

李钰钰,姚继英,田永路,等. 实验动物金黄色葡萄球菌微滴式数字 PCR 检测方法建立和优化 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(3): 430-439.

LI Y Y, YAO J Y, TIAN Y L, et al. Establishment of a digital PCR detection method for *Staphylococcus aureus* in laboratory animals using microdroplet technique [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(3): 430-439.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.03.011

实验动物金黄色葡萄球菌微滴式数字 PCR 检测方法建立和优化

李钰钰¹, 姚继英¹, 田永路², 孙甜甜¹, 韦玉生^{1*}, 李夏莹^{1*}

(1. 北京大学 生命科学学院 实验动物中心, 北京 100871; 2. 北京大学 心理与认知科学学院, 北京 100871)

【摘要】 目的 建立一种快速、准确的微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 检测方法, 用于检测实验动物和环境中的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA)。**方法** 针对 SA 耐热核酸酶基因 (*nuc*) 的保守区域, 设计并合成一对特异性引物和探针, 通过实验优化, 确定最佳反应条件, 检测动力学范围, 验证该方法的特异性和方法再现性; 以相同的模板分别进行 ddPCR 和实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法反应, 检测两种方法的互换性; 最后将该方法用于各种临床样品的检测。**结果** 建立的 SA ddPCR 方法的动力学范围为 100 ~ 15 000 copies/μL, 检测极限为 2.5 copies, 定量极限为 10 copies; 检测该方法的特异性, 结果仅 SA 有阳性微滴, 其他病原体均无阳性微滴; 对 3 个平行样本进行测量后, 计算得到其标准偏差与相对标准偏差发现, 在 ddPCR 的动力学检测区间内, 随着目标拷贝数的逐渐降低, 相对标准偏差呈现上升趋势, 然而始终低于 25% 的, 这一结果表明该检测方法具有良好的稳定性。*t* 检验分析 ddPCR 和 qPCR 方法的检测结果, 显示两种方法所得拷贝数均无明显差异。共检测 10 份临床样本, 有 2 份临床样本为阳性, 其他均为阴性, 该结果与 qPCR 检测结果一致。**结论** 建立的检测 SA 的 ddPCR 方法灵敏度高、特异性强、稳定性好和重复性好, 可用于实验动物 SA 的检测。

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 微滴式数字 PCR; 实验动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 03-0430-10

Establishment of a digital PCR detection method for *Staphylococcus aureus* in laboratory animals using microdroplet technique

LI Yuyu¹, YAO Jiying¹, TIAN Yonglu², SUN Tiantian¹, WEI Yusheng^{1*}, LI Xiaying^{1*}

(1. Laboratory Animal Research Center, School of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China;

2. School of Psychological and Cognitive Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Corresponding author: WEI Yusheng. E-mail: yusheng.wei@pku.edu.cn; LI Xiaying. E-mail: lixiaying@pku.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a rapid and accurate droplet digital PCR (ddPCR) detection method for detecting *Staphylococcus aureus* (SA) in laboratory animals and the environment. **Methods** Using the heat-stable nuclease gene (*nuc*) of SA as the target gene, a pair of specific primers and probes are designed within its conserved region. Optimize the reaction conditions, test the dynamic range, and evaluate the specificity and stability of the method. Using the same template, test reactions were performed with both ddPCR and real-time quantitative PCR (qPCR) method to assess the interchangeability between the two approaches. Finally, the method is applied to the detection of various clinical samples. **Results** The kinetic range of the established SA ddPCR method is 100 ~ 15 000 copies/μL, with a detection limit of 2.5 copies and a quantification limit of 10 copies; The specificity of this

【作者简介】 李钰钰, 女, 硕士, 研究方向: 实验动物医学。Email: yuyuli0626@pku.edu.cn

【通信作者】 韦玉生, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 基因修饰动物模型研发与实验动物管理。Email: yusheng.wei@pku.edu.cn;

李夏莹, 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 实验动物福利伦理和微生物检测。Email: lixiaying@pku.edu.cn。

* 共同通信作者

method was tested, and only SA showed positive droplets, while no positive droplets were found for other pathogens; After measuring three parallel samples, the standard deviation and relative standard deviation were calculated. It was found that within the dynamic detection interval of ddPCR, as the target copy number gradually decreased, the relative standard deviation showed an upward trend, but remained below 25%. This result indicates that the detection method has good stability. **Conclusions** The established ddPCR method for detecting SA has the advantages of high sensitivity, strong specificity, good stability, and good reproducibility. This method can be applied for the detection of SA in laboratory animals.

【Keywords】 *Staphylococcus aureus*; droplet digital PCR; laboratory animals

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是一种广泛存在于自然环境和宿主体内的革兰氏阳性菌,因其致病性强且易于传播,成为实验动物研究中的重要病原体^[1-2]。SA 感染可导致实验动物出现多种严重的疾病,包括皮肤感染、肺炎、败血症和心内膜炎等^[3-4],啮齿类动物感染则常引发肺炎、睾丸炎、乳腺炎以及化脓性炎症等^[5],这不仅影响实验动物的健康和福利,还可能干扰实验结果的准确性和可靠性^[6]。

实验动物中 SA 感染的有效监测与控制至关重要,因此开发一种快速且准确的检测方法显得尤为关键。尽管传统的细菌培养法一直是检测 SA 的“金标准”,但其漫长的检测周期严重制约了检测效率,通常需要 24 ~ 48 h 才能得到结果,难以满足实验研究中对快速诊断的需求^[7]。随着分子生物学技术的快速发展,病原体的快速检测有了新的技术手段。在众多新兴技术中,ddPCR 凭借其高灵敏度、高特异性和绝对定量的优势,成为核酸精准检测领域的重要方法之一^[8]。ddPCR 通过将样本分配到数万个微滴中进行独立的 PCR 反应,能够在短时间内对目标基因进行绝对定量检测^[9]。该方法不仅能够快速提供检测结果,还可以定量分析样本中 SA 的浓度,为实验研究和感染控制提供重要参考。

