

基于重组溶葡萄球菌酶和 ATP 生物发光技术特异定量检测金黄色葡萄球菌

李玉元^{1,2}, 米志强², 安小平², 周育森^{1,2}, 童贻刚²

1 广西医科大学, 广西 南宁 530021

2 军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

李玉元, 米志强, 安小平, 等. 基于重组溶葡萄球菌酶和 ATP 生物发光技术特异定量检测金黄色葡萄球菌. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1283-1290.

Li YY, Mi ZQ, An XP, et al. Quantitative specific detection of *Staphylococcus aureus* based on recombinant lysostaphin and ATP bioluminescence. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1283-1290.

摘要: 基于重组溶葡萄球菌酶和 ATP 生物发光法建立特异定量检测金黄色葡萄球菌的方法。优化设计合成溶葡萄球菌酶序列, 构建重组表达载体 pQE30-Lys, 转化至大肠杆菌 M15 并诱导表达, 镍柱纯化得到目的蛋白。利用重组溶葡萄球菌酶和 ATP 生物发光法特异定量检测金黄色葡萄球菌并与平板计数对比。成功表达了重组溶葡萄球菌酶, 并建立了特异定量检测金黄色葡萄球菌的方法, 与平板计数具有显著线性关系。本研究建立的将重组溶葡萄球菌酶和 ATP 生物发光法相结合的检测方法操作快捷简单, 具有良好的应用前景。

关键词: 金黄色葡萄球菌, 重组溶葡萄球菌酶, ATP 生物发光, 特异和定量检测

Received: November 12, 2013; **Accepted:** December 17, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81072350), China Mega-Project on Major Drug Development (No. 2011ZX09401-023), China Mega-Project on Infectious Disease Prevention (No. 2011ZX10004-001), State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity Program (No. SKLPBS1113).

Corresponding author: Yusen Zhou. E-mail: yszhou@nic.bmi.ac.cn

Yigang Tong. Tel: +86-10-63869835; E-mail: tong.yigang@gmail.com

国家自然科学基金 (No. 81072350), “重大新药创制”科技重大专项“十二五”实施计划 (No. 2011ZX09401-023), “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项“十二五”实施计划 (No. 2011ZX10004-001), 病原微生物生物安全国家重点实验室开放课题 (No. SKLPBS1113) 资助。

网络出版时间: 2014-03-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130578.html>

Quantitative specific detection of *Staphylococcus aureus* based on recombinant lysostaphin and ATP bioluminescence

Yuyuan Li^{1,2}, Zhiqiang Mi², Xiaoping An², Yusen Zhou^{1,2}, and Yigang Tong²

¹ Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

² State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Quantitative specific detection of *Staphylococcus aureus* is based on recombinant lysostaphin and ATP bioluminescence. To produce recombinant lysostaphin, the lysostaphin gene was chemically synthesized and inserted it into prokaryotic expression vector pQE30, and the resulting expression plasmid pQE30-Lys was transformed into *E. coli* M15 for expressing lysostaphin with IPTG induction. The recombinant protein was purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography. *Staphylococcus aureus* was detected by the recombinant lysostaphin with ATP bioluminescence, and plate count method. The results of the two methods were compared. The recombinant lysostaphin was successfully expressed, and a method of quantitative specific detection of *S. aureus* has been established, which showed a significant linear correlation with the colony counting. The detection method developed has good perspective to quantify *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, recombinant lysostaphin, ATP bioluminescence, specific and quantitative detection

金黄色葡萄球菌 (简称金葡菌) 是人类皮肤表面常见菌群, 但它同时也是一种非常重要的致病菌, 能够引起小到皮肤病大到肺炎及菌血症这类威胁人类生命的疾病^[1-5]。不仅仅是人类, 家畜也容易感染金黄色葡萄球菌, 金葡菌能够导致奶牛乳腺炎及鸡传染性关节炎, 这严重威胁了食品健康, 导致食品污染, 带来重大经济损失^[6-7]。值得注意的是, 耐药金葡菌的感染不断增加, 例如, 耐甲氧西林金葡菌 (MRSA) 和耐万古霉素金葡菌 (VRSA) 已引起更多关注, 因为金葡菌是医院感染最常见的原因^[8-12]。因此, 建立快速检测金黄色葡萄球菌的方法, 对于防治金黄色葡萄球菌感染, 进行早期治疗减少损失是非常必要的。

