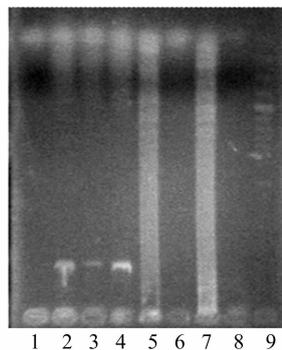
2.2.1 LAMP 反应温度 应用建立的 LAMP 方法, 在其他条件不变的情况下对反应温度进一步优化。如图 2 所示, 泳道



1—蒸馏水; 2—金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的 LAMP 扩增结果; 3—金黄色葡萄球菌基因组 DNA 电泳图

图1 LAMP 检测结果电泳图

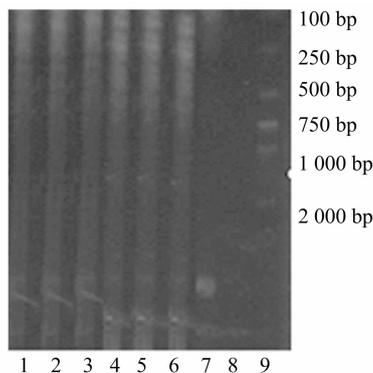
5、7 出现明显的梯状条带, 而其余温度的没有扩增成功, 说明该反应的最适反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。



1、3—50 $^{\circ}\text{C}$; 2、4—55 $^{\circ}\text{C}$; 5、7—60 $^{\circ}\text{C}$; 6、8—65 $^{\circ}\text{C}$; 9—70 $^{\circ}\text{C}$

图2 LAMP 反应温度优化结果

2.2.2 LAMP 反应时间 从图 3 可以看出: 在其他条件不变的情况下, 不同反应时间对扩增有影响, 当反应时间为 35 min 时即开始扩增, 且在 45 min 时出现了明显的梯状条带。

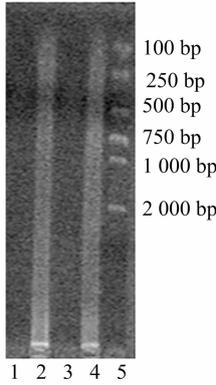


1—60 min; 2—55 min; 3—50 min; 4—45 min; 5—40 min; 6—35 min; 7—30 min; 8—空白对照; 9—DL 2000 DNA Marker

图3 LAMP 反应时间的优化结果

2.2.3 LAMP 引物 图 4 表明: 加入环引物与否并不影响 LAMP 的成功扩增, 但是加入环引物的 LAMP 扩增速率明显比未加环引物的扩增速率高 (表 1), 加环引物的扩增只需

35 min,而未加环引物的需要 45 min 才可见到絮状沉淀,说明加环引物能加快 LAMP 的反应速率。



1、3—空白对照；2—加LAMP环引物；4—未加LAMP环引物
图4 引物对LAMP反应的影响

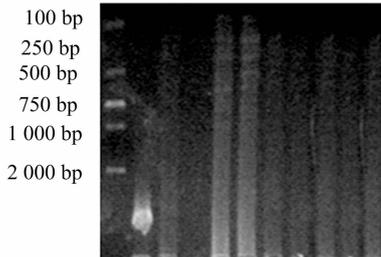
表1 引物对 LAMP 反应时间的影响

时间(min)	无加环引物	有加环引物
30	-	-
35	-	+
40	-	+
45	+	+
50	+	+
60	+	+

注：“-”“+”分别表示未出现沉淀、出现沉淀。

2.3 LAMP 检测特异性试验结果

应用上述试验建立并优化的 LAMP 反应条件,针对 2 株金黄色葡萄球菌、3 株大肠杆菌、1 株醋酸杆菌及 1 株沙门氏菌进行检测,结果显示:只有金黄色葡萄球菌显示阳性,而其余菌均显示阴性。说明本试验中根据金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因设计的引物具有较高的特异性。

