

金黄色葡萄球菌鉴定方法研究

郭瑞军^{1*}, 王 超²

(1. 濮阳市食品药品检验检测中心, 濮阳 457000; 2. 西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100)

摘 要: **目的** 筛选出能够快速准确鉴定金黄色葡萄球菌的方法。**方法** 利用国家标准法、VITEK 2 Compact 生化鉴定、16S rDNA 序列分析和 PCR 鉴定等 4 种方法对酱卤肉制品中分离出的典型菌落进行鉴定。**结果** 国家标准法检测结果显示菌株为革兰氏阳性菌, 血平板上有明显的透明溶血圈且血浆凝固酶试验结果为阳性, 符合金黄色葡萄球菌判定标准。VITEK 2 Compact 生化鉴定结果中不吻合的典型生化谱仅有 1 项(dMAL), 判定菌株为金黄色葡萄球菌(98%概率), 为极好的鉴定。16S rDNA 序列比对分析及以邻接法构建的进化树均显示典型菌落为金黄色葡萄球菌。以耐热核酸酶基因(*nuc*)设计的引物能扩增出单一的清晰条带, 能快速准确的识别出金黄色葡萄球菌。**结论** 4 种方法均能准确鉴定出金黄色葡萄球菌, 但耗时都比较长, 通过改进实验方法, 缩短 DNA 提取时间, PCR 鉴定将表现出较大优势。

关键词: 酱卤肉; 国标法; VITEK 2 Compact; 16S rDNA; PCR 鉴定

Study on the identification methods for *Staphylococcus aureus*

GUO Rui-Jun^{1*}, WANG Chao²

(1. Puyang Food and Drug Inspection and Testing Center, Puyang 457000, China;
2. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

ABSTRACT: Objective To select the method for rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus*. **Methods** The typical colonies isolated from soy sauce and pot-roast meat products were identified with national standard method, VITEK 2 Compact identification, 16S rDNA sequence analysis and PCR identification. **Results** The results from national standard method showed that the strain was a gram-positive bacteria, there was a clear hemolytic circle on blood plate and the assay result of coagulase test was positive, all the identification met the criteria of *Staphylococcus aureus*. Only one term (dMAL) did not match the typical biochemical spectrum in the identification results of VITEK 2 Compact, which was proved to be *Staphylococcus aureus* (98% probability) and indicated to be an excellent identification. The result of 16S rDNA sequences analysis and phylogenetic tree constructed by Neighbor-Join method indicated that the typical colony was *Staphylococcus aureus*. The primers designed with gene *nuc* could amplify the specific positive bands, PCR identification could identify *Staphylococcus aureus* rapidly and effectively. **Conclusion** The four methods can accurately identify *Staphylococcus aureus*, but it takes a long time. By improving the experimental method, shortening the extraction time of DNA, PCR identification will show greater advantages.

KEY WORDS: soy sauce and pot-roast meat products; national standard method; VITEK 2 Compact; 16S rDNA; PCR identification

*通讯作者: 郭瑞军, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: guo_2009_2013@nwsuaf.edu.cn

*Corresponding author: GUO Rui-Jun, Master, Puyang Food and Drug Inspection and Testing Center, Puyang 457000, China. E-mail: guo_2009_2013@nwsuaf.edu.cn

1 引言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种革兰氏阳性致病菌, 在自然界中广泛存在, 能分泌具有毒性的肠毒素, 严重威胁食品安全, 生活中由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件时常发生^[1-3]。

国标法检验金黄色葡萄球菌包括增菌培养、分离培养、生理生化鉴定等过程, 步骤较多、操作繁琐, 耗时较长, 同时对表型特征有差异的菌株鉴定困难。VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统自动化程度高、稳定性好, 鉴定结果可靠且具有可重复性, 在医药和食品安全领域被广泛应用^[4]。王娟等^[5]利用传统方法与 VITEK 2 Compact 鉴定方法对金黄色葡萄球菌进行鉴定, 2 种方法的鉴定结果并无差异, 且 VITEK 2 Compact 鉴定方法更加准确、快捷。

