

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master Thesis

利用熱休克蛋白基因序列開發主要葡萄球菌 PCR 及晶片檢測法

指導教授: 盧錫祺 博士

Advisor: Lu, Hsi-Chi, Ph. D.

共同指導教授: 蔣育錚 博士

Co-Adviser: Chiang, Yu-Cheng, Ph. D.

Development of heat shock protein gene based primers and biochips for the
detection of major *staphylococcus spp.*

研究生: 李勝智

Graduate Student: Li, Sheng-chih

中華民國一百年六月

June, 2011

目錄

中文摘要.....	7
ABSTRACT.....	8
壹、文獻整理.....	9
一、葡萄球菌屬及重要菌種介紹.....	9
二、熱休克蛋白.....	12
三、傳統金黃色葡萄球菌的檢測方法(CNS 方法；CHINESE NATIONAL STANDARD).....	13
四、分子生物檢測方法.....	13
五、生物晶片檢測方法.....	14
六、研究目的.....	14
貳、材料與方法.....	15
一、實驗材料.....	15
二、實驗方法.....	18
A.PCR 引子組.....	18
1.PCR 引子組設計.....	18
2.DNA 萃取.....	18
3.PCR 引子組特異性檢測.....	19

4.PCR 純水中靈敏度檢測	19
5.牛乳 PCR 靈敏度測試	19
B.晶物晶片	20
1.寡核苷酸探針之設計	20
2.DNA 製備	20
3.PCR 聚合酶連鎖反應 (DNA AMPLIFICATION)	20
4.雜合試驗 (HYBRIDIZATION)	21
5.呈色反應.....	21
6.晶片在純水樣品中靈敏度測試.....	21
7.晶片在牛乳樣品中靈敏度測試.....	22
8.晶片在尿液樣品中靈敏度測試.....	22
9.晶片在血液樣品中靈敏度測試.....	22
10.血液樣品經簡單增菌培養後靈敏度測試.....	22
參、結果討論.....	23
一、PCR 專一性	23
二、PCR 靈敏度	24
三、共通性引子組專一性及靈敏度結果.....	25

四、晶片條件最佳化討論.....	26
五、晶片應用於各檢體結果.....	27
肆、結論.....	28
伍、圖表.....	29
陸、參考文獻.....	70



表次

表一、文獻發表用於確認菌株之 PCR 引子組	29
表二、本研究設計之 PCR 引子組。	30
表三、本研究所使用之標準菌株	31
表四、本研究所測試非目標菌株	32
表五、PCR 引子組檢測結果	33
表六、葡萄球菌引子組靈敏度測試結果	40
表七、本實驗所使用之探針	60
表八、Staphylococci 晶片探針規格	63
表九、共通性引子組及晶片靈敏度結果	65



圖次

圖一、針對 <i>S. carnosus</i> 設計之 PCR 引子組，對目標菌株與非目標菌之 PCR 專一性檢測結果。.....	34
圖二、針對 <i>S. hyicus</i> 設計之 PCR 引子組，對目標菌株與非目標菌之 PCR 專一性檢測結果。.....	35
圖三、針對 <i>S. intermedius</i> 引設計之 PCR 引子組，對目標菌株與非目標菌之 PCR 專一性檢測結果。.....	36
圖四、針對 <i>S. xylosus</i> 引設計之 PCR 引子組，對目標菌株與非目標菌之 PCR 專一性檢測結果。.....	37
圖五、 <i>S. intermedius</i> 、 <i>S. pseudintermedius</i> 序列比對結果。.....	38
圖六、不同引子組鑑定 <i>S. xylosus</i> 結果。.....	39
圖七、 <i>S. carnosus</i> 於純水中靈敏度測試結果.....	41
圖八、 <i>S. hyicus</i> 於純水中靈敏度測試結果.....	42
圖九、 <i>S. intermedius</i> 於純水中靈敏度測試結果.....	43
圖十、 <i>S. xylosus</i> BCRC15442 靈敏度測試結果.....	44
圖十一、 <i>S. carnosus</i> 於牛乳中靈敏度測試結果.....	45
圖十二、 <i>S. hyicus</i> 於牛乳中靈敏度測試結果.....	46
圖十三、 <i>S. intermedius</i> 於牛乳中靈敏度測試結果.....	47
圖十四、 <i>S. xylosus</i> 於牛乳中靈敏度測試結果.....	48
圖十五、牛乳靈敏度經過 TSB 增菌培養檢測結果。.....	49
圖十六、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 檢測結果.....	50
圖十七、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 牛乳靈敏度檢測結果.....	51
圖十八、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 牛乳靈敏度檢測結果.....	52
圖十九、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 牛乳靈敏度檢測結果.....	53
圖二十、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 尿液靈敏度檢測結果.....	54
圖二十一、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 尿液靈敏度檢測結果。.....	55
圖二十二、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 尿液靈敏度檢測結果。.....	56
圖二十三、為 Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 血液靈敏度檢測結果。.....	57
圖二十四、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 血液靈敏度檢測結果.....	58

圖二十五、Universal primer 針對 <i>Staphylococci</i> 血液靈敏度檢測結果。	59
圖二十六、探針共通性引子組示意圖	61
圖二十七 <i>Staphylococci</i> 晶片於 45°C 檢測結果。	64
圖二十八、牛乳晶片靈敏度於 45°C 檢測結果。	66
圖二十九、尿液晶片於 45°C 檢測結果	67
圖三十、血液晶片靈敏度於 45°C 檢測結果。	68
圖三十一、血液檢體經過增菌培養後於晶片 45°C 雜交結果。	69



中文摘要

葡萄球菌屬是非常重要的病原菌，可由哺乳動物表皮、呼吸道系統以及環境中分離出。部分葡萄球菌也常用在發酵香腸的製程中，因此檢測在食品安全、感染控制以及動物防疫均具有相當的重要性。若干研究利用熱休克蛋白之基因序列來鑑定葡萄球菌，其序列具有高度的保守性，在種間變異則比 16S rRNA 來高，但仍然無法區分部分的葡萄球菌種。有研究發現 *groEL*、*groES* 中間具有的非蛋白質編碼區具有更大的差異性，可以做為葡萄球菌鑑定之用。因此本研究利用此基因序列設計葡萄球菌 PCR 引子組並進行特異性及靈敏度檢測，如具有專一性再修改為探針使用。另外本研究群先前亦利用 *groEL* 及 *groES* 設計葡萄球菌屬共通性引子組，可同時進行 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. saprophyticus*、*S. carnosus*、*S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xylophilus* 八株菌種 PCR 共同擴增。利用此 PCR 產物與上述探針進行晶片核酸雜交反應條件最佳化調整，並進行牛乳、尿液、血液模擬環境相關檢測試驗。結果顯示引子組除了目標菌株有 PCR 產物之生成，其他非目標菌株皆不會產生偽陽性結果，PCR 引子組靈敏度於純水中為 $N \times 10^3$ cfu/ml，於牛乳中靈敏度約為 $N \times 10^4 \sim N \times 10^5$ cfu/ml，而在經過 TSB 培養基 8~12 小時 37°C 培養後則可達 $N \times 10^0$ cfu/ml。共通性引子組靈敏度約在牛乳約 $N \times 10^4 \sim N \times 10^5$ cfu/ml、尿液約為 $N \times 10^3 \sim N \times 10^5$ cfu/ml、血液為 $N \times 10^5 \sim N \times 10^6$ cfu/ml。晶片檢測結果牛乳及尿液靈敏度都可達到 $N \times 10^2$ cfu/ml，血液靈敏度為 $N \times 10^4 \sim N \times 10^6$ cfu/ml。結果除 *S. carnosus* 及 *S. xylophilus* 會有部分干擾，其他皆能呈現正確結果。在許多文獻使用多重 PCR 的方法檢測來共同擴增，在晶片檢測上也必須用多點探針確定，若有干擾更容易影響判讀結果，本研究使用單一引子組進行共同擴增，菌種僅用單一探針確定，即可同時偵測八種菌種，可以減少引子組及探針間互相干擾以及節省合成成本，本研究建立之葡萄球菌檢測方法，可望用於牛乳、尿液、血液快速檢測，以提供食品業者、醫院及相關單位檢測使用。

關鍵字:葡萄球菌屬、生物晶片、熱休克蛋白

Abstract

Staphylococcus spp. are important pathogens, and are frequently isolated from mammalian skin, respiratory system and environment. *Staphylococcus spp.* also be used in fermented sausages. Therefore, detection and identification of *staphylococci* have great value for food safety, infection control and animal epidemic prevention. Previous researchers detect *Staphylococcus spp.* by the gene sequences of heat shock proteins, taking the advantages of their high degree of conservancy. However, only limited *Staphylococcus* species can be discriminated by this sequence. Previous researchers found that the non-coding sequences intergenic between *groEL* and *groES*, of *Staphylococci* intergenic region (IGR) are more divergent and are more suitable identifying *Staphylococcus specie*. In this study, we designed a universal primer pair and individual *staphylococcal* PCR primers to amplify the IGRs of *Staphylococcus spp.* The universal primers can coamplify sequences form *S. aureus* · *S. epidermidis* · *S. haemolyticus* · *S. saprophyticus* · *S. carnosus* · *S. hyicus* · *S. intermedius* · *S. xylosus*. To emulate detections of environmental *staphylococci*, we tested the primers sensitivity and specificity of primers in milk, urine, blood samples. The bio-chip probes were modified from the specific primers in this study and the best analytical conditions were verified by their detection sensitivity and specificity in milk, urine, and blood. The results showed the specificity of PCR primers. All target strains generated correct PCR products, all other non-target strains did not produce false positive results. the sensitivity of PCR primers in the water is $N \times 10^3$ cfu / ml, in milk sensitivity is $N \times 10^4 \sim N \times 10^5$ cfu/mL for milk and waters, up to $N \times 10^0$ cfu/mL in milk after enrichment. For universal primers, the sensitivity was about $N \times 10^4 \sim N \times 10^5$ cfu/mL in milk, $N \times 10^3 \sim N \times 10^5$ cfu/mL in urine and $N \times 10^5 \sim N \times 10^6$ cfu/ml in blood. When tested in Chips, milk and urine was $N \times 10^2$ cfu/mL and was $N \times 10^4 \sim N \times 10^6$ cfu/mL the blood. While the probe signals were somewhat ambiguous in *S. carnosus* and *S. xylosus*, others show the correct results. In traditional multiplex PCR and multi-point probe design, the data were generally difficult to be interpret once, this study, by using a single primer to amplified and single probe to determined one species, we can detect the eight *staphylococcal* strains in the same time, which may avoid the interference and save cost, this strategy could be used quick test of milk, urine, blood and may be applied in industry, hospitals and related organizations.

