

利用简并引物检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B 基因

Research on degenerate primers for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A, B gene

刘继超¹ 陈柏儒² 姜铁民¹ 陈历俊¹

LIU Ji-chao¹ CHEN Bai-ru² JIANG Tie-min¹ CHEN Li-jun¹

(1. 北京三元食品股份有限公司, 北京 100163; 2. 北京市育才学校, 北京 100050)

(1. Beijing Sanyuan Foods Co. Ltd., Beijing 100163, China; 2. Beijing Yucai School, Beijing 100050, China)

摘要:通过设计简并引物建立一种 PCR 技术同步快速检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 和 B 基因的方法。根据金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B 基因编码序列,设计一对特异性简并引物 SEAB 来扩增靶基因片段,长度分别为 105 bp 和 135 bp,通过对金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B 菌株和 4 株对照菌株进行 PCR 检测,评价该引物的特异性;对金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的 DNA 系列 10 倍稀释,对其灵敏性进行 PCR 检测。结果显示,金黄色葡萄球菌肠毒素 A 和 B 菌株的 DNA 检测结果呈阳性,4 株对照菌株的检测结果显示阴性,通过基因测序证实了 PCR 产物的特异性,SEB 的 DNA 最低检测浓度为 3.58 ng,整个检测过程不超过 20 h。建立了一个特异、快速灵敏的在同一条件下,金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B 基因的 PCR 检测方法。

关键词:PCR;金黄色葡萄球菌;肠毒素;A、B 基因

Abstract: The degenerate primers were designed to establish a PCR assay for synchronous and fast detection of staphylococcal enterotoxin A and B. According to the sequences of SEA and SEB gene, primers were designed and used for PCR. The lengths of the amplified primers were 105 bp and 135 bp. To evaluate the specificity of PCR assay, 2 strains of SEA, SEB and 4 strains of non-SEA-B were tested by PCR. SEB was 10-fold serially diluted and amplified by PCR to verify its sensitivity. The results showed that the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A, B strain DNA results were positive and 4 strains of control strains tested negative. The specificity of PCR products was confirmed by DNA sequencing. In addition, the minimum detection limit of DNA was 3.58 ng of SEB and the whole process was less than 20 h. A rapid, specific and sensitive detection method was established and the method can simultaneously detect *Staphylococcal* enterotoxins A, B in the same reaction condition.

Keywords: PCR; *Staphylococcus aureus*; enterotoxins; A, B gene

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划(编号:2012BAD12B06);奶牛产业技术体系北京市创新团队项目

作者简介:刘继超(1983—),男,北京三元食品股份有限公司中级工程师,硕士。E-mail:liujichao1215@126.com

通讯作者:陈历俊

收稿日期:2015-08-25

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA),是目前最常见的能够引起细菌性食物中毒的病原体之一,该菌产生葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)是引起食物中毒的主要原因。根据血清学特性,SEs 可分为 5 型(SEA、SEB、SEC、SED、SEE),这五类称为经典肠毒素,也是全球食物中毒中最常见的血清型^[1,2],其中引起的食物中毒最多的是 A 和 D 型,B 和 C 型次之。

目前检测金黄色葡萄球菌肠毒素的主要方法是免疫学方法,其特异性和灵敏度较差,已不能满足食物中毒等公共安全事件检测的需要^[3]。但随着 PCR 技术的完善,应用该技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素的报道^[4-6]越来越多。顾琳等^[7]使用 PCR 技术检测出食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、G 等,其中 SEA 的检出率最高为 77.27%。Mehrotra 等^[8]使用多重 PCR 技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、C、D、E 的基因,比用单一引物更具特异性和有效性。而简并引物有比特异引物有更高的适应性^[9],以及较宽的检测范围,这对提高检测效率和降低检测成本更为有利。本研究拟利用 SEA 与 SEB 之间具有同源性的特点,自行设计简并引物 SEAB,在同一台 PCR 仪、同一 PCR 条件下,建立同时检测 SEA、SEB 的方法,不仅能够克服酶联免疫法检测时间长的问题,还可提高 PCR 技术的检测效率,降低检测成本,对于快速诊断是否是由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

