第 31 卷第 5 期
2015 年 9 月

FOOD & MACHINERY 食品与机械

Vol. 31, No. 5
Sep. 2015

DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2015.05.013

金黄色葡萄球菌 LAMP 可视化快速检测方法的建立

Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of *Staphylococcus aureus*

宋涛平　邱华丽　王淑娟　彭新凯　杨丽霞

SONG Tao-ping　QIU Hua-li　WANG Shu-juan　PENG Xin-kai　YANG Li-xia

（长沙市食品质量安全监督检测中心，湖南 长沙　410013）

（*Changsha Centre of Supervision & Inspection on Food Quality Safety, Changsha, Hunan* 410013, *China*）

摘要：建立金黄色葡萄球菌 LAMP 可视化检测方法。通过对 2 套引物的筛选，最终选取 *nuc* 基因的 6 条引物建立 LAMP 反应体系。整个反应在 63 ℃恒温条件下进行 45 min，即可通过肉眼直接对反应结果进行判定。对金黄色葡萄球菌的检测灵敏度为 0.001 ng/μL，且与其他致病菌无交叉反应。该方法快速、特异性高，操作简便，适合基层快速检测。

关键词：金黄色葡萄球菌；环介导等温扩增；可视化检测

Abstract: To develop a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for visual detecting *Staphylococcus aureus*, 2 sets of specific primers were designed and 6 primers targeting the nuc gene was selected. The method could detect *Staphylococcus aureus* within 45 min at a constant temperature of 63 ℃. The sensitivity of the method was 1 pg/μL, and had no cross reaction with other pathogens. The result indicated that the LAMP assay was a rapid, specific and simple tool for field diagnosis of *Staphylococcus* aureus.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; loop-mediated isothermal amplification; visual detection

近期中国卫计委通报了 2014 年全国食物中毒事件情况，突发公共卫生事件网络直报系统全年共收到 26 个省份（含自治区、直辖市）食物中毒类突发公共卫生事件报告 160 起，中毒人数 5 657 人，其中死亡人数 110 人；而微生物性食物中毒人数最多，占中毒人数 67.7%；且微生物性食物中毒事件主要由沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等引起[1]。在美国由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒事件也占到整个细菌性食物中毒事件的 33%；加拿大更高达 45%[2]。

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）是革兰氏阳性菌，为全球最常见的食源性致病菌之一，其引起的食物中毒在细菌性食物中毒中占有较大比例[3]。人类因食用受其污染的肉、奶、鱼、蛋类及其制品等食品而感染，主要会引起食物中毒及肺炎、心包炎、败血症等疾病[4-6]。金黄色葡萄球菌可在温度 7.0～48.5 ℃、pH 4.2～9.3 及高盐（高达 15% NaCl）的环境条件下生存，这些特点皆有利于其污染不同的食品[7]。因此，建立快速、灵敏、可靠的食源性致病菌金黄色葡萄球菌的检测方法，对预防和控制致病菌引起的中毒事件发生，增强食品安全性具有重要意义。

传统致病菌检测以生化培养检测方法为主，检测时间较长，且灵敏度较低。PCR 技术灵敏度高、特异性强，常被用于致病菌检测，但需要后续电泳检测，增加了污染的风险[8,9]。同时，实时荧光 PCR 技术也可用于致病菌检测[10-12]，但其设备、试剂昂贵，且需经过专业培训的人员操作，对实验室环境条件的要求也较高，只有专业实验室才能具备上述条件，基层单位难以开展此类检测。

环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）技术是利用 *Bst* DNA 聚合酶在 60～65 ℃恒温条件下完成核酸的扩增[13]。*Bst* DNA 聚合酶在较高镁离子浓度条件下，才具有 5′→3′外切酶活性[14]。该酶 80 ℃处理 15 min 即可失活。在 LAMP 反应中，需要针对靶基因的6 个区域设计 4 种特异引物，在恒温条件下进行核酸扩增[13]。环引物的加入可缩短反应时间[15]。LAMP 技术已广泛应用于致病菌的检测，包括金黄色葡萄球菌[16]、大肠杆菌 O157[17]、沙门氏菌[18,19]、副溶血性弧菌[20,21]、绿脓假单胞菌[22]、单核细胞增多性李斯特菌[23]、阪崎肠杆菌[24]。目前已报道的 LAMP 技术主要是采用浊度仪或反应后加入显色剂，根据浊度或颜色的变化进行结果判断，浊度法需要较为贵重的浊度仪，而反应后加入显色剂 SYBR Green Ⅰ，开盖容易造成气溶胶污染，反应前加入高浓度 SYBR Green Ⅰ对反应有抑制作用。因此，急需建立一种更适合基层使用的反应前加入显色剂，且无需开盖、无需大型仪器设备的 LAMP 扩增技术。

