

金黄色葡萄球菌特异性 PCR 检测靶点的自动化筛选

范一灵^{1,2}, 朱东升^{1,3}, 胡瑜¹, 史贤明¹

1 上海交通大学农业与生物学院陆伯勋食品安全研究中心 中美食品安全联合研究中心, 上海 200240

2 上海市食品药品检验所, 上海 201203

3 联合利华 (上海) 研发中心 联合利华中国研究所, 上海 200335

摘要: 旨在挖掘用于鉴定金黄色葡萄球菌的高特异性靶点及其 PCR 检测引物。采用 C++ 语言编程, 以金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* MRSA 252 基因组编码序列为对象, 对 2 656 个可编码区进行分析, 获得特异性靶点序列, 并设计 PCR 扩增引物。对包括葡萄球菌属 11 个种及其他细菌属在内的共计 137 株细菌验证引物特异性, 筛选获得 9 个 DNA 序列, 并设计了 4 对引物。经验证 2 对引物的特异性较好, 其中引物 SA3 的基因组 DNA 检测限为 13.7 fg/ μ L, 菌体检测限为 9.25×10^2 CFU/mL。结果验证了特异性 DNA 靶点筛选平台的实用性, 该方法突破了传统特异性靶点挖掘方法对检测对象的限制, 适用性广, 可移植性强。

关键词: 金黄色葡萄球菌, 基因组, 生物信息比对分析, 编码序列, C++ 编程

Screening of specific target sequences for the PCR detection of *Staphylococcus aureus* by automatic genomic comparison

Yiling Fan^{1,2}, Dongsheng Zhu^{1,3}, Yu Hu¹, and Xianming Shi¹

1 Joint Sino-US Food Safety Research Center & Bor Luh Food Safety Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China

3 Unilever Discover Shanghai, Unilever Research and Development Shanghai, Shanghai 200335, China

Abstract: The aim of this study was to establish a fast and accurate method for developing specific DNA sequences and PCR primers for the detection of *Staphylococcus aureus*. An automatic C++ program for genomic comparison was used to identify specific DNA sequences from the genome of *S. aureus* MRSA 252. Four primer pairs were obtained from 9 specific target sequences by comparison of 2656 coding sequences with our local genome database, and 2 pairs of primers were confirmed to be specific to *S. aureus* by PCR evaluation against 137 bacterial strains, including 11 species of *Staphylococcus*. Furthermore, the DNA detection sensitivity of primer SA3 was 13.7 fg/ μ L and the cell sensitivity for this primer was 9.25×10^2 CFU/mL. This

Received: July 8, 2010; **Accepted:** January 20, 2011

Supported by: National Key Technology Research and Development Program of China (No. 2009BAK43B31), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Nos. 10142201300, 08142200700, 08391911000).

Corresponding author: Xianming Shi. Tel/Fax: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

国家科技支撑计划 (No. 2009BAK43B31), 上海市科委项目 (Nos. 10142201300, 08142200700, 08391911000) 资助。

method has overcome the limitations of specific target mining in conventional assays, and it could be easily and widely used for other foodborne pathogens.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, genome, bioinformatic comparison analysis, coding sequence, C++ programming

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是一种重要的食源性和医源性致病菌^[1], 它可以分泌多种毒力因子, 如肠毒素 (Staphylococcal enterotoxins, SEs)、毒素休克综合征毒素-1 (Staphylococcal toxic shock syndrome-1, TSST-1)、表皮剥脱毒素 (Exfoliative toxins, ETs)、葡萄球菌溶素 (Staphylolysin) 和凝固酶 (Coagulase) 等, 可以引起食物中毒、毒素休克综合征、骨髓炎、坏死性肺炎和心内膜炎等严重疾病^[2-3]。在国家标准检验方法中金黄色葡萄球菌检测方法仍然采用传统培养分离法, 需要 5~6 d 才能得到检验结果^[4]。快速、有效地检测和鉴别金黄色葡萄球菌是急需解决的问题之一。近些年, 以特异性 DNA 片段为靶点的分子生物学检测手段作为一种快速检测方法已被广泛采用^[3,5-10]。

