

PCR法检测葡萄球菌肠毒素A基因

张勇¹, 石晓璐², 周海涛¹, 李波¹, 陈润莉¹, 曾华书¹

摘要:目的 建立PCR方法快速检测葡萄球菌肠毒素A(*Staphylococcal enterotoxin A*, SEA)基因。方法 根据SEA基因的序列,设计PCR引物特异性扩增靶基因片段,对1株产SEA金黄色葡萄球菌和9株对照菌株进行PCR检测,评价其特异性和敏感性。另检测30株金黄色葡萄球菌SEA基因的携带情况。结果 建立PCR方法快速检测SEA基因,扩增产物长度为439bp。PCR反应体系中有29cfu的产SEA金黄色葡萄球菌即可检出SEA基因,30株分离的金黄色葡萄球菌中有10株携带有SEA基因。结论 PCR法可以快速、敏感地检测SEA基因,为金黄色葡萄球菌食物中毒诊断提供依据。

关键词:金黄色葡萄球菌,葡萄球菌肠毒素A,聚合酶链反应

中图分类号 R378.11 文献标识码 A 文章编号 1009-9727(2012)12-1450-03

Detection of gene encoding *Staphylococcal enterotoxin A* by PCR. ZHANG Yong, SHI Xiao-lu, ZHOU Hai-tao, et al. (1. Futian District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518040, Guangdong, P. R. China; 2. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518073, Guangdong, P. R. China)

Abstract: Objective To establish a polymerase chain reaction (PCR) assay for the rapid and sensitive detection of *Staphylococcal enterotoxin A* (SEA) gene. **Methods** According to the sequences of the SEA gene, primers were selected and were used to amplify SEA gene. The specificity of the assay was determined by detection of 1 SEA positive *Staphylococcus aureus* strain and 9 non-*Staphylococcus aureus* strains using PCR. The detection limit of the assay for SEA positive *Staphylococcus aureus* strain was 10-fold serially diluted and was amplified by PCR. The SEA gene in 30 *Staphylococcus aureus* strains were detected by PCR. **Results** The PCR assay for the rapid and sensitive detection of SEA gene was well established. The length of amplification was 439bp. The detection limit for SEA gene was 29 CFU. Among 30 *Staphylococcus aureus* strains 10 strains were positive for SEA gene. **Conclusion** The PCR assay can rapidly and exactly detect the SEA gene, and can provide evidence for the rapid diagnosis of food poisonings due to *Staphylococcus aureus* infection.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcal enterotoxin A*, PCR

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是目前细菌性食物中毒和人类化脓性感染中最常见的病原菌之一,该菌产生的葡萄球菌肠毒素(*Staphylococcal enterotoxins*, SEs)是引起食物中毒的主要原因。在美国,由SEs引起的食物中毒占细菌性食物中毒的33%,加拿大则更多,占45%^[1],我国每年发生的此类食物中毒事件也很普遍。近年来,SEs除了SEA、SEB、SEC、SED、SEE 5种传统的血清型外,还发现了SEG、SEH、SEI、SEJ、SEK等新型的肠毒素,以SEA的毒性最强,引起食物中毒最为常见^[2,3]。对于SEs的检测,目前主要依靠免疫学的方法,但其特异性和敏感性较差,已不能满足公共卫生检测的需要,随着PCR技术的出现,已有较多利用PCR技术检测SEs的报道^[1,4-6]。本研究以葡萄球菌肠毒素A(*Staphylococcal enterotoxin A*, SEA)基因为检测靶基因,建立PCR方法检测SEA,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 1株阳性对照菌株和产SEA金黄

色葡萄球菌标准菌株(ATCC13565)购自中国药品生物制品检测所。大肠埃希氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、小肠结肠耶尔森氏菌、空肠弯曲菌、溶血性链球菌、非产肠毒素金黄色葡萄球菌等阴性对照菌株均为本实验室保存菌株。

1.1.2 主要试剂 DNA提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)为北京天根公司产品;Premix Taq PCR试剂为宝生物工程(大连)有限公司产品;琼脂糖凝胶为Oxoid公司产品;5×TBE为生工生物工程(上海)有限公司产品;GelRed染料为Biotium公司产品;600bp DNA Marker B(100bp Ladder, 100bp-600bp)为Bio Basic公司产品;所有试剂均在有效期内使用,其配制严格按使用说明进行。