随着分子生物技术的快速发展和在微生物鉴定方面广泛应用, 分子鉴定的方法日渐完善, 鉴定水平逐步提高。16S rDNA 序列在分子进化中比较保守, 且具有较高的种以上水平的分辨能力, 常被用来进行细菌的鉴定分析。研究发现 16S rDNA 序列能有效鉴定出金黄色葡萄球菌, 且对凝固酶异常的菌株有较好的鉴定效果^[6-8]。PCR 鉴定是以微生物特定的基因设计引物进行 PCR 扩增, 该方法特异性好、灵敏度高且操作便捷。研究表明 PCR 鉴定能准确快速的鉴定金黄色葡萄球菌^[9,10]。Rajch 等^[11]研究指出 PCR 是鉴定金黄色葡萄球菌非常好的标准。廖光华等^[12]以随机挑选的 50 株菌为研究对象, 建立了一种基于 *nuc* 基因进行 PCR 检测金黄色葡萄球菌的方法。目前, 关于金黄色葡萄球菌鉴定方法准确性的研究已有报道, 而对于各种鉴定方法在检验过程中的实际应用研究较少。

本文通过利用国标法、VITEK 2 Compact 生化鉴定、16S rDNA 序列分析和 PCR 鉴定等 4 种方法对酱卤肉制品检验过程中分离出的典型菌落进行鉴定, 从鉴定结果及鉴定时长方面进行比较分析, 以期对金黄色葡萄球菌鉴定方法的选择与改进提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

LER-080(H)智能生化培养箱(郑州生元仪器有限公司); VITEK 2 Compact(法国梅里埃公司); TG16.5 高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); 2720 PCR 仪(美国 ABI 公司); DYCP-31E 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

Baird-Parker 平板、血平板、革兰氏染色液试剂盒、脑心浸出液肉汤、冻干兔血浆(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); GP 鉴定卡(梅里埃诊断产品(上海)有限公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR Master mix(天根生化科技(北京)有限公司)。

实验材料为市售预包装酱卤肉制品。

2.2 样品前处理

称取 25 g 样品至无菌均质袋中, 加入 225 mL 无菌生理盐水, 均质器拍打 1~2 min, 得到 1:10 的样品溶液。吸取 1:10 的样品溶液 1 mL 至含 9 mL 无菌生理盐水的试管中, 振荡混匀后得 1:100 的样品溶液。吸取两个稀释度的样品溶液各 1 mL, 均按照 3:3:4 的比例分别加入三块 Baird-Parker 平板中, 用无菌涂布棒涂布均匀后, 置于 36 °C 培养箱倒置培养 24~48 h, 挑取 5 个典型菌落进行检验。

2.3 国标法鉴定

按照国家标准 GB 4789.10-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[13]中第一法进行革兰氏染色、血平板检验和血浆凝固酶检验等鉴定试验。

2.4 VITEK 2 Compact 生化鉴定

将典型菌落分别划线接种到含 5%羊血的胰酶大豆琼脂(tryptone soya agar, TSAB)培养基上, 36 °C 培养 18~24 h 后, 用无菌生理盐水制成 0.5~0.63 McF 的菌悬液, 选用 GP 鉴定卡, 按照标准化操作流程, 利用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统进行鉴定。

2.5 菌体培养及 DNA 提取

取典型菌落分别接种到装有 10 mL 无菌 LB 培养基的试管中, 36 °C, 160 r/min 振荡培养过夜, 利用试剂盒提取细菌基因组 DNA。

2.6 16S rDNA 鉴定

以细菌基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增, 扩增程序为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经凝胶电泳检测后送公司双向测序, 测序结果拼接处理后在 NCBI 网站上用 Blast 工具进行比对, 利用 MEGA 6.0 软件进行分析、处理^[14], 用邻接法构建系统发育树。