本研究致力于构建一种针对 SA 的 ddPCR 检测方法,通过系统性地优化各项参数,并对其灵敏度、特异性和重复性进行全面评估,旨在为 SA 的精准定量检测提供一种新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 SPF 级雌性 ICR 小鼠,8 周龄,平均体质

量约为 28 g,共计 20 只,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。饲养于北京大学实验动物中心【SYXK(京)2020-0035】;饲养环境温度在 20 ~ 26 ℃、相对湿度 30% ~ 70%、保持昼(12 h)夜(12 h)明暗交替。本实验的全部操作流程均严格遵循北京大学实验伦理学的相关要求,并已获得北京大学实验动物福利伦理委员会的审批(LAC-WeiYS-1),且全程遵循 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

SA 阳性核酸(苏州西山,0101-3341),螺杆菌阳性核酸(苏州西山,0101-3061),肺炎克雷伯杆菌阳性核酸(苏州西山,0101-3231),肺炎支原体阳性核酸(苏州西山,0101-3021),沙门氏菌阳性核酸(苏州西山,0101-3071),绿脓杆菌阳性核酸(苏州西山,0101-3331),嗜肺巴斯德杆菌阳性核酸(苏州西山,0101-3271)。Premix Ex TaqTM (Probe qPCR) 酶试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司,RR390A),ddPCR supermix for probes (Bio Rad,1863010),粪便基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司,DP328),数字 PCR 探针法生成油(Bio Rad,1863005),血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司,DP304-02)。微滴式数字 PCR 仪 QX200(Bio Rad,美国),荧光定量 PCR 仪 CFX96 (Bio Rad,美国),Nano Drop 微量分光光度计(ThermoFisher,美国)。

1.2 方法

1.2.1 特异性引物和探针

根据已发表的 SA 耐热核酸酶 *nuc* 基因(Gen Bank 登录号:OP821411.1)的序列,利用软件 Snapgene 6.0.2 设计了特异性引物和探针。具体序列如下:SA-F-1:5'-GCGATTGATGGTGATACG-

3’;SA-R-1:5’-CGTAAATGCACTTGCTTC-3’;SA-P-1:5’-FAM-AAATTAATGTACAAAGGTCAACCAATGAC-BHQ1-3’。

1.2.2 ddPCR 检测体系的建立及优化

在 ddPCR 平台 QX200 上进行 SA ddPCR,用 ddPCR Supermix 配置反应体系,体系中引物浓度经优化确定为 400 nmol/L、探针浓度经优化确定为 200 nmol/L。将 20 μ L PCR 反应液和 70 μ L 微滴生成油加入微滴生成卡生成微滴。将生成的微滴转移到 PCR 管中进行 PCR 扩增反应。经退火温度优化,确定 ddPCR 的最佳退火温度为 51 $^{\circ}$ C。ddPCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,51 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min,45 个循环;98 $^{\circ}$ C 变性 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 ddPCR 的特异性

分别以 SA 阳性核酸、绿脓杆菌阳性核酸、嗜肺巴斯德杆菌阳性核酸、螺杆菌阳性核酸、沙门氏菌阳性核酸、肺支原体阳性核酸、肺炎克雷伯杆菌阳性核酸为模板,阴性对照组使用去离子水作为模板,设置 3 个平行样本,利用优化好的反应程序和体系,进行 ddPCR 反应,以评估所设计引物和探针的特异性。

1.2.4 ddPCR 检测方法的动力学范围及稳定性

ddPCR 的理论检测范围可涵盖从单拷贝到 12 万 copies 的数量级。在 20 μ L 的反应体系中,微滴生成器能够产生大约 1.2 万~1.6 万个有效的微滴。结果表明,当微滴的数量超过 10 000 个时,反应被认为是有效的。将 SA 阳性核酸稀释,使得加入反应体系中的模板量分别为 50 000、25 000、10 000、2000、400、80、40、20、10、5、2.5、1.25 和 0.625 copies,每种浓度设置 3 个平行样本,利用已优化好的反应程序和反应体系,进行 ddPCR 反应,分析预期值和测量值的相关性,以确定该检测方法的动力学范围。根据 3 个平行间测量值的相对标准偏差评估该方法的稳定性。

1.2.5 ddPCR 的检测极限和定量极限

将 SA 阳性核酸 2 倍梯度稀释至 40、20、10、5、2.5 和 1.25 copies,进行 ddPCR 扩增,每个浓度平行 3 次,确定其检测极限和定量极限。

1.2.6 ddPCR 方法和 qPCR 方法的互换性测试

将 SA 阳性核酸稀释为不同浓度,进行 ddPCR 和 qPCR 反应,分析两种方法测试结果的差异。

(1) SA qPCR 方法的反应体系:qPCR supermix 12.5 μ L,模板 5 μ L,引物 0.5 μ L,探针 0.25 μ L,用水补齐至 25 μ L。qPCR 的扩增程序:95 $^{\circ}$ C,30 s;95 $^{\circ}$ C,5 s;60 $^{\circ}$ C,34 s;45 个循环,72 $^{\circ}$ C,10 s;4 $^{\circ}$ C 保存。

