

·论 著·

## 葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌肠毒素液相悬浮芯片方法的建立

石晓路,吕冬月,林一曼,邱亚群,李迎慧,扈庆华\*

**摘要** :目的 采用 Luminex 液相悬浮芯片检测方法,建立一管同时检测 19 种葡萄球菌肠毒素和蜡样芽胞杆菌肠毒素的快速筛查方法。方法 根据 GenBank 公布的葡萄球菌肠毒素 *entA-entR* 基因、蜡样芽胞杆菌 *cesB*、*nheB* 基因,设计特异性引物和探针,优化反应体系和条件,建立 19 种肠毒素的 Luminex 液相悬浮芯片检测方法。结果 Luminex 液相悬浮芯片体系检测 19 种肠毒素互不干扰,经验证 80 株金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌菌株,均出现特异性荧光中值信号。Luminex 液相悬浮芯片技术从样品处理到检测结果需 3.5h 左右。结论 Luminex 液相悬浮芯片筛查方法可应用于食物中毒等应急检测的快速和高通量筛查。

**关键词** :葡萄球菌,蜡样芽胞杆菌,肠毒素,Luminex 液相悬浮芯片

**中图分类号** :R37 **文献标识码** :A **文章编号** :1009-9727(2012)11-1307-04

**Development and application of Luminex liquid chip assay for rapid identification of enterotoxins of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*.** SHI Xiao-lu, LV Dong-yue, LI Yi-man, et al.(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China)

**Abstract** : **Objective** To develop a Luminex liquid chip assay for the simultaneous detection of 19 enterotoxins in a single-tube reaction. **Methods** Specific primers and probes were designed and synthesized for *entA-entR* gene of *Staphylococcus*, *cesB* and *nheB* gene of *Bacillus cereus* based on the target gene sequences from GenBank. Then the Luminex liquid chip assay for the detection of 19 enterotoxins were developed. **Results** The developed assay were tested against 80 strains and no cross-reaction and false signals were observed using Luminex liquid chip assay. **Conclusion** The Luminex liquid chip assay could be applied to the identification of 19 enterotoxins and the assay would be finished within 3.5 hours including samples DNA preparation and detection. The method could be applied to the rapid and simultaneous detection of enterotoxins in food poisoning.

**Key words** :*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, Enterotoxin, Luminex liquid chip Multiplex assay

葡萄球菌肠毒素(SE)目前已发现的有 17 种,常用的检测方法仅能鉴定常见的 A-D 型肠毒素,对新发现的肠毒素则无法检出而产生漏检。蜡样芽胞杆菌也可产生肠毒素,包括腹泻毒素和呕吐毒素。

近年来,随着 PCR 技术和荧光 PCR 技术的发展,基于核酸水平的肠毒素检测方法逐渐开发。但目前现有的快速检测方法只能 1 管检测 1~2 种致病菌,不能满足多个致病菌或多种肠毒素的检测。因此高通量检测方法可以作为有效预防食源性疾病发生和进行食品安全风险监测的重要技术手段。近年来所关注的高通量研究技术主要包括焦磷酸测序法、454 (Roche)测序、Solexa 技术、反向杂交、寡核苷酸芯片技术、PCR 技术、液相悬浮芯片技术、高分辨溶解曲线分析、质谱分析和液质联用等技术<sup>[1-4]</sup>。本研究建立了 Luminex 液相悬浮芯片检测 19 种肠毒素的检测体系,实现食物中毒检测中的肠毒素基因的初步筛查,可提高阳性检出率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验用菌株** 葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌菌株共 80 株,其中 8 株菌株购自中国药品生物制品检定所,72 株菌株为深圳市历年食物中毒的标本。取 3 株金黄色葡萄球菌标准菌株和 2 株蜡样芽胞杆菌标准菌株(63302 和 63303)用于体系建立和检出限分析,80 株临床菌株和标准菌株用于特异性试验。标准菌株信息见表 1。

**1.1.2 菌株分离培养与鉴定** 按中华人民共和国卫生部发布的《食品安全国家标准-食品微生物学检验》(GB4789-2010)操作。

**1.1.3 试剂与仪器** rTaq 酶、dNTP 等购自 Takara 公司;基因组提取试剂盒购自 Qiagen 公司;微球交联试剂盒、链霉素亲和素藻红蛋白(SA-PE)、分析校准试剂、光路校正试剂等购自美国 Bio-Rad 公司。Bio-Plex 悬浮芯片系统为美国 Bio-Rad 公司产品,ND-1000 紫外可见光分光光度计为美国 NanoDrop 公司产品,台式高速冷冻离心机为 eppendorf 公司产品;