Keywords: *Staphylococcus spp.*, Biochips, heat shock protein

壹、文獻整理

一、葡萄球菌屬及重要菌種介紹

葡萄球菌屬為革蘭氏陽性球菌、微球菌科，不會產生孢子，為兼性厭氧菌，可以單一菌體存在，但通常聚集成串，因此得名。常存於哺乳動物體表、上呼吸道及黏膜系統，與人類及哺乳動物的關係非常密切，是人類主要的病原菌。目前世界已知的葡萄球菌種類超過 40 種，其中 13 種可在人類身上發現 (表 1-1) (王聖予 *et al.* 2002)。然而葡萄球菌會造成人類的食品中毒、敗血症等。葡萄球菌能從絕大多數的溫血動物身上分離出，在人類身上主要以 *S. aureus* 以及 *S. epidermidis* 為主，而在其他動物身上葡萄球菌分布比例不同，例如鴿子、狗、馬、水貂身上可以分離出大量的 *S. intermedius* (HAJEK 1976)。葡萄球菌為伺機性病原菌，大多數的葡萄球菌並不會造成疾病，但是當宿主抵抗力較差時，就可能侵入造成各種疾病，除了常見會引起院內感染的 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*S. saprophyticus*、*S. haemolyticus* 及 *S. intermedius*，最近亦有許多關於 *S. xylosum* 造成新生兒菌血症的例子 (Cunha Mde *et al.* 2002)。葡萄球菌也會造成動物染上疾病，如金黃色葡萄球菌引起牛、羊的乳腺炎、*S. hyicus* 引起豬、狗的滲出性皮膚炎等等。由此可見葡萄球菌影響的範圍不只是人類的疾病，更會影響到酪農業、畜牧業的經濟發展。葡萄球菌也用於乾式香腸的發酵，可以提供香腸特殊風味，因此葡萄球菌對於食品加工業以及酪農業都有相當的重要性。主要會感染人畜的葡萄球菌主要有，*Staphylococcus aureus*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. hyicus*、*S. saprophyticus*、*S. intermedius*、*S. carnosus*、*S. xylosum* 主要用於發酵的葡萄球菌，以下針對上述八種葡萄球菌作相關文獻的介紹。

1. *Staphylococcus aureus* (金黃色葡萄球菌)

S. aureus，在有氧環境下生長會產生類 β 胡蘿蔔素使菌落呈現黃色，因此中文被命名為金黃色葡萄球菌，為食品中毒常見的病原菌之一。在美國及台灣高居食品中毒案件數第二名。因為 *S. aureus* 會產生腸毒素，當吃入被 *S. aureus* 污染之食品會造成食品中毒 (staphylococcal enterotoxins, SEs)，其中熱穩定型腸毒素(SEA、SEB、SEC、SED、SEE)，在數小時的加熱烹煮下，依然具有毒性。潛伏期為 3~4 小時，其症狀為噁心、嘔吐、發冷、發汗、脈搏微弱、腹部痙攣、絞痛、腹瀉、脫水，嚴重者會導致昏迷甚至是死亡(蔣育錚 2005)。

金黃色葡萄球菌常存在溫血動物體表及上呼吸道中，為人體正常菌相之一，一般健康者不會患病，但是宿主抵抗力較差時，容易侵入宿主體內而使宿主發病。金黃色葡萄球菌可引發多種疾病，如食品中毒、蜂窩性組織炎、骨髓炎、乳腺炎、菌血症等。其中菌血症若不以抗生素治療，病患死亡率可高達百分之八十以上。因此大量使用的抗生素，造成今日金黃色葡萄球菌對於多種抗生素都具有抗藥性。根據統計顯示，多重抗藥性的金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)案件，自 1999 年到 2005 年案例增加了 62% (Klein *et al.* 2007)。

S. aureus 常存於大部分溫血動物體表，例如人類、牛、羊等，也是造成乳腺炎的菌種之一，感染乳腺炎的牛、羊會造成泌乳量下降、乳品變質，因此造成酪農業相當大的經濟損失(Sears and McCarthy 2003)。據統計美國每頭牛因為乳腺炎所造成的經濟損失 184 美金 (Lee *et al.* 2008)。

2. *Staphylococcus carnosus* (肉葡萄球菌)

葡萄球菌屬長久以來用於肉製品發酵(Neubauer and Gotz 1996)，早期這些葡萄球菌被歸類為微球菌屬，後來才重新被分類到葡萄球菌屬。其中根據 DNA/DNA 核酸雜交結果、生化特性以及細胞壁成分組成不同從發酵肉製品中分離出新的菌種-*S. carnosus* (Rosenstein *et al.* 2009)。

使用 *S. carnosus* 發酵有以下幾個好處，首先可以抑制其他食品腐敗菌及食品中毒病原菌的生長。其次，可以幫助硝酸鹽還原成亞硝酸鹽，亞硝酸鹽可以與肉製品的肌紅蛋白結合使肉製品保持鮮紅色，使產品外觀優良，再者可以適當的降低 pH 值、提供風味，以及減少過氧化氫的生成(Neubauer and Gotz 1996; Neubauer *et al.* 1999)。

3. *Staphylococcus epidermidis* (表皮葡萄球菌)

S. epidermidis 為凝固酶陰性葡萄球菌(coagulase-negative staphylococci, CoNS)，屬人體皮膚及黏膜正常菌相，但能感染免疫力較差的個體，因此 *S. aureus* 與 *S. epidermidis* 被認為是健康保健最重要的菌株(Schoenfelder *et al.* 2010)。 *S. epidermidis* 會造成皮膚感染、腹膜炎、菌血症等症狀(Modun *et al.* 1998; Ben-Ami *et al.* 2003)，而造成菌血症的主要原因主要是靜脈導管輸血(Carretto *et al.* 2005; Shittu *et al.* 2004)，為院內感染菌血

症主要病原菌之一(Elouennass *et al.* 2008)。根據調查，表皮葡萄球菌除了對 2, 6-二甲氧基苯青黴素(Methicillin)及其他抗生素均具有抗性。

4. *Staphylococcus haemolyticus* (溶血葡萄球菌)

S. haemolyticus 為凝固酶陰性葡萄球菌，在醫院內常會導致腦膜炎、皮膚或組織感染、人工關節感染、菌血症(Shittu *et al.* 2004)。溶血性葡萄球菌對於 2-6 甲氧基苯青黴素(methicillin)及葡萄肽類等抗生物素都具有抗藥性(Campanile *et al.* 2008)，並且普遍存在於醫院環境及醫護人員手上(Schuenck *et al.* 2008)。

5. *Staphylococcus hyicus* (蜂巢葡萄球菌/豬葡萄球菌)

S. hyicus 是造成豬感染滲出性表皮炎的主要病原菌屬，受感染的病體有滲出液及消瘦等臨床症狀(Futagawa-Saito *et al.* 2007)，可在滲出液中分離出大量的 *S. hyicus*。長久以來抗生素是最有效的治療方法，也因此 *S. hyicus* 常具有相當高的抗生素抗性，造成後期用藥上的困難(Wegener *et al.* 1994; Futagawa-Saito *et al.* 2009)。*S. hyicus* 具有脫皮毒素(exfoliative toxins)基因，與 *S. aureus* 脫皮毒素基因類似(Ahrens and Andresen 2004)，接觸病豬可能會造成人類皮膚的感染。

6. *Staphylococcus intermedius* (中間型葡萄球菌)

S. intermedius，為凝固酶陽性菌，因此早期被歸類在 *S. aureus* 中，後來經過其他分子生物及生化鑑定的方法後被獨立分離出來，為動物身上最主要的葡萄球菌，可由犬、貓、牛、馬以及病人身上分離出，是造成犬類皮膚炎感染主要的原因 (Talan *et al.* 1989)，後來利用多位點序列分析法 (multilocus sequencing approach)把 *S. intermedius* 再區分成 *S. intermedius*、*S. pseudintermedius*、*S. delphini* 三大類。*Staphylococcus intermedius* 是人畜共通病原菌，除了會造成犬科皮膚炎外，也能染感人類造成皮膚膿腫 (Kelesidis and Tsiodras 2010)。

7. *Staphylococcus saprophyticus* (腐生葡萄球菌)

S. saprophyticus 是造成年輕婦女感染泌尿道炎最頻繁的菌種 (Kuroda *et al.* 2005)。*S. saprophyticus* 平時此聚集在泌尿道，感染後婦女出現排尿疼痛，尿中有膿及細菌等症狀。雖然其他葡萄球菌種類並沒有像 *S. aureus* 具致命性，但針對醫院移植病患可能扮演重要的

角色。*S. saprophyticus* 造成泌尿道炎僅次於 *Escherichia coli*(Raz *et al.* 2005)。在常見細菌系泌尿道炎感染中 *S. saprophyticus* 排名第二 (Urinary tract infection, UTI) (Martineau *et al.* 2000)。

8. *Staphylococcus xylosum* (木糖葡萄球菌)

S. xylosum 是共生在人類和動物的皮膚上，是一種普遍存在自然的細菌。常當作肉製品的初次發酵劑，但是部分菌株可能潛在危害性 (Dordet-Frisoni *et al.* 2007)。葡萄球菌為一種伺機性病原菌，一般在牛、羊等溫血動物體表或其乳汁中常發現葡萄球菌屬的存在，1986年 Rather 等學者研究牛乳發現有 *S. aureus*、*S. simulans*、*S. xylosum*、*S. epidermidis*、*S. saprophyticus*、*S. hyicus*、*S. cohnii*、*S. haemolyticus* and *S. warneri* 等菌株存在，並且具有抗生素抗性 (Rather *et al.* 1986)。1987年 Bautista 等學者研究發現綿羊乳可分離出具有腸毒素的 *S. aureus*、*S. xylosum*、*S. epidermidis*、*S. cohnii*、*S. haemolyticus* 菌株 (Bautista *et al.* 1988)。而這些菌株能產腸毒素，若後續處理不當則更容易造成食品中毒等潛在問題。凝固酶陰性葡萄球菌也常造成人類感染，例如 2002年 Cunha Mde 等人就在新生嬰兒的臨床檢體中分離到 *S. xylosum* (Cunha Mde *et al.* 2002)。

二、熱休克蛋白

熱休克蛋白質(heat shock proteins, HSPs)是經由熱所誘發產生的蛋白質，是生物在面對高於生長溫度時所誘發釋出的保護性蛋白 (Pirkkala *et al.* 2001)。熱休克蛋白廣泛存在於生物中，除了熱休克處理，許多環境的刺激，例如病原的感染、各種藥物或賀爾蒙、缺氧及葡萄糖的缺乏等也會誘導熱休克蛋白大量生成，顯示釋放熱休克蛋白是細胞因應不良環境時的重要措施。依功能可分三大類分別為結構性熱休克蛋白、誘發性熱休克蛋白及熱休克蛋白類似物；起先依照分子量大小主要可分為四個家族 (Burel *et al.* 1992)，而後來許多研究也發現其他分子量更小的熱休克蛋白，統整起來共有六類，分別為 *hsp100*、*hsp90*、*hsp70*、*hsp60*、*hsp40*、*hsp10* (Li and Srivastava 2004)。其中 *hsp60* 又被稱為 *groEL* 而 *hsp10* 被稱為 *groES*。

熱休克蛋白是生物演化上具相當保守性的蛋白質，例如大腸桿菌與人的 *hsp60* 有 50% 以上的基因相似性，其廣泛分布於原核及真核細胞中，為細胞維持生存所必須，平常就有高度且穩定的表現量。這是因為熱休克蛋白具有 Chaperone 的特性，能夠幫助蛋白質正確的摺疊，是維持生命非常重要的物質，也因此熱休克蛋白基因

間具有較高度的保守性；目前亦有許多文獻指出熱休克蛋白基因家族可用於微生物間之分類鑑定工具(Chiang *et al.* 2008)。

三、傳統金黃色葡萄球菌的檢測方法(CNS 方法；Chinese National Standard)

包括增菌、選擇性平板培養基、鑑定培養、生化特性篩選等階段(如表)。至少需要 4 天才能知道是否為陰性結果，若要確認陽性反應，則需要再花 4-5 天的時間。對工廠品管來說傳統方法太耗時，故目前市面上已販售許多種類的葡萄球菌快速檢測套組，如改良式選擇性培養基、生化鑑定套組、免疫分析法、聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction；PCR)檢測法及生物晶片等，廠商可選擇適合的方法使用。目前鑑定的方式有很多種，在酪農業中最常被使用的是凝固酶試驗以及血清乳膠凝集法試驗或是做成快篩套組的家勒福尼亞法 (California Mastitis Test；CMT)以及 api® Staph 生化鑑定套組。但這些方法都有產生偽陽性和偽陰性的潛在缺點的結果。

四、分子生物檢測方法

葡萄球菌主要會污染肉製品、乳製品及麵包產品造成食品中毒。主要造成汙染的原因，是因食品處理過程不當，主要是生熟食未分區處理造成交叉汙染或是烹調時加熱不完全，而乳製品的部分是因為牛、羊乳腺患有乳腺炎或是乳房遭受細菌感染造成。傳統上檢測葡萄球菌的方法主要是根據生長型態及生化特性來鑑定，檢測方法須要有足夠的靈敏度及專一性，才能有效檢測出食品中的葡萄球菌，以往是利用培養基培養法進行一連串的生化試驗，相當的廢時。近年來，分子分型檢測方法越來越成熟，其中利用聚合酶連鎖反應法 (polymerase chain reaction,PCR)是被公認的有效檢測方法，其具有快速，方法簡單、靈敏度高等優點。