1.1.3 主要仪器 梯度PCR扩增仪C1000-SERIES(美国Bio Rad公司);核酸蛋白电泳系统(美国Bio Rad公司);GDS8000凝胶成像系统(基因公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成和纯化,各引物序列见表1。

作者单位: 1. 深圳市福田区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518040 2. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518073

作者简介: 张勇(1976~), 女, 汉族, 硕士研究生, 副主任技师, 主要从事微生物检验。

表1 SEA基因的PCR引物序列
Table 1 SEA gene PCR primer sequence

基因Target gene	引物Primer	序列(5' -3') Sequence(5' -3')	产物长度Product size
SEA	SEA-F	GGATATTGTTGATAAATATAAAGGGAAG	439bp
	SEA-R	GTTAATCGTTTTATTATCTCTATATATTCTTAATAGT	

1.2.2 模板DNA的提取 将阳性对照菌株和9株阴性对照菌株分别接种于营养肉汤增菌液中, 37℃恒温培育16~18h, 取1ml增菌液10,000rpm离心1min, 菌沉淀加入20mg/ml的溶菌酶溶液180μl, 37℃处理45min, 其余步骤按TIANamp Bacteria DNA Kit试剂盒说明书进行, 最后加200μl TE洗脱DNA收集备用。

1.2.3 PCR反应体系 PCR反应体系体积为20μl, 其中模板DNA 2.0μl, 相应的上、下游引物(20UM)各0.2μl, Premix Taq 10μl, ddH₂O 7.6μl, 轻弹混匀, 稍微离心后放入PCR仪内进行PCR扩增反应, 反应条件为: ①95℃10min; ②95℃30s; ③54℃30s; ④72℃30s; ⑤72℃10min, 其中②~④步循环40次。

1.2.4 扩增产物的电泳检测 取0.9g琼脂糖凝胶粉末与60mlTBE缓冲液混合, 于微波炉加热煮沸, 冷却至60℃左右加入GelRed 6μl制备成1.5%的琼脂糖凝胶。取5μl扩增产物与1μl 6×loading buffer混匀后点样于琼脂糖凝胶中, 于1×TBE电泳缓冲液中以70V电泳70分钟后放于凝胶成像系统中成像, 观察PCR扩增产物有无预期大小的目标DNA片段(439bp)。

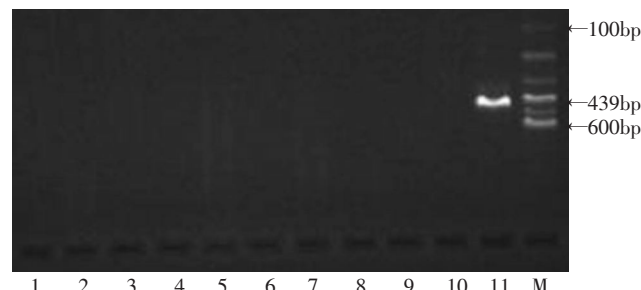
1.2.5 特异性分析 将阳性对照菌株、阴性对照菌株按上述方法进行DNA提取、PCR扩增及电泳检测分析。

1.2.6 灵敏度分析 产SEA金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC13565), 37℃培养16~18h, 增菌液用无菌水作10倍梯度稀释, 平板菌落计数得知各梯度浓度为 2.9×10^4 cfu/ml、 2.9×10^3 cfu/ml、 2.9×10^2 cfu/ml, 分别用上述方法进行DNA提取、PCR扩增及电泳检测分析。

1.2.7 SEA基因携带情况分析 PCR检测本实验室保存的30株金黄色葡萄球菌SEA基因。30株菌株中分离自食物中毒症状病人的吐泻物10株; 分离自市场采样检测食品16株; 分离自医院消毒效果监测环境涂抹样品4株。

2 结果

2.1 SEA基因PCR扩增产物的电泳结果 SEA产金黄色葡萄球菌PCR扩增产物有439bp大小的目的DNA片段, 9株阴性对照菌PCR扩增产物未出现任何条带。SEA基因PCR引物只对产SEA金黄色葡萄球菌出现PCR阳性扩增反应, 显示了良好的特异性。见图1。