细菌特异性 DNA 是指仅存在于某一目标细菌基因组内、而在其他非目标细菌基因组内缺失或者变异、可用于特异性检测和鉴定该目标细菌的 DNA 片段^[3]。在细菌的分子生物学检测中, 常用的特异性保守区域 DNA 片段多位于 16S rRNA 和 23S rRNA 区。另外, *nuc1* 基因是检测金黄色葡萄球菌的重要靶点, 它可以编码产生一种金黄色葡萄球菌特有的与凝固酶相关的耐热核酸酶 (TNase)^[6-8,11]。除了上述检测靶点外, 其他特异基因片段还有 *coa* 基因^[12] 和 *tRNA* 间隔序列等^[3,5]。然而, 上述目标 DNA 的检测位点的发现经历了十分漫长的研究过程。

随着致病微生物基因组数据的增加, 生物信息学、基因组学和蛋白质组学的不断发展, 大规模的基因组比对分析和蛋白质功能预测为快速、高效地发掘特异性 DNA 靶点提供了可能^[13-15]。通过自动化程序对基因组数据库编码序列 (Coding sequences, CDS) 的比对和筛选, 可以大幅度提高特异性检测位点的发掘效率。

本研究在组建本地细菌基因组数据库的基础上, 建立了基于 C++编程的金黄色葡萄球菌特异性 DNA 序列自动化筛选方法。利用该方法对金黄色葡萄球菌 MRSA 252 的全基因组编码序列进行分析, 以获得特异性 DNA 片段。

1 材料与方法

1.1 细菌培养及基因组 DNA 提取

本实验所用菌株共 137 株, 其中金黄色葡萄球菌分离株来自临床样本 (表 1)。实验所用菌株均接种于 Luria-Bertani (LB) 培养基中, 160 r/min、37 °C 振荡培养 18 h 备用。

细菌基因组 DNA 提取和纯化采用 QIAGEN 公司 DNeasy Blood and Tissue Kit 试剂盒, 按试剂盒说明书操作, 用 100 μL TE 缓冲液洗脱细菌基因组 DNA, 存放于 -20 °C 备用。

1.2 基因组 CDS 自动化比对

在 GenBank 细菌全基因组数据库 (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>) 中, 选取具有代表性的 139 个细菌的基因组数据, 利用 Blast 软件 (版本号 Blast-2.2.9-ia32) 建立本地基因组数据库 (不包含 14 个金黄色葡萄球菌基因组信息)。采用基于 C++平台的基因组 CDS 比对程序^[16], 分析金黄色葡萄球菌 MRSA252 的全基因组 CDS 信息 (文件来源 NCBI 数据 NC_002952.ffn)。筛选参数为 E>4.0, L>400 bp, 由程序自动比对每个 Blast 生成文件中的 E 值。对程序筛选出的 CDS 序列通过网上 Blast 比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), 验证自动筛选的 CDS 特异性。

1.3 引物的设计及 PCR 检测

采用 PRIMER PREMIER 5.0 软件, 对筛选出的 CDS 区 DNA 序列设计引物 (表 1)。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

表 1 实验菌株

Table 1 Bacteria strains tested in this assay

Bacterial species/strains	Number of strains	Source
<i>Staphylococcus aureus</i> isolates	84	a
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	1	b
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	a
<i>S. aureus</i> ATCC 27940	1	b
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1	a
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1	b
<i>S. aureus</i> CMCC 26001	1	a
<i>S. aureus</i> CMCC 26003	1	c
<i>S. capitis</i> ATCC 49325	1	b
<i>S. caprae</i> ATCC 35538	1	b
<i>S. chromogenes</i> 3688	1	b
<i>S. cohnii</i> isolate	1	a
<i>S. epidermidis</i> 11993	1	b
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1	b
<i>S. epidermidis</i> ATCC 146	1	b
<i>S. epidermidis</i> isolates	5	a
<i>S. hominis</i> isolate	1	a
<i>S. lugdunensis</i> ATCC 43809	1	b
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	1	b
<i>S. schleiferi</i> ATCC 43808	1	b
<i>S. sciuri</i> ATCC 29062	1	b
<i>S. simulans</i> 13044	1	b
<i>S. warneri</i> isolate	1	a
<i>S. xylosus</i> ATCC 29971	1	b
<i>Bacillus subtilis</i> CMCC 63501	1	c
<i>Escherichia coli</i> CMCC 44102	1	c
<i>E. coli</i> isolates	6	a
<i>Listeria grayi</i> ATCC 700545	1	b
<i>L. innocua</i> ATCC 51742	1	b
<i>L. ivanovii</i> ATCC 35967	1	b
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	1	b
<i>L. seeligeri</i> TYPE I	1	b
<i>L. welshimeri</i> ATCC 35897	1	b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CMCC 10104	1	c
<i>Salmonella</i> isolates	4	a
<i>Salmonella paratyphi</i> CMCC 50094	1	c
<i>Salmonella typhimurium</i> CMCC 50017	1	a
<i>Salmonella typhimurium</i> CMCC 50098	1	a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolates	4	a