基金项目 国家自然科学基金项目(No.81071433) 广东省医学科学技术研究基金(No.B2012323) 深圳市科技计划项目(No.200902085)

作者单位 深圳市疾病预防控制中心,深圳重大传染病防控重点实验室 广东 深圳 518055

作者简介 石晓路(1978~),女,汉族,安徽舒城县人,硕士,副主任技师,主要从事病原菌快速检测和分子分型研究。

\*通讯作者 E-mail huqinghua03@163.com

表 1 实验用标准菌株

Table 1 Standard strains

菌株编号 Strain No.	菌株名称 Strain name	肠毒素类型 Enterotoxin type	菌株来源 Source
26072	金黄色葡萄球菌 ATCC13565 <i>Staphylococcus aureus</i>	肠毒素 A 型 Enterotoxin A	中检所 CMCC
26074	金黄色葡萄球菌 ATCC27664 <i>Staphylococcus aureus</i>	肠毒素 E 型 Enterotoxin E	中检所 CMCC
26075	金黄色葡萄球菌 ATCC14458 <i>Staphylococcus aureus</i>	肠毒素 B 型 Enterotoxin B	中检所 CMCC
63301	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereu</i>	不明 ND	中检所 CMCC
63302	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereu</i>	不明 ND	中检所 CMCC
63303	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereu</i>	不明 ND	中检所 CMCC
63304	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereu</i>	不明 ND	中检所 CMCC
63305	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereu</i>	不明 ND	中检所 CMCC

PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品 ,菌液比浊仪为法国生物梅里埃公司产品。

1.1.4 引物、探针的设计 根据 GenBank 中金黄色葡萄球菌肠毒素 entA-entR 基因、蜡样芽胞杆菌 cesB、nheB 基因 ,分别设计 19 对特异性的引物和 19 个探针 ,其中每对的下游引物 5′ 端均用 Biotin 生物素标记 ,19 个探针 5′ 端均用 NH<sub>2</sub>C6 标记。引物和探针均由 TAKARA 公司合成 ,序列略。

1.2 方法

1.2.1 反应模板的制备 菌株分别接种于 LB 肉汤 ,37℃ 过夜培养后 ,各取 1ml 增菌液 ,12 000rpm 离心 5min ,沉淀加入 200μl 灭菌纯水悬浮 ,100℃ 煮沸 5min 后 ,12 000rpm 离心 2min ,取 5μl 上清作为多重 PCR 反应的模板。

1.2.2 多重液相悬浮芯片体系的建立

1.2.2.1 通过优化反应条件 ,建立多重实时荧光定量 PCR ,总体积为 25μl ,内含 2.5μl 10×PCR 缓冲液 ,1U Taq 酶 ,0.04~0.1μmmol/L 引物 ,2mmol/L MgCl<sub>2</sub> ,0.2mmol/L dNTP ,DNA 模板 5μl。PCR 反应程序为 :95℃ 5min ,95℃ 30s ,55℃ 45s ,72℃ 45s ,循环 40 次 ;最后 72℃ 10min。

1.2.2.2 微球与探针偶联 将合成的 19 种探针分别加入到活化后的编码微球中 ,使探针 5′ 端的氨基和微球的羧基发生脱羧反应 ,于 4℃ 避光保存。

1.2.2.3 检测 将耦连探针的微球混合液 10μl 加入到 96 孔板上 ,再加入 7μl PCR 产物和 33μl 1.5×杂交检测缓冲液 ,95℃ 变性 5min 后 ,52℃ 杂交 15min ,再向每个反应孔内加入 25μl 报告混合液 ,于 52℃ 杂交 5min。杂交反应后上机 ,用 Luminex 悬浮芯片系统读取荧光信号 MFI 值 ,分析数据。

1.2.2.4 cutoff 值的确定 将各样品 MFI 值的均值定为检测样品的 cutoff 值 ,作为判断阴阳性结果的界值。样品的 MFI≥250 判为阳性 ,MFI<100 判为阴性 ;将 150≤MFI<250 设置为灰度区间。若样品的 MFI 值处在灰度区间 ,则需重复实验<sup>[5]</sup>。