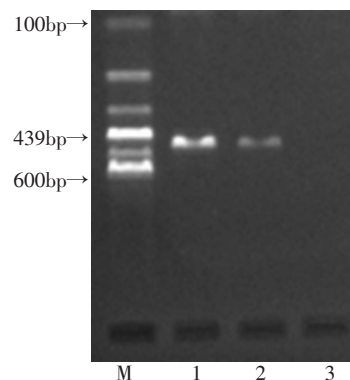
M: DNA marker(100bp Ladder, 100bp-600bp); 1: 大肠埃希氏菌; 2: 沙门氏菌; 3: 志贺氏菌; 4: 副溶血性弧菌; 5: 霍乱弧菌; 6: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 7: 空肠弯曲菌; 8: 溶血性链球菌; 9: 非产肠毒素金黄色葡萄球菌; 10: 空白对照; 11: 产SEA金黄色葡萄球菌。

M: DNA marker(100bp Ladder, 100bp-600bp); 1: Escherichia coli; 2: Salmonella; 3: Shigella; 4: Vibrio parahaemolyticus; 5: Vibrio cholerae; 6: Yersinia enterocolitica; 7: Campylobacter jejuni; 8: Streptococcus hemolyticus; 9: SEA negative Staphylococcus aureus; 10: blank control; 11: SEA positive Staphylococcus aureus.

图1 SEA基因PCR扩增产物电泳结果

Fig 1 PCR amplification for the detection of SEA gene

2.2 产SEA金黄色葡萄球菌不同菌浓度SEA基因PCR扩增产物的电泳结果 在菌液浓度分别为 2.9×10^4 cfu/ml、 2.9×10^3 cfu/ml时PCR扩增产物有预期大小的目标DNA片段(439bp), 在菌液浓度分别为 2.9×10^2 cfu/ml时, PCR扩增产物无预期大小的目标DNA片段(439bp), 见图2。



M: DNA marker(100bp Ladder, 100bp-600bp); 1: 菌液浓度为 2.9×10^4 cfu/ml; 2: 菌液浓度为 2.9×10^3 cfu/ml; 3: 菌液浓度为 2.9×10^2 cfu/ml。

M: DNA marker(100bp Ladder, 100bp-600bp); 1: The bacterial concentration is 2.9×10^4 cfu/ml; 2: The bacterial concentration is 2.9×10^3 cfu/ml; 3: The bacterial concentration is 2.9×10^2 cfu/ml.

图2 不同菌浓度SEA基因PCR扩增产物电泳结果

Fig 2 PCR amplification for the detection of SEA gene from different bacterial concentration

2.3 产SEA金黄色葡萄球菌SEA基因PCR扩增产物

灵敏度分析 PCR反应体系中有29cfu的产SEA金黄色葡萄球菌即可检出SEA基因,见表2。

2.4 30株金黄色葡萄球菌SEA基因携带情况 分离自食物中毒吐泻样品、市场采样检测食品的金黄色葡萄球菌SEA基因携带率高,分别为60%(6/10)、25%(4/16),而分离自送院消毒效果监测样品则为0.0%(0/4)。

表2 PCR检测SEA基因的检出限分析
Table 2 Detection limit analysis to PCR amplification for the detection of SEA gene

菌液浓度	增菌液体积	缓冲液TE体积	DNA模板体积	PCR反应体系中菌落数	PCR反应结果
bacterial concentration	Volume of broth	Volume of TE buffer	Volume of DNA template	CFU in PCR reaction system	Result of PCR
(cfu/ml)	(ml)	(μl)	(μl)	(cfu)	
2.9×10 ⁴	1.0	200	2.0	290	+
2.9×10 ³	1.0	200	2.0	29	+
2.9×10 ²	1.0	200	2.0	2.9	-

注:PCR反应体系中菌落数=菌液浓度×增菌液体积×DNA模板体积/缓冲液TE体积。Note :CFU in PCR reaction system= bacterial concentration×Volume of broth×Volume of DNA template / Volume of TE buffer