利用表現型的方法很難去分離鑑定來源不同的葡萄球菌，因為葡萄球菌會因為來源不同而有特徵穩定性的問題，其中 *S. xyloso* 即是一個高異源性的菌株 (Garcia-Varona *et al.* 2000; Villard *et al.* 2000)，因此需要其他更有效鑑定方法。分子生物學的發展，提供更多穩定的檢測方法，例如聚合酶連鎖反應(PCR)、脈衝式電泳(pulse-field gel electrophoresis；PFGE)、隨機增幅多型性核酸法(random amplified polymorphic diversity；RAPD) (Snopkova *et al.* 1994; Di Maria *et al.* 2002)、限制酶片段多型性分析(Restriction Fragment Length

Polymorphism ; RFLP) , DNA 微陣列(micro array)皆為目前常應用流行病學等之微生物檢測 (Gonzalez-Rey *et al.* 2003; Saunders and Holmes 2007) 。即便如此鑑定葡萄球菌使用單一檢測方法依然有相當的難度 (Rossi *et al.* 2001; Di Maria *et al.* 2002) 。

最常被利用檢測細菌的基因序列有 16S rRNA、23S rRNA 等，因這些這序列可與核糖體蛋白結合，使核糖體具有完整活性功能，使 mRNA 能順利轉譯成蛋白質，因此具高較高度的保守性。1994 年有研究發現 16S-23S rRNA 中間的插入序列 intergenic spacer sequences (ITS) 基因序列也可用來分析葡萄球菌(Dolzani *et al.*, 1994)，後續有許多學者也利用 ITS 序列當做細菌的鑑定標的(Maggi and Breitschwerdt 2005)。後續文獻指出，*groEL* 基因的保守序列的變異性比 16S rRNA 基因更多，更有利於菌種的分類 (Karenlampi *et al.* 2004)，以有文獻利用 *groEL* 基因序列以 PCR 及核酸雜交等方法鑑定葡萄球菌屬(Kwok *et al.* 1999; Kwok and Chow 2003)。有學者發現熱休克蛋白基因 *groEL*、*groES* 此兩段基因中間帶有的非蛋白質編碼區 intergenic region (IGR) 有高度的特異性，可作為菌種鑑定使用(Tsai *et al.* 2005)。

五、生物晶片檢測方法

DNA 微陣列技術也被稱為生物晶片(biochip)，以南方墨點法為基礎，將檢測寡核苷酸探針以微量的體積固定在晶片上，可在極小的面積放置更多不同的檢測探針，另一方面利用 PCR 增加目標基因量，最後利用核苷酸互補原理，進行核酸雜合反應以達到偵測目的。因此這項技術擁有可一次檢測多項基因的好處(Heller 2002)，2005 年 Monecke 及 Ehricht 學者成功利用生物晶片同時檢測 MRSA 抗生素相關基因及腸毒素基因(Monecke and Ehricht 2005)。晶片技術目前已廣泛應用在基因的表現、流行病學之分子分型、微生物之鑑定，抗藥性及毒性基因之檢測等等。如 2001 年 Detweiler 等人開發的沙門氏菌基因晶片 (Detweiler *et al.* 2001)，以及 2001 年 Hamels 等人所開發的葡萄球菌及抗生素基因檢測晶片 (Hamels *et al.* 2001) 等。其中最常用來檢測細菌的 16S rRNA、23S rRNA 基因常也被開發成生物晶片。文獻發現 *hsp60* 及 *hsp40* 基因比 16S rRNA 的基因差異大很多，可作為菌種間親緣鑑定使用(Kwok *et al.* 1999; Ghebremedhin *et al.* 2008)。

六、研究目的

葡萄球菌屬引起的食品中毒為細菌性急性腸胃炎，因此開發快速檢測方法具有

相當的重要性，本研究利用 PCR 引子及生物晶片方法來擷取快速檢測目的。在本研究室先前研究中，以完成 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. saprophyticus* PCR 引子組、共通性引子組及晶片探針設計，但尚未完成晶片最佳化，*S. carnosus*、*S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xylophilus* 則未進行 PCR 引子及探針設計，本研究延續先前研究，利用熱休克蛋白基因 *groEL*、*groES* 及 IGR 針對 *S. carnosus*、*S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xylophilus* 設計 PCR 引子組及探針 S.car F/S.car R、S.hyi F/S.hyi R、S.int F/S.intR、S.xyl F/S.xyl R。設計引子組時，其中一端會位於變異性較高的 IGR 序列中，除了因為序列比對結果 IGR 適合設計引子組及探針外，還有幾個重要的目的，第一以 PCR 的方法初步確認 IGR 序列是否具有專一性，若是 PCR 產物具有專一性則表示 IGR 序列可能具有特異性可修改為探針，其次確認各引子組黏合溫度是否一致，若溫度一致將有利於後續晶片雜交溫度的整合，確認後再修飾為探針使用。另外為了使共通性引子組能擴增到所有目標菌株，經序列比對後重新調整為退化性引子組，並測試其專一性測試。其後利用共通性引子組進行 PCR 共同擴增反應後，利用 PCR 產物與晶片上探針進行核酸雜交反應，並進行晶片整合條件最佳化、靈敏度以及模擬牛乳、尿液、血液樣品測試，以利後訊在食品及臨床葡萄球菌之快速檢測。

貳、材料與方法

一、實驗材料

1. 菌株

本實驗所使用的葡萄球菌標準菌株及非葡萄球菌菌株，自於來美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, U.S.A.)，食品工業發展研究所菌種保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Hsin-Chu, Taiwan)

非目標菌株選用標準，主要與葡萄球菌屬相關菌株，如微球菌屬 (*Micrococcus spp.*)，其他常見食品中毒病原菌，如 *Shigella*、*Bacillus*、*Citrobacter*、*Yersinia*、*Vibrio* 等菌屬，以及其他常見污染食品菌株。

2. 培養基

Trypticase soy broth (TSB)、Plate count agar (PCA) 和 Luria-Bertani broth、Baird-Parker

(BP) plate 均購自 Difco 公司 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A)·Egg Yolk Tullurite (CMP, 啟新生物科技公司, 台北, 台灣)

3. 藥品

Prozyme DNA polymerase、Prozyme PCR buffer (10×buffer : 100mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1% Triton X-100)、Tris base、Glacial acetic acid、購自波仕特有限公司 (PROtech Technology Ent. Co., Ltd.) BCIP/NBT stock solution、Streptavidin conjugated-alkaline phosphatase 購自 PerkinElmer (PerkinElmer Life Science, Boston, MA, USA)、SafeView DNA Stain 購自量子生物生科技有限公司、Proteinase K 購自 Merk (Darmstadt, Germany)、Agarose 購自 Promega (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, U.S.A)dATP、dTTP、dCTP 及 dGTP 購自 Boehringer Mannheim GmbH Biocheria (Mannheim, Germany)、Salmon sperm DNA 購自 Stratagene (Merck Ltd., Taiwan)、EDTA、Dextran sulfate、Tetramethylammonium chloride 購自 Sigma (Sigma Chemical Company, St., Louis, Missouri); 50×TAE buffer (50×TAE buffer : Tris base 242g, Glacial acetic acid 57.1 mL, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100mL, Distilled water 1000mL)、6× Loading dye (30% (W/V) Glycerol, 0.25% (W/V) Bromophenol blue, 0.25% (W/V) Xylene cyanol)。以上藥品均使用分生等級。

DNA 製備商業套組

GeneMark, Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit(禾鑫生物科技, 台北)

4. 緩衝液

I. 50×TAE buffer

Tris base 242 g

Glacial acetic acid 57.1 mL

0.5 M EDTA (pH8.0) 100 mL

Distilled water 1000 mL

II. 1x TBS (Tris-buffered Saline)

NaCl 8g

KCl 0.2g

Tris-Base 3g

Distilled water 1000mL

III. 20 x SSC

NaCl 175 g

Sodium citrate 88.8 g

pH 至 7.0

Distilled water 1000 mL

IV. hybridization buffer

5 x SSC

1 x Blocking Reagent

Salmon sperm DNA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

0.5 % SDS

V. Blocking dilution buffer

0.1M Maleic acid

0.15M NaCl

pH7.5

VI. Blocking reagent

Blocking dilution buffer 4mL

20% dextran sulfate 0.5mL

10% blocking reagent 0.5mL

VII. Streptavidin conjugated - alkaline phosphatase buffer

1xTBS (含 0.3% BSA) 4.5mL

10% blocking reagent 0.5mL

Streptavidin conjugated - alkaline phosphatase 0.5 μL

5. 儀器

I. PCR 熱循環: Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Perkin-Elmer Corporations, Norwalk, CT, U.S.A.)

II. 乾式加熱器: eppendorf Thermomix confort

- III. 離心機:epperndrof Centrifuge 5415R、epperndrof Centrifuge 5424
- IV. 電泳膠片影像擷取分析系統:GLUBIO Gel catcher 1500R (倡宇科技, 台灣台中)
- V. 電泳儀器 Mupid-2 mini gel electrophoresis system (Cosomo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)。
- VI. 晶片自動點片機 (晶宇生物晶片公司, 新竹, 台灣)
- VII. 小型雜交烘箱 (DR. Mini TM Oven) (晶宇生物晶片公司, 新竹, 台灣)
- VIII. 生物晶片影像讀取儀 (DR. AiM TM Reader) (晶宇生物晶片公司, 新竹, 台灣)

二、實驗方法

A.PCR 引子組

1. PCR 引子組設計

利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的分子生物資料庫 (Biological molecular database) GenBank, 取得 *S. aureus*、*S. carnosus*、*S. epidermidi*、*S. haemolyticus*、*S. hyicus*、*S. saprophyticus* 之熱休克蛋白家族基因 *groEL*、*groES* 基因序列進行序列比對, 選擇 *S. carnosus* 特異性片段若干組作為該菌株之特異性引子組, 並且利用 NCBI 中的 BLASTN 軟體以及使用 clustalx 方法進行序列比對, 排除特異性不佳者, 並利用設計出 PCR 特異性引子組及菌屬共通性引子組進行葡萄球菌屬之檢測, *S. intermedius*、*S. xylosus*、*S. hyicus* 因為基因庫尚無完整資訊, 所以採用設計出之共通性引子組進行核酸擴增反應, 並將產物定序, 將定序結果與其他葡萄球菌進行比對, 並用上述電腦軟體進行 *S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xylosus* 之引子設計。

2. DNA 萃取

鉤取一白金耳的菌量於 5 mL TSB broth 中, 37°C 培養 12 小時 1ml 菌液於微量離心管中, 以最高速 13000 rpm 離心 5 分鐘, 倒掉上清液再加入 1mL 無菌水均勻振盪清洗 pellet, 再以 13000 rpm 離心 5 分鐘, 倒掉上清液, 加入 lysostaphin buffer 250µL 均勻振散後加入 1µL lysostaphin (50mg/mL) 及 10µL lysozyme (10 mg/mL), 於 37°C 下反應約 2 小時使作用至澄清, 接著接續商業套組的步驟, 加入 200µL Buffer 與 25µL proteinase K (10 mg/mL), 於 60°C 下反應 1 小時使菌液繼續作用至澄清。以下的步驟皆依照 GeneMark Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit 的方法, 最後以 200 µL 無菌水復溶。