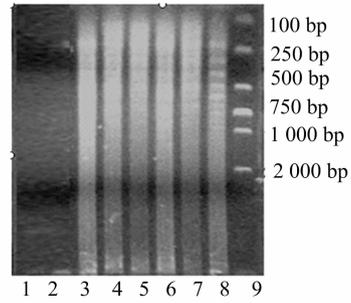


M 1—DL 2000 DNA Marker; 1—金黄色葡萄球菌DNA; 2—蒸馏水; 3—空白; 4—金黄色葡萄球菌 (ATCC14458); 5—金黄色葡萄球菌 (ATCC25923); 6—大肠杆菌 (ATCC35218); 7—大肠杆菌 (CMCC44752); 8—大肠杆菌 (O157:H7); 9—酿脓链球菌 (ATCC19615); 10—沙门氏菌 (ATCC14028)

图5 LAMP反应特异性试验结果

2.4 LAMP 检测限试验结果

针对提取的 DNA 模板进行梯度稀释,即分别稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的浓度。结果表明:阴性对照没有梯状条带出现,且 LAMP 检测的最低限度为 100 fg,较 PCR 有较高的检测限。



1—蒸馏水; 2—10 fg DNA; 3—100 fg DNA; 4—1 pg DNA; 5—10 pg DNA; 6—100 pg DNA; 7—1 ng DNA; 8—10 ng DNA; 9—DL 2000 DNA Marker

图6 LAMP检测限结果

3 结论

引物设计是 LAMP 法的关键,若引物质量不好,容易使引物间形成小于 100 bp 的聚合物^[9]。本研究以金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因作为靶基因,并据该基因的 6 个位点设计引物,增加了扩增的特异性。针对所检测的菌种,仅有金黄色葡萄球菌显示阳性,而其余菌种均显示阴性,说明本研究设计的引物有较好的特异性。

BstDNA 聚合酶大片段是分离于嗜热脂肪芽孢杆菌的 DNA 聚合酶的一部分,具有 5'-3'核酸外切酶的活性^[10],不仅需要在高浓度的 Mg^{2+} 环境下反应,而且温度不宜超过 70 °C,以免使其失去活性。在本试验中,60 °C 时扩增效果最好,可能由于温度低于 60 °C 时,酶的活性没有被激活,而温度到 70 °C 时,酶的活性已经失去,因此未能扩增成功。

对于反应中加入环引物与未加环引物的研究,由本试验可知:加入环引物仅需 30min 即可看到白色絮状沉淀,而未加入环引物要 45 min 才可以看到沉淀。这与梁磊研究的加环引物的比未加环引物的提前 1/3 看到白色沉淀是一致的^[11],而且同 Nagamine 等研究的加入环引物可以使反应时间缩短 30% ~ 50% 的结果^[12]一致。

LAMP 是一种经济、快速、准确、灵敏的分子检测技术,已经被广泛应用于诸多领域,但是在国内较少应用于食品质量检测方面,可能由于筛选合适的引物比较困难。随着研究的不断深入,相信 LAMP 技术会很快普及到食品安全检测领域。

参考文献:

[1]高涛.食品中金黄色葡萄球菌肠毒素及检测方法的研究进展[J].福建分析测试,2003,12(2):39-42.
[2]Udo E E, Al - Mufti S, Albert M J. The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants[J]. BMC Research Notes,2009(2):108.
[3]Yang H, Ma X Y, Zhang X Z, et al. Development and evaluation of a loop - mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food[J]. European Food Research and Technology,2011,232(5):769 - 776.
[4]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.
[5]Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop - mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research,2000,28(12):e63.

钱宗耀,郑伟华,华震宇,等. 气质联用技术分析玫瑰花中的脂肪酸组成[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):241-242.

气质联用技术分析玫瑰花中的脂肪酸组成

钱宗耀,郑伟华,华震宇,王成

(新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/新疆农业科学院农产品质量安全重点实验室,新疆乌鲁木齐 830091)

摘要:对新疆和田地区种植的玫瑰花中的脂肪酸类化学成分进行分析测定。采用索氏提取法对玫瑰花样品中的脂肪酸进行提取,应用气相色谱-质谱联用技术结合计算机检索对脂肪酸甲酯化后的化学组成及含量进行了测定分析。分析结果表明:玫瑰花中主要含有棕榈酸、亚油酸、亚麻酸、硬脂酸等19种脂肪酸。通过面积归一化法计算出各种脂肪酸的相对含量,其中不饱和脂肪酸亚麻酸与亚油酸的相对含量超过65%。研究结果可为今后玫瑰花的脂肪酸化学成分研究及其营养功能开发提供理论依据。