本研究基于重组溶葡萄球菌酶和 ATP 生物发光法建立金黄色葡萄球菌快速检测方法。溶葡萄球菌酶 (Lysostaphin) 是从模仿葡萄球菌

Staphylococcus simulans 中分离出来的一种含锌的金属蛋白酶, 具有水解葡萄球菌细胞壁肽聚糖五肽桥联的催化活性, 对金葡菌有强大的溶菌作用^[13-15]; ATP 生物发光测定法是快速检测微生物的方法之一^[16-17], 在 Mg²⁺存在下, 荧光素酶 (Luciferase) 以 D-荧光素、ATP、O₂ 为底物, 将化学能转化为光能, 发出荧光, 根据 ATP 与荧光素反应产生荧光的原理, 可对微生物细胞内的 ATP 进行测定, 从而定量检测细菌数^[18-20]。所以, 本实验室首先利用重组溶葡萄球菌酶裂解金葡菌释放 ATP, 然后结合 ATP 生物发光法, 实现对金葡菌的快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

pQE30 质粒由本实验室保存。克隆菌株

E. coli Trans1-T1 购自北京全式金生物技术有限公司；表达菌株 *E. coli* M15 购自北京博迈德生物技术有限公司；金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 购自美国模式培养物集存库 (ATCC)，其他菌株来源于军事医学科学院附属医院临床检验科，本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和设备

LB 培养基：蛋白胨 1%，酵母提取物 0.5%，NaCl 1%，pH 7.0，制作平板时加入 1.5% 琼脂粉，制作半固体时加入 0.75% 琼脂粉，121 °C 高压灭菌 20 min。

限制性内切酶 *Bam*H I-HF、*Hind* III-HF 和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。DNA Marker、Protein Marker 和质粒提取试剂盒均购自北京博迈德生物技术有限公司；镍柱预装柱购自上海生工生物工程有限公司；Profile-1 3560 (10X) ATP 微生物快速检测系统购自北京浩正智信科技有限公司；752 紫外-可见分光光度计购自上海菁华科技仪器有限公司。

化学试剂均为国产分析纯，由本实验室保存制备。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的合成及重组表达载体的构建

在 NCBI 上得到 *Lysostaphin* (*Staphylococcus simulans* by staphylolyticus) 的基因序列 (GenBank Accession No. 8864975)，对其进行优化设计，使其更易于在大肠杆菌原核表达系统中进行可溶性表达，分别设计上下游酶切位点 *Bam*H I (GGATCC) 和 *Hind* III (AAGCTT)，片段大小 753 bp，由金唯智生物科技 (北京) 有限公司合成。

*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切目的基因和表达载体 pQE30，连接转化至大肠杆菌 Trans1-T1。挑取阳性克隆经酶切初步鉴定正确的进行测

序，将测序正确的重组质粒命名为 pQE30-Lys。

1.2.2 重组溶葡萄球菌酶的诱导表达、纯化

将构建正确的重组质粒 pQE30-Lys 转化至表达菌株 *E. coli* M15 中，涂于含有氨苄抗生素 (终浓度 100 µg/mL) 的固体 LB 培养基平板中，倒置平板，37 °C 过夜培养。挑取单克隆 37 °C 振荡培养过夜，次日按 1:100 比例转接至 500 mL 新鲜氨苄抗性培养基，37 °C 振荡培养至 OD_{600} 值约 0.6–0.8，加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L，37 °C 继续振荡培养 6–8 h 后收集菌液。诱导后的菌液 10 000×g 离心 10 min，弃掉上清，PBS 重悬菌体，超声波破碎处理后 10 000×g 离心 10 min，收集上清经 0.45 µm 滤膜过滤后采用镍柱纯化的方式回收目的蛋白，表达及纯化结果以 SDS-PAGE 方法检测。