3. PCR 引子組特異性檢測

針對本實驗室之 *S. carnosus*、*S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xylosum* 標準菌株及其他非目標菌株(表 2-1~表 2-2)之 DNA 使用 S.car F/S.car R、S.hyi F/S.hyi R、S.int F/S.intR、S.xyl F/S.xyl R 引子組進行 PCR 擴增反應，方法如下：在 0.2 mL PCR amplification tube 加入 2 μ L 之 2.5 mM dNTP，2.5 μ L 之 10x PCR buffer，1 μ L 之 primers (10 mM)，2U 之 ProzymeTM 及 16.3 μ L 無菌去離子水，再加入 2 μ L 之 DNA(濃度經定量為 150~100ng/ μ L)。而後將 amplification tube 置入 PCR thermocycler，進行反應。反應之條件如下：第一步 95 $^{\circ}$ C 維持 5 分鐘，再進行 95 $^{\circ}$ C 30 秒，50 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 30 秒的 35 個循環。最後以 72 $^{\circ}$ C 維持 5 分鐘，溫度及時間是使用 PCR thermocycler 的內建的程式作控制。反應結束後取 5 μ L PCR 反應產物，以 2 % agarose 於 0.5 \times TAE buffer 中進行電泳分析，經 SafeView DNA Stain 染色，以 UV box 觀察後拍照。

4. PCR 純水中靈敏度檢測

S.car F/S.car R、S.hyi F/S.hyi R、S.int F/S.intR、S.xyl F/S.xyl R 之靈敏度試驗。做法如下：目標菌和經 TSB 活化後，接一白金耳之菌液接種 5mL TSB broth，經 37 $^{\circ}$ C、180 rpm 培養 8 小時後，取出菌液 1mL 加入 9mL 的無菌水中做 10 倍系列稀釋，再分別取 1 mL 之稀釋液於 plate 中並倒入 Plate Count Agar，經培養 18 小時計數並換算出原始濃度為 $N \times 10^9$ cfu/mL。同時吸取濃度為 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ 、 $N \times 10^{-8}$ 、 $N \times 10^{-9}$ cfu/mL 之菌液 1 mL，以商業套組方式抽取 DNA，最後以 200 μ L 無菌水復溶。取 2 μ L DNA 進行 PCR 反應，完成後取 5 μ L PCR 反應產物，以 2 % agarose 於 0.5 \times TAE buffer 中進行電泳分析，經 SafeView DNA Stain 染色，以照相系統觀察後拍照。靈敏度的算法為數出原始菌數，單位為 cfu/mL，再乘以稀釋倍數，最後抽取 DNA 的步驟中，是以 200 μ L 無菌水回溶，而進行 PCR 的時候則取其中的 2 μ L 之 DNA(總量的 1/100)，因此 PCR 靈敏度的算法是以原始菌液菌數(cfu/mL)乘以稀釋倍數再乘以 1/100。

5. 牛乳 PCR 靈敏度測試

牛乳是採用市售林鳳營低脂牛乳，牛乳樣品之製備方法如下：取出菌液 1mL 加入 9mL 的無菌水中做 10 倍系列稀釋，使菌液起使濃度為 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、

$N \times 10^{-7}$ 、 $N \times 10^{-8}$ cfu/mL，再將混合後的菌液 1mL 加入 9mL 牛乳中，則得到起始濃度為 $N \times 10^{-1}$ 、 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ cfu/mL 的牛乳樣品，並取 1mL 進行 DNA 抽取。另外也進行簡單培養後的靈敏度測試，取上述製備之牛乳樣品各 1mL 加入 3mL TSB broth，經 37°C、180 rpm 培養 8~12 小時，同樣取菌液 1ml，以商業套組的方式抽取 DNA，最後以 200 μ l 無菌水復溶，以上述 PCR 之方法檢測引子組在牛乳樣品中的靈敏度。

B. 晶物晶片

1. 寡核苷酸探針之設計

針對 IGR 片段設計之引子組，經過修飾及調整後即為晶片所使用之探針，探針委託禾鑫生物科技合成，其中新設計一組共通探針-Positive control，能偵測 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. saprophyticus*、*S. carnosus*、*S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xyloso* 八個菌種，此設計是當作核酸雜交反應陽性控制組使用。

2. DNA 製備

取 1.0 mL 各種檢體菌液於微量離心管中，以 15000g 離心 3 分鐘，倒掉上清液再加入 1 mL ddH₂O 均勻振盪清洗 pellet，再離心 15000g 離心 3 分鐘，倒掉上清液，加入 lysostaphin buffer 180 μ L 均勻震散後加入 2 μ L lysostaphin (50 mg/mL)，20 μ L lysozyme (2 mg/mL)，於 37°C 下反應約 2-3 小時使作用至澄清，接著接續商業套組(GeneMark, Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit)步驟，加入 200 μ L Extraction buffer 與 20 μ L proteinase K (10 mg/mL)，於 60°C 下反應 1-3 小時，再加熱 70°C 一小時，使 proteinase K 失去活性。接續加入 200 μ L 絕對酒精，混合後將液體轉移到組合完成的 Column Collection tube 套組，以 13000 rpm 離心一分鐘，倒掉離心液。再加入 200 μ L Binding Solution，離心一分鐘。接續上述步驟，使用 700 μ L Wash Solution 清洗後離心一分鐘，移除離心液，並重複上述步驟，最後，以最高速離心五分鐘，除去多餘的酒精，並以 200 μ L ddH₂O 回溶，即完成 DNA 之萃取。

3. PCR 聚合酶連鎖反應 (DNA amplification)

使用 5' 標定 Biotin 之 universal primers，進行所有菌株測試。在 0.2 mL PCR amplification tube 加入 2 μ L 之 2.5 mM dNTP，2.5 μ L 之 10x PCR buffer，1 μ L 之 primers (10 mM)，2U 之 Prozyme™ 及 16.3 μ L 無菌去離子水，再加入 2 μ L 之 DNA。而後將 amplification tube 置

入 PCR thermocycler, 進行反應。反應之條件如下: 第一步 95°C 維持 5 分鐘, 再進行 95°C 60 秒, 50°C 60 秒, 72°C 60 秒的 35 個循環。最後以 72°C 維持 5 分鐘, 溫度及時間是使用 PCR thermocycler 的內建的程式作控制。

4. 雜合試驗 (Hybridization)

雜合前將 DR. Mini™ Oven 預熱至 45°C。取檢體 PCR 產物 10μL 加到 PCR amplification tube, 並加入 180μL hybridization buffer 混合均勻。將核酸雜交液, 使用 ABI 2720 PCR thermocycler 加熱至 95°C 並作用 10min, 在快速放到冰盒中 5min (使 DNA 維持在單股), 在將核酸雜交液加入經過固定好 probe 的 DR. DIY N3 Chip 中, 使用 DR. Mini™ Oven 最高速進行核酸雜交反應 3hr, 移除雜交液並使用 2X SSC 溶液先清洗一次, 在使用 1X SSC 清洗第二次, 每次清洗 5min。

5. 呈色反應

接續上步驟, 將 200 μL Blocking Reagent 混合後加 Chip, 使用 DR. Mini™ Oven 最高速進行 Blocking 30min, 移除 Blocking 液體, 使用 2X SSC 清洗 5min 兩次。再加入 200 μL Streptavidin conjugated - alkaline phosphatase buffer 使用 DR. Mini™ Oven 最高速進行上抗反應 30min, 使用 2X SSC 清洗 5min 兩次。最後取 200 μL NBT/BCIP 混合均勻, 加入 Chip 中置入暗室呈色 5~10 分鐘, 呈色後以清水洗淨, 烘乾後以生物晶片影像讀取儀掃描成數位影像, 並與 Probe 分佈結果進行比對, 以檢查結果是否正確。

6. 晶片在純水樣品中靈敏度測試

目標菌和經 TSB 活化後, 接一白金耳之菌液接種 5mL TSB broth, 經 37°C、180 rpm 培養 8 小時後, 取出菌液 1mL 加入 9mL 的無菌水中做 10 倍系列稀釋, 再分別取 1 mL 之稀釋液於 plate 中並倒入 Plate Count Agar, 經培養 18 小時計數並換算出原始濃度為 $N \times 10^9$ cfu/mL。同時吸取濃度為 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ 、 $N \times 10^{-8}$ 、 $N \times 10^{-9}$ cfu/mL 之菌液 1 mL, 以商業套組方式抽取 DNA, 最後以 200 μL 無菌水復溶。取 2μL DNA 以 Universal F/Universal R 引子組進行 PCR 共同擴增反應, 並接續晶片步驟完成靈敏度測試。

7. 晶片在牛乳樣品中靈敏度測試

牛乳是採用市售林鳳營低脂牛乳，牛乳樣品之製備方法如下：取出菌液 1mL 加入 9mL 的無菌水中做 10 倍系列稀釋，使菌液起使濃度為 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ 、 $N \times 10^{-8}$ cfu/mL，再將混合後的菌液 1mL 加入 9mL 牛乳中，則得到起始濃度為 $N \times 10^{-1}$ 、 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ cfu/mL 的牛乳樣品，並取 1mL 進行 DNA 抽取，並接續晶片之步驟完成牛乳之靈敏度測試。

8. 晶片在尿液樣品中靈敏度測試

尿液檢體收集至本實驗室人體尿液，並進行高溫滅菌處理，接續以下步驟完成尿液靈敏度模擬試驗：取出菌液 1mL 加入 9mL 的無菌水中做 10 倍系列稀釋，使菌液起使濃度為 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ 、 $N \times 10^{-8}$ cfu/mL，再將混合後的菌液 1mL 加入 9mL 尿液中，則得到起始濃度為 $N \times 10^{-1}$ 、 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ cfu/mL 的牛乳樣品，並取 1mL 進行 DNA 抽取，並接續晶片之步驟完成尿液之靈敏度測試。

9. 晶片在血液樣品中靈敏度測試

血液來源是由本實驗室人員到台中榮民總醫院抽血，使用 BD vacutainer K₂ EDTA 採血管收及血液樣本並接續以下步驟完成血液靈敏度模擬試驗：取出菌液 1mL 加入 9mL 的無菌水中做 10 倍系列稀釋，使菌液起使濃度為 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ 、 $N \times 10^{-8}$ cfu/mL，再將混合後的菌液 30 μ L 加入 270 μ L 尿液中，則得到起始濃度為 $N \times 10^{-1}$ 、 $N \times 10^{-2}$ 、 $N \times 10^{-3}$ 、 $N \times 10^{-4}$ 、 $N \times 10^{-5}$ 、 $N \times 10^{-6}$ 、 $N \times 10^{-7}$ cfu/mL 的血液樣品，並取 100 μ L 進行 DNA 抽取，並接續晶片之步驟完成尿液之靈敏度測試。

10. 血液樣品經簡單增菌培養後靈敏度測試

取上述製備之血液樣品各 100 μ L 加入 3mL TSB broth，經 37 $^{\circ}$ C、180 rpm 培養 8~12 小時，同樣取菌液 1ml，以商業套組的方式抽取 DNA，最後以 200 μ l 無菌水復溶，接續晶片之步驟完成靈敏度之測試。

參、結果討論

一、PCR 專一性

本研究設計之引子組 *S. car* F/*S. car* R、*S. hyi* F/*S. hyi* R、*S. int* F/*S. int* R、*S. xyl* F/*S. xyl* R 產物大小分別為 108bp、192bp、179bp、180bp，由表二可看到 PCR 引子組條件調整為同一個條件，這是為了後續修改為探針時較容易整合溫度條件所設計。結果顯示引子組針對其目標菌株都有高度專一性，並無其他非特異性片段，其他非目標菌株沒有產物生成(圖一~圖四)，統計結果如表五，由以上結果得知，設計之引子組具有高度專一性，無偽陽性及偽陰性的結果產生，根據其結果表示本研究所設計之引子可用於 *S. carnosus*、*S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xylosus* 菌種鑑定。

S. carnosus、*S. hyicus* BCRC 及 ATCC 都只有一株或兩株標準菌，是否能檢測到其他的 *S. carnosus*、*S. hyicus* 菌株是有相當大的疑問，目前實驗室亦無法其他相關的分離菌株，後續必須再尋求其他管道，如疾病管制局等，取得相關分離株，以建立更完整有效的數據，以提高檢測方法的公信力。

