

# PCR 法检测水中金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因

叶云, 钟英英 (广西工学院生物与化学工程系, 广西柳州 545006)

**摘要** [目的] 建立一种快速准确检测水中金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的方法。[方法] 将金黄色葡萄球菌模拟污染的水增菌后提取菌体 DNA, 以沙门氏菌、大肠杆菌 DNA 和空白作对照, 用 PCR 法扩增金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因。[结果] 金黄色葡萄球菌 DNA 的检测呈阳性, 检测底限达 100 cfu/L, 而大肠杆菌和沙门氏菌及空白对照均未出现特异性片段, 整个检测过程只需要 24 h。[结论] 试验建立的 PCR 方法可检测水及类似食品中的金黄色葡萄球菌 SEA 基因, 并具有特异性强、灵敏度高、速度快和易操作的特点。

**关键词** 金黄色葡萄球菌; 肠毒素 A 基因; PCR 技术; 水样

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)26-11238-02

## Study on the Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A Gene in Water by PCR

YE Yun et al (Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou, Guangxi 545006)

**Abstract** [Objective] The aim was to establish a rapid specific assay for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in drinking water. [Method] A polymerase chain reaction (PCR) assay targeting gene encoding *Staphylococcus aureus* enterotoxin A was developed for detecting *Staphylococcus aureus* in pure DNA and artificially contaminated water. *Salmonella*, *E. coli* DNA and blank were also amplified under the same condition. *Staphylococcus aureus* enterotoxin A was amplified by PCR. [Result] The detection result of *Staphylococcus aureus* DNA was positive, with detection limit being 100 cfu/L; the while PCR products was not found in *Salmonella*, *E. coli* and blank. The total assay time including enrichment was approximately 24 h. [Conclusion] Results suggested that the PCR could be used to rapidly detect *Staphylococcus aureus* in water and possibly other types of food products, and the PCR assay also showed high specificity, sensitivity and easy operation.

**Key words** *Staphylococcus aureus*; Enterotoxin A gene; PCR technology; Water sample

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是引起食品污染和细菌性食物中毒的一种主要细菌, 可感染食品使之腐败变质, 而且部分菌株产生的肠毒素会引起食物中毒。由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒的 33%, 仅次于大肠埃希菌<sup>[1]</sup>。金黄色葡萄球菌能产生多种毒素, 主要有肠毒素 (SEs)、剥脱毒素 (ETs) 和中毒休克毒素 (TSST-1) 等。肠毒素是引起金黄色葡萄球菌食物中毒的主要因子, 它是一类结构相关、毒力相似、抗原性不同的胞外蛋白质<sup>[2]</sup>, 金黄色葡萄球菌肠毒素 A (SEA) 是其中的一种肠毒素, 是爆发性食物中毒的重要致病因子。

目前, 检测食品金黄色葡萄球菌肠毒素最常用的免疫学方法常出现假阳性或假阴性结果, 且常因检测周期长而造成食品积压。PCR 法具有快速、可靠、敏感、特异等优点, 可以克服传统食品检测方法的缺点和不足。PCR (Polymerase Chain Reaction) 即聚合酶链式反应, 是一种体外合成 DNA 的方法。有关金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因的克隆和扩增方法已有报道<sup>[3-4]</sup>, 但利用 PCR 技术对 SEA 基因进行检测则很少见报道。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 分泌 SEA 的金黄色葡萄球菌购于中国药品生物制品检定所 (北京), 沙门氏菌和大肠杆菌均由广西工学院微生物研究室提供。

**1.2 仪器与试剂** PCR 扩增仪 (德国 Biometra), 生物电泳图像分析系统 FR-980 (上海复日科技); 琼脂糖, DNA Marker, 引物及 PCR 扩增系统均购自北京鼎国生物技术有限公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 水的人工污染。** 取适量金黄色葡萄球菌加入 5 ml 的 LB 液体培养基中, 振荡过夜。取金黄色葡萄球菌过夜培养

物污染去氯的自来水, 用血细胞计数板进行菌落计数。将水中的金黄色葡萄球菌浓度稀释成 10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup> cfu/L 5 个不同的倍数, 用于 PCR 敏感试验。