本研究拟采用实时荧光 LAMP 技术，根据扩增时间和荧光强度筛选最佳引物组合，并最终运用金属离子指示剂羟基萘酚蓝[25]（hydroxy naphthol blue，HNB）判定反应结果，使

基金项目：国家公益性行业科研专项项目（编号：201310130）；长沙市科技计划项目（编号：K1406008-31）

作者简介：宋涛平（1982—），男，长沙市食品质量安全监督检测中心工程师。E-mail：songtaoping@163.com

收稿日期：2015－08－09

LAMP 的结果判断更简单直观，旨为建立适合在基层检测单位推广使用的金黄色葡萄球菌 LAMP 可视化快速检测方法。

1　材料与方法

1.1　菌株

金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、大肠埃希氏杆菌、阪崎肠杆菌、铜绿假单胞菌、产气荚膜梭菌、粪肠球菌、副溶血性弧菌：美国典型菌种保藏中心（ATCC）；

鼠伤寒沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、β 溶血性链球菌、志贺氏菌：中国医学微生物菌种保藏管理中心（CMCC）；

大肠埃希氏菌 O157：H7：英国国家标准菌种保藏中心（NCTC）；

金黄色葡萄球菌：由本实验室依据 GB/T 4789.10—2010 从食品中分离鉴定。

1.2　主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；

DNA 等温扩增试剂盒：广州迪澳生物科技有限公司；

羟基萘酚蓝（HNB）：美国 Sigma 公司；

DL 1,000 DNA Marker、Premix Taq™：大连宝生物工程有限公司；

超微量核酸蛋白分析仪：BD1000 型，北京五洲东方科技发展有限公司；

干式恒温器：K30B 型，杭州奥盛仪器有限公司；

实时荧光定量 PCR 仪：7500 FAST 型，美国应用生物系统公司。

1.3　细菌基因组 DNA 提取

按细菌基因组 DNA 提取试剂盒使用说明书操作。

1.4　LAMP 引物的设计与合成

针对金黄色葡萄球菌的特异性基因 *nuc* 和 *femA*，参照文献[26]和 SN/T 2754.1—2011 中引物序列（见表 1），合成 2 套 LAMP 引物，用于筛选最佳引物组合，引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1　引物序列

Table 1　Sequences of primers

引物	序列（5'→3'）
nuc-F3	AACAGTATATAGTGCAACTTCAA
nuc-B3	CTTTGTCAAACTCGACTTCAA
nuc-FIP	ATGTCATTGGTTGACCTTTGTACATAAAT-TACATAAAGAACCTGCGA
nuc-BIP	GTTGATACACCTGAAACAAAGCATCATTT-TTTTCGTAAATGCACTTGC
nuc-LF	GTATCACCATCAATCGCTTT
nuc-LB	GGTGTAGAGAAATATGGTCC
femA-F3	TTTAACAGCTAAAGAGTTTGGT
femA-B3	TTTTCATAATCRATCACTGGAC
femA-FIP	CCTTCAGCAAGCTTTAACTCATAGTTTTTC-AGATAGCATGCCATACAGTC
femA-BIP	ACAATAATAACGAGGTYATTGCAGCTTTT-CTTGAACACTTTCATAACAGGTAC

1.5　LAMP 体系建立

LAMP 反应体系 25 μL，包括：F3、B3 浓度为 0.2 μmol/L，FIP、BIP 浓度为 1.6 μmol/L，LB、LF 浓度为 0.3 μmol/L（无环引物加双蒸水补足体积），2× 反应缓冲液 12.5 μL，8 U Bst DNA 聚合酶 1 μL，DNA 模板 2 μL。将反应体系于 63 ℃恒温反应 45 min。实时荧光 LAMP 反应体系中加 SYTO-9 荧光染料 0.5 μL，在实时荧光定量 PCR 仪上完成反应；显色法加 3 mmol/L HNB 0.5 μL，在干式恒温器上完成反应。