3 讨论

在《WS/T 80-1996 葡萄球菌食物中毒诊断标准及处理原则》中规定,分离的金黄色葡萄球菌必须进行SEs的检测,且SEs为同一型别才能作为引起食物中毒的病原学诊断依据。传统的检测方法繁琐,费时费力,同时遗传学研究表明^[7],SEA、SED、SEE之间的同源性为54%-84%,因此,用免疫学方法检测时,SEA、SED、SEE可能会出现血清型之间的交叉反应,导致不能准确进行分型检测。为满足食物中毒快速检测的需要,很多实验室采用了PCR方法检测SEs。在PCR检测金黄色葡萄球菌肠毒素基因的方法具有快速、准确、灵敏度高、特异性好,得到了广泛的使用,具有广泛的应用前景。

在金黄色葡萄球菌引起的食物中毒中,约77.8%的食物中毒都是由SEA引起^[8],并且很少剂量的SEA即能够引起呕吐,甚至毒性休克综合症症状^[9]。因此检测SEA对金黄色葡萄球菌引起的食物中毒的调查和诊治都具有重要意义。本研究针对SEA基因进行检测,特异性好,可排除其他常见食物中毒病原菌的干扰,灵敏度高,菌浓度为2.9×10³ CFU/ml、PCR反应体系中仅有29CFU的金黄色葡萄球菌既可检出,快速,整个检测从模板制备到PCR产物分析只需4小时左右,为产SEA金黄色葡萄球菌引起的食物中毒和医院感染的快速查因及流行病学调查提供了可行的方法。

参考文献:

[1] Liang YS. Advance in the research of detection of endotoxin of Staphylococcus aureus[J]. China Trop Med,2008,8(9):1658-1659. (In Chinese)

(梁毅珊. 金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法的研究进展[J].中

国热带医学,2008,8(9):1658-1659.)

[2] Zhang YJ,Zhang JY,Mei LL,et al. Typing and distribution of toxin genes among Staphylococcus aureus isolates from samples of raw milk [J].Chin J health lab technol,2005,15(6):682-684.(In Chinese)

(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):682-684.)

[3] Zschock M,Kloppert B,Wolter W,et al. Pattern of enterotoxin genes seg, she, sei and sej positive Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis[J].VetMicrobiol,2005,108: 243-249.

[4] Wang B,Lin YM,Xian HX,et al. Survey of drug resistance of food-borne Staphylococcus aureus in Shenzhen City[J]. China Trop Med,2011,11(1):5-7.(In Chinese)

(王冰,林一曼,冼慧霞,等.深圳市食源性金葡菌的耐药趋势及携带肠毒素监测[J].中国热带医学,2011,11(1):5-7.)

[5] Yang YJ,Huang WW,Wang ZY,et al. A study on fast detection of four kinds of Staphylococcus aureus endotoxin genes with a multiplex PCR method[J].Modern Prev Med,2009,36(9): 1713-1715.(In Chinese)

(杨玉军,黄韦唯,王志云,等.多重PCR快速检测金黄色葡萄球菌四型肠毒素基因的研究[J].现代预防医学,2009,36(9):1713-1715.)

[6] Liu Q,Liao LL,Xu YJ,et al. Development of fluorescence quantitative PCR method for detection of enterotoxin A of Staphylococcus aureus[J]. Chin J health lab technol,2010,20(4):788-789,803.(In Chinese)

(刘渠,廖灵灵,许亚军,等.荧光定量PCR检测金黄色葡萄球菌肠毒素A方法研究[J].中国卫生检验杂志,2010,20(4):788-789,803.)

[7] Wang HL,Cai HP,Zhang RS,et al. Detection of Gene Encoding Staphylococcal Enterotoxin C by PCR[J].Practical Prev Med,2008,15(2): 344-346.(In Chinese)

(王丽华,蔡慧萍,张如胜.PCR检测金黄色葡萄球菌肠毒素C基因的研究[J].实用预防医学,2008,15(2):344-346.)

[8] Casman EP. Staphylococcal enterotoxin[J].Sci,1965,128:124-131.

[9] Yan DH,Xu SL,Wang S,et al. An Analysis of the Research Progress of Staphylococcal Enterotoxin A[J]. J Jia xing University,2006,18(6): 122-125.(In Chinese)

(颜丹红,徐水凌,王莎,等.葡萄球菌肠毒素A的研究进展分析[J].嘉兴学院学报,2006,18(6):122-125.)

收稿日期 2012-09-11 编辑 符式刚