S. intermedius 引子組設計時未考慮 *S. pseudintermedius*，本實驗室當時也未添購此菌株，所以沒有進行 *S. pseudintermedius* 測試，而有研究報告在 2010 年將此序列解出，並可由 NCBI 取得其序列資訊，經過比對，*S. intermedius* 之引子對 *S.int* F/R 可與 *S. pseudintermedius* 之序列吻合，所以推論 *S.int* F/*S.int* R 在鑑定此兩種菌種是應該無法分辨。依目前現有資料經過序列比對後，此兩菌種具有高度的相似度(圖五)，可由比對結果發現只有四個鹼基不一樣，其中只有編號 1 及編號 4 是 *S. intermedius*、*S. pseudintermedius* 兩者不同處，而編號 2 及編號 3 處則是 *S. intermedius* 不同編號菌株之差異，這種差異可能是由單一核苷酸多型性(Single Nucleotide Polymorphism；SNP)造成，因此無法也不能推斷此兩處的差異是菌種間的差異。因此要再使用此基因序列進行這兩種菌種分離是有困難的。*S. intermedius*、*S. pseudintermedius* 在分類上也同屬 *Staphylococcus intermedius* group (SIG)，主要是感染犬科動物，所引發病灶都相同，治療方式也相同，基於以上理由，*S. intermedius*、*S. pseudintermedius* 在醫療上鑑定到 SIG 以足夠，如果需要進一步確認，可使用其他已發表之方法再進行細部的確認。

在確認標準菌株是否正確時，使用了兩組文獻的 PCR 引子組作為 *S. xylosus* 測試之用，因為在標準菌株測試時，發現 XYL-F/XYL-R、STAX-XyI/STAX-XyII 組，都無法同時偵測 BCRC15252、BCRC15253、BCRC15442 這三株 *S. xylosus*(圖六(a)、圖六(b))，推測先前文獻使用的兩組引子組的目標基因會因來源不同而有差異性。而本研究新設計之引子組可以正確將此三株 *S. xylosus* 擴增(圖六(c))，後續必須收集更多相關菌株，確保此引子組能包含更多來源不同的 *S. xylosus*。

二、PCR 靈敏度

本研究所設計之引子組靈敏度統計結果列於表六，除了 *S. hycus* 只有 $N \times 10^5$ cfu/mL(圖八)，其餘靈敏度介於 $N \times 10^1 \sim N \times 10^2$ cfu/mL(圖七、圖九、圖十)。以往使用 PCR 偵測 *S. aureus* 靈敏度可偵測到 $N \times 10^1 \sim N \times 10^2$ cfu/mL (Brakstad *et al.* 1992)、(Riyaz-Ul-Hassan *et al.* 2008)，偵測其他食品病原菌如 *Alternaria spp.* 靈敏度為 $N \times 10^2$ cfu/ml (Pavon *et al.* 2011)，其結果顯示本研究所設計之 *S. car* F/*S. car* R、*S. int* F/*S. int* R、*S. xyl* F/*S. xyl* R 引子組有足夠的檢測靈敏度，可用於菌種鑑定使用。

牛乳靈敏度測試方面，*S. carnosus* 可達 $N \times 10^4$ cfu/mL(圖十一)，*S. hycus* 為 $N \times 10^5$ cfu/mL(圖十二)，*S. intermedius* 為 $N \times 10^4$ cfu/mL(圖十三)，*S. xylosus* 為 $N \times 10^2$ (圖十四)，在經過簡單的增菌培養後，檢測濃度可以達到 $N \times 10^0$ cfu/mL(圖十五)，根據文獻資料顯示，利用 16S and 23S rRNA 檢測牛乳樣品中的 *S. aureus* 亦可達 $N \times 10^1$ cfu/mL，*E. coli* 可達 $N \times 10^2$ cfu/mL(Chotar *et al.* 2006)，在其他食品檢測上檢測極限約為 $N \times 10^3$ cfu/mL (Alarcon *et al.* 2006)，根據以上結果再不經過培的狀況下只有 *S. xylosus* 有足夠的靈敏度，經過 TSB 培養基 37°C 簡單培養 8~12 小時後，能提高靈敏度至 $N \times 10^0$ cfu/mL，表示經過簡單增菌培養後 *S. car* F/*S. car* R、*S. hyi* F/*S. hyi* R、*S. int* F/*S. int* R、*S. xyl* F/*S. xyl* R 引子組可用於牛乳的檢測使用。

在靈敏度測試上，可以發現模擬牛乳的靈敏度比水中的靈敏度下降的許多，可能是因為牛乳中含有許多 pcr 干擾物影響擴增效率所造成，食品中常見的抑制物，例如：有機化合物、酚類化合物、肝糖及鈣離子 (Wilson 1997)。其中牛乳常見的抑制物耐熱性核酸分解酶 (Thermonuclease)、蛋白質、其他細菌的碎片等 (Wilson *et al.* 1991)。Bickley 等學者研究顯示牛乳中大量的鈣離子會影響 PCR 的靈敏度 (Bickley

et al. 1996)。另外靈敏度可能也與引子設計本身有關，在圖十一~圖十二中發現有大量的 Primer dimer 產生，可能是引子中有序列互補，因而容易形成 Primer dimer 而降低與目標基因結合的機率。因此要提高靈敏度的方法有兩個策略，第一是降低牛乳中抑制物質，可利用可以使用其他方法萃取，如 DTAB/CTAB 帶陽離子強性介面活性劑，可以得到較純的 DNA，以提高靈敏度，或是重新調整引子組避免 Primer dimer 生成。

三、共通性引子組專一性及靈敏度結果

本研究設計之共通性引子組，在專一性檢測中，可以偵測到 *S. aureus*、*S. carnosus*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. hyicus*、*S. saprophyticus*、*S. intermedius*、*S. xylousus*(圖十六)，而其他常見食品中毒及醫院感染之其他菌株無 PCR 產物產生(表五)，顯示其共通性引子組有足夠的專一性，可用於鑑定這些葡萄球菌，但其他如 *S. simulans*、*S. cohnii* 則無 PCR 產物，顯示要再整合其他葡萄球菌，需要再調整共通性引子組，或是利用兩組以上的共通引子組進行 Multiple PCR。

本研究設計之引子組，PCR 產物大小 233bp 是根據 *S. aureus* 序列所計算出來的，因為引子組兩段正好各位於 *hsp60*、*hsp10* 上，因此產物會包含 intergenic region (IGR)之序列，葡萄球菌會因不同菌種 IGR 長度會有部分差異，例如 *S. carnosus* 及 *S. intermedius* 經過比對結果此片段較小，也可由圖十六結果看到不同的菌種 PCR 產物的確有些許的差異。

共通性引子組檢測靈敏度方面，在牛乳、尿液方面，偵測極限介於 $N \times 10^4$ - $N \times 10^5$ CFU/mL(圖十七~二十二)，而血液方面約為 $N \times 10^6$ CFU/mL(圖二十三~二十五)，因為檢體中有許多成分會干擾 PCR 的反應過程，因此靈敏度較低，尤其是血液是使用全血抽取 DNA，血液中含有大量的物質容易干擾 PCR 產物的生成，如血球 DNA、DNA-binding proteins、Heparin 都會影響 PCR 的靈敏度 (Wilson 1997)，也有文獻指出 Immunoglobulin G 是血液中主要干擾 PCR 反應的物質 (Al-Soud et al. 2000)，因此同樣可以使用 DTAB/CTAB 帶陽離子強性介面活性劑，可以得到較純的 DNA，以提高靈敏度，或者在血液方面可以以低速離心的方法分離大部分的血球(George et al. 1982)，以降低血球 DNA 的干擾。

共通性引子組設計時應可在更廣泛，這樣可以包含更廣泛的區域以利探針的選擇，最初設計時只有考慮到要包含 IGR 序列，結果設計所包含基因片段，導致後續設計探針不容易，因此後續也將重新設計共通性引子組，包含更大的區域，以利後續葡萄球菌晶片整合時，探針更容易設計。

四、晶片條件最佳化討論

除了 *S. carnosus*，*S. xylosus* 再 45°C 下(圖二十七)有嚴重干擾外，其他可呈現正確圖譜，無任何干擾，*S. carnosus* 會出現 *S. aureus* 輕微偽陽性干擾，這些結果可能試探針專一性不夠造成，可以利用提高溫度、SSC 濃度降低、使用 Tetramethylammonium chloride 清洗調整嚴苛度以增加專一性或是降低 Strep-AP 濃度的方法避免過多非專一性的結合，但是卻造成其他探針靈敏度下降而無法偵測結果，如溫度提高至 47°C 時幾乎所有葡萄球菌都無法被偵測到，因此必須再將探針做細部的調整，目前經過許多探針測試的結果，暫時還無法找到比目前更優良的條件。晶片在其他檢測中，也會出現干擾，可以利用晶片判讀儀設定檢測閾值，將訊號微弱的干擾視為陰性反應，因此後續必須收集更多不同編號的菌株晶片結果，建立成更有效力的判讀結果。

探針與晶片之結合力會影響專一性及靈敏度，而影響結合力的因素包含點於晶片上的體積與濃度，(Jayaraman *et al.* 2007)，由圖二十八、二十九中 *S. xylosus* 出現許多微弱的干擾以及 *S. aureus*、*S. saprophyticus* 等結果可以見到 biotin 及 positive control 出現拖尾狀況，這也可能是因為探針濃度過高造成。表七、為本研究所使用探針，其中探針會在 5' 或 3' 端增加 T 尾修飾，2000 年 Brown 等學者提出，探針過短會造成訊號較弱，因此在 3' 端增加 5~10 個 T 可以增強訊號(Brown and Anthony 2000)，因此本研究也使用此方法來增強訊號，結果顯示在 5' 端增加 T 也可以有這樣的效果。另外可從表七看到，增加 T 還有另外一個好處，就是可以調整探針長度，將探針調整至 40 個鹼基，可以使 Tm 值較為相近，不過 *S. xylosus* 探針訊號不佳，又延長至 50 個鹼基的長度。

五、晶片應用於各檢體結果

晶片靈敏度方面，牛乳、尿液皆可達到 $N \times 10^2$ CFU/mL，結果顯示靈敏度至少可以比 PCR 結果提高一個 log 值，顯示晶片比 PCR 的方法有更高的靈敏度，但是會有干擾產生，此結果可能是其他葡萄球菌產生的偽陽性反應，尤其牛乳、羊乳樣品中，常含有許多葡萄球菌，例如 *S. simulans*、*S. cohnii*、*S. warneri* (Rather *et al.* 1986)，不過在共通性引子組測試中，除 *S. warneri* 會產生產物外，*S. simulans* 及 *S. cohnii* 並不會有 PCR 產物的生成，本研究利用各設計之引子組測試過 *S. simulans*、*S. cohnii*、*S. warneri* 這三種葡萄球菌，所有菌種專一性引子組並不會產生 PCR 產物，而探針利用 PCR 引子組修飾而成，可以排除這些菌株干擾晶片結果，是否還有其他未知葡萄球菌之菌株會影響結果須進一步釐清，加上純水、牛奶、尿液以及血液經過共通性引子組檢測，並沒有 PCR 產生，因該來自其他葡萄球菌菌種干擾可能性較低。

血液方面晶片與 PCR 相較並沒有明顯提高靈敏度。因為本研究在血液 DNA 萃取時，並未將血球分離，因此檢體 DNA 中含有大量血球 DNA，可能會干擾而造成靈敏度下降，即使使用晶片也未必能達到更好的效果，不過經過簡單擴增培養 8-12 小時後，PCR 及晶片靈敏度可達 $N \times 10^2$ CFU/mL，其靈敏度足夠用於檢測菌血症，不過以往研究經簡單培養後靈敏度可達 $N \times 10^0$ CFU/mL，這可能是因為未使用血液用培養基導致。