(2)绘制 qPCR 标准曲线:用 ddPCR 定过值的阳性核酸绘制标准曲线。

(3)制备 8 个盲样,分别用 ddPCR 和 qPCR 的方法进行定值。

1.2.7 临床样品的验证实验

对 10 份临床样本,包括动物暂养设施环境擦拭样、暂养设施小鼠粪便、暂养设施小鼠肠道组织和暂养设施小鼠脏垫料接触介质,分别用 ddPCR 和 qPCR 检测。

1.3 统计学分析

利用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。1.2.6 中两组间拷贝值比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 ddPCR 退火温度的优化

在 50 ~ 65 $^{\circ}$ C 之间设置 8 个不同的温度梯度作为退火温度,进行 ddPCR 检测。实验结果显示,在退火温度设定为 51 $^{\circ}$ C 的条件下,观察到的阳性微滴信号荧光强度最明显,并且阳性与阴性微滴之间的荧光信号差异清晰可辨(图 1)。并且“下雨”现象较弱,因此选择 51 $^{\circ}$ C 为最优退火温度。

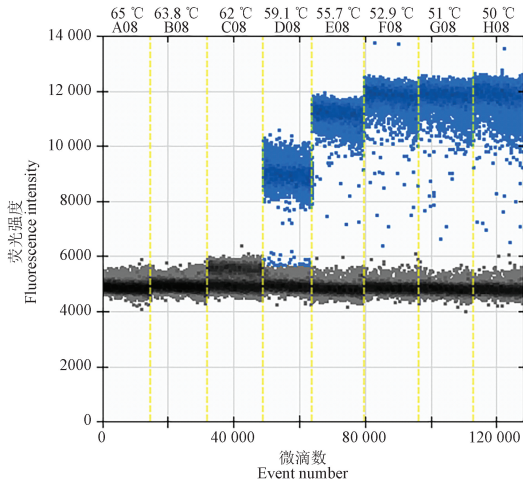


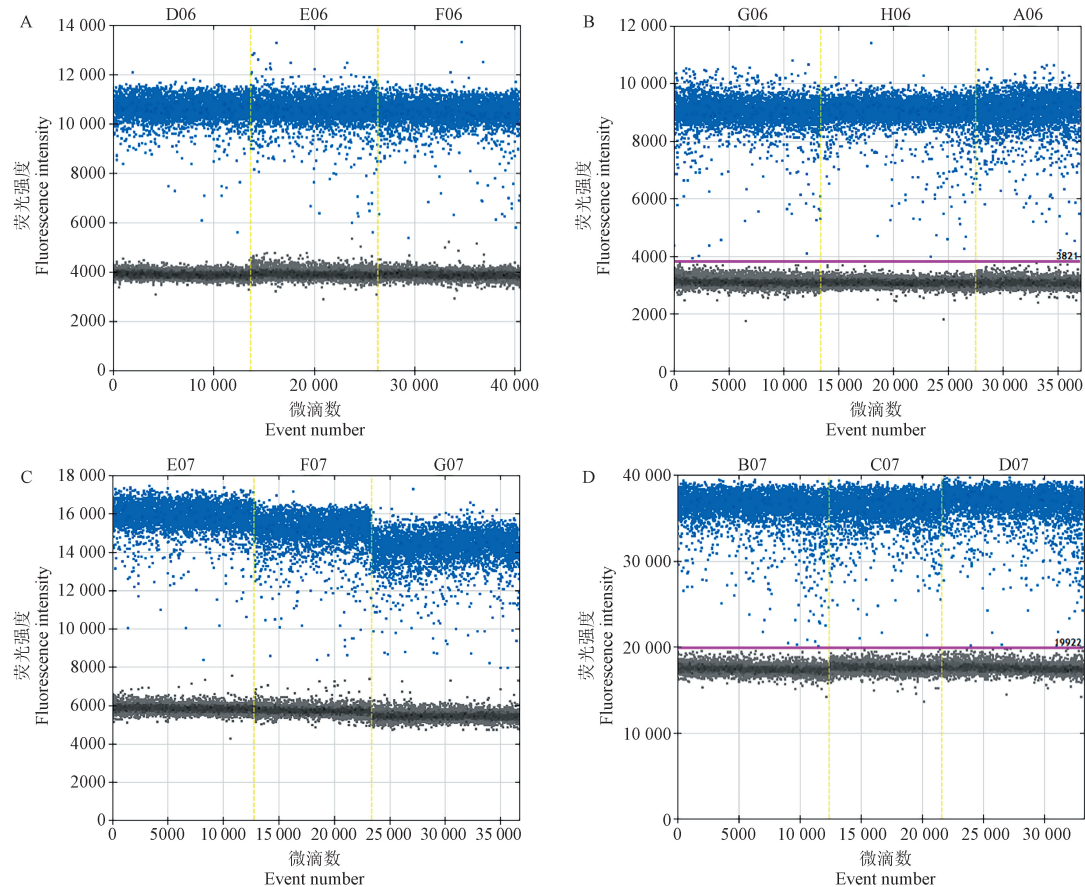
图 1 退火温度优化结果

Figure 1 Optimization results of annealing temperature

2.2 ddPCR 引物和探针浓度的优化

设置 4 组引物和探针浓度,分别是引物浓度 400 nmol/L 和探针浓度 200 nmol/L、引物浓度 700 nmol/L 和探针浓度 150 nmol/L、引物浓度 900 nmol/L 和探针浓度 250 nmol/L、引物浓度 1100 nmol/L 和 800 nmol/L,每种浓度组合设置 3 个平行,进行 ddPCR 反应。实验数据表明,在引

