

冻鸡肉中金黄色葡萄球菌 LAMP 快速检测方法的建立

袁光宇¹, 谢体波¹, 龚维瑶¹, 吴紫洁², 程茹¹, 张凯², 钟新敏²

(1. 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司, 贵州贵阳 550009; 2. 贵州安为天检测技术有限公司, 贵州贵阳 550009)

摘要 [目的]建立冻鸡肉中金黄色葡萄球菌的 LAMP 检测方法。[方法]根据金黄色葡萄球菌特异性耐热核酸酶基因序列设计 2 对引物, 建立 LAMP 检测方法, 并用于检测采购自贵阳市各大超市的冻鸡肉样品。[结果]设计合成的 2 对引物和建立的 LAMP 方法检测金黄色葡萄球菌具有良好的特异性, 反应体系的灵敏度为 65 CFU/mL。检测采购自贵阳市各大超市和经人为污染的 264 份冻鸡肉样品分别用 LAMP 方法检测, 并用国标方法检测验证, 其特异性为 95.2%, 准确度为 97.3%。[结论]该研究建立的方法为实现在冻鸡肉中金黄色葡萄球菌的快速检测奠定了良好的基础。

关键词 金黄色葡萄球菌; LAMP; 检测方法; 冻鸡肉

中图分类号 S851.34⁺7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)25-0162-02

Establishment of Rapid Detection Method of *Staphylococcus aureus* LAMP in Frozen Chicken

YUAN Guang-yu, XIE Ti-bo, GONG Wei-yao et al (Guizhou Kwinbon Science and Technology for Food Safety Co., Ltd., Guiyang, Guizhou 550009)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a LAMP method for detection of *S. aureus* in frozen chicken. [Method] Two pairs of primers were designed based on the *nuc* gene sequence of *S. aureus*. A LAMP detection method was established and used to detect frozen chicken samples from major supermarkets in Guiyang. [Result] Two pairs of primers and the established LAMP method had good specificity for the detection of *S. aureus*. The sensitivity was 65 CFU/mL. 264 frozen chicken samples purchased from major supermarkets in Guiyang and polluted by humans were detected by LAMP method and verified by national standard method. The specificity was 95.2% and the accuracy was 97.3%. [Conclusion] The method established in this study laid a good foundation for rapid detection of *S. aureus* in frozen chicken.

Key words *Staphylococcus aureus*; LAMP; Detection method; Frozen chicken

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 简称金葡菌, 是一种革兰氏阳性需氧或兼性厌氧菌, 广泛分布于人类生活环境中, 多寄生在人和动物的表皮、呼吸道、消化道及化脓性伤口^[1-2]。金葡菌无运动能力, 不产生芽孢, 最适生长环境为温度 37 °C、pH 7.4, 能够适应 10% 的高盐环境^[3]。金葡菌本身不具致病性, 但其在繁殖过程合成肠毒素, 从而导致食物中毒, 出现恶心、呕吐、腹泻等症状^[4-5]。食品在生产、加工过程中的不严格管控, 极易受该菌污染。

在国内, 由金葡菌导致的食物中毒事件时有发生^[6-7]。同时, 冻品被检测出金葡菌污染也时有报道^[8]。目前, 对金葡菌的主要检测方法有国标方法、PCR、免疫检测等^[9-10]。各检测方法各有所长, 国标方法准确检测率 100%, 但操作要求无菌, 检测周期较长, 无法实现快速出结果; 免疫检测方法虽然时间较短, 但受到灵敏度的制约^[9]; PCR 方法也需要精密仪器实现控制温度变化, 并且灵敏度也较低^[11]。环介导等温扩增 (LAMP) 由 Notomi 等^[12]于 2000 年开发的一种基于 PCR 的 DNA 恒温扩增方法, 其具有特异性高、灵敏度高、检测速度快等特点, 被应用在微生物、寄生虫的检测等领域^[13-15]。笔者根据金葡菌的特异性 *nuc* 基因序列设计引物, 实现在冻鸡肉中金葡菌的快速检测, 以期为冻品中金葡菌的快速检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 DP302 购自天根生化科技(北京)有限公司; 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成; Isothermal Mix、荧光等温扩增仪 GENE II 型购自 OptiGene 公司; 试验菌株信息为金黄色葡萄球菌 (CGMCC 1.282)、大肠杆菌 (CICC 10003)、枯草芽孢杆菌 (CGMCC 1.821)、单增李斯特菌 (CMCC 54003)、伤害沙门氏菌 (CMCC 50071), 由北京勤邦生物技术有限公司提供; 冻鸡肉购自贵阳市各大超市。