使用注射針抽血再打到血瓶中或真空採血器直接抽到血瓶中是最適當的採血方法，直接從靜脈或動脈導管抽血做培養的方法容易產生環境的污染。(Wormser *et al.* 1990)，本研究使用靜脈導管抽血做培養，可能產生環境汙染，因而在經過培養後晶片產生更多的干擾。

晶片干擾結果會影響一些問題，如果檢體中含有兩種以上的菌如何判斷是干擾形成還真有兩種以上的菌種在檢體中，因此後續混合菌種其及實際樣品的測試相當重要。

肆、結論

本研究所設計之引子組 *S. car* F/R、*S. hyi* F/R、*S. int* F/R、*S. xyl* F/R 針對目標菌株 *S. carnosus*、*S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xylosus* 進行測試，除了目標菌株能出現產物外，其餘非目標菌株不會有 PCR 產物的生成。因此設計之專一性引子組可以用於葡萄球菌屬之鑑定。

牛乳靈敏度經過簡單的增菌培養後，靈敏度可以到達 $N \times 10^0$ cfu/mL。因此靈敏度是足夠用於偵測目標菌株。計算簡單培養、DNA 萃取及 PCR 擴增過程所需的時間，可在兩天內完成。本實驗所設計的引子組可望應用在市售的牛乳，以達到快速檢測的目的。

本研究所設計的引子組是利用熱休克蛋白基因所設計，加上本實驗室先前研究所設計之 *S. aur* F/R、*S. epi* F/R、*S. int* F/R、*S. xyl* F/R，此段基因可以成功鑑定出八種葡萄球菌。並無偽陽性及偽陰性的結果，因此使用此段基因用於鑑定葡萄球菌屬，後續其他葡萄球菌或其他菌屬可利用此熱休克蛋白基因進行引子的設計。

使用晶片檢測，速度相當快速，若搭配核酸自動萃取儀，由檢體抽取 DNA 到晶片呈色完成最快可以 10 小時內完成，可於當日內發布檢測報告，如果要提高靈敏度到 $N \times 10^2$ CFU/mL，則需經過增菌培養 18~24 小時，也能在 36 小時內完成，也可於次日發布檢測結果相較 CNS 的方法需要 4-5 天已是相當快速。本研究所開發之晶片可以整合 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. hyicus*、*S. saprophyticus*、*S. intermedius*、*S. xylosus* 以完成最適化條件，因此可以用於葡萄球菌的快速檢測。

使用晶片做為一般檢測，在成本上相對較高，本研究團隊尚有開發其他重要食品中毒、臨床檢體及流行病學之重要菌株之檢測探針，可以再加以整合，以增加晶片的使用價值。另外探針可修改成 Real Time PCR 用的探針，使用 Real Time PCR 系統具有同步定量，可檢測相對菌量，檢測靈敏度相較一般 PCR 也更高，探針上可標記不同螢光達到一次檢測多種目標菌株的好處(Goto *et al.* 2007)，可提供不同需求檢測使用。

伍、圖表

表一、文獻發表用於確認菌株之 PCR 引子組

Target	Primer	Oligonucleotide sequence(5'→3')	Length	Target gene	Reference
bacterias					
<i>S. carnosus</i>	ScaI	GAACCGCATGGTTCTGCAA	305	16S rRNA	(Blaiotta <i>et al.</i> 2003)
	ScaII	CCGTCAAGGTGCGCATAGT			
<i>S. hyicus</i>	STAH-HyI	TACGGAATATCGCCTTAGG	250	16S-23S rRNA intergenic spacer regions	(Forsman <i>et al.</i> 1997)
	STAH-HyII	AAAACATCTGTCATCCGAAG			
<i>S. intermedius</i>	cpn60-F	GCGACTGTACTTGCACAAGCA	550	chaperonin 60(cpn60)	(Bannoehr <i>et al.</i> 2007)
	cpn60-R	AACTGCAACCGCTGTAAATG			
<i>S. xylosus</i>	XYL-F	AACGCGCAACGTGATAAAATTAATG	539	16S rRNA gene	(Morot-Bizot <i>et al.</i> 2003)
	XYL-R	AACGCGCAACAGCAATTACG			
<i>S. xylosus</i>	STAX-XyI	TCTTTAGAAGATGACAGAGG	260	16S-23S rRNA intergenic spacer regions	(Forsman <i>et al.</i> 1997)
	STAX-XyII	TGACTTTTAACACGACGAAG			

表二、本研究設計之 PCR 引子組。

Target bacterias	Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Target gene	Predicted product (bp)
<i>S. carnosus</i>	S.car F	TAGCCTCCTGTATTTGTATTA	IGR	108bp
	S.car R	CAGTGAAGTGCAAGTAGGAG	<i>groES</i>	
<i>S. hyicus</i>	S.hyi F	GCAAGTCTTATATGTACCAAGC	IGR	192 bp
	S.hyi R	TGCGTTGACCATTATCAAGAAT	<i>groES</i>	
<i>S. intermedius</i>	S. int F	TCTATTACCTCCGTTGTTGG	IGR	179 bp
	S. int R	CGTCTCAAACCTGAACTCAAC	<i>groES</i>	
<i>S. xylosus</i>	S. xyl F	CGCCATATTACTTATACCTCC	IGR	180bp
	S.xyl R	AAGGCGATAATGTAGTATTTCA	<i>groES</i>	
<i>Staphylococci</i>	Universal F	Biotin- CACCACGTAACATWGMITTGWC	<i>groEL</i>	223bp
	Universal R	Biotin-TCGTGTTCCAACAATWYGCTGG	<i>groES</i>	

PCR condition: Step 1 94°C 5min , Step 2 94°C 30s , 55°C 30s , 72°C 30s , 35 cycle , Step 3 72°C 7min

表三、本研究所使用之標準菌株

Species	NO.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 700699、BCRC 10782、BCRC 12652、BCRC 12654、 BCRC 12656、BCRC 12657、BCRC 13830、BCRC13828、BCRC 13825、BCRC 13826、BCRC 13827、BCRC 13829、BCRC 13830、BCRC 13831、BCRC 13824
<i>staphylococcus carnosus</i>	BCRC 12922、BCRC 12924
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228、BCRC 10785、BCRC 17069、BCRC 15246、 BCRC 11030
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	BCRC 12923、BCRC 15237、BCRC 15240
<i>Staphylococcus hyicus</i>	BCRC 12925
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305、BCRC 10786、BCRC 13977
<i>Staphylococcus intermedius</i>	BCRC 15235、BCRC 12536
<i>Staphylococcus xylosum</i>	BCRC 15442、BCRC 15252、BCRC 15253
<i>Staphylococcus cohnii</i>	BCRC 12155
<i>Staphylococcus warneri</i>	BCRC 12929
<i>Staphylococcus simulans</i>	BCRC 10778、BCRC 12928
<i>Staphylococcus lentus</i>	BCRC 12926
<i>Staphylococcus sciuri</i>	BCRC 12927
ATCC: 美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection, U.S.A)	
BCRC: 台灣食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresources Collection and Research Center, Taiwan)	

表四、本研究所測試非目標菌株

Acinetobacter calcoaceticus ATCC 19609, *Alcaligenes faecalis* BCRC 10828, *Bacillus coagulans* BCRC 10251, *Bacillus coagulans* BCRC 10267, *Bacillus cereus* BCRC 10603, *Bacillus cereus* BCRC 12812, *Brevibacterium linens* BCRC 19391, *Corynebacterium glutam* BCRC 10448, *Citrobacter freundii* BCRC 10041, *Citrobacter freundii* BCRC 12291, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355, *Erwinia carotovora* BCRC 11298, *Enterobacter aerogenes* BCRC 10370, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355, *Shigella flexneri* BCRC 10772, *Shigella flexneri* BCRC 13894, *Shigella sonnei* BCRC 10773, *Shigella boydii* BCRC 15959, *Shigella dysenteriae* BCRC 13893, *Streptococcus mutans* BCRC 10793, *Streptomyces chrysomallus* BCRC 11511, *Streptococcus pyogenes* BCRC 10797, *Hafnia alvei* BCRC 10906, *Klebsiella pneumoniae* BCRC 10692, *Kluyvera ascorbata* BCRC 11645, *Lactobacillus acidophilus* BCRC 14065, *Lactobacillus fermentum* BCRC 12194, *Proteus vulgaris* BCRC 10728, *Micrococcus roseus* BCRC 11577, *Morganella morganii* BCRC 10706, *Micrococcus luecus* BCRC 10449, *Micrococcus varians* BCRC 112725, *Morganella morganii* BCRC 10706, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17803, *Vibrio parahaemolyticus* CCRC 12958, *Yersinia enterocolitica* CCRC 10807, *Escherichia coli* CCRC 14824, *Escherichia coli* CCRC 13084.

ATCC: 美國菌種保存中心 (American Type Culture Collection, U.S.A)

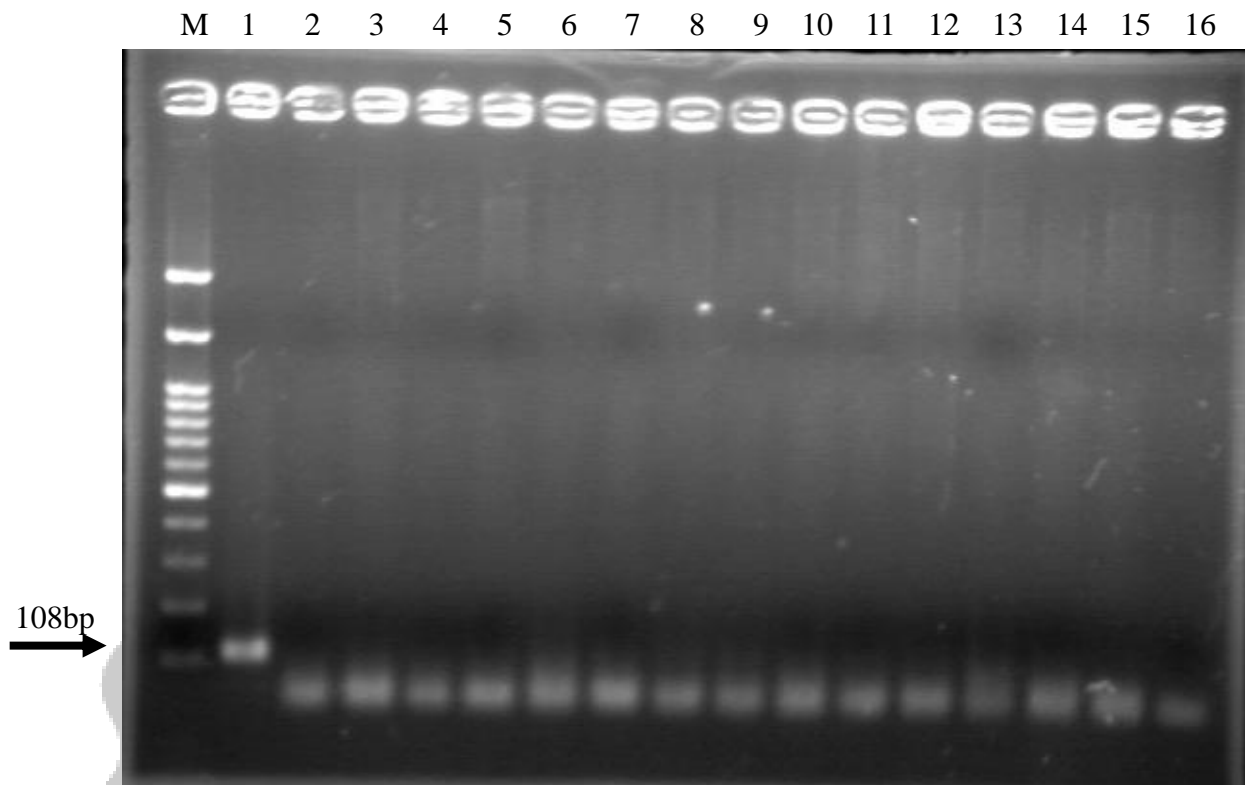
BCRC: 台灣食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresources Collection and Research Center, Taiwan)