a: Strains provided by Shanghai Institute for Food and Drug Control; b: Strains provided by Dr. George C. Paoli from East Regional Research Center, Agricultural Research Service, USDA; c: Strains provided by Joint Sino-US Food Safety Research Center & Bor Luh Food Safety Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, *S. aureus* isolates were obtained from clinical samples.

表 2 特异性 CDS 区段的 PCR 扩增引物

Table 2 PCR primers against specific CDS

Name of CDS	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
SA1	SA1-F	CTATTTGCTGTATTAGGTGGCG	203
	SA1-R	CCGTAAAGACTTCCGACTAACC	
SA2	SA2-F	CGCTTACCTCGCATTACACTT	208
	SA2-R	CGCCACCTAATACAGCAAATA	
SA3	SA3-F	AAGCACTTACACGAAACCCAAT	318
	SA3-R	CGGAGCCACTCAACCAGAATA	
SA4	SA4-F	CGTTACATAGTCAGGCTTATTCGC	216
	SA4-R	ATGATTTACAGTTGTGCGACC	

PCR 扩增体系为: 1.0 μ L 细菌基因组 DNA; 1 U *rTaq* DNA 聚合酶 (天根生化科技有限公司, 北京); 1 \times PCR 缓冲液 [200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4); 200 mmol/L KCl; 100 mmol/L (NH₄)₂SO₄]; 2.0 mmol/L MgCl₂; 4 种 dNTPs 各 0.25 mmol/L; 上、下游引物各 10 nmol/L; 加蒸馏水至 25 μ L。

采用 Peltier Thermal Cyclers PTC-200 PCR 仪 (Bio-Rad Laboratories, USA) 进行 PCR 扩增。反应条件为: 105 $^{\circ}$ C 热盖; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

将 6 μ L PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 用 10 μ g/mL 的 EB 溶液染色 15 min, 置于紫外成像仪 (MultiImage Light Cabinet, Alphamager) 内观察。DNA 分子量标准选用 100 bp DNA ladder (天根生化科技有限公司, 北京)。

1.4 引物特异性评价和检测限评价

初步评价实验选择 15 株细菌, 包括 11 株金黄色葡萄球菌和 4 株非金黄色葡萄球菌。在上述 PCR 检测体系中, 利用设计的 4 对引物对细菌基因组 DNA 进行扩增, 评价引物的特异性。将初步评价结果较好的特异性引物, 应用于全部其他细菌的检测验证中。

选取特异性较高的引物进行检测限的评价, 分别采用金黄色葡萄球菌标准菌株 CMCC 26003 的基因组 DNA 浓度 10 倍稀释组和细菌菌体浓度 10 倍稀释组, 对引物的 DNA 检测限和菌体检测限两项

指标进行评价。基因组 DNA 的浓度梯度为： 1.37×10^7 、 1.37×10^6 、 1.37×10^5 、 1.37×10^4 、 1.37×10^3 、 1.37×10^2 、13.7、 $1.37 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。细菌菌体浓度梯度为： 9.25×10^6 、 9.25×10^5 、 9.25×10^4 、 9.25×10^3 、 9.25×10^2 、9.25、0.925、0 CFU/mL (空白对照)。