物和探针的浓度配比为 400 nmol/L 和 200 nmol/L 时,能够获得最强的阳性微滴信号,并且阳性微滴与阴性微滴的荧光信号之间呈现出明显的区分度(图 2),并且下雨现象较弱,因此选择引物浓度 400 nmol/L 和探针浓度 200 nmol/L 为最优引物和探针浓度。



注:A:引物浓度 400 nmol/L,探针浓度 200 nmol/L;B:引物浓度 700 nmol/L,探针浓度 150 nmol/L;C:引物浓度 900 nmol/L,探针浓度 250 nmol/L;D:引物浓度 1100 nmol/L,探针浓度 800 nmol/L。

图 2 引物探针浓度优化结果

Note. A. Primer concentration 400 nmol/L, probe concentration 200 nmol/L. B. Primer concentration 700 nmol/L, probe concentration 150 nmol/L. C. Primer concentration 900 nmol/L, probe concentration 250 nmol/L. D. Primer concentration 1100 nmol/L, probe concentration 800 nmol/L.

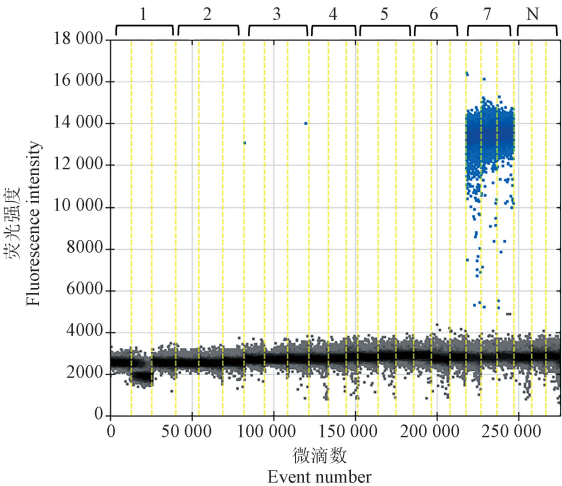
Figure 2 Optimization results of primer and probe concentrations

2.3 ddPCR 特异性检验

以 SA 阳性核酸、沙门氏菌阳性核酸、螺杆菌阳性核酸、绿脓杆菌阳性核酸、肺炎克雷伯杆菌阳性核酸、肺支原体阳性核酸、嗜肺巴斯德杆菌阳性核酸为模板,进行 ddPCR 检测的特异性评估。结果显示,仅 SA 阳性核酸检测结果为阳性,其他样品均为阴性,表明该检测方法具有较高的特异性(图 3)。

2.4 ddPCR 动力学范围

将 SA 阳性核酸的浓度调整为 56 733.33、29 526.67、11 306.67、2 033.33、258.67、82.67、41.33、20.00、8.80、6.13、2.07、1.87、0.80 copies 分别进行 ddPCR。对预期值与测量值的相关性进行分析后发现,当模板量处于 5 ~ 50 000 copies 之间时,ddPCR 所获得的测量值与预期拷



注:1:绿脓杆菌;2:沙门氏菌;3:螺杆菌;4:嗜肺巴斯德杆菌;5:肺炎克雷伯杆菌;6:肺炎支原体;7:金黄色葡萄球菌;N: 阴性对照。

图 3 特异性检测结果

Note. 1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. *Salmonella* spp. 3. *Helicobacter* spp. 4. *Pasteurella pneumotropica*. 5. *Klebsiella pneumoniae*. 6. *Mycoplasma pneumoniae*. 7. *Staphylococcus aureus*. N. Negative control.

Figure 3 Specificity test results

贝数呈现出良好的相关性,其决定系数 R^2 值为 0.9996(图 4)。当测试样品的浓度处于动力学范围内时,定量结果最为准确。因此,在配置 ddPCR 反应体系之前,需将基因组 DNA 稀释至每微升 100 ~ 15 000 copies。之后,加入 2 μ L

DNA 溶液到反应体系中,使初始模板量在 200 ~ 30 000 copies 之间,这样可以有效保证检测结果的稳定性和可靠性。

2.5 ddPCR 的稳定性测试

使用不同浓度的 SA DNA 为模板进行 ddPCR 扩增,统计 3 个平行样本的相对标准偏差。结果表明,在 ddPCR 的动力学范围内,拷贝数降低时相对标准偏差升高,但低于 25%,说明测试样品稳定性良好(表 1)。

2.6 ddPCR 的检测极限和定量极限

将 SA 阳性核酸原液稀释为 40、20、10、5、2.5 和 1.25 copies,进行 ddPCR 扩增,每个浓度平行 3 次。当 SA 阳性核酸浓度低至 2.5 copies 时,依然可以稳定地检测到阳性信号,阳性信号微滴数在 1 ~ 9 之间,而当 SA 阳性核酸浓度低至 1.25 copies 时,均无阳性微滴;推测 ddPCR 的检测极限为 2.5 copies(表 2)。

当 SA 阳性核酸浓度为 10 copies 时,重复反应间测量值的相对标准偏差为 9.82%;当 DNA 浓度低至 5 copies 时,重复反应间测量值的相对标准偏差为 23.32%,推测 ddPCR 的定量极限是 10 copies(表 2)。

2.7 ddPCR 方法和 qPCR 方法的互换性测试

结果见图 5、图 6、表 3。使用经 ddPCR 定量

表 1 ddPCR 检测的稳定性测试

Table 1 Stability test of ddPCR detection

预期值/(copies/ μ L) Expected value/ (copies/ μ L)	重复数 Replicate number	测量值/(copies/ μ L) Measured value/ (copies/ μ L)	平均值/(copies/ μ L) Average/ (copies/ μ L)	标准偏差 Standard deviation	相对标准偏差 Relative standard deviation
50 000	1	55 800	56 733.33	736.36	1.30
	2	56 800			
	3	57 600			
25 000	1	27 520	28 526.67	833.04	2.92
	2	29 560			
	3	28 500			
2000	1	2020	2033.33	33.99	1.67
	2	2000			
	3	2080			
200	1	260	258.67	9.84	3.81
	2	270			
	3	246			
80	1	82	81	0.82	1.01
	2	81			
	3	80			