1.2.3 特异性实验 选取 80 株金黄色葡萄球菌和蜡

样芽胞杆菌菌株 ,增菌后提取基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板 ,再将 PCR 产物和偶联探针的微球杂交后上机读取荧光中值 ,根据检测信号 ,验证 Luminex 检测方法的特异性。

1.2.4 检出限实验 选取 3 株金黄色葡萄球菌标准菌株(肠毒素 A、B、E 型)、2 株临床分离株(肠毒素 C 和 D 型)以及 2 株蜡样芽胞杆菌标准菌株作为检出限试验的代表株 ,同时进行 DNA 及菌液的检出限分析。

DNA 检出限实验 :用试剂盒提取上述菌株的 DNA ,测定 DNA 浓度。将模板定量至 100ng/5μl ,分别采用 10 倍梯度稀释法做 6 个稀释度 ,每个稀释度各取 5μl 进行多重 PCR 反应 ,扩增产物进行 Luminex 液相芯片技术检测。

菌液检出限实验 :分别进行增菌培养 ,将各增菌液调至 0.5 个麦氏单位 ,分别采用 10 倍梯度稀释法做 8 个稀释度 ,同时做菌落计数。按照 2.1 制备菌液模板 ,每个稀释度各取 5μl 进行多重 PCR 反应 ,扩增产物进行 Luminex 液相芯片技术检测。

2 结果

2.1 Luminex 检测 19 种肠毒素方法的建立 通过调整 Mg<sup>2+</sup>含量、rTaq 酶含量、退火温度、适当延长 PCR 反应产物和微球杂交的时间 ,建立 Luminex 液相芯片技术对葡萄球菌肠毒素 entA-entR 基因和蜡样芽胞杆菌肠毒素 cesB、nheB 基因的检测方法 ,部分检测结果见表 2。

2.2 特异性实验 Luminex 液相悬浮芯片技术对 19 种靶基因的检测结果均为阳性 ,而非目的菌株检测结果均为阴性。与传统检测结果一致 ,并且 19 种目的基因之间无交叉反应 ,特异性达 100%。

2.3 检出限实验 在多重检测体系中 ,DNA 检出限为 1pg/PCR-10pg/PCR ,其中蜡样芽胞杆菌的检出限最低 ,达到 1pg/PCR ;其他型别肠毒素菌株检出限均为 10pg/PCR。对于菌液检出限为 10<sup>5</sup>cfu/ml-10<sup>7</sup>cfu/ml ,其中蜡样芽胞杆菌的检出限最低 ,达到 10<sup>5</sup>cfu/ml ;其他型别肠毒素菌株检出限均为 10<sup>7</sup>cfu/ml。

表2 Luminex液相芯片多重体系检测MFI值

Table 2 Detection results of Luminex

菌名 Strains	entA(MFI)	entB(MFI)	entC(MFI)	entD(MFI)	entE(MFI)	cesB(MFI)	nheB(MFI)
NTC	5	6	8	7	10	5	11
葡萄球菌 entA of <i>S.aureus</i>	410	15	28	12	22	22	15
葡萄球菌 entB of <i>S.aureus</i>	7	470	21	10	12	11	16
葡萄球菌 entC of <i>S.aureus</i>	10	17	340	9	19	11	15
葡萄球菌 entD of <i>S.aureus</i>	5	15	30	480	30	30	15
葡萄球菌 entE of <i>S.aureus</i>	5	14	22	14	510	13	17
蜡样芽胞杆菌 cesB of <i>B.aureus</i>	7	15	19	8	11	502	16
蜡样芽胞杆菌 nheB of <i>B.aureus</i>	4	13	30	10	10	8	605
截断值 Cutoff	250	250	250	250	250	250	250

### 3 讨论

针对病原微生物传统检测方法操作繁琐,耗时长,灵敏度低等缺陷,各种快速简便的高通量检测技术应运而生,在病原微生物的检测和预防控制领域具有重要的应用价值<sup>[6-7]</sup>。本文所建立的Luminex液相悬浮芯片快速检测方法可用于金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌肠毒素的初步筛查和鉴定。

