·实验研究·

重组酶介导扩增方法快速检测 A 族乙型溶血性链球菌

魏莹 [1],郭利川 [2],张小平 [1],黄雷 [3],郑乐怡 [1],应清界 [2],吴忠华 [1],郑伟 [1]

1.杭州海关,浙江 杭州 310016;2.江苏齐天基因生物科技有限公司;3.舟山海关

摘要:目的 利用重组酶介导核酸扩增技术(RAA)建立快速检测 A 族乙型溶血性链球菌的方法。**方法** 根据 A 族乙型溶血性链球菌细胞包膜蛋白酶 A(*CepA*)基因的保守序列设计引物和探针,通过构建含有目的基因片段的质粒分析方法的灵敏度,通过检测沙门菌、大肠杆菌、志贺菌和金黄色葡萄球菌标准菌株分析方法的特异性。**结果** 建立的 RAA 方法在 39℃,短时间内(<20 min)完成检测,灵敏度为 10 拷贝/μl,与沙门菌、大肠杆菌、志贺菌和金黄色葡萄球菌标准菌株无交叉反应,具有良好的特异性。**结论** 建立的 RAA 方法速度快、特异性强、灵敏度高,适用于 A 族乙型溶血性链球菌的快速检测。

关键词:A 族乙型溶血性链球菌;重组酶介导扩增;分子检测

中图分类号:R378.1+2 **文献标识码:**A **DOI:**10.16408/j.1004-9770.2018.05.003

Establishment of Recombinase aided amplification assay for group A *streptococcus pyogens* detection

WEI Ying*, GUO Li-chuan, ZHANG Xiao-ping, HUANG Lei, ZHENG Le-yi, YING Qing-jie, WU Zhong-hua, ZHENG Wei

Hangzhou Customs, Hangzhou, Zhejiang 310016, China

Abstract: Objective To establish Recombinase aided amplification(RAA) assay for the detection of group A *streptococcus pyogens*. **Methods** A pair of primers and probe were designed based on *CepA* gene sequence of group A *streptococcus pyogens*. The *CepA* gene was cloned into a plasmid for sensitivity detection. The strains of *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella* and *Staphylococcus aureus* were used to test specificity. **Results** This RAA method was performed in a short time (<20 min) under the constant temperature of 39℃,with low detection limitation (10 copies/μl). This method had no cross reaction with *Salmonella*,*Escherichia coli*,*Shigella* and *Staphylococcus aureus* strains. **Conclusion** The RAA method was rapid,specific and sensitive. It could be used to detect group A *streptococcus pyogens* rapidly.

Key words: Group A *streptococcus pyogens*;Recombinase aided amplification;Molecular detection

http://www.ixueshu.com

近年来,食品安全成为公众关注的焦点问题,而微生物污染造成的食源性疾病仍是食品安全中最突出的问题。溶血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)属于链球菌属,对热和化学清毒剂均敏感,常引起扁桃体、咽部、中耳感染,也是猩红热、肾盂肾炎的病原体。溶血性链球菌广泛存在于空气、水、尘埃、粪便及健康人和动物的口腔、鼻腔、咽喉中,可通过直接接触、飞沫或皮肤、粘膜伤口而感染,而被污染的食品如奶、肉、蛋及其制品也会导致人类感染。

A 族乙型溶血性链球菌是链球菌中致病性最强的一种,是能够引起人或动物感染性疾病的病原体[1-3],最常导致的是急性咽峡炎,其次为皮肤感染,还可引起各种化脓性和非化脓性并发症。目前实验室对 A 族乙型溶血性链球菌的检测技术主要有细菌分离培养[4]和免疫学方法(酶联免疫吸附试验[5-7]、免疫磁性分离技术[8])。随着 PCR 技术的发展,越来越多的高效、准确、特异的 PCR 方法得以建立,如实时荧光定量 PCR 方法[9]、LAMP 技术[10-11]和基因芯片技术[12]等。

重组酶介导等温核酸扩增技术, 即 RAA 技术,是一种可以在等温条件下(39℃)反应的技术,与PCR 法相比,具有反应快速,灵敏度高,特异性强,操作简单等特点,已被应用到病原微生物检测中[13-17]。本研究采用 RAA 技术,建立高效、特异、操作简单且适用于现场检测 A 族乙型溶血性链球菌的方法,旨在为