1.6　灵敏度分析

将 100 ng/μL 的金黄色葡萄球菌基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释，使得浓度梯度依次为 100，10，1，0.1，0.01，0.001，0.000 1 ng/μL。以此为模板进行 LAMP 扩增。平行进行 PCR 法检测金黄色葡萄球菌灵敏度的试验，对比分析两种方法的检测灵敏度。PCR 法反应体系：2× Premix Taq 12.5 μL，引物 nuc-F3/nuc-B3（10 μmol/L）各 0.5 μL，100 ng DNA 模版，补灭菌蒸馏水至 25 μL。反应程序为 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s 共进行 35 个循环，最后 72 ℃ 5 min。

1.7　特异性分析

利用建立的 LAMP 法对表 2 中菌株的基因组 DNA 进行扩增，验证本方法的特异性。同时，使用金黄色葡萄球菌可视化 LAMP 检测法对按照 GB/T 4789.10—2010 的方法从肉类及蛋奶制品等样品中分离得到的野生菌株进行验证检测，并平行进行普通 PCR 检测。

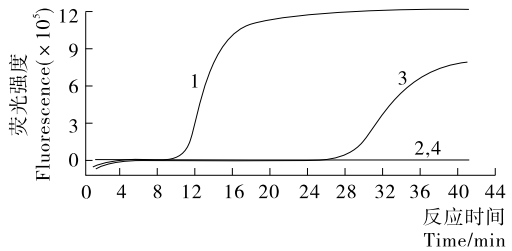
2　结果与分析

2.1　最佳引物筛选

按上述反应体系，以金黄色葡萄球菌 DNA 为模板，运用 2 套 LAMP 引物分别进行实时荧光 LAMP 扩增，比较其扩增效率筛选最佳引物组合，图 1 为最佳引物筛选结果。由图 1可知，*nuc*、*femA* 引物组的扩增出峰时间分别为 11.7，31.6 min，而 *nuc* 引物组的扩增荧光强度明显高于 *femA* 引物组。因此选择 *nuc* 引物组进行后续试验。

2.2　LAMP 法与 PCR 法检测灵敏度比较

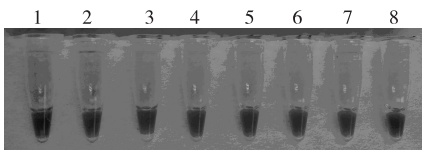
在反应前加入 HNB 作为 LAMP 扩增的指示剂，根据 HNB 的颜色变化进行结果判定，阳性呈天蓝色，阴性为紫罗兰色。用 *nuc* 引物组，以金黄色葡萄球菌 DNA 为模板，用去离子水进行 10 倍系列稀释，分别进行 LAMP、PCR 法检测，比较两者灵敏度，结果见图 2。由图 2 可知，LAMP 法和 PCR 法灵敏度基本相同，都可以达到 0.001 ng/μL，但 PCR



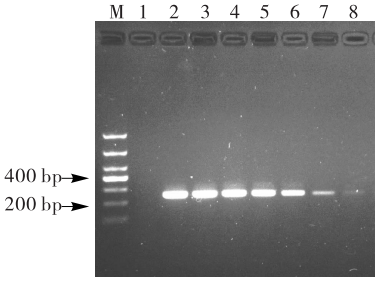
1. *nuc* 引物组扩增结果　2. *nuc* 引物组空白对照　3. *femA* 引物组扩增结果　4. *femA* 引物组空白对照

图 1　最佳引物筛选

Figure 1　Screening the best primers



(a) 可视化LAMP检测法



(b) 普通PCR检测法

M. DL 1 000 DNA Marker　1. 空白对照　2～8. 100,10,1,0.1,0.01,0.001,0.000 1 ng/μL

图 2　金黄色葡萄球菌检测灵敏度结果

Figure 2　Detection sensitivity of *Staphylococcus aureus*

法在 0.001 ng/μL 的电泳条带较弱。

从试验易操作性、结果判定直观角度考虑,LAMP 可视化检测法更适合现场快速检测。

2.3　LAMP 特异性试验结果

利用建立的金黄色葡萄球菌 LAMP 法对表 2 中的13 个种类共计 27 株细菌进行特异性试验,采用去离子水作为阴性对照。其中 15 株金黄色葡萄球菌为 LAMP 阳性结果、其他菌为阴性结果,与平行进行的普通 PCR 法检测结果一致,表明本试验所用的 LAMP 引物具有高度特异性。