表五、PCR 引子組檢測結果

Species	Primers								
	Universal F Universal R ^a	S.car F S.car R ^b	S.hyi F S.hyi R ^b	S.int F S.int R ^b	S.xyl F S.xyl R ^b	S.aur F S.aur R ^a	S.sap F S.sap R ^a	S.epi F S.epi R ^a	S.hae F S.hae R ^a
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. carnosus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. haemolyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. hyicus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. intermedius</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. xylosus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. simulans</i> 、 <i>S. lentus</i> 、 <i>S. sciuri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
非目標菌株(表所列)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

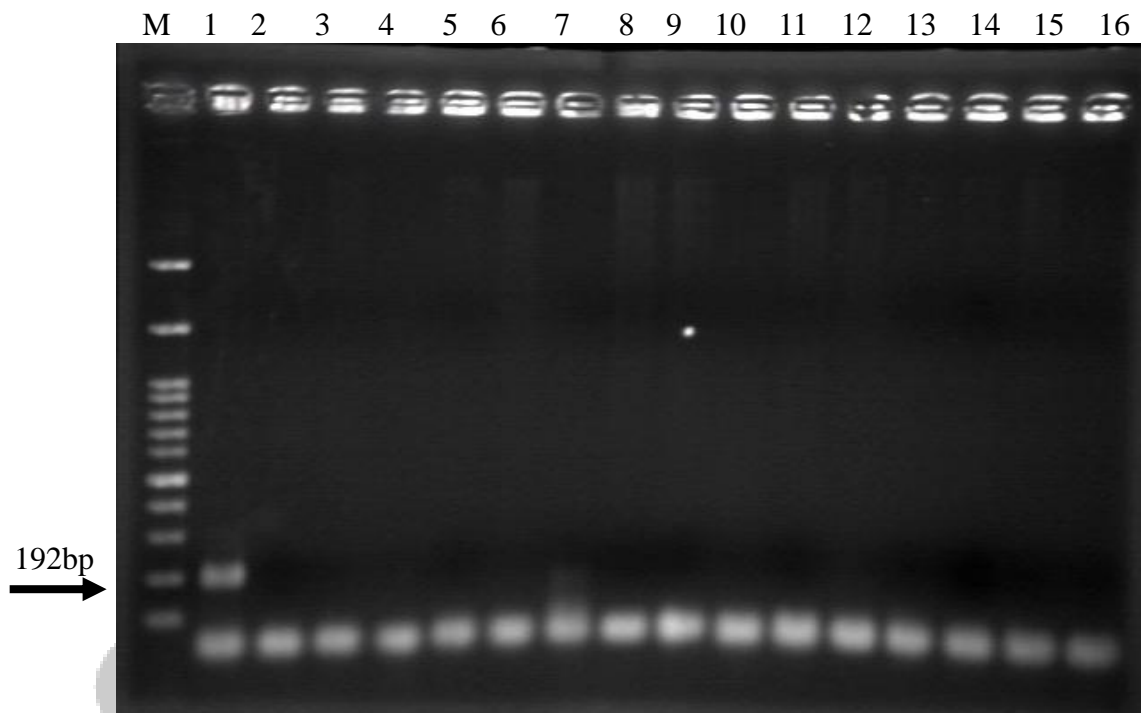
a:此五組 PCR primers 引用自 2009 年張予馨碩士論文，除 Universal F/Universal R 經過部分修飾，其於 primers 序列無更動。

b:此四組 PCR primers 為本研究所設計之引子組



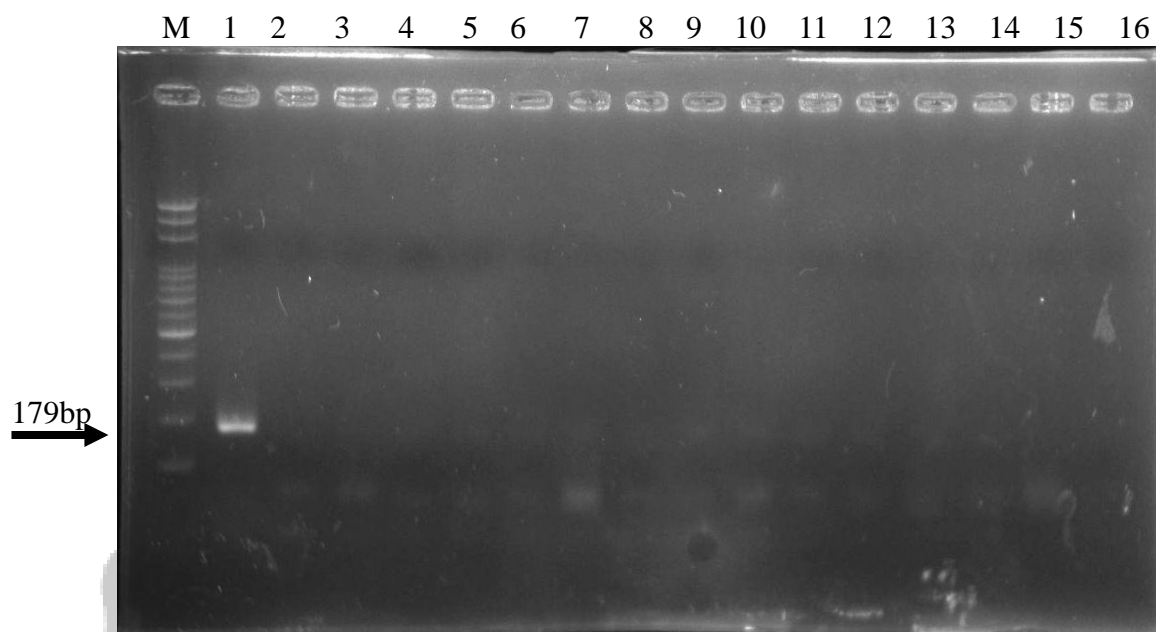
圖一、針對 *S. carnosus* 設計之 PCR 引子組，對目標菌株與非目標菌之 PCR 專一性檢測結果。(*S. carnosus* PCR product size 108 bp)

Lane M : 100 bp ladder , Lane 1 : *S. carnosus* BCRC 12922 、 Lane2~15: *S. epidermidis* ATCC 12228 、 *Streptococcus mutans* BCRC 10793 、 *Bacillus subtilis* BCRC 10267 、 *S. epidermidis* BCRC 11030 、 *Micrococcus varians* BCRC 11272、*Streptomyces chrysomallus* BCRC 11511、*S.intermedius* BCRC 1257 、 *Staphylococcus hyicus* BCRC 12925 、 *Staphylococcus warneri* BCRC 12929 、 *S. lentus* BCRC 12926 、 *S. epidermidis* BCRC 17069 、 *S. aureus* 、 BCRC 10782 、 *S. sciuri* BCRC 12927 、 *S. simulans* BRCR12928 、
Lane 16 : blank control



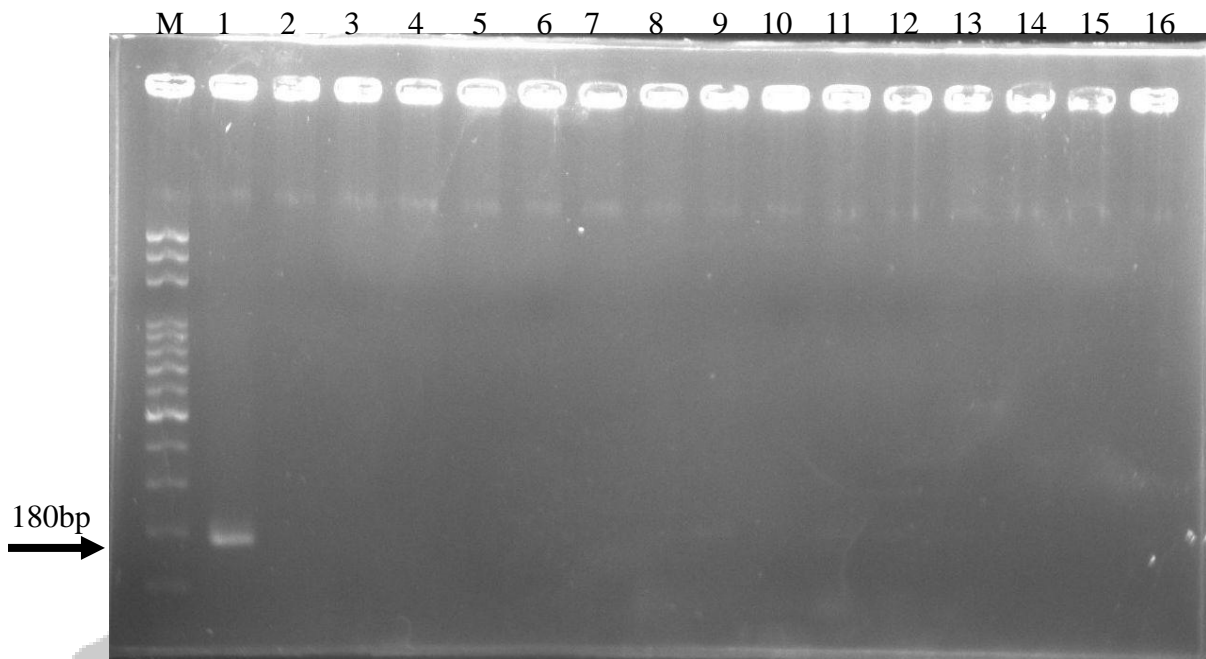
圖二、針對 *S. hyicus* 設計之 PCR 引子組，對目標菌株與非目標菌之 PCR 專一性檢測結果。(*S. hyicus* PCR product size **192 bp**)

Lane M : 100 bp ladder , Lane 1 : *S. hyicus* BCRC12925 , Lane 2~15: *S. epidermidis* ATCC 12228 、
Streptococcus mutans BCRC 10793 、*Bacillus subtilis* BCRC 10267 、*S. epidermidis* BCRC 11030 、
Micrococcus varians BCRC 11272 、*Streptomyces chrysomallus* BCRC 11511 、*S. intermedius* BCRC 15235 、
S. carnosus BCRC 12922 、*S. warneri* BCRC 12929 、*S. lentus* BCRC 12926 、*S. epidermidis* BCRC 17069 、
S. aureus BCRC 10782 、*S. sciuri* BCRC 12927 、*S. simulans* BRRC12928 、 Lane 16 : blank control



圖三、針對 *S. intermedius* 引設計之 PCR 引子組，對目標菌株與非目標菌之 PCR 專一性檢測結果。(Staphylococcus intermedius PCR product size 179 bp)