1.2.3 重组溶葡萄球菌酶活性检测

将金葡萄菌 (金葡萄菌标准菌株 ATCC 25923 和 173 株临床分离的金葡萄菌) 和其他 7 株受试菌 (108 大肠杆菌、095 沙门氏菌、012 嗜麦芽窄食单胞菌、002 粪肠球菌、071 鲍曼不动杆菌、084 大肠埃希菌、003 肺炎克雷伯菌) 培养至对数期，取 500 µL 铺双层 LB 平板，室温静置 10 min，吸取 1 µL 酶液滴于平板上，同时以缓冲液 PBS 作阴性对照，37 °C 倒置培养 3–4 h 后观察结果。

1.2.4 平板计数金葡萄菌 ATCC 25923 和其他 7 株受试菌

将培养好的菌液离心 (10 000 r/min, 1 min) 倒去上清液，沉淀用等体积 PBS 洗涤 1 次，用等体积 PBS 悬浮，此即菌液原液。稀释：(假定菌液浓度约为 1×10^6 CFU/mL) 用 PBS 将菌液做 10 倍递增稀释。分别吸取各稀释度的菌液 50 µL 涂布于固体 LB 平板，37 °C 倒置培养过夜，每个梯度做 3 个重复，同时作空白对照。次日选取菌落数在 30–300

范围内的稀释度作平板计数并取其平均值^[21]。

1.2.5 ATP 发光法特异定量检测金黄色葡萄球菌

按照 Profile-1 3560 (10X) ATP 微生物快速检测系统标准操作进行:分别取 50 μ L 待测菌液加入到专用的过滤比色杯中,比色杯下铺一层滤纸,滴加 4 滴 SRA 试剂(非细菌细胞释放液),用压力器对准比色杯顶端,按下压力器把液体压出至滤纸,重复该步骤一次;将比色杯放入 3560 (10X) 微光度计的抽屉中,加入 100 μ L (约 4.5 μ g) 稀释的重组溶葡萄球菌酶液,等待 2 min,使细菌充分被裂解,吸取 50 μ L 已制备好的荧光酶溶液加入到比色杯中,吹打混匀 3 次,推回抽屉,记录仪器读数。每个浓度梯度的样品做 3 组重复,计算平均值为最终结果^[22-23]。

2 结果

2.1 基因合成和重组质粒 pQE30-Lys 转化结果鉴定

密码子优化设计合成序列如下,加粗部分为酶切位点:

GGATCCGCGCCACCCACGAGCACAGCGCA
CAGTGGCTGAACAACACTACAAGAAAGGTTAT
GGCTACGGCCCTTACCCGCTGGGCATCAATG
GTGGCATGCACTACGGCGTGGACTTCTTCAT
GAACATCGGCACCCCTGTGAAGGCCATCAG
CAGCGCAAAAATCGTGGAGGCCGCTGGAG
CAATTACGGCGGTGGCAACCAGATCGGCCT
GATCGAGAACGACGGCGTGCACCGCCAGTG
GTACATGCACCTGAGCAAGTACAACGTGAA
GGTGGGTGACTACGTGAAGGCCGCGCCAGAT
TATCGGCTGGAGTGGTAGCACCCGCTATAG
CACCGCCCTCACCTGCACTTCCAGCGCATG
GTTAACAGCTTACGCAACAGCACCGCCCAA
GATCCGATGCCGTTCTGAAGAGCGCCGTT
ATGGCAAGGCAGGCGGTACCGTTACCCCGA
CCCCGAACACAGGCTGGAAGACCAACAAGT
ACGGCACCTGTATAAGAGCGAGAGTGCCA