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFF0203200),生物安全关键技术研发重点专项项目(2016YFC1202700)

通信作者: 郑伟,E-mail:zwei@ziq.gov.cn

溶血性链球菌的早期快速诊断提供实验基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株 乙型溶血性链球菌(*Streptococcus hemolytic*-β,ATCC1059)、肠炎沙门菌标准菌株(*Salmonella enteritidis*,ATCC15611)、大肠杆菌标准菌株(*Escherichia coli*,ATCC25922)、福氏志贺菌标准菌株(*Shigella flexneri*,ATCC12022)、金黄色葡萄球菌标准菌株(*Staphylococcus aureus*,ATCC6538)。以上菌株均为广东环凯微生物科技有限公司生产。

1.2 仪器与试剂 质粒提取试剂盒和基因组提取试剂盒(天根);恒温核酸扩增检测仪(RAA-F1620)、RAA 核酸扩增试剂盒和 RAA 核酸扩增试剂盒 (荧光法)(江苏奇天基因生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 提取 依据相应细菌的培养基,培养 1.1 中的细菌,取培养好的细菌菌液,按基因组提取试剂盒说明书进行提取。

1.3.2 引物和探针设计 在 NCBI(The National Center for Biotechnology Information)数据库中找出链球菌细胞包膜蛋白酶 A (*CepA*) 基因组序列,Gen Bank 号如下:AP018337.1、CP007562.1、DQ413046.2、DQ413034.2、AP014596.1、CP007023.1、BA000034.2、AE014074.1、AE009949.1、AM29500731、LN83103 4.1、EU73695.1、HG316453.2、DQ413039.2、DQ413041.2。在软件上(DNAMan7.0)进行序列比对,找出保守区域,进行引物和探针设计。

1.3.3 RAA 基础扩增体系和条件 采用 RAA 核酸扩增试剂盒,扩增体系为不引进探针的反应体系,反应产物用琼脂糖凝胶电泳检测,按 RAA 核酸扩增试剂盒使用说明配制反应体系,总体积为 50 μl,包括反应缓冲液 25 μl、无菌双蒸水 17.5 μl;正向和反向引物(10 μmol/L)各 2 μl、DNA 模板(阴性对照为水)1 μl,混匀后加到 RAA 反应单元冻干粉中,使之溶解均匀;将 2.5 μl 醋酸镁(280 mmol/L)溶液加到干粉管管盖上, 放入恒温振荡混匀仪,39℃反应 40min。反应结束后,向反应管中加入 50 μl 酚/氯仿(1∶1),振荡均匀,12 000×g 离心 1 min,吸取 10 μl 上层液进行琼脂糖凝胶电泳。

1.3.4 RAA 荧光扩增体系和条件 采用 RAA 核酸扩增试剂盒(荧光法),是引进探针的扩增体系,可对结果进行实时荧光监测。反应体积为50 μl,包括反应缓冲液 25 μl、无菌双蒸水 16.7 μl、正向和反向引物(10 μmol/L)各 2.1 μl、探针(10 μmol/L)0.6 μl、DNA 模板(阴性对照为水)1 μl,充分混合加到 RAA 反应单元冻干粉中,使之溶解均匀,瞬时离心;将 2.5 μl 醋酸镁(280 mmol/L)溶液加入到干粉管管盖上,放入到恒温振荡混匀仪,39℃,短振,然后放入恒温核酸扩增检测仪中,39℃反应 20 min。

1.3.5 质粒构建和拷贝数计算 选取的 A 族乙型溶血性链球菌检测 *CepA* 基因碱基序列(360 bp),如下所示:5’-TGACAACAACAGTAGCAGCAGATGAGCTAACCACAACGAGTGAACCAACAATCACGAATCACACTCAACAACAAGCGCAACATCTCACCAATACAGAGTTGAGCTCAGCTGAATCAAAACCTCAAGACACATCACAAATCACTCTCAAGACAAATCGTGAAAAAGAGCAACCACAAGGTCTAGTCTCTGAGCCAACCACAACTGAGCTAGCTGACACAGATGCAGCACCAATGGCTAATACAGGTCCTGATGCGACTCAAAAAAGCGCTTCTTTACCGCCAGTCAATACAGATGTTCACGATTGGGTAAAAACCAAAGGAGCTTGGGACAAGGGATACAAAGGACAAGGCAAGGTTGTCG-3’,委托上海生工生物工程有限公司合成。拷贝数(拷贝/μl) =[(6.02×10^{23})×质粒浓度 (ng/μl)×10^{-9}]/(DNA 长度×660)。