PCR 仪:GeneAmp PCR System 2400 型,美国 PE 公司;
电泳仪:PAC300 型,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;

天能凝胶成像仪:Tanon GIS 2010 型,上海天能科技有限公司;

离心机:2K15 型,美国 Sigma 公司。

1.1.2 试剂

乙二醇四乙酸、十二烷基硫酸钠、无水乙醇、苯酚、三氯

甲烷、异戊醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
胞壁质酶:超纯,10 kU/mg,美国 Sigma 公司;
核糖核酸酶 A:≥50 kU/mg,美国 Sigma 公司;
琼脂糖:优级纯,Spain Agarose 香港基因公司;
dNTPs、PCR 染料、DNA Marker B:超纯,北京赛百盛基因技术公司;
Taq DNA 聚合酶:5 U/μL,北京赛百盛基因技术公司;
PCR 产物回收试剂盒(离心柱型)、新型 pUM-T 快速克隆试剂盒:北京百泰克生物技术有限公司。

1.1.3 菌种

金黄色葡萄球菌肠毒素 SEA(ATCC-13565)、金黄色葡萄球菌肠毒素 SEB(ATCC-14458):中国药品生物制品检定所菌种保藏中心;

金黄色葡萄球菌(CGMCC1.0128)、大肠杆菌(CGMCC1.1369)、沙门氏菌(CGMCC1.1552)、表皮葡萄球菌(CGMCC1.2429):中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 方法

1.2.1 DNA 模板提取 挑取金黄色葡萄球菌肠毒素 SEA 和 SEB 的菌落,分别接种于 10 mL 营养肉汤中,放置与 37 ℃ 生化培养箱内培养 12 h 后,培养基中有大量菌体增殖,分别离心收集菌体,提取基因组 DNA^[3,10],于-20 ℃ 保存备用。

1.2.2 扩增引物设计 依据 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>上发布的 SEA 和 SEB 的基因编码序列,利用生物软件 ClustalW 与 Primer 5.0,设计检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 和 B 的简并引物 SEAB(见表 1),简并引物 SEAB 在 SEA 和 SEB 上的相应位置分别为 566~670,338~472,扩增产物长度分别为 105,135 bp。

表 1 引物 SEAB 的序列

Table 1 Primers sequence of SEAB

引物名称	引物序列(5'-3')
SEAB-F	TGATAAATAYAAAGRKAAAWAMGTAG
SEAB-R	GTTACACCACCATACATRCAAG

Score=189 bits (102), Expect=1e-52
Identities=104/105 (99%), Gaps=0/102 (0%)
Strand=plus/plus

Query 1 TGATAAATATAAAGGGAATAAGTACACTTATATGGTGCTTATTATGGTTATCAATGTGC 60
|
Sbjct 564 TGATAAATATAAAGGGAATAAGTACACTTATATGGTGCTTATTATGGTTATCAATGTGC 623

Query 61 GGGTGGTACACCAACAAACAGCTTGCATGTATGGTGGTGAAC 105
|
Sbjct 624 GGGTGGTACACCAACAAACAGCTTGCATGTATGGTGGTGAAC 668

图 1 SEA 的 Blast 比对结果

Figure 1 Blast comparison results of SEA

Score=244 bits (132), Expect=2e-69
Identities=134/135 (99%), Gaps=0/135 (0%)
Strand=plus/plus

Query 1 TGATAAATACAAAGATAAATACGTAGATGTGTTTGGAGCTAATTATTATTATCAATGTTA 60
|
Sbjct 336 TGATAAATACAAAGATAAATACGTAGATGTGTTTGGAGCTAATTACTATTATCAATGTTA 395

Query 61 TTTTCTAaaaaaaCGAATGATATTAATTCACATCAAACGACAAACGAAAACTGTAT 120
|
Sbjct 396 TTTTCTAaaaaaaCGAATGATATTAATTCACATCAAACGACAAACGAAAACTGTAT 455