GCTTCACCCCGAACACCGACATCATTACCCG
CACAACCGGTCCGTTCCGTAGCATGCCTCAG
AGCGGCGTGCTGAAGGCAGGCCAGACCATC
CACTACGACGAGGTGATGAAGCAGGACGGC
CATGTGTGGGTTGGCTATACCGGCAATAGCG
GCCAACGCATCTACCTGCCGGTGCGCACCTG
GAATAAGAGCACCAACACCCTGGGCGTGCT
GTGGGGCACAATCAAATAAAAAGCTT

重组质粒 pQE30-Lys 经双酶切后,可见大小约 753 bp 的目的片段,经测序证实结果正确,表明原核表达载体构建成功(图 1)。

2.2 重组溶葡萄球菌酶的诱导表达与纯化

重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定,可见一相对分子质量约为 27 kDa 的蛋白条带,大小与理论预测的蛋白大小相一致(图 2)。经镍柱纯化后蛋白条带比较单一,得到较纯的蛋白(图 3),测定纯化后的蛋白浓度约为 1 mg/mL。

2.3 重组溶葡萄球菌酶活性检测

点滴法验证重组溶葡萄球菌酶活性,可在金黄色葡萄球菌(金葡菌 ATCC 25923 和 173 株临

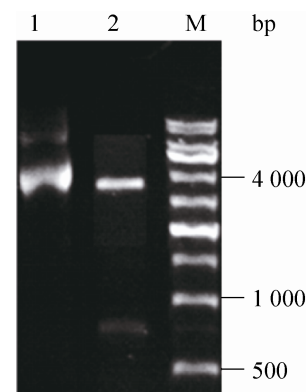


图 1 酶切鉴定重组质粒 pQE30-Lys

Fig. 1 Recombinant plasmid pQE30-Lys digested with restriction endonuclease *Bam*H I and *Hind* III. 1: recombinant plasmid pQE30-Lys; 2: recombinant plasmid pQE30-Lys digested with restriction endonuclease *Bam*H I and *Hind* III; M: 1 kb ladder DNA marker.

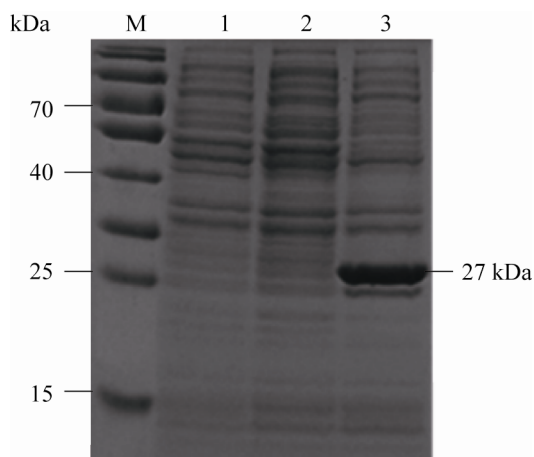


图2 SDS-PAGE 分析重组溶葡萄球菌酶的表达
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression of recombinant lysostaphin. M: broad molecular weight protein marker; 1, 2: negative control pQE30/M15; 3: pQE30-Lys/M15.

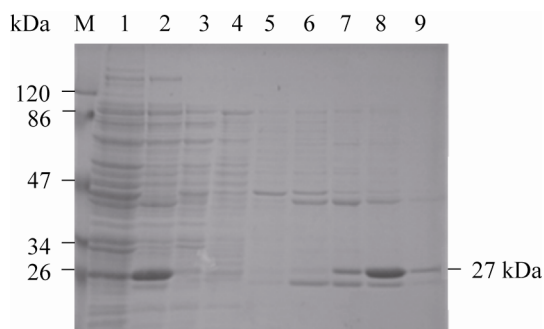


图3 SDS-PAGE 分析重组溶葡萄球菌酶的纯化
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purification results of the recombinant lysostaphin. M: low molecular weight protein marker; 1: the ultrasonic supernatant of pQE30-Lys/M15 with IPTG induction; 2-9: purified recombinant lysostaphin.