2.7 PCR 鉴定

参考熊苏玥等^[15]的方法, 以金黄色葡萄球菌耐热核糖核酸酶基因(*nuc*)设计引物 nuc-F(5'-GGATGGCTATCAGTAA TGTTTCG-3')和 nuc-R(5'-ATTACGCCGTTATCTGTTTG T-3'), 利用细菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物进行凝胶电泳检测。

3 结果与分析

3.1 确证鉴定结果

Baird-Parker 平板上的典型菌落表面光滑湿润, 呈灰

黑色,周围有不透明圈(图 1-A)。利用革兰氏染色液试剂盒对典型菌落进行染色分析,显微镜下观察显示 5 个菌落的菌株均为革兰氏阳性球菌。血平板培养后的菌落比 Baird-Parker 平板上的菌落直径大,菌落呈圆形凸起状,周围可见明显的透明溶血圈(图 1-B)。

挑取 Baird-Parker 平板上的典型菌落接种到 5 mL 脑心浸出液肉汤(BHI), 36 °C培养 18~24 h 后,吸取 0.8 mL 培养液加入含冻干兔血浆的西林瓶中, 36 °C培养,结果呈现凝固状,因此判定所挑取的典型菌落均为金黄色葡萄球菌。

3.2 VITEK 2 Compact 鉴定结果

利用 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统对挑选的典型菌落进行鉴定,5 个典型菌落的菌株鉴定结果一

致(见表 1),D-甘露醇(dMAN)、D-甘露糖(dMNE)、D-海藻糖(dTRE)等 14 项检测结果为阳性,D-木糖(dXYL)、苦杏仁苷(AMY)、磷脂酰磷脂酶 C(PIPLC)等 29 项检测结果为阴性,不吻合的典型生化谱 1 项(dMAL),结果判定为金黄色葡萄球菌(98%概率),为极好的鉴定。

3.3 16S rDNA 序列测定与分析

5 个典型菌落的 PCR 产物经凝胶电泳检测后均出现单一条带,大小约为 1500 bp(图 2)。测序所得序列在 GenBank 数据库中分别进行 Blast 比对,结果均与金黄色葡萄球菌的同源性最高。利用邻接法构建进化树(图 3),结果显示典型菌落均与金黄色葡萄球菌聚为一支,表明所挑选的典型菌落均为金黄色葡萄球菌。

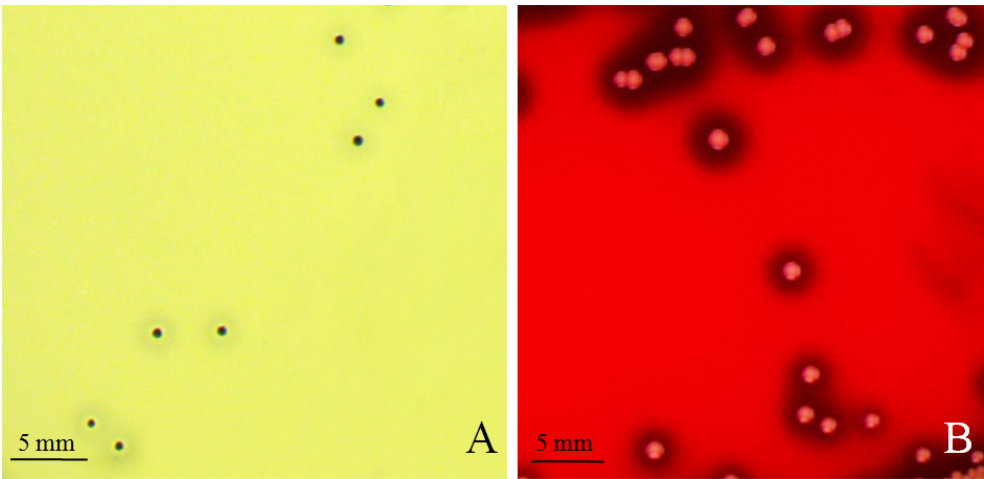
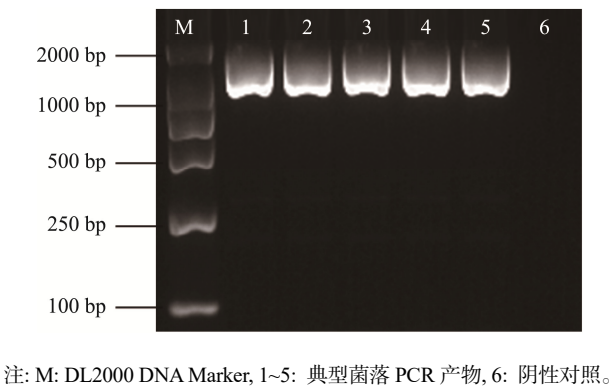