1.5 人工污染样品的制备

取新鲜鸡蛋蛋液 200 g, 混匀后分成蛋液含量为 25.0 g 的样品 8 份。其中随机抽取 2 份蛋液, 按照国标 GB/T 4789.10-2008 金黄色葡萄球菌检验中规定的方法进行检验。其余 6 份蛋液分为 3 组, 向 3 组蛋液中加入金黄色葡萄球菌标准菌株 CMCC 26003 菌悬液, 接种量分别为 9.25×10^2 CFU/25 g、9.25 CFU/25 g 和 0.925 CFU/25 g。将人工污染的蛋液样品加入到 225 mL 生理盐水中混匀, 吸取 5 mL 上述液体加入 50 mL 7.5% NaCl 肉汤中培养 8 h。取 1 mL 肉汤培养物, 按 1.3 中所述步骤进行 PCR 检测。每组做 2 个平行试验。人工污染的样品的后续步骤仍按国标方法进行检验, 比较两种方法的检测结果。

1.6 食品污染调查应用

调查市售加工点心类产品, 包括汉堡、寿司、三明治、中西式糕点、包子、月饼、批萨和肉卷等

共计 185 件, 按国标规定的前处理方法进行增菌培养, 取增菌肉汤 1 mL 采用本研究所用引物和 PCR 扩增条件进行检查; 并同时取增菌肉汤分别采用 DuPont BAX Q7 荧光定量 PCR 方法和国标方法进行检验, 比较三者对金黄色葡萄球菌的检出情况。

2 结果

2.1 特异性 CDS 的自动化筛选

金黄色葡萄球菌 MRSA 252 全基因组包含已注释的编码序列共有 2 656 个, 通过 C++筛选程序, 获得 9 个 $E > 4.0$ 且 $L > 400$ bp 的 CDS, 分别命名为编码区 SA1 至 SA9 (表 3)。通过比对验证, 选出 4 个特异性较好的 CDS 区设计检测引物。

2.2 引物的特异性评价

将 SA1-SA4 这 4 对引物分别对 11 株金黄色葡萄球菌和 4 株非金黄色葡萄球菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增实验。引物 SA2 和 SA3 对所用金黄色葡萄球菌 DNA 具有特异性 (图 1)。137 株细菌基因组 DNA 的 PCR 试验结果表明: 引物 SA2 和 SA3 可以特异性鉴别金黄色葡萄球菌基因组 DNA, 试验所用非金黄色葡萄球菌基因组 DNA 未见 PCR 扩增条带 (包括葡萄球菌属内的其他 13 个种)。

表 3 金黄色葡萄球菌特异性 CDS 的自动化筛选

Table 3 Screening of specific CDS from *S. aureus*

Name of CDS	File name	Position (5'-3')	Size (bp)	Expression product *
SA1	0114	BX571856.1 127918-126920	999	Siderophore compound ABC transporter permease protein SirC
SA2	0115	BX571856.1 222069-222947	879	Sucrose-specific PTS transporter protein RpiR family transcriptional regulator
SA3	0193	BX571856.1 128910-127915	996	Siderophore compound ABC transporter permease protein SirB
SA4	1484	BX571856.1 1527354- 1528338	985	Cell wall associated fibronectin-binding protein, hypothetical protein EbhB
SA5	0952	BX571856.1 1017875-1018729	855	Putative RNA pseudouridylylate synthase
SA6	1179	BX571856.1 1254819-1255805	987	Putative glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX
SA7	1347	BX571856.1 1433735-1434997	1263	ImpB/MucB/SamB family protein
SA8	1938	BX571856.1 2068690-2069676	987	Hypothetical protein
SA9	2293	BX571856.1 2412296-2413183	888	Acetyl-transferase (GNAT)family protein

*The information was collected from GenBank website in September 2009.