床分离金黄色葡萄球菌) 平板上滴有重组溶葡萄球菌酶的区域观察到透亮裂解斑如图4箭头所示, 其他7株受试菌没有裂解斑(此处仅显示出金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和大肠杆菌 *E. coli* 点滴法验证结果, 其他不一一列出)(图4)。

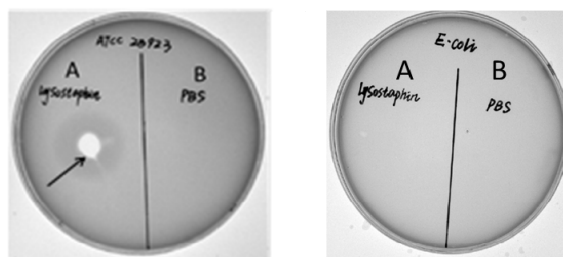


图4 重组溶葡萄球菌酶活性验证

Fig. 4 Spot test on a LB plate with purified recombinant lysostaphin. (A) Recombinant lysostaphin. (B) Negative control PBS.

2.4 ATP 测定法与平板计数法

2.4.1 ATP 测定法与平板计数法试验结果

选取稀释倍数为 10^{-4} 细菌溶液的平板计数结果为依据, 3组数据分别为: 204、189和165, 求得平均值是186, 并由此计算其他稀释度细菌溶液的细菌数, 见表1; 利用ATP生物发光法测定出相应稀释度的细菌溶液的发光值, 每个样品重复3次测定, 记录数据, 计算其平均值, 结果见表1。

2.4.2 ATP 测定法与平板计数法相关性

根据表1, 采用 10^{-4} 及以上稀释度各组的数据, 以平板计数平均值的对数值为 X 轴, 以光值平均值的对数值为 Y 轴, 做 X 、 Y 散点图描绘关系曲线, 如图5, 线性回归方程为: $y=0.9613x-0.5881$, $R^2=0.9957$ 。由表1和图5可知, 当细菌数在186 CFU以上时, 生物发光值与平板计数呈显著相关。

2.5 基于ATP生物发光法和重组溶葡萄球菌酶特异性检测金黄色葡萄球菌

将金黄色葡萄球菌与其他7株受试菌培养到对数期, 按一定比例稀释, 使菌液浓度一致, 然后利用重组溶葡萄球菌酶结合ATP生物发光法进行细菌检测, 结果如图6所示, 从图6可以

表 1 ATP 测定法与平板计数法数据

Table 1 Data by ATP test method and plate count method

Dilution	Plate count			Luminescence value				
	Average value	lg (CFU)		1	2	3	Average value	lg (luminescence value)
Original fluid	1 860 000	6.269 513		228 746	271 277	284 327	261450	5.417 389
10 ⁻¹	186 000	5.269 513		36 686	43 586	40 136	40 136	4.603 534
10 ⁻²	18 600	4.269 513		2 583	2 254	2 152	2 329	3.367 169
10 ⁻³	1 860	3.269 513		305	362	416	361	2.558 709
10 ⁻⁴	186	2.269 513		43	36	50	43	1.633 468
10 ⁻⁵	19	1.278 753		0	0	0	0	

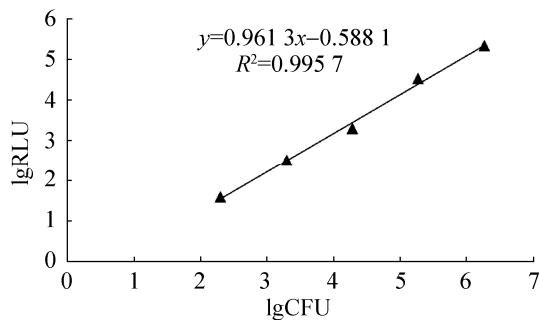


图 5 平板计数与光值对应关系标准曲线

Fig. 5 Standard curve of plate count and luminescence value.