图 1 Baird-Parker 平板(A)和血平板(B)菌落特征
Fig.1 Colony characteristics on Baird-Parker plate(A)and blood plate(B)

表 1 VITEK 2 Compact 生化鉴定结果
Table 1 The results of biochemical test by VITEK 2 Compact System

生化试验	结果	生化试验	结果	生化试验	结果	生化试验	结果
AMY	—	PHOS	+	POLYB	+	dMNE	+
PIPLC	—	LeuA	—	dGAL	—	MBdG	—
dXYL	—	ProA	—	dRIB	—	PUL	—
ADH1	+	BGURr	—	ILATk	+	dRAF	—
BGAL	—	AGAL	—	LAC	—	O129R	+
AGLU	(—)	PyrA	+	NAG	+	SAL	—
APPA	—	BGUR	—	dMAL	—	SAC	+
CDEX	—	AlaA	—	BACI	+	dTRE	+
AspA	—	TyrA	—	NOVO	—	ADH2s	—
BGAR	—	dSOR	—	NC6.5	+	OPTO	+
AMAN	—	URE	—	dMAN	+		

注: +, 阳性; —, 阴性; (+), 弱阳性; (—), 弱阴性。



注: M: DL2000 DNA Marker, 1~5: 典型菌落 PCR 产物, 6: 阴性对照。
图 2 典型菌落 PCR 产物电泳图
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of typical colonies