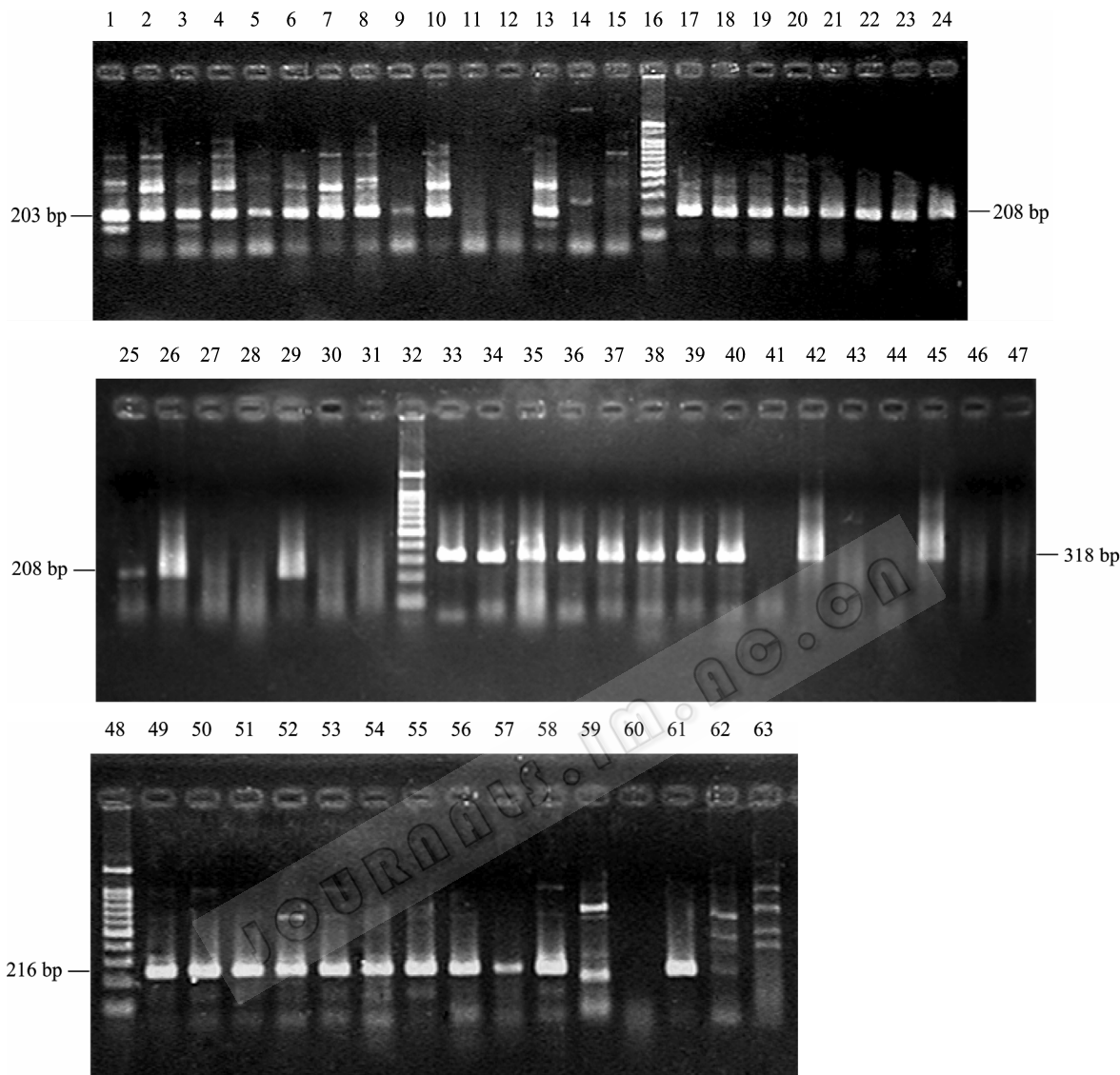


图1 金黄色葡萄球菌 4 对 PCR 引物的特异性验证图

Fig. 1 PCR specificity evaluations on four primers for *S. aureus*. 1–15: results for primer SA1; 17–31: results for primer SA2; 33–47: results for primer SA3; 49–63: results for primer SA4. The bacterial strains (From left to right) tested for each pair of primers were *S. aureus* ATCC 27940, *S. aureus* ATCC 13565, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* CMCC 26001, *S. aureus* ATCC6538, *S. aureus* ATCC25923, *S. aureus* ATCC12228, *S. aureus* ATCC29213, *S. aureus* strain B255, *V. Parahaemolyticus* strain 39001, *Salmonella* strain T16, *S. aureus* strain G64, *S. capitis* ATCC 49325 and *E. coli* strain 133; 16, 32, 48: standard DNA marker.