1.2 研究方法

1.2.1 引物设计。根据在 GenBank 中查询到金黄色葡萄球菌耐热核酸酶 (*nuc*) 基因序列 (GenBank DQ507382.1), 分别设计 2 对引物, 引物序列如表 1 所示。

表 1 *nuc* 基因 LAMP 反应引物序列信息

Table 1 Primer sequence information of <i>nuc</i> gene		
序号 No.	引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'→3')
1	F3	ACTAGTTGCTTAGTGTTAAC
2	B3	ATCGCTTTAATTAATGTCGC
3	FIP	GACTTGAAGCTACAACAAATAAGTAGCTCAGCA AATGCATCACA
4	BIP3	ACAGTATACAGTCAACTTCAACTAAGTTCTTTA TGTAATTTTT

1.2.2 LAMP 反应体系的建立。试验菌株按试剂盒方法步骤提取 DNA, 并测定核酸浓度。以提取的 DNA 作为模板, 建立 20 μL 反应体系。PCR 管中依次加入等温扩增混合液 10 μL、引物 F3/B3 (0.2 μmol/L) 1 μL、引物 FIP/BIP (0.8 μmol/L) 1 μL、DNA 模板 (50 μg/L) 1 μL、ddH₂O 7 μL。将反应体系混合均匀, 放入荧光等温扩增仪, 65 °C 扩增 45 min。

基金项目 贵州省科技计划项目“微生物快速检测技术集成研究与应用示范”; 贵州省工业和信息化发展专项“技术中心能力建设”; 贵阳市人才创新创业项目“环介导等温扩增技术快速检测产品开发”; 贵阳市科技计划项目“基于大数据的农产品中毒素污染现场快速检测溯源技术应用研究”。

作者简介 袁光宇 (1992—), 男, 贵州遵义人, 工程师, 硕士, 从事食品安全及快速检测产品应用研究。

收稿日期 2018-04-11

1.2.3 LAMP 检测方法的特异性和灵敏度。为验证设计的引物序列经 LAMP 检测金葡萄菌 *nuc* 基因序列特异性,将菌株金黄色葡萄球菌(CGMCC 1.282)、大肠杆菌(CICC 10003)、枯草芽孢杆菌(CGMCC 1.821)、单增李斯特菌(CMCC 54003)、伤害沙门氏菌(CMCC 50071)按适宜培养条件液体培养过夜,按试剂盒方法提取细菌基因组 DNA,测定 DNA 浓度,定量至 50 $\mu\text{g/L}$ 。以细菌基因组 DNA 作为模板,用“1.2.2”建立的方法验证特异性。

将金葡萄菌按 10 倍梯度稀释至 10^{-8} , 国标方法(GB 4789.10—2016)进行菌落计数,测定金葡萄菌活数。将各稀释菌液煮沸、离心,取 1 μL 作为模板,用于验证 LAMP 方法的灵敏度。

1.2.4 冻鸡肉中金葡萄菌的检测。将采购自各大超市的金葡萄菌阴性冻鸡肉,取 50 g 接种已知浓度的金葡萄菌进行污染,作为阳性样本,以不添加金葡萄菌冻鸡肉作为阴性样本,共计 264 份。分别用国标方法(GB 4789.10—2016)和 LAMP 方法盲检。

2 结果与分析

2.1 LAMP 检测的特异性 经荧光等温扩增仪扩增金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、单增李斯特菌、伤害沙门氏菌 5 株致病菌基因组 DNA,结果如图 1 所示。结果显示,金黄色葡萄球菌荧光信号呈指数增加,其余 4 株均未检测到荧光信号的变化,表明设计的 *nuc* 基因序列用于 LAMP 检测金黄色葡萄球菌特异性高。