1.3.6 灵敏度检测 将合成的质粒稀释为 10^4、10^3、10^2、10^1、10^0 拷贝/μl,分别作为 DNA 扩增模板,按照 RAA 荧光扩增体系检测扩增结果。

1.3.7 特异性检测 特异性检测包括检测乙型溶血性链球菌、肠炎沙门菌、大肠杆菌、福氏志贺菌和金黄色葡萄球菌, 按照 RAA 荧光扩增体系检测扩增结果。

2 结 果

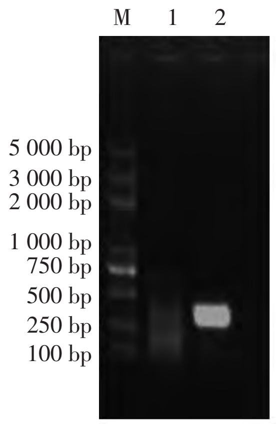
2.1 引物和探针设计 经过 NCBI 数据库中多条 A 族乙型溶血性链球菌 *CepA* 基因序列比对, 设计的探针和引物的序列见表 1。

表 1 根据 *CepA* 基因保守序列设计的引物和探针

引物/探针	序列(5’-3’)	扩增长度(bp)
F	CAACAACAGTAGCAGCAGATGAGCTAACCAC	354
R	CAACCTTGCCTTGTCCTTTGTATCCCTTGTC	
P	CTAGCTGACACAGATGCAGCACCAATGGC(FAM-dT)A(THF) (BHQ-dT)ACAGGTCCTGATGCG	

http://www.ixueshu.com

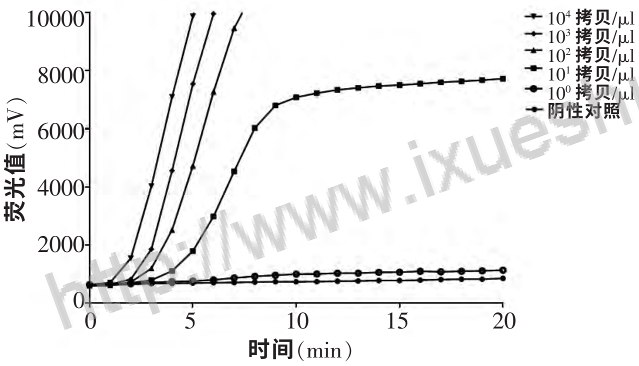
2.2　RAA 基础扩增结果　以乙型溶血性链球菌的基因组 DNA 为模板进行 RAA 基础扩增，电泳结果如图 1 所示。扩增的目的条带大小和预期相符，阴性对照成立。



M：DNA 分子量标准；1：阴性对照；2：乙型溶血性链球菌

图 1　乙型溶血性链球菌基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.3　灵敏度检测　以合成的质粒 DNA 为模板进行灵敏度检测，扩增结果如图 2 所示。最低可检测到 10 拷贝/μl 的质粒 DNA，阴性对照成立。



http://www.ixueshu.com

图 2 含 *CepA* 基因的质粒扩增结果

2.4　特异性检测　以乙型溶血性链球菌、沙门菌、大肠杆菌、志贺菌和金黄色葡萄球菌的基因组 DNA 为模板进行扩增。结果表明，只有乙型溶血性链球菌基因组 DNA 出现扩增，其他细菌未见相应的扩增，无交叉反应(图 3)。