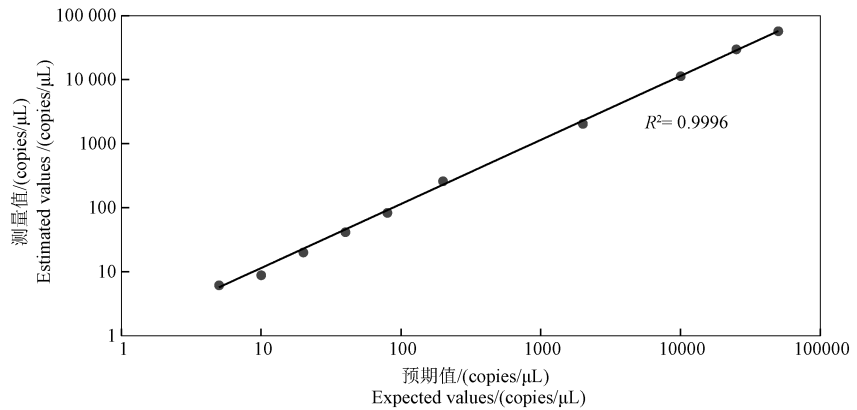


图 4 动力学范围测试

Figure 4 Dynamics range test

表 2 ddPCR 检测极限和定量极限分析

Table 2 Analysis of detection limit and quantification limit of ddPCR

预期值/(copies/μL) Expected value/ (copies/μL)	重复数 Replicate number	测量值/(copies/μL) Measured value/ (copies/μL)	平均值/ (copies/μL) Average/ (copies/μL)	标准偏差 Standard deviation	相对标准偏差 Relative standard deviation
40	1	50.00	46.67	2.50	5.34
	2	44.00			
	3	46.00			
20	1	20.00	20.00	1.63	8.16
	2	18.00			
	3	22.00			
10	1	8.00	8.80	0.86	9.82
	2	8.40			
	3	10.00			
5	1	8.40	6.40	1.49	23.32
	2	6.60			
	3	4.20			
2.5	1	7.00	4.80	2.19	45.77
	2	1.80			
	3	5.60			
1.25	1	—	—	—	—
	2	—			
	3	—			

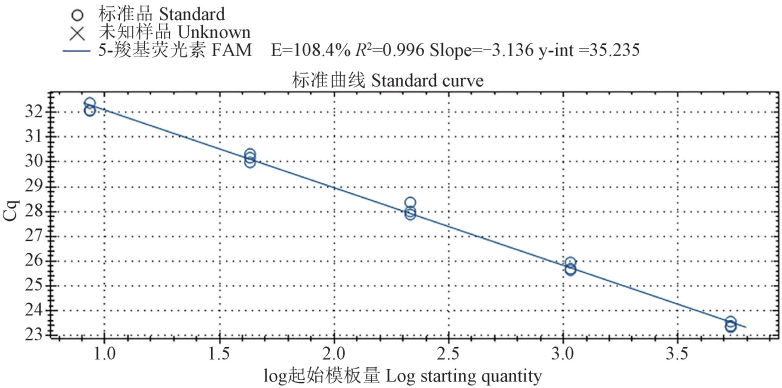


图 5 qPCR 标准曲线

Figure 5 Standard curve of qPCR

的阳性核酸作为标准样品,绘制实时荧光 PCR 标准曲线,得到标准曲线公式: $y = 36.236x - 3.136$ 。初始浓度是 5000 copies/ μL ,进行 5 倍稀