表 2　特异性分析结果

Table 2　Results of LAMP specific amplification

菌种	数量	来源	阳性菌株数	
			LAMP 法	PCR 法
金黄色葡萄球菌	1	ATCC 6538	1	1
鼠伤寒沙门氏菌	1	CMCC(B)50115	0	0
大肠埃希氏菌 O157:H7	1	NCTC 12900	0	0
单增李斯特菌	1	ATCC 19115	0	0
大肠埃希氏杆菌	1	ATCC 25922	0	0
蜡样芽孢杆菌	1	CMCC(B)63303	0	0
阪崎肠杆菌	1	ATCC 29004	0	0
铜绿假单胞菌	1	ATCC 27853	0	0
β溶血性链球菌	1	CMCC(B)32210	0	0
产气荚膜梭菌	1	ATCC 13124	0	0
粪肠球菌	1	ATCC 29212	0	0
副溶血性弧菌	1	ATCC 17802	0	0
志贺氏菌	1	CMCC(B) 51592	0	0
金黄色葡萄球菌	14	/	14	14

3　讨论

本研究通过实时荧光 LAMP 法对金黄色葡萄球菌的 2 套LAMP 引物进行筛选,比较其出峰时间、荧光强度确定最佳引物组合。采用在反应前添加金属离子指示剂 HNB,通过肉眼直接观察颜色变化进行判定,若反应液由紫罗兰变为天蓝色,即为阳性。本试验建立了金黄色葡萄球菌可视化 LAMP 反应体系,检测灵敏度为 0.001 ng/μL,与普通 PCR 相当,且特异性良好,与其他种类的致病菌无交叉反应。HNB 作为 LAMP 反应显色剂,结果易于识别,且与普通 PCR 一致,说明基于 HNB 染料的 LAMP 检测结果可信。

本研究建立了金黄色葡萄球菌可视化快速检测方法,在 63 ℃恒温条件下反应 45 min 便可直接判定结果,无需特殊仪器设备,简便易行,可用于食品安全现场监督检验和基层快速检测。

参考文献

1　中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 国家卫生计生委办公厅关于 2014 年全国食物中毒事件情况的通报[EB/OL]. (2015—02—15)[2015－05－11]. http://www.nhfpc.gov.cn/yjb/s3585/201502/91fa4b047e984d3a89c16194722ee9f2.shtml.

2　黄冰, 邓志爱, 谭铭雄, 等. 食品中金黄色葡萄球菌污染状况产肠毒素特性及耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1 380～1 382.

3　Zhao Xi-hong, Li Yan-mei, Myoungsu P, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *femA* gene for rapid detection of *Staphylococcus aureus* from clinical and food samples [J]. Microbiol Biotechnol, 2013, 23(2): 246～250.

4　Jorgensen H J, Mork T, Hogasen H R, et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(1): 158～166.

5　Kennedy J, Bolton D J, Cowan C. Food safety and bacterial pathogens: Why you should eat in restaurants [C]// Proceedings of an international conference hosted by the 32nd Annual Food science and Technology Research Conference. Ireland Cork: National University of Ireland Cork, 2002: 5.

6　王江桥, 罗君, 蔡珠, 等. 金黄色葡萄球菌感染的特征及其耐药性[J]. 实用预防医学, 2007, 14(4): 990～991.

7　Margrit S, Ursula S S, Schmidt-Lorenz W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods[J]. Int J. Food Microbiol, 1990, 11: 1～19.

8　Matsuda K, Tsuji H, Asahara T. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR[J]. Applied Environment Microbiology, 2007, 73(1): 32～39.

9　Alarcon B, Vicedo B, Aznar R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food[J]. J. Appl Microbiol, 2006, 100: 352～364.

10　Sabet N S, Subramaniam G, Navaratnam P. 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　Hein I, Lehner A, Rieck P, et al. Comparison of different ap-

proaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 3 122～3 126.

12 Palomares C, Torres M J, Torres A, et al. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003, 45: 183～189.

13 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.

14 Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289: 150～154.

15 Shi Xian-ming, Long Fei, Suo Biao. Molecular methods for the detection and characterization of food-borne pathogens[J]. Pure Appl Chem., 2010, 82: 69～79.

16 Mohammadali S, Minhaz U A, Andy N. High-throughput real-time electrochemical monitoring of LAMP for pathogenic bacteria detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 58: 101～106.