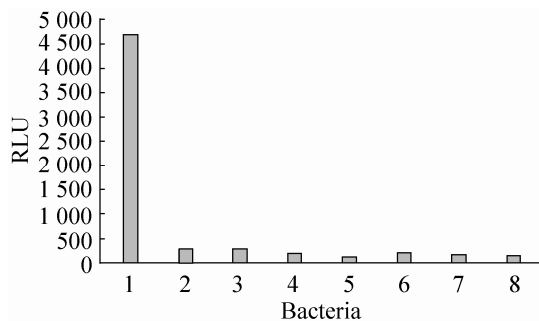


图 6 重组溶葡萄球菌酶裂解细菌后的相对发光值

Fig. 6 Relative luminescence value after recombinant lysostaphin lysis. 1: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 2: 108 *E. coli*; 3: 095 *Salmonella*; 4: 012 *Stenotrophomonas maltophilia*; 5: 002 *E. faecalis*; 6: 071 *A. baumannii*; 7: 084 *E. coli*; 8: 003 *Klebsiella pneumoniae*.

看出同等浓度下的细菌，金黄色葡萄球菌的相对发光值与其他菌株存在明显差异，重组溶葡萄球菌酶对于金黄色葡萄球菌显示了强大的杀菌能力；同时点滴法的结果（结果 2.3）表明，重组溶葡萄球菌酶对除金黄色葡萄球菌之外的其他 7 株受试菌株均无杀菌活性，均不能观察到透亮的裂解斑，进一步说明了结合重组溶葡萄球菌酶的 ATP 发光法检测金黄色葡萄球菌具有特异性。

3 讨论

近年来，随着生物技术的快速发展，利用 ATP 生物发光法对细菌进行定量检测的方法已应用于食品工业、临床检测等众多领域^[18,24-25]。目前以 ATP 生物发光法定量检测细菌的研究往往采用细菌裂解液来裂解细菌从而释放 ATP，大多不具有特异性和专一性。重组溶葡萄球菌酶能够高效特异地裂解葡萄球菌尤其是金黄色葡萄球菌。因此，本实验室通过重新设计溶葡萄球菌酶的蛋白结构，保留其杀菌活性区，使溶葡萄球菌酶的生产不用从其生物学活性极低的蛋白前体开始，而是直接表达杀菌活性强的成熟溶葡萄球菌酶^[26]，同时对编码的基因序列进行

密码子优化,在大肠杆菌原核表达系统中实现了高效可溶性表达,通过镍柱纯化获得较纯的酶液。重组溶葡萄球菌酶对于金葡菌标准株和临床分离株杀菌活性的研究,证明了重组溶葡萄球菌酶保持了强大的杀菌活性。因此本研究利用重组溶葡萄球菌酶替代原始检测系统中的细菌裂解液,结合 ATP 生物发光技术,建立了快速检测金黄色葡萄球菌的方法。该检测方法的检测下限为 186 CFU,可以满足一般检测的需求;当样品所含的细菌数量低于 186 CFU 时,可以采用简便的浓缩富集技术或者多次加样的方法,使浓缩后的样品菌落总数达到有效检测范围以内,检测后再通过换算得到原样品的细菌数量。

同时,该方法具备传统 ATP 发光法检测技术灵敏快速的优点,从待测样品的制备到细菌 ATP 的提取,直到 ATP 发光强度的检测,整个过程可在 1 h 内完成,具有快速、简便的特点,可以满足一般快速检测的要求,在裂解细菌方面又具有特异性,在现场或临床定性定量检测金黄色葡萄球菌方面具有良好的前景和实用价值。