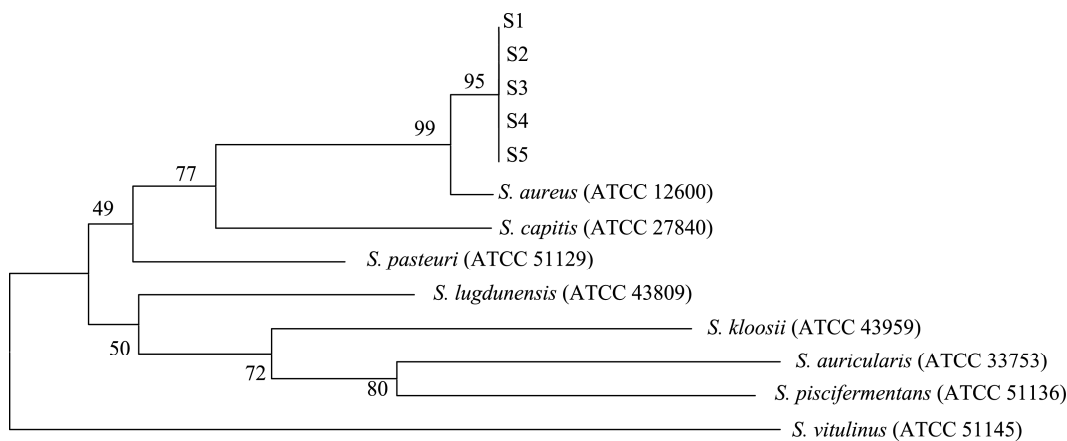
3.4 PCR 鉴定结果

以典型菌落的基因组 DNA 为模板, 利用金黄色葡萄

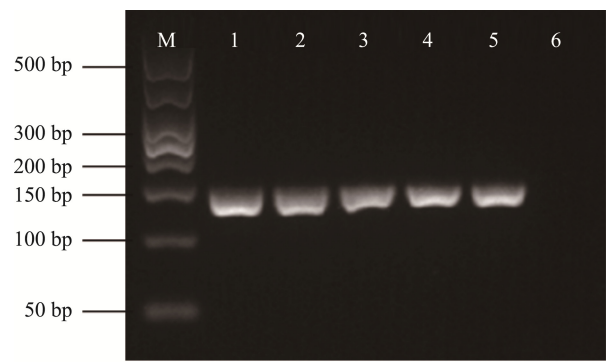
球菌特异性引物进行 PCR 扩增, 在约 150 bp 处出现单一清晰条带(图 4), 与理论上的目的条带大小相符, 判定典型菌落为金黄色葡萄球菌。

3.5 鉴定方法比较分析

在鉴定结果方面, 4 种方法均能准确鉴定出所挑选的典型菌落, 且均鉴定到种水平。在鉴定时长方面, 从挑选出典型菌落以后开始计算: 国标法在血浆凝固酶试验中耗时较长, BHI 培养基需培养 18~24 h, 然后将 BHI 培养物加入血浆中观察约 6 h, 期间可以完成革兰氏染色和血平板检验; VITEK 2 Compact 鉴定方法中需要将典型菌落接种特定培养基上培养 18~24 h, 挑取培养好的菌落配成一定浊度的溶液, 然后上机测试约 5 h; 16S rDNA 鉴定和 PCR 鉴定均包含过夜培养和基因组 DNA 提取的过程, PCR 鉴定在 PCR 扩增结束后进行凝胶电泳检测即可进行判定, 而 16S rDNA 鉴定在 PCR 扩增后, 还需要进行测序分析。



注: S1~S5: 典型菌落
图 3 基于 16S rDNA 序列的系统进化树
Fig.3 The phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences



注: M: 50 bp DNA ladder, 1~5: 典型菌落 PCR 产物, 6: 阴性对照。
图 4 典型菌落 PCR 产物电泳图
Fig.4 PCR products of typical colonies by electrophoresis

4 讨论与结论

国标法鉴定金黄色葡萄球菌的主要依据是革兰氏染色阳性、血平板有明显溶血圈以及血浆凝固酶试验阳性。然而对于同种菌的不同菌株, 生化特征未必完全相同。代义闯等^[16]从牛乳中分离出 5 株凝固酶阴性的金黄色葡萄球菌, 章海通等^[17]从鸡排中分离出一株凝固酶异常的金黄色葡萄球菌, 血浆凝固酶试验在 24 h 时观察到完全凝固, 超过了国标法中规定的 6 h 观察时间。凝固酶阴性的金黄色葡萄球菌被发现, 造成国标法无法做出准确鉴定, 因此需要对国标法进行优化或者联合其他方法共同鉴定。

革兰氏阳性细菌鉴定卡(VITEK 2 GP Test Kit)包含了

43 个生化反应,用于测定细菌的碳源利用、酶活性和耐药性。Delmas 等^[18]研究表明 Vitek 2 GP 鉴定卡对金黄色葡萄球菌的鉴定准确率为 100%,对包含在数据库中的葡萄球菌种的鉴定准确率达 93.2%。大部分金黄色葡萄球菌能够利用 D-麦芽糖(dMAL),然而不同菌株之间又存在一定的差异性,因此需要通过大多数金黄色葡萄球菌共有的生化特征进行判定。张璟等^[19]利用 VITEK 2 系统对 337 株金黄色葡萄球菌及 3 个标准菌株进行检验分析,43 个生化反应中有 19 项的检测结果在所有菌株中保持一致,可作为判定金黄色葡萄球菌的关键生化反应。本研究利用 GP 鉴定卡进行检验,鉴定结果极好,仅 D-麦芽糖检测结果与典型生化图谱不吻合,其中与张璟等^[19]所提出的关键生化反应中相同的项目有 18 项,且检验结果一致,更进一步证明了检验结果的准确性。