目前报道的多种病原体高通量检测技术中<sup>[8-11]</sup>,王子良等<sup>[11]</sup>针对单增李斯特菌、志贺菌和沙门菌建立液相芯片检测方法,仅检测3种致病菌,通量不足。胡瑞等<sup>[10]</sup>建立了xMAP液态芯片同时检测四种病原微生物的方法,但他以重组质粒DNA为模板,而不是以菌株DNA作为检测对象,也没有应用于实际样品。本文所建立的Luminex液相悬浮芯片体系首次对19种肠毒素进行检测。结果表明,Luminex液相悬浮芯片体系检测的80株临床菌株和标准菌株,均出现特异性荧光中值信号,非目的菌株无荧光中值信号,19种肠毒素检测互不干扰,特异性良好。本文所建立的Luminex检测法对肠毒素的最低检出限不同,为1pg/PCR-10pg/PCR和 $10^5$ cfu/ml- $10^7$ cfu/ml范围内。可用于食物中毒标本中肠毒素的筛查和初步鉴定。

Luminex液相悬浮芯片技术在国内虽然在逐步得到重视,但该技术仍处于研发阶段,成型的试剂盒并不多,在国外,根据液相芯片的特点,Luminex公司设计了可以用于临床检测和实验的试剂盒。目前该技术还存在着一些缺点,如抗体匹配、交联条件的最优化、多种反应混合交叉反应的避免及反应条件的优化、数据的处理等等,因此,Luminex液相悬浮芯片技术还有待进一步研究和评价。另外,Luminex液相悬浮芯片技术需要进行探针与荧光微球共价结合、多重PCR、PCR开盖后处理、结果分析等步骤,影响因素较多,容易出现偏差。而本实验室所研发的多重荧光PCR技术<sup>[12-13]</sup>无需开盖后处理,可实现一管对多种病

原菌的快速检测。另外和本室建立的多重荧光PCR方法进行比较,Luminex液相悬浮芯片对多种病原体进行检测时整体灵敏度偏低,因此开发实时荧光PCR技术有着更为美好的前景。

### 参考文献:

- [1] Holt KE, Parkhill J, Mazzoni CJ, et al. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in salmonella Typhi [J]. Nat Genet, 2008, 40(8):987-993.
- [2] Lee DY, Lauder H, Cruwys H, et al. Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens [J]. Sci Total Environ, 2008, 398(1-3):203-211.
- [3] Garritano S, Gemignani F, Voegelé C, et al. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus [J]. BMC Genet, 2009, 10(1):5.
- [4] Fung DY. Rapid methods and automation in microbiology [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety, 2002, 1:3-22.
- [5] Dirk Dereg, Scott A. Gilbert, Sandor Dudas, et al. A multiplex DNA suspension microarray for simultaneous detection and differentiation of classical swine fever virus and other pestiviruses [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 136:17-23.
- [6] Mao ZG, Zheng HX, Wang XY, et al. The evaluation of the detection of intestinal pathogens by microarray method [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2008, 17(10):809-812. (in Chinese)  
(毛正果, 郑浩轩, 王新颖, 等. 基因芯片检测常见肠道致病菌感染的研究与评价 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(10):809-812.)
- [7] Sugihara T, Koda M, Maeda Y, et al. Rapid identification of bacterial species with bacterial DNA microarray in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis [J]. Intern Med, 2009, 48(1):3-10.
- [8] Zhang GQ. Development of high throughput methods for pathogen detection [J]. Chinese Journal of Immunology, 2010, 26(9):859-863. (In Chinese)  
(张国强. 病原微生物高通量检测方法的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(9):859-863.)
- [9] Gao X, Wang JL. The application of gene microarray in detecting of pathogenic bacteria [J]. China Biotechnology, 2010, 30(2):100-104. (In Chinese)

(下转第1316页)



居民每人每天镉的平均暴露量为9.3008~16.4537 $\mu\text{g}$ ,呈上升趋势,与镉的PTDI值比较,占PTDI值的18.60%~32.91%,但仍提示深圳市居民通过食用粮食类食品摄入镉存在一定风险。