释,共 5 个点。绘制完标准曲线之后,分别用 ddPCR 和 qPCR 方法对 8 个盲样进行检测(图 6)。将两种方法测试盲样所得到的拷贝数进行

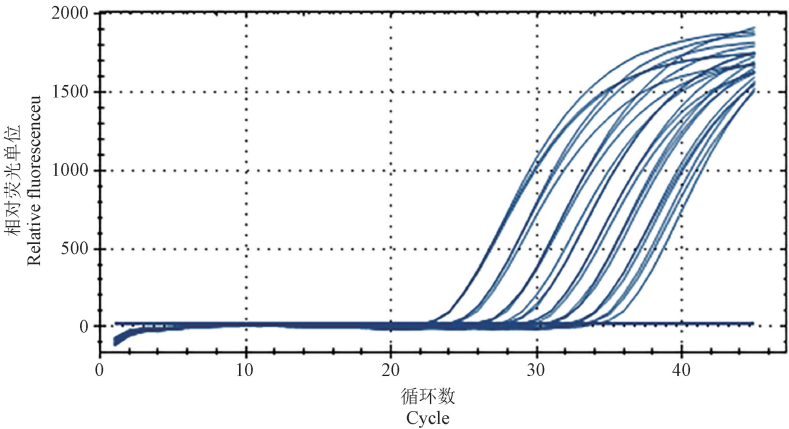


图 6 8 个盲样 qPCR 扩增曲线

Figure 6 Amplification curves of qPCR for 8 blind samples

表 3 ddPCR 和 qPCR 方法检测结果互换性检测

Table 3 Interchangeability detection of ddPCR and qPCR methods

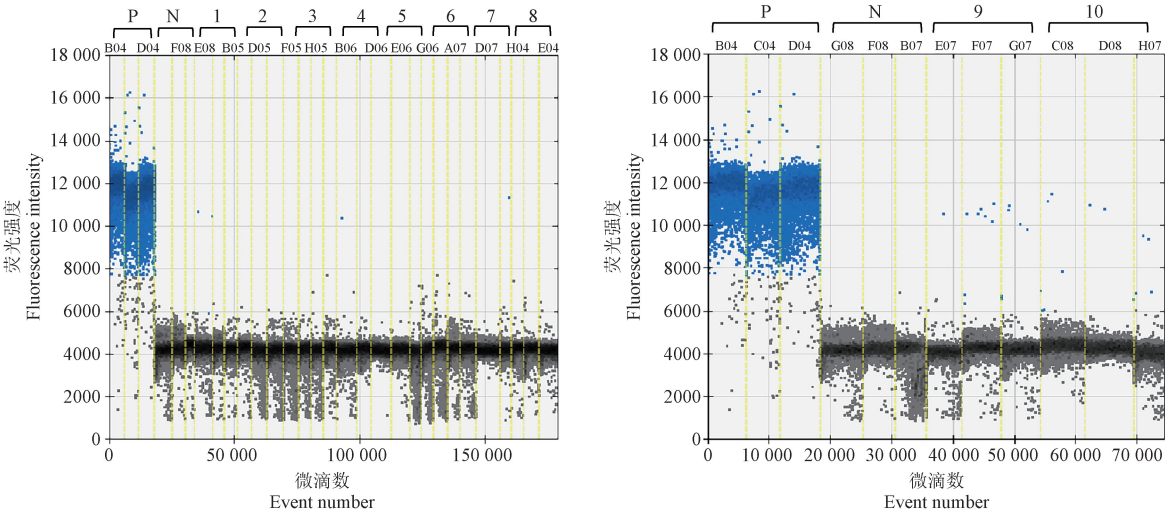
样品 编号 Sample number	组别 Groups								P 值 P value	是否有显 著性差异 Is there a significant difference
	qPCR				ddPCR					
	浓度/ (copies/μL) Concentration/ (copies/μL)	平均值/ (copies/μL) Average/ (copies/μL)	标准差 Standard deviation	相对标 准差 Relative standard deviation	浓度/ (copies/μL) Concentration/ (copies/μL)	平均值/ (copies/μL) Average/ (copies/μL)	标准差 Standard deviation	相对标 准差 Relative standard deviation		
1	12 560.00				13 600				0.177	否 No
	13 131.00	12 260.00	860.21	7.02	13 270	13 293.33	241.43	1.82		
	11 089.00				13 010					
2	2 830.00				3 870				0.197	否 No
	3 326.60	3 319.50	396.80	11.95	3 760	3 763.33	85.76	2.28		
	3 801.89				3 660					
3	407.38				551				0.620	否 No
	524.80	485.66	55.35	11.40	456	511.67	40.47	7.91		
	524.80				528					
4	181.97				248				0.627	否 No
	234.42	232.74	40.79	17.53	265	248.67	13.07	5.26		
	281.84				233					
5	57.54				48				0.480	否 No
	48.98	53.41	3.50	6.55	45	50.00	5.10	10.20		
	53.70				57					
6	20.89				28				0.316	否 No
	29.51	25.17	3.52	13.98	26	28.67	2.49	8.70		
	25.11				32					
7	4.78				7				0.456	否 No
	6.02	5.70	0.66	11.59	2.60	4.57	1.83	39.99		
	6.30				4.10					
8	3.54				6.10				0.857	否 No
	3.98	3.20	0.81	25.38	1.70	2.87	2.32	80.78		
	2.08				0.80					

比较。通过 t 检验分析表明,两种方法所得的检测结果均无显著性差异,说明两种方法得到的检测结果可以有效互换(表 3)。说明设计的引物和探针在 qPCR 和 ddPCR 两个平台可以通用,考虑到大多数检测单位没有配备数字 PCR 仪,该方法在两个平台通用,且实时荧光 PCR 的结果与绝对

定量的 ddPCR 可以互换,进一步扩大了该方法的应用场景。

2.8 临床样本测试

结果见图 7 和图 8。利用本研究建立的方法对 10 份样本,包括动物暂养设施环境擦拭样、暂养设施小鼠粪便、暂养设施小鼠肠道组织和暂养

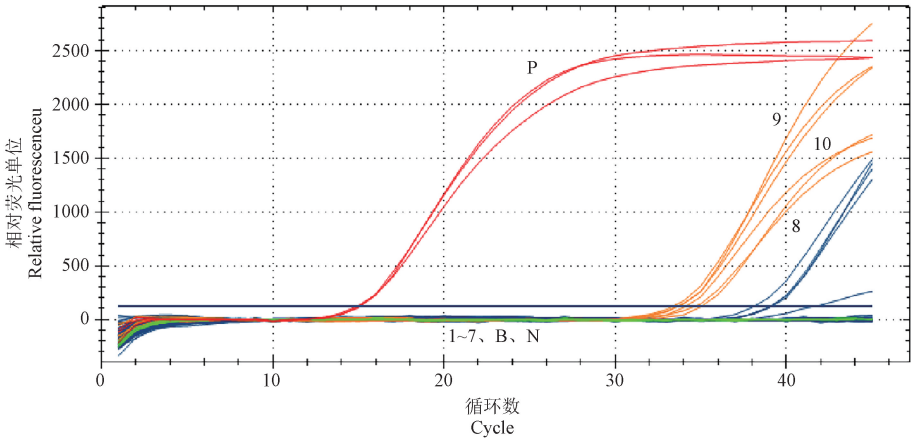


注:A:1 ~ 8 号临床样品;B:9 ~ 10 号临床样品;P:阳性对照;N:阴性对照;1:环境样品 1;2:环境样品 2;3:环境样品 3;4:环境样品 4;5:小鼠粪便 1;6:小鼠粪便 2;7:小鼠肠道 1;8:小鼠肠道 2;9:脏垫料接触介质;10:小鼠肠道 4。