国内农业标准、进出口行业标准及地方标准中,鉴定金黄色葡萄球菌存在 PCR 法^[20-22]。由于金黄色葡萄球菌是革兰氏阳性菌,细胞壁较厚致使菌体难以裂解,采用试剂盒法或一些改良方法可提取到高质量基因组 DNA^[23-25]。而 PCR 鉴定过程中需要提取基因组 DNA,且单个菌落无法满足试验所需的用量,因此需要增加培养过程,延长了鉴定时间。如果能通过改进实验方法,实现利用少量菌落直接进行菌落 PCR 或者提取出微量 DNA 进行 PCR 检测,将会使检验效率有较大提高。汪敏等^[26]利用 *femA* 基因设计特异性引物,通过菌落 PCR 检测出化妆品中的金黄色葡萄球菌。利用水煮法提取金黄色葡萄球菌 DNA,操作简单、成本低且耗时短,与试剂盒等提取方法相比,提取的 DNA 产量大,但是纯度较低^[27,28]。肖茜文等^[29]利用 5 种方法提取金黄色葡萄球菌 DNA,根据 *nuc* 基因设计特异性引物,目的条带 506 bp,然后进行 PCR 检测,结果显示仅水煮法未能扩增出目的条带。模板 DNA 的质量和浓度对 PCR 结果有重要影响^[30],有研究指出热裂解过柱法能快速稳定地提取出金黄色葡萄球菌的 DNA 用于 qPCR 检测^[31]。本研究在检验过程中对各种鉴定方法进行比较的同时,也利用水煮法提取典型菌落的基因组 DNA,然后进行 PCR,并成功扩增出 16S rDNA 序列和 *nuc* 基因特异性序列。因此可以看出,PCR 鉴定方法具有重要的潜在应用价值,通过优化 DNA 提取方法,提高 DNA 的产量和质量,PCR 鉴定方法将表现出较大优势。