2.3 引物的检测限评价

通过 PCR 退火温度梯度试验 (48 °C~62 °C) 和镁离子浓度梯度试验 (0.5~3.0 mmol/L), 对引物进行反应条件优化。在 56 °C 温度下退火, 镁离子浓度为 2.0 mmol/L 时, 引物 SA2 和 SA3 的 PCR 产物具有明亮的单一扩增条带, PCR 扩增效率较高。

根据特异性评价结果, 采用优化的 PCR 反应条件评价引物的检测限。引物 SA2 的基因组 DNA 检测限为 137 fg/μL (图 2, Lane 6); 引物 SA3 的基因组 DNA 检测限为 13.7 fg/μL (图 2, Lane 15)。另外, 引物 SA2 和引物 SA3 的菌体检测限都能达到 9.25×10^2 CFU/mL (图 3, Lane 5 和 Lane 15)。

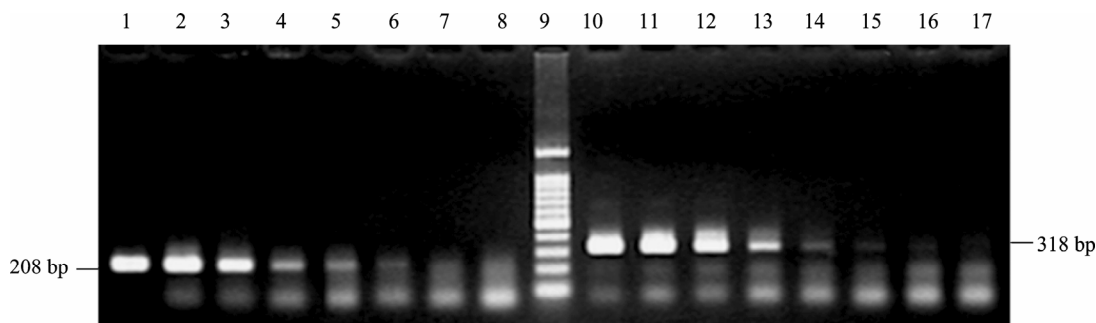


图2 引物 SA2 和 SA3 的基因组 DNA 检测限试验 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of sensitivity tests genomic DNA of primer SA2 and SA3. 1–8: primer SA2 were applied; 10–17: primer SA3 were applied; 9: standard DNA marker. The genomic DNA of *S. aureus* ATCC 6538 were 1.37×10^7 fg/ μ L, 1.37×10^6 fg/ μ L, 1.37×10^5 fg/ μ L, 1.37×10^4 fg/ μ L, 1.37×10^3 fg/ μ L, 1.37×10^2 fg/ μ L, 13.7 fg/ μ L and 1.37 fg/ μ L, respectively.

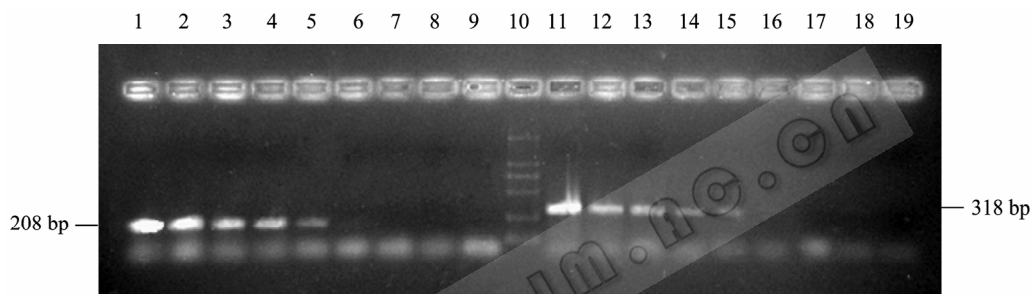


图3 引物 SA2 和 SA3 细菌菌体检测限试验 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification of cell sensitivity tests for primer SA2 and SA3. 1–9: primer SA2 were applied; 11–19: primer SA3 were applied. 1–9 and 11–19: the cell concentrations of *S. aureus* CMCC 26003 were 9.25×10^6 CFU/mL, 9.25×10^5 CFU/mL, 9.25×10^4 CFU/mL, 9.25×10^3 CFU/mL, 9.25×10^2 CFU/mL, 9.25 CFU/mL, 0.925 CFU/mL and negative control, respectively; 10: standard DNA marker (From bottom to top: 100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1 000 bp and 2 000 bp).