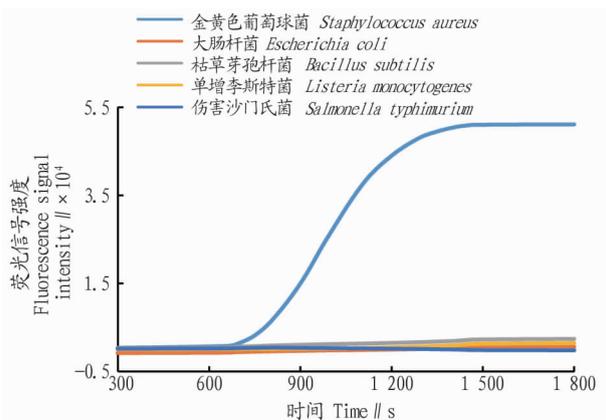


图 1 LAMP 检测特异性

Fig. 1 Specificity of LAMP detection

2.2 LAMP 检测的灵敏度 金葡萄菌经一系列稀释后,对各稀释度利用建立的 LAMP 检测荧光信号,结果如图 2 所示。结果显示,5 个梯度(32、47、65、82、100 CFU/mL)中,随着时间增加 32、47 CFU/mL 荧光信号均未变化,65 CFU/mL 在 30 min 左右开始检测到荧光信号增强,82、100 CFU/mL 均在反应开始较短时间内荧光信号开始增强。因此,金葡萄菌灵敏度能够达 65 CFU/mL,说明试验建立的 LAMP 方法具有较高的灵敏度。

2.3 LAMP 检测冻鸡肉 将采购自贵阳市各大超市冻鸡肉和人为污染冻鸡肉,根据建立的 LAMP 和国标方法检测金葡萄菌,结果显示,测出阳性样品分别为 LAMP 方法 138 份,国标

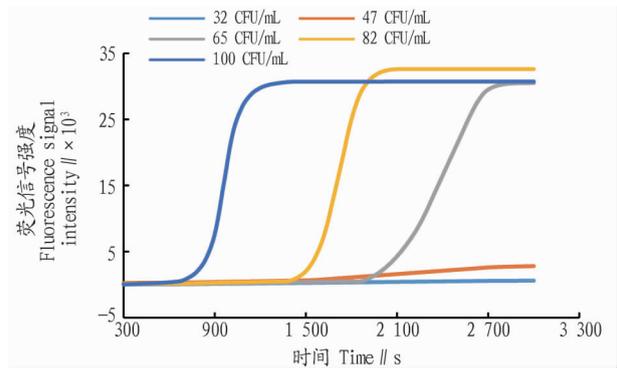


图 2 LAMP 检测灵敏度

Fig. 2 Sensitivity of LAMP detection

方法 145 份;阴性样本分别为 LAMP 方法 126 份,国标方法 119 份。分析结果可知建立的 LAMP 检测特异性为 95.2%,准确度为 97.3%。

3 讨论与结论

冻鸡肉因其长期存放在低温环境,并不适于微生物的生长需求,因此在受到微生物污染后,短时间内并不会出现明显的变质,但仍然存在微生物污染后的潜在危险。因此建立一种快速准确的检测方法相当重要。金葡萄菌是食品污染的主要菌之一,其检测方法中国标方法检测主要受时间的制约,每次检测约需 48 h,耗时耗力^[16]。PCR 方法受灵敏度的限制,现有文献报道的其检测限多在 $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL^[17-18]。而 LAMP 方法很好地避免了以上 2 种方法存在的问题,能够实现冻品更快速准确的检测需求。