**1.3.2 细菌 DNA 提取。** 取不同稀释倍数的菌悬液于 LB 液体培养基中过夜培养增菌。取 1 ml 过夜培养的菌液 5 000 r/min 离心, 收集菌体, 加入 140 μl TE 缓冲溶液 (浓度 10 mmol/L Tris, 浓度 0.5 mmol/L EDTA, pH 值 8.0) 和 10 μl 浓度 10% SDS, 混匀后 55 °C 恒温浴 1 h, 加入 30 μl 浓度 5 mol/L 的 NaCl 和 30 μl 丙酮溶液, 再加入等体积的酚/氯仿, 稍加振荡, 4 °C 离心 (12 000 r/min) 10 min, 取上清液抽提 2 次后加入等体积 -20 °C 预冷的无水乙醇, 颠倒混匀, 4 °C 离心 (12 000 r/min) 10 min, 收集 DNA 沉淀, 用 70% 的乙醇洗涤沉淀, 加入 30 μl 的 TE 缓冲溶液溶解 DNA 沉淀, -20 °C 保存备用。

**1.3.3 引物设计与合成。** 根据 Genbank 公开发布的 SEA 基因的核苷酸序列, 用 primer premier 5.0 软件设计 1 对引物。引物为北京鼎国生物技术有限公司合成。引物序列: 引物 1, 5'-TTT TAT TCA TTG CCC TAA CG 3'; 引物 2, 5'-ACT GTC CTT GAG CAC CAA A 3'。

**1.3.4 PCR 扩增。** PCR 混合液组成: 反应总体积为 50 μl, 包括 DNA 模板 2 μl, 引物 1 和引物 2 各 2 μl, 10 × 扩增缓冲液 (含 Mg<sup>2+</sup>) 10 μl, 浓度 10 mmol/L dNTP 混合物 2 μl, Taq DNA 聚合酶 1 U, 加无菌水至 50 μl 混匀。设计空白对照, 同时用大肠杆菌和沙门氏菌 DNA 模板, 然后相同条件下进行 PCR 扩增, 以检测反应特异性。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 共进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

电泳检测: 反应结束后, 取 PCR 产物 5 μl 加入浓度 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 同时加入 DNA 分子量 Marker 作为标准, 电压 80 ~ 100 V, 时间 40 min 左右, 溴化乙锭染色 10 min, 利用凝胶成像系统对结果进行分析与鉴定。

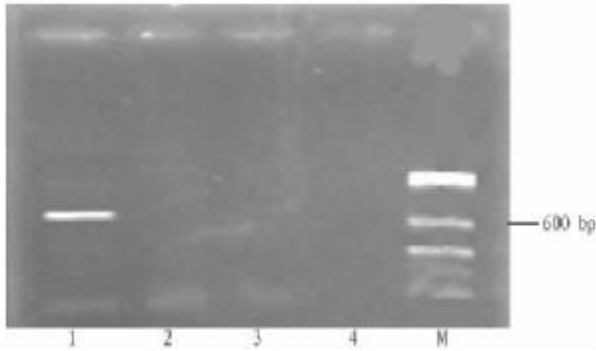
## 2 结果与分析

**2.1 PCR 检测结果** 金黄色葡萄球菌 DNA 经 PCR 电泳检

**作者简介** 叶云 (1978 - ), 男, 广西灵山人, 硕士, 讲师, 从事生物技术研究。

**收稿日期** 2008-07-03

测后,出现特异性目标条带,结果为阳性(图1)。而沙门氏菌、大肠杆菌 DNA 作为模板的 PCR 电泳结果没出现特异性条带,空白对照同样呈阴性结果。



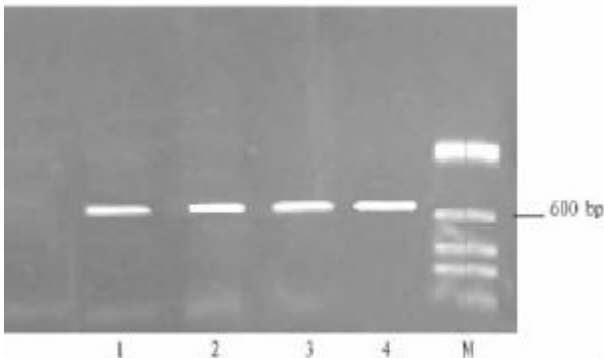
注:1,金黄色葡萄球菌;2,大肠杆菌;3,沙门氏菌;4,对照;M,Marker。

Note:1. *Staphylococcus aureus*; 2. *E. coli*; 3. *Salmonella*; 4. Control; M. Marker.

图1 3种细菌 DNA 的 PCR 结果比较

Fig.1 Comparison of PCR results of three bacteria DNA

**2.2 灵敏度检测结果** 由图2可见,通过设计5种不同菌种浓度的模拟污染水样进行 PCR 检测,除了浓度为 10 模拟污染水外,其他4个浓度的模拟水样均可有效扩增出 SEA 基因,其最低检测限达 100 cfu/L。



注:M,Marker;1~5,SA 菌液浓度分别为  $10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$  cfu/L。

Note:M. Marker; the bacterial concentrations of 1~5 are  $10, 10^2, 10^3, 10^4$  and  $10^5$  cfu/L.