图 7 临床样品 ddPCR 检测结果

Note. A. Clinical samples No. 1 to No. 8. B. Clinical samples No. 9 to No. 10. P. Positive control. N. Negative control. 1. Environmental sample 1. 2. Environmental sample 2. 3. Environmental sample 3. 4. Environmental sample 4. 5. Mouse feces 1. 6. Mouse feces 2. 7. Mouse intestine 1. 8. Mouse intestine 2. 9. Contaminated bedding contact medium. 10. Mouse intestine 4.

Figure 7 Clinical sample ddPCR detection results



注:1:环境样品 1;2:环境样品 2;3:环境样品 3;4:环境样品 4;5:小鼠粪便 1;6:小鼠粪便 2;7:小鼠肠道 1;8:小鼠肠道 2;9:脏垫料接触介质;10:小鼠肠道 4;B:空白对照;N:阴性对照;P:阳性对照。

图 8 临床样品 qPCR 检测结果

Note. 1. Environmental sample 1. 2. Environmental sample 2. 3. Environmental sample 3. 4. Environmental sample 4. 5. Mouse feces 1. 6. Mouse feces 2. 7. Mouse intestine 1. 8. Mouse intestine 2. 9. Soiled bedding contact medium. 10. Mouse intestine 4. B. Blank control. N. Negative control. P. Positive control.

Figure 8 Clinical sample qPCR detection results

设施小鼠脏垫料接触介质,分别进行 ddPCR(图 7)和 qPCR(图 8),同时设置空白对照、阴性对照和阳性对照。结果显示两种方法检测结果一致,仅 1 份接触脏垫料(样品 9)和 1 份小鼠肠道组织样品(样品 10)为阳性,其余样品为阴性。ddPCR 可对弱阳性样品进行精确的定量。

3 讨论

SA 是一种人畜共患的条件性病原菌,既影响实验动物的质量,也会对从业人员的健康构成威胁^[3-5]。因此,建立一种准确、灵敏、快速的检测方法,对控制屏障环境中 SA 的传播至关重要。目前,检测 SA 的常用方法有细菌分离培养法^[10-11];分子生物学方法,包括 PCR 法、qPCR 方法、核酸等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等^[12-14];免疫学方法,包括乳胶凝集法、酶联免疫吸附法、化学发光酶联免疫检测法等^[15]。常规培养鉴定法成本较低、容易操作,但是这种方法需要的时间长,不能适应快速检测的需要^[16]。PCR 方法检验结果准确,可以将大大缩短实验时间,但容易出现外源 DNA 的污染、只能定性分析、存在非特异性扩增等;常规的 LAMP 检测方法虽然特异性强、敏感性高,操作简便快速,但分析过程容易产生交叉污染且只能得到定性结果^[17]。qPCR 方法灵敏度高、不易造成污染,可以实现相对定量分析,但仍需依赖标准曲线来实现。ddPCR 技术是通过“有限稀释”原理,使得每个反应单元独立扩增,再经“泊松分布”理论模型统计分析,计算样品中目标基因的拷贝数,不依赖标准曲线就可以完成目标分子的绝对定量^[8,18]。

编码 SA 的细胞外耐热核酸酶(*thermonuclease*, TNase)的 *nuc* 基因^[19-21],具有较强的保守性和特异性,常被用作诊断和检测 SA 的分子靶标^[22-23]。本研究以 *nuc* 基因为靶基因,成功建立了针对实验动物中 SA 的 ddPCR 检测方法,并通过优化引物和探针浓度及退火温度,提升了 ddPCR 的扩增效率,并实现了阳性微滴和阴性微滴的明显区分,从而减弱了“下雨现象”。经过优化,引物浓度确定为 400 nmol/L,探针浓度为 200 nmol/L,最佳退火温度为 51℃。该方法检测极限为 2.5 copies/μL,定量极限为 10 copies/μL,

灵敏度高,可检测低载量样本。此外该方法专一性检测出 SA,具有较高的特异性。本方法设计的引物和探针也可以用于 SA 的 qPCR 检测,通过对不同浓度 SA 阳性样本进行 ddPCR 和 qPCR 检测,*t* 检验分析结果表明两种方法所得样本拷贝数均无明显差异。对采集的 10 份临床样本,包括小鼠组织样本、小鼠粪便样本和环境样本,分别进行 qPCR 和 ddPCR 检测,结果显示 2 种检测方法所得的检测结果均一致。qPCR 方法只能实现相对定量,必须依赖标准曲线才能进行定量分析;ddPCR 是不依赖于标准曲线的绝对定量检测方法,可以适用于对低浓度样品的精准定量。

总之,本研究建立的实验动物中 SA ddPCR 方法特异性强、重复性好、检测灵敏度高,为实验动物中 SA 的快速检测提供了一种高效且精确的检测手段。该方法的应用将显著助力于实验动物中 SA 感染的早期诊断以及及时控制,从而提高实验结果的可靠性和动物福利。未来的研究应进一步验证其在不同样本中的应用效果,并探索其在其他领域样品检测中的潜在应用。

参 考 文 献(References)