#### 参考文献:

- [1] Wen J, Li H, Dai CF, et al. Risk assessment of cadmium in food in Guangdong Province[J]. South China J Prev Med, 2008, 34(1): 63-64. (In Chinese)  
(闻剑, 李海, 戴昌芬, 等. 广东省食品中镉的危害评估[J]. 华南预防医学, 2008, 34(1): 63-64.)
- [2] Zhang WP. Statistical methods of the data below the detection limit in Environmental monitoring[J]. Shanghai Environmental Science, 1993, 12(11): 38-40. (in Chinese)  
(张文平. 环境监测中低于检出限数据的统计处理方法[J]. 上海环境科学, 1993, 12(11): 38-40.)
- [3] Gao RJ, Chen LZ, Zhang WJ. Review on Pesticide Residues Acute Dietary Risk Assessment [J]. Food Science, 2007, 28(2): 363-368. (In Chinese)  
(高仁君, 陈隆智, 张文吉. 农药残留急性膳食风险评估研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 363-368.)
- [4] Huang W, Wang Z, Pan LB, et al. Exposure Assessment of Pollution of Dietary Cadmium in Foods in Shenzhen City[J]. Chin J Food Hyg, 2008, 20(8): 405-408. (in Chinese)  
(黄薇, 王舟, 潘柳波, 等. 深圳市食品镉污染的暴露量评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(8): 405-408.)
- [5] Liu SF. Grey system theory and its application[M]. Beijing Science Press. 1999, 1051. (in Chinese)  
(刘思峰. 灰色系统理论及其应用[M]. 北京科学出版社, 1999, 1051.)
- [6] LUO You-xin, PEN Zhu, ZHANG Long-ting. Grey GM (1,1) model with function transfer method for the wear trend prediction and its application[J]. Internal J Plant Eng and Management, 2001, 21(4): 220-232.  
收稿日期 2012-07-13 编辑 谢永慧

(上接第1309页)

- (Chinese)  
(高兴, 王景林. 基因芯片技术在病原细菌检测中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 100-104.)
- [10] Hu R, Zhao JY, Chen DK. Application of Luminex xMAP technology in the rapid, high-throughput, multiplexed detection and identification of four pathogens [J]. Progress Modern Biomed, 2008; 8(12): 2232-2235. (In Chinese)  
(胡瑞, 赵金银, 陈德坤. 应用xMAP液态芯片多重快速检测四种病原微生物的研究[J]. 现代生物医学进展, 2008; 8(12): 2232-2235.)
- [11] Wang ZL, Wang Y, Peng SJ. Application of new liquid-chip system in rapid detection of foodborne pathogens [J]. Chin J Health Lab Technol, 2010, 20(3): 462-463. (In Chinese)  
(王子良, 王颖, 彭少杰, 等. 新型液相芯片系统在食源性致病菌快速检测中的应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(3): 462-463.)
- [12] Shi XL, Hu QH, Zhang JF, et al. Rapid simultaneous detection of Salmonella and Shigella using modified molecular beacons and real-time PCR [J]. Chin J Epidemiol, 2006, 27(12): 1053-1056 (In Chinese)  
(石晓路, 扈庆华, 张佳峰, 等. 多重实时PCR快速同时检测沙门菌和志贺菌[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(12): 1053-1056)
- [13] Qiying Huang, Qinghua Hu, Qingge Li. Identification of 8 Foodborne Pathogens by Multicolor Combinational Probe Coding Technology in a Single Real-Time PCR[J]. Clin. Chem, 2007, 53(10): 1741-1748.  
收稿日期 2012-08-06 编辑 谢永慧

## 作者单位\署名与通讯作者

1 作者单位 作者单位应注明全称(到科室),并注明所在省、市及邮政编码。在作者姓名右上角加注不同的阿拉伯数字序号,在作者名下依序号分述其单位名称,不同单位之间用分号;隔开。

英文摘要中的作者单位著录项目应与中文一致,并应在邮政编码后加注国名 China。

2 署名 英文摘要中国内作者的姓名用汉语拼音字母标注。汉族作者姓名姓在前,复姓连写,姓全部大写,名在后,首字母大写,双名间加连字符。名不缩写,姓与名之间空1格。对于复姓或双名的汉语拼音音节界限易混淆者,应加隔音号。少数民族作者姓名按照民族习俗,用汉语拼音字母音译转写,分连次序依民族习惯。香港、澳门、台湾地区作者姓名的书写方式应尊重其传统习惯。外国作者的姓名写法遵从国际惯例。

3 通讯作者 通讯作者的姓名和E-mail地址置于文章首页地脚。

本刊编辑部