图2 不同浓度 SA 菌液污染水的检测结果

Fig. 2 PCR results of water sample contaminated by different SA concentrations

### 3 讨论

金黄色葡萄球菌分泌的肠毒素 A 是暴发性食物中毒的主要致病因子,是一类结构相关、毒力相似、抗原性不同的胞外蛋白质。SEA 基因全长序列为 774 bp<sup>[5]</sup>,由温和噬菌体编码,该噬菌体通过溶源性转换整合到金黄色葡萄球菌的染色体中。一直以来,金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因的鉴定主要依赖于免疫学技术,该技术需要细菌纯培养和制备肠毒素,试验周期长,步骤繁琐,因而限制了其在食品卫生学鉴定上的应用。Fluit 等首先运用 PCR 方法检测金黄色葡萄球菌,结果表明,用 PCR 方法检测金黄色葡萄球菌各种毒素基因具有特异性强、灵敏度高、操作简便快速等特点<sup>[6]</sup>。此后,

PCR 方法在金黄色葡萄球菌毒素基因的检测中得到了广泛的应用,为鉴定食品中的金黄色葡萄球菌提供了新的途径。该试验建立的 PCR 条件,检测效果比较理想,利用上游引物为 20 bp、下游引物为 19 bp 长的 DNA 片段,可以扩增出中间距为 662 bp 长的 DNA 片段。

由于 PCR 检测灵敏度高,对模板 DNA 的量要求非常少。因此,一般使用加热变性裂解菌体细胞即可,但是它并不能完全取代传统的 DNA 提取方法。这是因为,如果得到的模板越多,由交叉污染引起错误结果的可能性越小。研究曾试图直接采用菌液和模拟污染的水样进行检测,发现检测灵敏度不高,还存在一定的难度。因此,还需通过增菌和提取样本 DNA 方法来提高灵敏度和准确度。但这又会延长检测时间,也许可以通过磁免疫 PCR 技术来直接从样品中检测金黄色葡萄球菌来解决这一矛盾<sup>[7]</sup>。

食品加工过程中,要经过一系列高温和化学处理,这些因素会导致食品中微生物 DNA 的断裂、降解。因而加工不仅灭活了食品中的微生物,也因为破坏了作为 PCR 反应的模板的微生物 DNA 而影响了 PCR 检测灵敏度。同时,PCR 反应容易受到食品基质、培养基成分的干扰,残留食物成分会抑制 PCR 反应的顺利进行<sup>[8]</sup>。食品中的脂肪含量也会影响金黄色葡萄球菌 DNA 有效的提取和 PCR 检测<sup>[9]</sup>。该试验建立的 PCR 条件能有效检测出模拟水样中污染的金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因,但对其他食品的检测还有待进一步探讨。

尽管 PCR 方法目前也有其不足,即它的敏感性极高,可扩增已死亡的金黄色葡萄球菌 DNA,从而造成假阳性结果<sup>[10]</sup>。但 PCR 方法高度特异、快速简便等特点,可以应对食物中毒的快速诊断以及食品企业和管理部门对食品安全的实时监控,具有明显的优越性。相信随着 PCR 技术的进一步完善,必将逐步取代传统的检测方法,成为检测葡萄球菌致病因子的主要技术。

### 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): 1775-1778.
- [2] 张严峻, 张俊彦, 梅玲玲, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因的分型和分布[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 682-683.
- [3] 张红河, 张卫英, 董晓勤, 等. 快速检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因方法的建立与应用[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(1): 46-47.
- [4] 陈悦, 倪培华, 吴洁敏. 金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因克隆及表达[J]. 检验医学, 2006, 21(2): 113-116.
- [5] BETLEY M J, MEKALANOS J. Nucleotide sequences of the type A staphylococcal enterotoxin gene[J]. J Bacteriol, 1988, 170(1): 34-41.
- [6] FLUIT A C, MYRA N W, ADRIENNE T A B, et al. Rapid detection of *Salmonella* in poultry with the magnetic immuno-PCR assay[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 1342.
- [7] LISA A LUCORE. Immobilization with metal hydroxides as a means to concentrate food-borne bacteria for detection by cultural and molecular methods[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5): 1769-1776.
- [8] 杨洋, 张伟, 袁耀武, 等. 用于 PCR 检测的乳品中金黄色葡萄球菌 DNA 提取方法比较研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(9): 91-95.
- [9] 王小红, 谢笔钧, 史贤明. 金黄色葡萄球菌致病因子检测的 PCR 方法[J]. 食品与机械, 2004, 20(3): 48-50.
- [10] JOHNSON W M, TYLER S D, EWAN E P, et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(3): 426-430.