关键词:玫瑰花;脂肪酸;气质联用;新疆和田

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0241-02

玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.)为蔷薇科蔷薇属植物,在新疆和田地区已有较大规模的种植,目前和田玫瑰已成为新疆的特色产品之一。玫瑰是集经济价值和观赏价值于一体的植物,可以药用和食用,以其花蕾入药,为我国的名贵药材之一,具有排毒养颜、行气活血、开窍化痰、疏肝醒脾、促进胆汁分泌、助消化、调节机体之功效^[1]。目前关于玫瑰的研究主要集中在玫瑰精油、玫瑰色素和栽培种植方面,已有学者研究了玫瑰种子和果实的脂肪酸成分^[2-3],但尚未见关于玫瑰花脂肪酸成分的研究报道。笔者已经对啤酒花、昆仑雪菊、沙棘等新疆特色产品的脂肪酸进行了相关研究^[4-7]。本研究采用索氏提取法提取新疆和田地区种植的玫瑰花中的脂肪酸,并用气相色谱-质谱仪对其脂肪酸成分进行了分析,以期开发利用新疆和田地区的玫瑰资源提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 试验材料为玫瑰花,采集于新疆和田

地区。

试验试剂:石油醚,由天津光复精细化工研究所生产,为分析纯;正己烷、甲醇,由Fisher Scientific有限公司生产,为色谱纯;氢氧化钾,由天津盛奥化学试剂厂生产,为分析纯。

1.1.2 试验仪器 气相色谱-质谱联用仪,配电子轰击离子源,由Perkin Elmer公司生产;分析天平,由Mettler-Toledo公司生产;旋转蒸发器,由EYELA公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 索氏法提取玫瑰花中的脂肪酸 向滤纸筒中加入经过预处理的8.0g酱状玫瑰花,放入索式抽提器内,再加入80mL有机溶剂石油醚,于70℃水浴加热回流,提取结束后,减压蒸馏后放入烘箱中烘烤以除去溶剂,得到粗油(待用)。

1.2.2 脂肪酸甲酯化 用氢氧化钾-甲醇甲酯化法对玫瑰花提取后的油脂进行脂肪酸甲酯化,加入正己烷进行脂肪酸甲酯的萃取。静置分层后,取上层有机相(正己烷)适当稀释,用针筒式微孔滤膜过滤器过滤后进行气相色谱-质谱仪进样分析。

1.2.3 气相色谱-质谱联用仪条件 色谱柱:HP-5MS(30m×0.25mm×0.5μm);载气:氦气(99.999%);流速:1.0mL/min;进样:2.0μL,分流比1:10;进样口温度:250℃;程序升温:初始温度80℃,以10℃/min的速度升温至280℃,保持15min;离子化方式:电子轰击(EI);离子化能量:70eV;离子源温度:230℃;传输线温度:270℃;溶剂延迟:3min;扫描范围:50~450amu;扫描方式:全离子扫描(SCAN)。

1.2.4 玫瑰花的脂肪酸化学组分定性定量分析 用气相色谱

443-445.

收稿日期:2013-06-28

基金项目:新疆农业科学院农产品质量安全重点实验室建设项目(编号:xjnkk1-2013-003)。

作者简介:钱宗耀(1982—),男,安徽合肥人,硕士,实验师,从事色谱分析、农药残留、食品营养成分的研究工作。

通信作者:王成,硕士,副研究员,主要从事农产品质量安全及风险评估研究。Tel:(0991)4558195;E-mail:wangcheng312@sina.com。

[6]张琳,马利,丁雅苓,等. 基于荧光显色的IBV LAMP检测方法研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(10):38-44.

[7]李永刚,王德国,武建刚,等. 环介导恒温扩增法(LAMP)检测金黄色葡萄球菌[J]. 食品工业科技,2010(1):388-391.

[8]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.

[9]欧新华,张如胜,宋克云,等. 逆转录-环介导等温扩增方法检测甲型H1N1流感病毒[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(5):

[10] Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide[J]. Journal of Cell Communications and Signaling, 2008, 2(1/2):25-45.

[11]梁磊. 应用环介导等温扩增技术检测牛肉中大肠杆菌O157的研究[D]. 保定:河北农业大学,2011.

[12] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16(3):223-229.