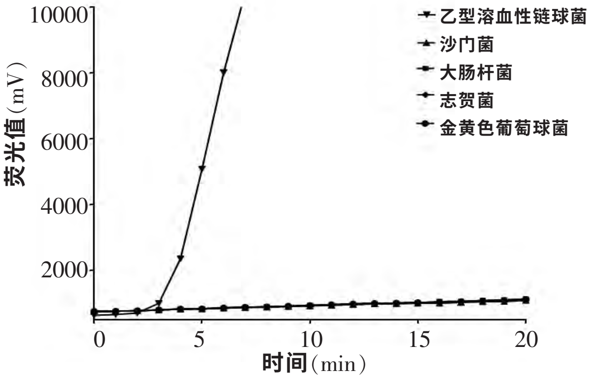


图 3　RAA 扩增的特异性

3　讨　论

溶血性链球菌感染和相关并发症一直是困扰公共健康和国民经济的严重问题。据统计，全球每年由溶血性链球菌引起的急性咽峡炎和皮肤感染分别为 6.16 亿例和 1.11 亿例，每年至少有 51.7 万人死于这些严重疾病[18]。

实验室常见的 A 族乙型溶血性链球菌方法主要有分离培养法、免疫学方法和分子检测。培养法为检测 A 族乙型溶血性链球菌的金标准，但也存在一定的缺点，如检测时间长、操作流程复杂、需要比较专业的人员来操作等。免疫学技术在检测 A 族乙型溶血性链球菌方面应用的也很多，反应时间短、操作简单，被广泛应用于链球菌的检测，但容易出现假阳性结果。分子检测主要是以 PCR 技术为主，具有检测灵敏度高，特异性好等优点。但 PCR 需要精密的变温设备，比较昂贵，也需要专业的人员操作。等温核酸扩增技术中应用较多的是 LAMP 技术，在 60~65℃下进行反应，操作方便，不需要特殊的设备，但 LAMP 需要至少 4 条引物，设计比较复杂，而且扩增产物无法分析。

重组酶介导扩增技术的引物设计简单，和 PCR 一样，只需要两条引物，并且反应温度为 39℃，反应时间也比较短，非常适合快速检测。本研究建立的 A 族乙型链球菌重组酶介导扩增方法检测链球菌 *CepA* 基因，在 39℃等温条件下，可在 20 min 内检测出目的基因，灵敏度可达到 10 拷贝/μl。与 PCR 法相比，RAA 法是在恒温下反应，明显缩短了反应时间，操作简单，摆脱了复杂昂贵的仪器所产生的经济成本，可做大量样品的快速检测。该方法快速、准确，可在基层推广应用。

参考文献

[1]　陈木林. 快速检测咽拭子中 A 群 β 溶血性链球菌结果的分析[J].现代保健：医学创新研究，2007，35(4)：7.

[2]　梁云梅，杨永弘.A 族 β 溶血性链球菌与猩红热的相关研究[J].微生物学杂志，2009，29(4)：89-92.

[3]　张一举.A 组 β 型溶血性链球菌性咽炎的研究进展[J].新医学，2006，37(12)：830-831.

[4]　Schroeder BM. Diagnosis and management of group A *streptococcal pharyngitis* [J]. American Family Physician，2003，67(4)：880-883.

[5]　Pedreanez A，Viera N，Rincon J，et al. Increased IL-6 in supernatant of rat mesangial cell cultures treated with erythrogenic toxin type B and its precursor isolated from nephritogenic *streptococci* [J]. American Journal of Nephrology，2006，26(1)：75-81.

(下转第 323 页)

其健康关注涉及到地方卫计委、口岸联检单位、机场安检、航空公司、境外官方卫生部门等机构。对于境内部门,经过 SARS、甲型 H1N1 流感、中东呼吸综合征等多次疫情防控,已经积累了丰富的应对经验。在口岸区域内,卫生检疫人员根据职责在出入境航空器及人员传染病疫情防控过程中发挥着主导作用,防控措施能够得到有效落实。此次事件的难点在于与境外官方卫生部门的沟通,目前受到客观条件的限制,我国多数口岸卫生检疫工作未与境外卫生检疫相关部门建立直接联系,遇到此类突发事件通常采取一些间接途径,可能对疫情的及时、有效处置有一定影响。