参考文献

- 王艳,吴雅冬,饶磊,等.一起幼儿园食物中毒的流行病学调查[J].医学动物防制,2019,35(2):198-200.
- Wang Y, Wu YD, Rao L, et al. Epidemiological survey on a case of food poisoning in kindergarten [J]. J Med Pest Control, 2019, 35(2): 198-200.
- 李光辉,郭卫芸,高雪丽,等.2003-2015 年金黄色葡萄球菌食物中毒事件特征分析[J].食品研究与开发,2018,39(6):200-203.
- Li GH, Guo WY, Gao XL, et al. Epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* food poisoning events in China during 2003-2015 [J]. Food Res Dev, 2018, 39(6): 200-203.
- 杨新利,祁琴.一起由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒的调查报告[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(73):296.
- Yang XL, Qi Q. A Survey on a Case of Food Poisoning Caused by *Staphylococcus aureus* [J]. World Latest Med Inform, 2018, 18(73): 296.
- 叶桦秀,李丽丽,江莉莉. VITEK 2 Compact 微生物全自动分析系统的应用及鉴定结果分析[J].中国医疗器械信息,2017,23(24):152-153,156.
- Ye HX, Li LL, Jiang LL. Application and Result Identification of VITEK2 Comoact automatic microorganism analyzer [J]. China Med Dev Inform, 2017, 23(24): 152-153, 156.
- 王娟,刘岐,朱世真.应用 VITEK2 Comoact 全自动微生物测定仪对药品中金黄色葡萄球菌的鉴定[J].中国处方药,2014,12(7):22-23.
- Wang J, Liu Q, Zhu SZ. VITEK2 Comoact automatic microorganism analyzer for drug identification of *Staphylococcus aureus* [J]. J China Prescr Drug, 2014, 12(7): 22-23.
- 陈霖祥,蔡颖,周广彪,等.16S rRNA 基因快速测序法鉴定 3 种常见病原微生物[J].现代预防医学,2014,41(17):3180-3183,3200.
- Chen LX, Cai Y, Zhou GB, et al. Identification of three common pathogenic microorganisms by using rapid sequencing of 16S rRNA gene [J]. Mod Pre Med, 2014, 41(17): 3180-3183, 3200.
- Yilmaz F, Orman N, Serim G, et al. Surface water-borne multidrug and heavy metal-resistant *Staphylococcus* isolates characterized by 16S rDNA sequencing [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2013, 91(6): 697-703.
- Woo PC, Leung AS, Leung KW, et al. Identification of slide coagulase positive, tube coagulase negative *Staphylococcus aureus* by 16S ribosomal RNA gene sequencing [J]. Mol Pathol: MP, 2001, 54(4): 244.
- Wladimir PS, Jorge AS, Márcia RPM, et al. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes [J]. Braz J Microbiol, 2003, 34: 125-127.
- Ercolini D, Blaiotta G, Fusco V, et al. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making [J]. J Appl Microbiol, 2004, 96(5): 1090-1096.
- Rajeh A, Kamal AA, Ayman AM, et al. Role of polymerase chain reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Egypt J Med Hum Genet, 2014, 15(3): 293-298.
- 廖光华,代佳君,邓钰萍,等.基于 *nuc* 基因的奶牛乳房炎性金黄色葡萄球菌 PCR 检测方法的建立[J].塔里木大学学报,2019,31(4):7-11.
- Liao GH, Dai JJ, Deng YP, et al. Identification of PCR amplification based on *nuc* gene for *Staphylococcus aureus* from raw Milk [J]. J Tarim Univ, 2019, 31(4): 7-11.
- GB 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验[S].
- GB 4789.10-2016 National food safety standard, Food microbiological examination: *Staphylococcus aureus* [S].
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Mol Biol Evolution, 2013, 30(4): 2725-2729.
- 熊苏玥,米瑞芳,陈曦,等.多重 PCR 同时检测食品中 4 种细菌与常见霉菌[J].食品科学,2019,40(4):305-311.
- Xiong SY, Mi RF, Chen X, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of four food-borne bacteria and common mold [J]. Food Sci,