17 Zhao Xi-hong, Li Yan-mei, Wang Li, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples[J]. Mol. Biol. Rep, 2010, 37: 2 183～2 188.

18 Ueda S, Kuwabara Y. The rapid detection of *Salmonella* from food samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Biocontrol Sci., 2009, 14: 73～76.

19 Ohtsuka M, Yanagawa K, Takatori K. Detection of *Salmonella Enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 6 730～6 735.

20 Chen Si-yi, Ge Bei-lei. Development of a toxR-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting Vibrio parahaemolyticus[J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 41～45.

21 Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes of Vibrio parahaemolyticus and related Vibrio species[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76: 820～828.

22 Zhao Xi-hong, Wang Li, Li Yan-mei, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. World J. Microbiol Biotechnol, 2011, 27: 181～184.

23 Wang Li, Li Yue, Chu Jin, et al. Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains[J]. Mol. Biol. Rep, 2012, 39: 445～449.

24 张淑红，吴清平，徐晓可，等. LAMP 法在阪崎肠杆菌快速检测中的应用[J]. 食品与机械，2011，27(5)：111～114.

25 Goto M, Honda E, Ogura A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue[J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167～172.

26 Wang Xin-ru, Wu Li-fen, Wang yan, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Appl Biochem Biotechol, 2015, 175(2): 882～291.

(上接第 46 页)

11 王雷. 中国对虾病害的免疫防治研究[M]. 北京：中国科学院海洋研究所，1993.

12 姚翠鸾，王维娜，王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 海洋科学，2003，27(10)：18～21.

13 陈国福，宋晓玲，黄健，等. A3tt-肽聚糖对凡纳滨对虾磷酸酶及细胞内酚氧化酶活性的影响[J]. 海洋水产研究，2007，28(1)：59～64.

14 刘树青，江晓路，牟海津，等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶，磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼，2009，30(3)：278～280.

15 Sonstein S A. Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 16(4): 277～232.

16 张慧芳，李嗣英，林赴田. 喹诺酮类抗生素的免疫调节作用研究进展[J]. 国外医药抗生素分册，2013，24(4)：145～149.

17 黄静，张天托. 氟喹诺酮类抗生素免疫调节分子机制研究进展[J]. 国外医药抗生素分册，2006，27(5)：211～215.

18 巩华，李华，于毅，等. 恩诺沙星对鲤酯酶同工酶和血清生理生化指标的影响[J]. 大连水产学院学报，2005，20(1)：29～33.

19 李真. 抗生素的免疫调节作用[J]. 国外医药(抗生素分册)，2007(9)：384～385.

20 张丽敏，吴灶和，简纪常，等. 腹腔注射恩诺沙星和氟苯尼考对红笛鲷血清 IgM 含量的影响[J]. 广东海洋大学学报，2009，29(3)：33～38.

21 王海潮，赵海泉，钱冬，等. 水产常用抗菌药物对锯缘青蟹酚氧化酶的影响[J]. 水产科学，2011，30(1)：38～42.

22 Ashida M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives Biochem. Biophys, 1971(44): 749～762.

23 史成银，黄倢，宋晓玲. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的 ELISA 快速检测[J]. 中国水产科学，2009，6(3)：116～118.

24 艾春香，陈立侨，高露姣，等. V_C对中华绒螯蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J]. 台湾海峡，2012，21(4)：431～438.

25 Hultmark. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolympph of immunized pupae of Hyalophora Cecropic[J]. Insect Immune, 2004(10): 136～145.

26 李光，樊景凤，林凤翱，等. 对虾的免疫机制及其疾病免疫预防的研究进展[J]. 水产科学，2007，26(1)：56～59.

27 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学，2005，16(4)：1～3.

28 沈锦玉，刘问，曹铮，等. 免疫增强剂对中华绒螯蟹免疫功能的影响[J]. 浙江农业学报，2004，16(1)：25～29.

29 潘鲁青，吴众望，张红霞. 重金属离子对凡纳滨对虾组织转氨酶活力的影响[J]. 中国海洋大学学报，2005，35(2)：195～198.

30 汤鸿，李少菁，王桂忠，等. 铜、锌、镉对锯缘青蟹仔蟹代谢酶活力影响的实验研究[J]. 厦门大学学报，2010，39(4)：521～525.