Query 121 GTATGGTGGTGAAC 135
|
Sbjct 456 GTATGGTGGTGAAC 470

图 2 SEB 的 Blast 比对结果

Figure 2 Blast comparison results of SEB

1.2.3 配制 PCR 反应体系 PCR 技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素 SEA 和 SEB 的反应体系为 20 μL:模板 1 μL、上下游引物各 0.5 μL(25 μmol/L)、10×扩增反应缓冲液 2 μL、PCR 染料 2 μL、dNTPs 0.5 μL、Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,其余为无菌超纯水。离心混匀后置 PCR 仪上进行扩增反应,循环参数设置:预变性 95 ℃ 3 min,变性 95 ℃ 30 s→退火 51 ℃ 30 s→延伸 72 ℃ 1 min,循环数为 30,最后 72 ℃ 延伸 10 min。从上述反应体系中吸取 10 μL,用于电泳检测。

1.2.4 克隆及测序 吸取 PCR 扩增后反应体系 100 μL,按 PCR 产物回收试剂盒的说明书操作。菌液抽提阳性质粒,送至天根科技公司进行测序。

1.2.5 特异性分析 利用上述 PCR 检测方法同时扩增 SEA 菌株、SEB 菌株和对照菌株的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、表皮葡萄球菌基因组 DNA,然后电泳检测 PCR 扩增产物,判定简并引物的特异性。

1.2.6 灵敏度分析 将提取的模板 DNA 进行适量稀释,再使用紫外分光光度计测定 260 nm 波长下的 OD 值,按式(1)计算其浓度。然后将其按照 10 倍系列进行逐步稀释至 10⁻⁵,以此为模板进行 PCR 检测,以分析简并引物 SEAB 检测 SEB 的 DNA 灵敏度。

$$c=OD_{260} \times m \times n$$
 (1)

式中:

c——DNA 浓度,μg/mL;

m——50 μg/mL, OD₂₆₀ = 1 时 dsDNA 浓度约为 50 μg/mL;

n——模板稀释倍数。

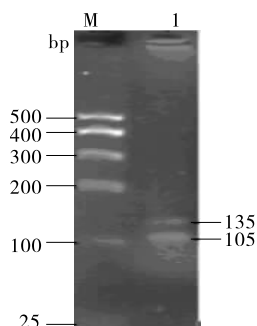
2 结果与分析

2.1 测序结果

将测序的结果在 NCBI 的 Blast 上与 GenBank 中核苷酸序列进行比对分析,结果发现与 GenBank 上发布的 SEA 和 SEB 基因序列的同源性均达到 99%(见图 1、2),证明了扩增的目的产物分别为 SEA、SEB 基因。

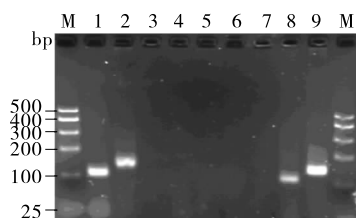
2.2 简并引物 SEAB 特异性分析

在同一个反应体系中分别加入 SEA、SEB 菌的 DNA 模板 1 μ L, 无菌超纯水 12 μ L, 其余用量与反应条件均同 1.2.3, 电泳检测的结果见图 3、4。由图 3、4 可知, PCR 反应分别扩增出 SEA 和 SEB 菌的目的基因片段, 而对照组未出现特异性片段, 显示出良好的特异性, 且整个检测过程不超过 20 h, 说明简并引物 SEAB 可以在同一个反应体系与反应条件下同步检测产 SEA 和 SEB 的金黄色葡萄球菌。



M. DNA Marker B 1. SEA、SEB 在同一 PCR 反应管中扩增的结果
图 3 SEA、SEB 在同一个 PCR 反应管中反应的电泳分析图

Figure 3 Electrophoretic analysis of SEA and SEB in the same PCR reaction tube



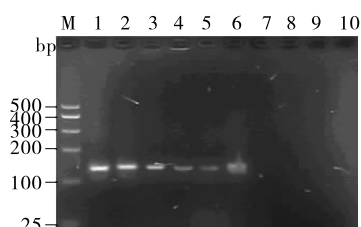
M. DNA Marker B 1、8. 金黄色葡萄球菌 SEA 2、9. 金黄色葡萄球菌 SEB 3. 阴性对照 4. 金黄色葡萄球菌 5. 表皮葡萄球菌 6. 大肠杆菌 7. 沙门氏菌