- 2019, 40(4): 305–311.
- [16] 代义闯, 陈娟, 谈永萍, 等. 乳源凝固酶阴性金黄色葡萄球菌挥发性代谢特征分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(24): 12–19.
- Dai YC, Chen J, Tan YP, et al. Analysis of volatile metabolic characteristics of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* from milk [J]. Food Res Dev, 2019, 40(24): 12–19.
- [17] 章海通, 邢家溧, 倪剑锋, 等. 鸡排中一株凝固酶异常的金黄色葡萄球菌的分离鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(4): 962–967.
- Zhang HT, Xing JL, Ni JF, et al. Isolation and identification of a strain of *Staphylococcus aureus* with coagulase abnormality in chicken chops [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(4): 962–967.
- [18] Delmas J, Chacornac JP, Robin F, et al. Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* species [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 311–313.
- [19] 张璟, 胡晓宁, 苏诚玉, 等. 2007~2011 年甘肃省食品中分离的金黄色葡萄球菌生化特征分析[J]. 疾病预防控制通报, 2013, 28(3): 53–55.
- Zhang J, Hu XN, Su CY, et al. Biochemical analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from food in Gansu province from 2007 to 2011 [J]. Bull Dis Control Pre(China), 2013, 28(3): 53–55.
- [20] NY/T 2962–2016 奶牛乳房炎乳汁中金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、无乳链球菌分离鉴定[S].
- NY/T 2962–2016 Methods for isolation and identification of *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus* and *Streptococcus agalactiae* in milk from dairy cow with mastitis [S].
- [21] SN/T 2206. 10–2014 化妆品微生物检验方法 第 10 部分: 金黄色葡萄球菌 PCR 法[S].
- SN/T 2206. 10–2014 Determination of microorganism in cosmetics—Part 10: PCR method for *Staphylococcus aureus* in cosmetics [S].
- [22] DB22/T 427–2005 食品中金黄色葡萄球菌 PCR 快速检验方法[S].
- DB22/T 427–2005 Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food with PCR assay [S].
- [23] 贾爱荣, 张永刚, 王萍, 等. 食品检测中革兰氏阳性菌 DNA 提取新方法的研究[J]. 食品工业, 2011, 32(12): 104–107.
- Jia AR, Zhang YG, Wang P, et al. New method for DNA extraction from gram-positive bacteria in food inspection [J]. Food Ind, 2011, 32(12): 104–107.
- [24] 庞建, 刘占英, 郝敏, 等. 革兰氏阳性细菌基因组 DNA 提取方法的比较及优化[J]. 微生物学通报, 2015, 42(12): 2482–2486.
- Pang J, Liu ZY, Hao M, et al. Comparison and optimization of methods for genomic DNA extraction from Gram positive bacteria [J]. Microbiol China, 2015, 42(12): 2482–2486.
- [25] Kelsey LK, Jeffrey LB. Rapid isolation of DNA from *Staphylococcus* [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1373: 59–62.
- [26] 汪敏, 王婷. 菌落 PCR 技术检测化妆品中金黄色葡萄球菌[J]. 香料香精化妆品, 2013, (6): 31–32.
- Wang M, Wang T. Determination of *Staphylococcus aureus* in cosmetics by colony polymerase chain reaction [J]. Flavour Fragrance Cosmet, 2013, (6): 31–32.
- [27] 滕要辉, 索标, 艾志录, 等. 速冻食品中沙门氏菌和金黄色葡萄球菌多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 140–144.
- Teng YH, Suo B, Ai ZL, et al. Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in quick-frozen foods [J]. Food Sci, 2013, 34(8): 140–144.
- [28] 朱素芬. PCR 检测速冻食品中金黄色葡萄球菌与沙门菌[J]. 中国城乡企业卫生, 2018, 33(4): 19–21.
- Zhu SF. PCR on detection of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* in frozen food [J]. Chin J Urban Rural Ind Hyg, 2018, 33(4): 19–21.
- [29] 肖茜文, 王艳蕊, 刘桐, 等. 沙门氏菌和金黄色葡萄球菌 DNA 提取方法的比较[J]. 农产品加工, 2017, (3): 48–50, 55.
- Xiao QW, Wang YR, Liu T, et al. A Comparative study on *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* DNA extraction methods [J]. Process Agric Prod, 2017, (3): 48–50, 55.
- [30] 唐恩洁. PCR 影响因素初探(二) 模板 DNA 质量对 PCR 结果的影响[J]. 川北医学院学报, 1997, (2): 1–4.
- Tang EJ. Initial research on the effect of pcr (two)—the effect of quality on template DNA for the result of PCR [J]. J North Sichuan Med Coll, 1997, (2): 1–4.
- [31] 田小兰, 冯俊丽, 汪艺. 一种快速高效的 DNA 提取方法及其在 qPCR 检测金黄色葡萄球菌中的应用[J]. 食品科技, 2019, 44(2): 344–350.
- Tian XL, Feng JL, Wang Y. A rapid and efficient DNA extraction method and its application in the detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Food Sci Technol, 2019, 44(2): 344–350.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



郭瑞军, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: guo_2009_2013@nwsuaf.edu.cn