该研究利用金葡萄菌 *nuc* 基因作为检测基因,建立一种 LAMP 技术快速检测冻鸡肉中金葡萄菌的方法。根据基因序列(GenBank DQ507382.1)设计的 2 对引物,建立的 LAMP 检测金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、单增李斯特菌、伤害沙门氏菌的基因组 DNA,以验证设计的 2 对引物检测金葡萄菌特异性。为获取足量细菌基因组 DNA,检测前对 5 株菌株分别进行扩增。扩增细菌经试剂盒方法提取,测定核酸蛋白浓度并统一稀释至 50 $\mu\text{g/L}$ 用于 LAMP 检测。检测结果显示,5 株菌株仅金葡萄菌荧光信号呈指数增强,表明 *nuc* 基因作为金葡萄菌检测具有特异性。金葡萄菌液经一系列稀释,菌液分别用于 LAMP 检测荧光信号强度、国标方法确定活菌数。检测结果显示,建立的 LAMP 方法灵敏度为 65 CFU/mL。该研究建立的 LAMP 方法与国标方法分别盲检采购自贵阳市各大超市冻鸡肉及人为污染的冻鸡肉 264 份,由结果可知 LAMP 检测特异性为 95.2%,准确度为 97.3%,表明该研究建立的 LAMP 快速检测方法检测结果可靠,准确度、特异度高。

参考文献

- [1] KHAN S, RASHEED F, ZAHRA R. Genetic polymorphism of agr locus and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* at two hospitals in Pakistan [J]. Pak J Med Sci, 2014, 30(1): 172-176.
- [2] GITAU G K, BUNDI R M, VANLEEUWEN J, et al. Evaluation of Petrifilm-sTM as a diagnostic test to detect bovine mastitis organisms in Kenya [J]. Trop Anim Health Prod, 2013, 45(3): 883-886.

方面,非正规的资金互助组织在全国迅猛发展,在为农村金融市场提供活力,促进农村经济发展的同时,存在各不相同的监管主体和监管依据。在实际实践中,存在着监管不到位或监管主体的相关能力不足,难以进行有效监管的问题存在。快速发展的非正规资金互助组织出现破产甚至跑路等问题。

此外,缺乏专业的管理与金融专业人才,难以有效地发挥组织的内部管理的功能,成为一个重要的阻碍^[8]。

4 促进农村资金互助社可持续发展的政策建议

农村经济发展的特殊性需要农村金融市场不断地引入活力。经过不断的改革与创新,农村资金互助社作为合作金融的新模式,表现出了强大的创造力,一定程度上满足了弱势群体金融需求的同时,提振了农村金融市场。同时,农村资金互助社在发展过程中也暴露诸多问题,需要不断地完善农村资金互助社的治理机制,并确定相关的法律制度,完善监管,实现农村资金互助社的可持续发展。

4.1 完善农村资金互助社资金管理与监控机制 严格限定了互助社的资金运用的程序与投向能够有效地降低资金损失的风险,限制了核心社员私自挪用资金谋取私利。尝试与商业银行开展合作,构建有效的资金托管制度。当然这需要政府部门的牵引,否则商业银行鉴于成本与收益的考量,难以主动与互助社达成合作。但是资金的有效托管,一方面可以提高资金的透明度,降低核心社员私自挪用资金,投向高风险行业的可能性。另一方面可以有效地增强普通社员的信心,方便社员对互助社资金运用的监督。

4.2 加快农村资金互助社的立法进程,依法监管 农村资金互助社的相关法律、规章的不完善难以确定其法律地位,

未能统一与明确监管规范和监管主体,一定程度上造成了盲目发展、监管不到位的问题。需要我国政府吸取国际上合作经济组织发展实践和法律的先进经验,并根据近年来我国农村资金互助社的实践。对于失败案例进行深刻分析。合理的调控好政府的地位,在给予农村金融改革与发展提供必要的政策与资金支持的同时,切忌不要过分的干涉发展,提供宽松的金融发展环境。并且对于监管,明确统一的监管主体。对于资金互助社的管理人员需要定期安排专业的技能培训,设置有效的考核制度,对于不合格的管理人员采取暂停职务,进一步培训的惩罚。提高资金互助社的管理能力。通过相关的优惠政策,为资金互助社吸引相关专业的高等学历人才,在结合农村的社区网络关系治理的同时,积极引入适宜的现代企业治理方式,提高互助社的治理水平。