参考文献

[1] 中国疾病预防控制中心. 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南(2015 版)[J]. 传染病专报,2015,3(37):1-44.
[2] Hall AJ,Glass RI,Parashar UD. New insights into the global burden of noroviruses and opportunities for prevention[J]. Expert Rev Vaccines,2016,15(8):949-951.
[3] Ahmed SM,Hall AJ,Robinson AE,et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis:a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis,2014,14(8):725-730.
[4] 王家栋,章琪,方筠,等. 上海口岸首例邮轮大规模诺如病毒感染爆发的应急处置 [J]. 中国国境卫生检疫杂志,2009,32(5):297-301.
[5] 薛芳,蔡鹏,宋锋林,等. 输入性诺如病毒感染性腹泻暴发疫情的流行病学调查和处置 [J]. 中国国境卫生检疫杂志,2010,33(3):153-155.
[6] 章琪,方筠,田桢干,等. 国境口岸快速处置一起邮轮诺如病毒性急性胃肠炎爆发疫情 [J]. 中国国境卫生检疫杂志,2008,31(6):366-370.
[7] 秦迪,初艳慧,孙景異,等. 一起 GⅡ.6 型诺如病毒聚集性疫情的流行病学调查[J]. 中国学校卫生,2016,37(5):794-797.
[8] 张海燕,徐文彩,郭建新,等. 北京市东城区 2013-2015 年诺如病毒感染聚集性疫情流行病学特征分析 [J]. 国际病毒学杂志,2016,23(4):242-245.
[9] Mathijs E,deOliveira-Filho EF,Pozzo FD,et al. Infectivity of a recombinant murine norovirus (RecMNV) in Balb/cByJ mice[J]. Veterinary Microbiology,2016,192(8):118-122.
[10] Mathijs E,Stals A,Baert L,et al. A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses [J]. Food & Environmental Virology,2012,4(4):131-152.

收稿日期 2018-05-20

http://www.ixueshu.com

(上接第 316 页)

[6] Viera N,Pedreanez A,Rincon J,et al. Streptococcal exotoxin B increases interleukin-6,tumor necrosis factor alpha,interleukin-8 and transforming growth factor beta-1 in leukocytes[J]. Pediatric Nephrology,2007,22(9):1273-1281.
[7] Luo YH,Kuo CF,Huang KJ,et al. *Streptococcal pyrogenic* exotoxin B antibodies in a mouse model of glomerulonephritis[J]. Kidney International,2007,72(6):716.
[8] Fitzmaurice J,Duffy G,Kilbride B,et al. Comparison of a membrane surface adhesion recovery method with an IMS method for use in a polymerase chain reaction method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef[J]. Journal of Microbiological Methods,2004,59(2):243.
[9] O'Grady J,Ruttledge M,Sedanobalbás S,et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR [J]. Food Microbiology,2009,26(1):4-7.
[10] Notomi T,Okayama H,Masubuchi H,et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research,2000,28(12):E63.
[11] 张也,刘以祥. 美联免疫技术与食品安全快速检测[J]. 食品科学,2003,24(8):200-204.
[12] 陈昱,潘迎捷,赵勇,等. 基因芯片技术检测 3 种食源性致病微生物方法的建立[J]. 微生物学通报,2009,36(2):285-291.
[13] Carapetis JR,Steer AC,Mulholland EK,et al. The global burden of group A streptococcal diseases[J]. Lancet Infectious Diseases,2005,5(11):685-694.
[14] 郑伟,徐琦,罗鹏等.重组酶介导扩增方法快速检测黄热病毒[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(1):1-3.
[15] 郑伟,王刚,杨永耀等. 重组酶介导恒温扩增技术检测疟原虫方法的建立[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2016,23(1):15-20.
[16] Zhang XP,Guo LC,Ma RR,et al. Rapid detection of *Salmonella* with Recombinase Aided Amplification[J].Journal of Microbiological Methods,2017. DOI:10.1016/j.mimet.2017.06.011.
[17] 张小平,郑乐怡,魏莹,等. 重组酶介导扩增技术快速检测沙门菌方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2017,40(5):317-319.
[18] Carapetis JR,Steer AC,Mulholland EK,et al. The global burden of group A streptococcal diseases [J].Lancet Infectious Diseases,2005,5(11):685-694.

收稿日期 2018-05-03

word版下载：http://www.ixueshu.com
免费论文查重：http://www.paperyy.com
3亿免费文献下载：http://www.ixueshu.com
超值论文自动降重：http://www.paperyy.com/reduce_repetition
PPT免费模版下载：http://ppt.ixueshu.com