图 4 简并引物 SEAB 特异性的琼脂糖凝胶电泳分析图

Figure 4 Electrophoretic analysis the specificity of SEAB with degenerate primers

2.3 简并引物 SEAB 灵敏性分析

紫外分光光度计分别测定 SEB 的 DNA 模板的 $OD_{260} = 0.7160$, 得出 DNA 含量为 358 ng/ μ L, 分别吸取各稀释倍数的 DNA 模板 1 μ L, 进行 PCR 检测, 结果见图 5。由图 5 可知, DNA 灵敏度为 3.58 ng。



M. DNA Marker B 1、2. 358 ng 3、4. 35.8 ng 5、6. 3.58 ng 7、8. 358 pg 9、10. 35.8 pg

图 5 简并引物 SEAB 灵敏性的琼脂糖凝胶电泳分析图

Figure 5 Electrophoretic analysis the sensitivity of SEAB with degenerate primers

3 结论

本研究通过对 SEA、SEB 设计简并引物 SEAB 建立了能

够准确地扩增目的基因的 PCR 方法, 即一次 PCR 反应可同时扩增两个靶基因, 表现出了良好的特异性, 能够有效区分其它引起食物中毒的病原菌, SEB 的 DNA 最低检测浓度为 3.58 ng, 整个检测过程不超过 20 h, 不但节省了检测时间, 降低了检测成本, 减少了漏检的可能性, 而且为金黄色葡萄球菌肠毒素 SEA 和 SEB 菌引起的食物中毒事件快速筛查, 以及流行病学研究提供了一种快速准确的检测方法。

在 PCR 反应中, 若简并引物的简并度过高, PCR 扩增产物的扩增效率和特异性较差, 会严重影响目的片段的分离, 应适当增加引物的浓度和调整退火温度, 才能获得理想的检测效果^[11]。而本研究设计的简并引物的简并度较低为 32, 不增加引物浓度或降低退火温度同样可获得较好的扩增结果。此外也应注意, 在设计简并引物时, 由于简并度的增加, PCR 的特异性会下降, 可能会造成假阳性结果。因此, 探讨如何降低简并引物的简并度, 提高简并引物的 PCR 扩增效率和特异性对于成功应用简并引物 PCR 法具有重要意义, 例如用脱氧次黄苷(dI)替代简并引物中的高简并位点, 可大幅度降低简并程度, 显著提高扩增产物的特异性及扩增效率。

参考文献

- 何晖, 刘华章, 魏泉德. PCR 技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、C、E 基因的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(7): 1 585~1 587.
- Smyth Davida S, Hartigan Patrick J, Meaney William J, et al. Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry[J]. Journal of Medical Microbiology, 2005, 54(4): 401~411.
- 刘继超, 姜铁民, 姜阿赤. 多重 PCR 检测金黄色葡萄球菌六型肠毒素基因的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(6): 304~307.
- Gigaud O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France[J]. Int. J. Food Microbiol., 2002, 77(1~2): 61~70.
- Lovseth A, Loncarevic S, Berdal K G. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates[J]. J. Clin Microbiol., 2004, 42(8): 3 869~3 872.
- Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, et al. Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR[J]. J. Vet. Med. Sci., 2005, 67(10): 1 037~1 041.
- 顾琳, 黄平, 宋衍燕, 等. PCR 检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素基因[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(2): 17~19.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson W M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(3): 1 032~1 035.
- 王少峡, 陈丽媛, 张竞秋, 等. 利用生物信息学资源设计简并引物[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2006, 26(2): 26~29.
- Moon J S, Lee A R, Kang H M, et al. Antibiofilm and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(4): 1 716~1 724.
- Simon A L, Jean M D, Johan M, et al. Identification of potyvirus using the polymerase chain reaction with degenerate primers[J]. Journal of General Virology, 1991(73): 1 531~1 541.