参考文献

- [1] 杨奇明,陈立辉,刘西川.农村资金互助社的绩效、制度优势与治理困境:国内研究述评[J].金融理论与实践,2015(4):104-110.
- [2] 董晓林,朱敏杰,张晓艳.农民资金互助社对农户正规信贷配给的影响机制分析:基于合作金融“共路监督”的视角[J].中国农村观察,2016(1):63-74.
- [3] 李明贤,周蓉.异质性社员参与农村资金互助业务的博弈分析[J].农业经济问题,2016(2):77-82.
- [4] 赵锦春,包宗顺.社员异质性与农民资金互助社的资本管理[J].山西财经大学学报,2016,38(12):75-88.
- [5] 周孟亮.普惠金融视角下新型农村合作金融创新发展:兼谈“百信模式”与“山东模式”[J].财经科学,2016(9):14-23.
- [6] 陈东平,钱卓林.资本累积不必然引起农村资金互助社使命漂移:以江苏省滨海县为例[J].农业经济问题,2015(3):40-46.
- [7] 朱乾宇,罗兴,马九杰.组织成本、专有性资源与农村资金互助社发起人控制[J].中国农村经济,2015(12):49-62.
- [8] 徐雪梅.农村资金互助社发展状况的调查与思考:以吉林省梨树县为例[J].吉林金融研究,2014(2):57-59.

(上接第 163 页)

- [3] 顾其芳,张红芝,朱颖莹,等.三种金黄色葡萄球菌选择性分离培养基的检测效果比较[J].上海预防医学,2018(1):69-73.
- [4] 韩善桥,赵晓航,石峰,等.测试片法在金黄色葡萄球菌感染快速检测中的应用[J].国际检验医学杂志,2015,36(17):2459-2460,2463.
- [5] 孔祥瑞,王洪柱.金黄色葡萄球菌检测方法的研究进展[J].中国乳业,2017(10):72-74.
- [6] 杜志荣,高海宁,罗静.一起金黄色葡萄球菌引起的学校食物中毒事件调查分析[J].中国卫生产业,2015(12):20-22.
- [7] 张峰,顾敏霞,戴正,等.一起金黄色葡萄球菌肠毒素食物中毒事件调查[J].中国农村卫生事业管理,2017,37(7):803-805.
- [8] 王锦彤,田建伟,熊定凯.供列车冻鸡肉中同时检出肠炎沙门菌和金黄色葡萄球菌[J].中国国境卫生检疫杂志,2009(1):43-44.
- [9] YAZDANKHAH S P, SØLVERØD L, SIMONSEN S, et al. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease in composite milk [J]. Vet Microbiol, 1999, 67(2):113-125.
- [10] 董蕾,刘慧敏,孟璐,等.快速检测金黄色葡萄球菌活菌的研究进展[J].食品工业,2017(10):253-259.

- [11] 张嘉荟,方志宇,乔文姝.实时荧光定量 PCR 技术对金黄色葡萄球菌的检测概况[J].食品安全导刊,2017(27):111.
- [12] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):1-7.
- [13] 黄潇航,陈淑萍,李涵,等.基于 LAMP 技术的微生物病原诊断研究进展[J].产业与科技论坛,2018,17(1):52-53.
- [14] ZHAO X, LI Y, PARK M, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *femA* gene for rapid detection of *Staphylococcus aureus* from clinical and food samples[J]. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(2):246-250.
- [15] 张艳艳,叶倩,王正荣,等.基于 *cox2* 基因的细粒棘球绦虫环介导等温扩增检测方法的初步建立[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2017(2):169-172.
- [16] 王利刚,张磊,张婧,等.国标培养法与 2 种金黄色葡萄球菌快速筛检方法的比较[J].食品安全质量检测学报,2017(1):238-242.
- [17] WEI C J, ZHONG J L, HU T, et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* by multiplex PCR in milk[J]. 3 Biotech, 2018, 8(1):76.
- [18] 李琳,黄金海,赵耘,等.葡萄球菌肠毒素基因分型 PCR 检测技术的研究[J].食品科学,2008,29(7):340-344.

科技论文写作规范——工作单位

在圆括号内书写作者的工作单位(用全称)、城市名及邮政编码。若为外国的工作单位,则加国名。多个作者不同工作单位时,在名字的右上角分别加注“1”“2”,和地址前注“1.”“2.”。