- [1] 于灵芝,谢建芸,冯丽萍,等.金黄色葡萄球菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其在大鼠、小鼠粪便检测中的应用[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(5): 566-573. YU L Z, XIE J Y, FENG L P, et al. Establishment of fluorescence qPCR method for detection of *Staphylococcus aureus* and its application in feces detection of rats and mice [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(5): 566-573.
- [2] AHMAD-MANSOUR N, LOUBET P, POUGET C, et al. *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments [J]. Toxins (Basel), 2021, 13(10): 677.
- [3] BRUCE S A, SMITH J T, MYDOSH J L, et al. Shared antibiotic resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* from diverse animal hosts [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 4413.
- [4] 王璇,王娉,葛毅强,等.食品中金黄色葡萄球菌致病性研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(6): 553-558. WANG X, WANG P, GE Y Q, et al. Review on pathogenicity of *Staphylococcus aureus* in food [J]. Chin J Zoonoses, 2017, 33(6): 553-558.
- [5] TUON F F, SUSS P H, TELLES J P, et al. Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. Antibiotics, 2023, 12(1): 87.
- [6] 吴运谱,张泽辉,崔子寅,等.金黄色葡萄球菌对实验动

- 物的感染及其分子分型方法比较 [J]. 实验动物科学, 2024, 41(3): 85–89.
- WU Y P, ZHANG Z H, CUI Z Y, et al. Comparison on molecular typing technologies and the infection condition of *Staphylococcus aureus* in laboratory animals [J]. Lab Anim Sci, 2024, 41(3): 85–89.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物微生物学检测方法: GB/T 14926–2001 [S]. 2022.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine; Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animals microbiological examination methods: GB/T 14926–2001 [S]. 2022.
- [8] HINDSON B J, NESS K D, MASQUELIER D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. Anal Chem, 2011, 83(22): 8604–8610.
- [9] 冯杰, 聂洪波, 曹乾大, 等. 微滴式数字 PCR 技术在动物疫病检测中的应用研究进展 [J]. 中国动物检疫, 2024, 41(4): 58–63, 90.
- FENG J, NIE H B, CAO Q D, et al. Research progress in the application of droplet-based digital PCR assay to animal disease detection [J]. Chin Anim Health Insp, 2024, 41(4): 58–63, 90.
- [10] 姚继英, 董文凤, 杨玮, 等. 实验动物金黄色葡萄球菌 PCR 检测方法的建立和应用 [J]. 实验技术与管理, 2023, 40(11): 91–96.
- YAO J Y, DONG W F, YANG W, et al. Establishment and application of PCR detection method for *Staphylococcus aureus* in laboratory animals [J]. Exp Technol Manag, 2023, 40(11): 91–96.
- [11] PINHEIRO L B, COLEMAN V A, HINDSON C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Anal Chem, 2012, 84(2): 1003–1011.
- [12] 高正琴, 邢华, 李厚达. PCR 技术在鼠金黄色葡萄球菌检测中的初步研究 [J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(8): 5–7.
- GAO Z Q, XING H, LI H D. The pilot study of polymerase chain reaction for detecting *Staphylococcus aureus* in rats and mice [J]. Anim Husb Vet Med, 2002, 34(8): 5–7.
- [13] 王鹏飞. 实验动物金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎支原体多重 PCR 检测方法的建立与初步应用 [D]. 石家庄: 河北医科大学; 2016.
- WANG P F. The establishment and preliminary applications of multiple PCR for detecting *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory animals [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University; 2016.
- [14] 陆文俊. 金黄色葡萄球菌特异性靶点的筛选与 PCR 快速检测方法的建立 [D]. 南京: 南京农业大学; 2017.
- LU W J. The screening of specific target for *Staphylococcus aureus* and establishment of rapid PCR detection method [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University; 2017.
- [15] TUCKER P W, HAZEN E E Jr, COTTON F A. Staphylococcal nuclease reviewed: a prototypic study in contemporary enzymology [J]. Mol Cell Biochem, 1978, 22(2/3): 67–77.
- [16] DE BUYSER M L, AUDINET N, DELBART M O, et al. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk [J]. Food Microbiol, 1998, 15(3): 339–346.
- [17] 刘培海, 白庆华, 王凯, 等. 环介导等温扩增技术及扩增产物分析方法的比较 [J]. 食品研究与开发, 2024, 45(11): 209–218.
- LIU P H, BAI Q H, WANG K, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and its amplification products detection methods [J]. Food Res Dev, 2024, 45(11): 209–218.
- [18] TAYLOR S C, LAPERRIERE G, GERMAIN H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2409.
- [19] BRAKSTAD O G, MAELAND J A. Generation and characterization of monoclonal antibodies against *Staphylococcus aureus* thermonuclease [J]. APMIS, 1989, 97(2): 166–174.
- [20] IBRAHEIM HK, FAYEZ RA, JASIM AS, GHARBAN HAJ. Role of nuc gene in *Staphylococcus aureus* to phagocytic activity in different cattle infections [J]. Open Vet J, 2023, 13(8): 1021–1026.
- [21] BRAKSTAD O G, AASBAKK K, MAELAND J A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(7): 1654–1660.
- [22] CHESNEAU O, ALLIGNET J, EL SOLH N. Thermonuclease gene as a target nucleotide sequence for specific recognition of *Staphylococcus aureus* [J]. Mol Cell Probes, 1993, 7(4): 301–310.
- [23] 王纯, 张若鸿, 王晓芳, 等. 乳制品中金黄色葡萄球菌 PCR 快速检测方法的建立 [J]. 核农学报, 2022, 36(6): 1193–1203.
- WANG C, ZHANG R H, WANG X F, et al. Development of PCR rapid detection method for *Staphylococcus aureus* in dairy products [J]. J Nucl Agric Sci, 2022, 36(6): 1193–1203.