REFERENCES

- [1] Mann NH. The potential of phages to prevent MRSA infections. *Res Microbiol*, 2008, 159(5): 400–405.
- [2] Watkins RR, David MZ, Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 2012, 61(9): 1179–1193.
- [3] Klem J, Domotor D, Schneider G, et al. Bacteriophage therapy against staphylococci. *Acta Microbiol Immunol Hungar*, 2013, 60(4): 411–422.
- [4] Rajan S. Skin and soft-tissue infections: classifying and treating a spectrum. *Cleveland Clin J Med*, 2012, 79(1): 57–66.
- [5] Pletz MW, Burkhardt O, Welte T. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia: linezolid or vancomycin?—comparison of pharmacology and clinical efficacy. *Eur J Med Res*, 2010, 15(12): 507.
- [6] Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epid Infect*, 2010, 138(5): 606–625.
- [7] Yoon H, Yun J, Lim JA, et al. Characterization and genomic analysis of two *Staphylococcus aureus* bacteriophages isolated from poultry/livestock farms. *J Gener Virol*, 2013, 94(11): 2569–2576.
- [8] DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Investig*, 2009, 119(9): 2464.
- [9] Dulon M, Haamann F, Peters C, et al. MRSA prevalence in European healthcare settings: a review. *BMC Infect Dis*, 2011, 11(1): 138.
- [10] McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(11): 5113–5120.
- [11] Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(2): 327.
- [12] Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol*, 1961, 14(4): 385.
- [13] Recsei PA, Gruss AD, Novick RP. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(5): 1127–1131.
- [14] Walsh S, Shah A, Mond J. Improved pharmacokinetics and reduced antibody reactivity of lysostaphin conjugated to polyethylene glycol. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(2): 554–558.
- [15] Baba T, Schneewind O. Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J*, 1996, 15(18): 4789.
- [16] Hawronskyj JM, Holah J. ATP: a universal hygiene monitor. *Trends Food Sci Technol*, 1997, 8(3): 79–84.

- [17] Champiat D, Matas N, Monfort B, et al. Applications of biochemiluminescence to HACCP. *Luminescence*, 2001, 16(2): 193–198.
- [18] Tang QQ, Ye ZZ, Wang JP, et al. Application of ATP bioluminescence in microbial detection. *Food Sci*, 2008, 29(6): 460–465 (in Chinese).
唐倩倩, 叶尊忠, 王剑平, 等. ATP 生物发光法在微生物检验中的应用. *食品科学*, 2008, 29(6): 460–465.
- [19] Mcelroy WD. Crystalline firefly luciferase: $\text{LH}_2 + \text{ATPLH}_2\text{-AMP} + \text{PPLH}_2\text{-AMP} + \text{O}_2: \text{L-AMP} + \text{light} + \text{H}_2\text{O}$. *Methods Enzymol*, 1963, 6: 445–448.
- [20] Hao QL, Lü B, Zhou YK, et al. Rapid detection of ATP concentration in cells using bioluminescence method. *Acta Med Univer Sci Technol Huazhong*, 2005, 34(1): 61–64 (in Chinese).
郝巧玲, 吕斌, 周宜开, 等. 生物发光法快速检测细胞内三磷酸腺苷. *华中科技大学学报: 医学版*, 2005, 34(1): 61–64.
- [21] Ma N, Zhao H, Zhang X, et al. Rapid determination of colony in food by ATP bioluminescence method. *Chin J Public Health Eng*, 2008, 7(5): 296–297 (in Chinese).
马妮, 赵虹, 张旭, 等. ATP 发光技术快速检测食品中菌落总数. *中国卫生工程学*, 2008, 7(5): 296–297.
- [22] Stopa PJ, Tieman D, Coon PA, et al. Detection of biological aerosols by luminescence techniques. *Field Anal Chem Technol*, 1999, 3(4/5): 283–290.
- [23] Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, et al. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(4): 583–607.
- [24] Li LX, Wu JE, Chang C, et al. The establish of ATP bioluminescent detection technique and the feasibility analysis of its application. *Food Sci Technol*, 2012, 37(1): 275–279 (in Chinese).
李利霞, 伍金娥, 常超, 等. ATP 生物发光检测技术的建立及应用可行性分析. *食品科技*, 2012, 37(1): 275–279.
- [25] de Boer E, Beumer RR. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol*, 1999, 50(1): 119–130.
- [26] Thumm G, Götz F. Studies on polysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Mol Microbiol*, 1997, 23(6): 1251–1265.

(本文责编 郝丽芳)