2.4 人工污染鸡蛋样品和食品污染调查应用

采用 PCR 方法 (含有引物 SA2 或 SA3) 和国标方法均能检出样品中含接种量为 9.25×10^2 CFU/25 g 和 9.25 CFU/25 g 的金黄色葡萄球菌; 然而, 在含 0.925 CFU/25 g 金黄色葡萄球菌样品检测中, 由于接种量太低, 国标方法和 PCR 方法均得到阴性结果。在调查检验市售 185 件样品中, 通过本研究的检测方法共检出金黄色葡萄球菌阳性 3 株, 占全部样品的 1.62%, 与 BAX Q7 检测系统和国标检测方法得到的结果相同。

3 讨论

传统微生物特异性 DNA 序列的发掘是基于对已知细菌特异性蛋白质的分析, 然后对调控或编码该特异蛋白质的基因或 DNA 片段进行研究^[3]。其中,

不少序列既有种内特异性又存在多态性, 如 *coa* 基因和 16S rRNA 序列在金黄色葡萄球菌种的最低相似度仅为 79%, 只有寻找这些区段内相对保守的部分进行引物设计来提高特异性。本实验通过生物信息学方法筛选出的 4 个金黄色葡萄球菌 CDS 区不存在种内多态性, 保守性好。SA2 基因在金黄色葡萄球菌种内相似性在 99% 以上, SA1、SA3 和 SA4 基因在金黄色葡萄球菌种内相似性不低于 93%。

分析金黄色葡萄球菌 CDS 序列对应的蛋白质产物信息可知, 这些编码序列均与细胞膜和细胞壁物质转运和调控的基因有关 (表 3)。其中, SA1 和 SA3 的表达产物分别为透性酶 SirC 和 SirB (Siderophore compound ABC transporter permease protein SirC and SirB)。通过对 Sir 系列蛋白质序列的分析研究显示, 许多细菌都含有类似 ABC 转运子功能的离子转运

蛋白^[18-20],如表面葡萄球菌和沙门氏菌等^[20-22]。通过 DNA 序列分析,金黄色葡萄球菌的 *sirB* 和 *sirC* 基因都具有很好的保守性^[23],和本研究的结论相符。由于 *sirB* 和 *sirC* 基因可能是多拷贝基因^[24],更适合用于对灵敏度要求较高的致病菌检测方法。*SA2* 的表达产物为蔗糖专属 PTS 转运蛋白转录调控基因 (Sucrose-specific PTS transporter protein RpiR family transcriptional regulator)。RpiR 蛋白可能与编码磷酸核糖异构酶的 *rpiB* 基因调控有关^[25]。*SA4* 则被推定为细胞壁纤维连接蛋白基因,其表达产物是一个推定蛋白 EbhB (Cell wall associated fibronectin-binding protein, hypothetical protein EbhB)。通过基因组比对发现 *ebh* 基因广泛存在于金黄色葡萄球菌基因组中^[26],与本实验结果相吻合。

大量可供分析的微生物基因组序列信息已成为生物信息学研究的重要内容^[13-15]。本研究结合 C++ 程序调用 Blast 软件,对金黄色葡萄球菌基因组进行自动比对,筛选编码区特异性 DNA 序列。该方法简单实用,可以快速锁定微生物特异性检测位点,提高比对效率,为建立基于微生物特异性 DNA 序列的快速检测方法提供了大量关键的备选目标区间。

致谢: 真诚感谢美国农业部东部研究中心 George C. Paoli 博士为本研究提供了大量标准菌株。

REFERENCES

- [1] Crossley KB, Archer GL. The *Staphylococci* in Human Disease. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1998: 253-255.
- [2] Cowie SE, Ma I, Lee SK, et al. Nosocomial MRSA infection in vascular surgery patients: impact on patient outcome. *Vasc Endovas Surg*, 2005, 39(4): 327-334.
- [3] Fan YL, Pan F, Shi XM. Common target genes of *Staphylococcus aureus* in molecular detection technique. *J Microbiol*, 2008, 28(3): 72-76.
范一灵, 潘峰, 史贤明. 金黄色葡萄球菌分子检测技术的常用靶基因. *微生物学杂志*, 2008, 28(3): 72-76.
- [4] GB/T 4789.10-2008, Detection of *Staphylococcus aureus*. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [5] Drancourt M, Raoult D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(4): 1333-1338.
- [6] Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(7): 1654-1660.
- [7] Wilson IG, Cooper JE, Gilmour A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC1* and the thermonuclease gene *nuc*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(6): 1793-1798.
- [8] Thomas LC, Gidding HF, Ginn AN, et al. Development of a real-time *Staphylococcus aureus* and MRSA (SAM-) PCR for routine blood culture. *J Microbiol Methods*, 2007, 68(2): 296-302.
- [9] Fan YL, Pan F, Paoli GC, et al. Development of a multiplex PCR method for detection of the genes encoding 16S rRNA, coagulase, methicillin resistance and enterotoxins in *Staphylococcus aureus*. *J Rapid Methods Autom Microbiol*, 2008, 16(4): 394-411.
- [10] Wang XH, Xie BJ, Shi XM. Detection of *Staphylococcus aureus* pathogenetic factor by PCR. *Food Machin*, 2004, 20(3): 48-50.
王小红, 谢笔钧, 史贤明. 金黄色葡萄球菌致病因子检测的 PCR 方法. *食品与机械*, 2004 年, 20(3): 48-50.
- [11] Tang JN, Zhou R, Shi XM, et al. Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and *in vitro* expression. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 284(2): 176-183.
- [12] Maes N, De Gheldre Y, De Ryck R, et al. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus species* by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(10): 2477-2481.
- [13] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, 215(3): 403-410.
- [14] Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, et al. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res*, 2008(36): 5-9.
- [15] Karlin S, Altschul SF. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(6): 2264-2268.

- [16] Zhu DS, Zhou M, Fan YL, et al. Identification of new target sequences for PCR detection of *Vibrio parahaemolyticus* by genome comparison. *J Rapid Methods Autom Microbiol*, 2009, 17(1): 67-79.
- [17] Tian J, Ji R, Yang J, et al. *Staphylococcus aureus* in food determined by polymerase chain reaction. *J Hygiene Res*, 2007, 36(2): 183-186.
田静, 计融, 杨军, 等. PCR 方法快速检测食品中的金黄色葡萄球菌. *卫生研究*, 2007, 36(2): 183-186.
- [18] Linton KJ, Higgins CF. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol*, 1998, 28(1): 5-13.
- [19] Nikaido H, Hall JA. Overview of bacterial ABC transporters. *Methods Enzymol*, 1998(292): 3-20.
- [20] Boos W, Eppler T. Prokaryotic Binding Protein-Dependent ABC Transporters. *Microbial Transport Systems*, Germany: Wiley-VCH, 2003: 77-114.
- [21] Heinrichs JH, Gatlin LE, Kunsch C, et al. Identification and characterization of *SirA*, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1999, 181(5): 1436-1443.
- [22] Hill PJ, Cockayne A, Landers P, et al. *SirR*, a novel iron-dependent repressor in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 1998, 66(9): 4123-4129.
- [23] Dale SE, Sebulsky MT, Heinrichs DE. Involvement of *SirABC* in iron-siderophore import in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2004, 186(24): 8356-8362.
- [24] Rakeman JL, Bonifield HR, Miller SI. A Hila-independent pathway to *Salmonella typhimurium* invasion gene transcription. *J Bacteriol*, 1999, 181(10): 3096-3104.
- [25] Sorensen KI, Hove-Jensen B. Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the *rpiB* gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the *rpiR* gene, which is involved in regulation of *rpiB* expression. *J Bacteriol*, 1996, 178(4): 1003-1011.
- [26] Tanaka Y, Sakamoto S, Kuroda M, et al. A helical string of alternately connected three-helix bundles for the cell wall-associated adhesion protein Ebh from *Staphylococcus aureus*. *Structure*, 2008, 16(3): 488-496.

~~~~~

### 本 期 广 告 索 引

| 企 业              | 版 位 | 企 业                 | 版 位 |
|------------------|-----|---------------------|-----|
| GE Healthcare 公司 | 封 底 | 生物谷网站               | 内 页 |
| 宝生物工程 (大连) 有限公司  | 封 二 | 第 5 届中国工业生物技术发展高峰论坛 | 内 页 |
| 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司 | 内 页 | 镇江东方生物工程公司          | 内 页 |
| 安琪酵母股份有限公司       | 内 页 |                     |     |