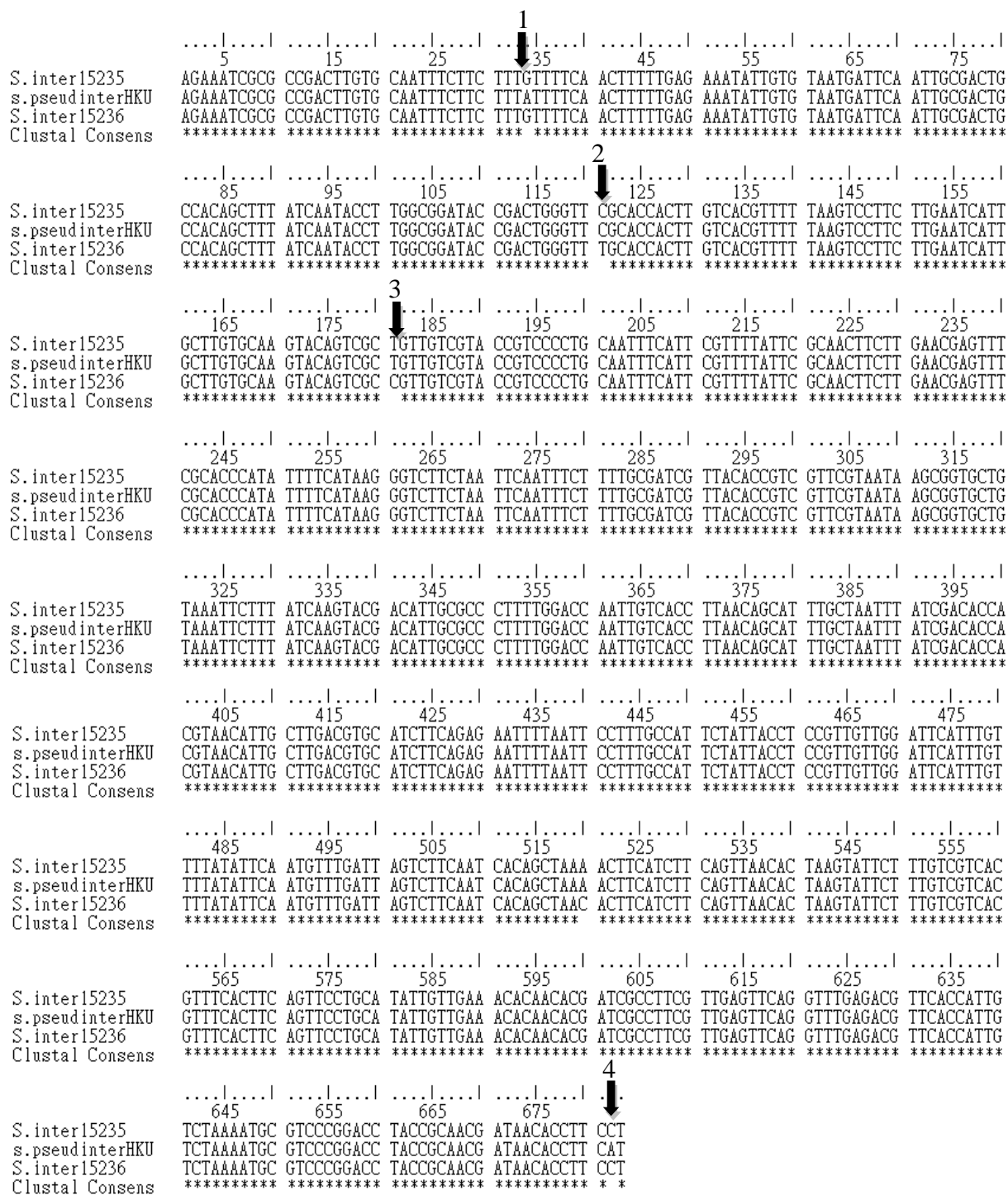
Lane M : 100 bp ladder , Lane 1 : *S. intermedius* BCRC15235 、 Lane2~15: *S. epidermidis* ATCC 12228、*Streptococcus mutans* BCRC 10793、*Bacillus subtilis* BCRC 10267、*S. epidermidis* BCRC 11030、*Micrococcus varians* BCRC 11272、*Streptomyces chrysomallus* BCRC 11511、*S. carnosus* BCRC 12922、*S. hyicus* BCRC12925、*Staphylococcus warneri* BCRC 12929、*S. lentus* BCRC 12926、*S. epidermidis* BCRC 17069、*S. aureus* BCRC 10782、*S. sciuri* BCRC 12927、*S. simulans* BRCCR12928、Lane 16: blank control



圖四、針對 *S. xylosus* 引設計之 PCR 引子組，對目標菌株與非目標菌之 PCR 專一性檢測結果。(*Staphylococcus xylosus* PCR product size **180 bp**)

Lane M : 100 bp ladder , Lane 1 : *S. xyl-F/S. xyl-R* 針對 *S. xylosus* BCRC15442 、 Lane2~15: *S. epidermidis* ATCC 12228 、 *Streptococcus mutans* BCRC 10793 、 *Bacillus subtilis* BCRC 10267 、 *S. epidermidis* BCRC 11030 、 *Micrococcus varians* BCRC 11272 、 *Streptomyces chrysomallus* BCRC 11511 、 *S. intermedius* BCRC 15235 、 *S. carnosus* BCRC 12922 、 *S. warneri* BCRC 12929 、 *S. lentus* BCRC 12926 、 *S. epidermidis* BCRC 17069 、 *S. aureus* BCRC 10782 、 *S. sciuri* BCRC 12927 、 *S. simulans* BRCR12928 、
Lane 16 : blank control

S. pseudintermedius 與 *S. intermedius* 序列比對結果

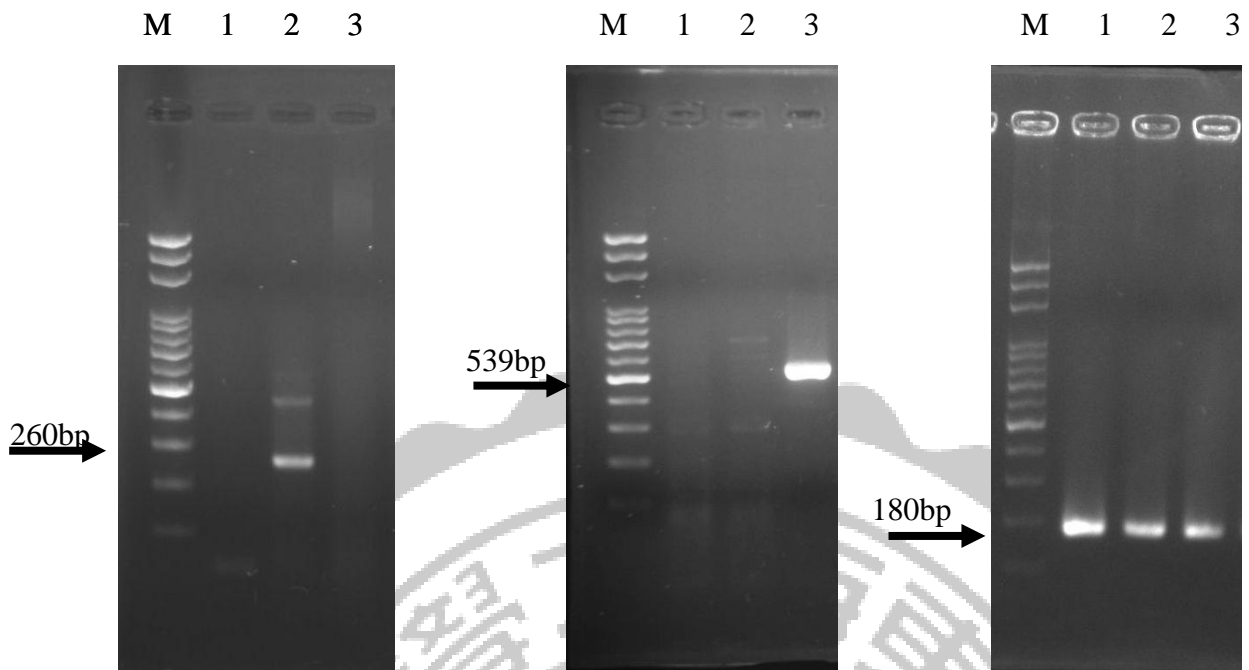


圖五、*S. intermedius*、*S. pseudintermedius* 序列比對結果。

依序為 *S. intermedius* BCRC 15235、*S. pseudintermedius* HKU10-03 與、*S. intermedius* BCRC 15236，此段基因為 groEL-IGR-groES 序列。

*表示序列完全相符，由本圖得知 *S. intermedius* 及 *S. pseudintermedius* HKU10-03

↓ 標示處為不同處。



圖六、不同引子組鑑定 *S. xylosus* 結果，(a)左圖(b)中圖(c)右圖。

產物順序相同依序為 LaneM 為 100bpladder，Lane1 為 *S. xylosus* BCRC15235，Lane2 為 *S. xylosus* BCRC15236，Lane3 為 *S. xylosus* BCRC15442。

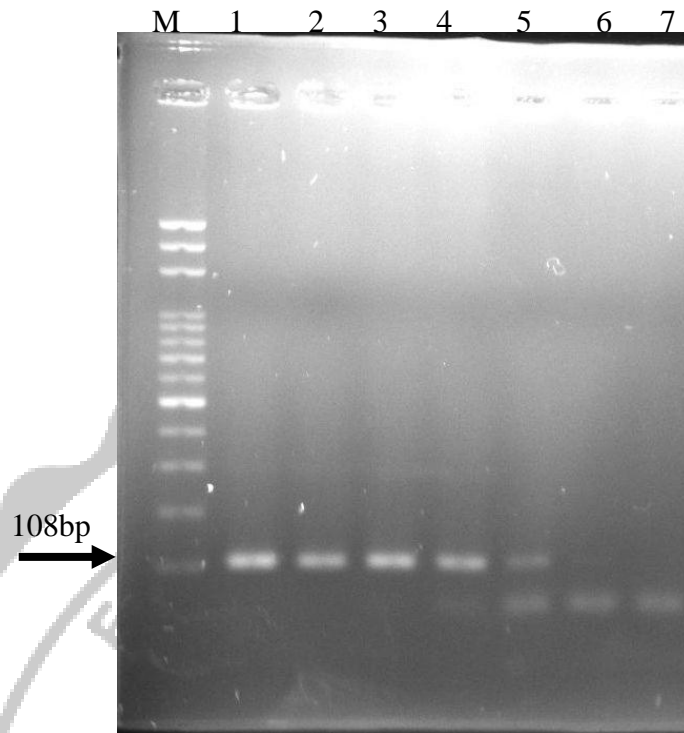
圖(a)使用引子組 STAX-XyI/STAX-XyII(Forsman *et al.* 1997)，產物大小 260bp。

圖(b)使用引子組 XYL-F/ XYL-R(Morot-Bizot *et al.* 2003)，產物大小 539bp。

圖(c)使用引子組 *S. syl*F/R(this study)，產物大小 180bp。

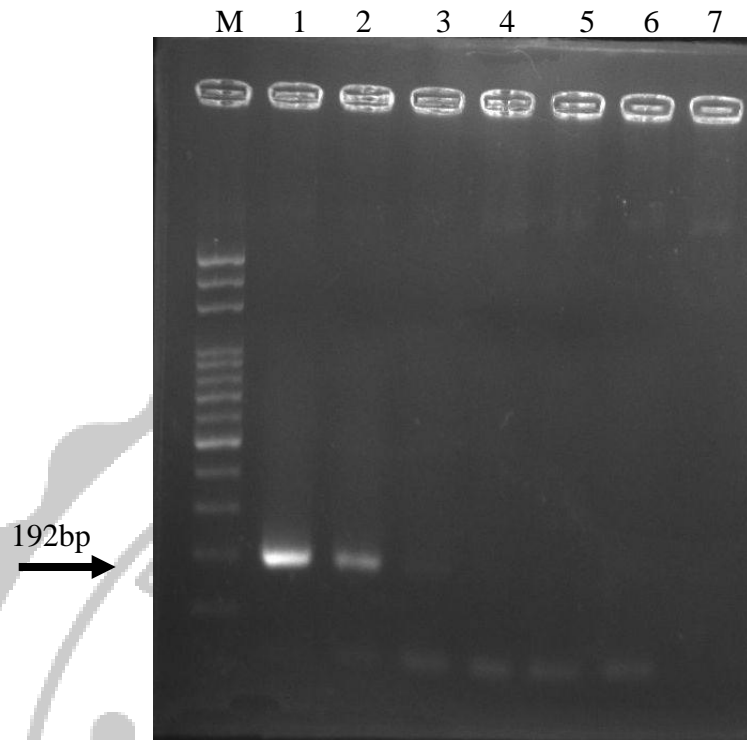
表六、葡萄球菌引子組靈敏度測試結果

Species	Detection limit		
	Water(CFU/mL)	Whole milk(CFU/mL)	Milk after enriched(CFU/mL)
<i>S. carnosus</i>	10 ²	10 ⁵	10 ⁰
<i>S. hyicus</i>	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁰
<i>S. intermedius</i>	10 ¹	10 ⁴	10 ⁰
<i>S. xylosus</i>	10 ²	10 ²	10 ⁰



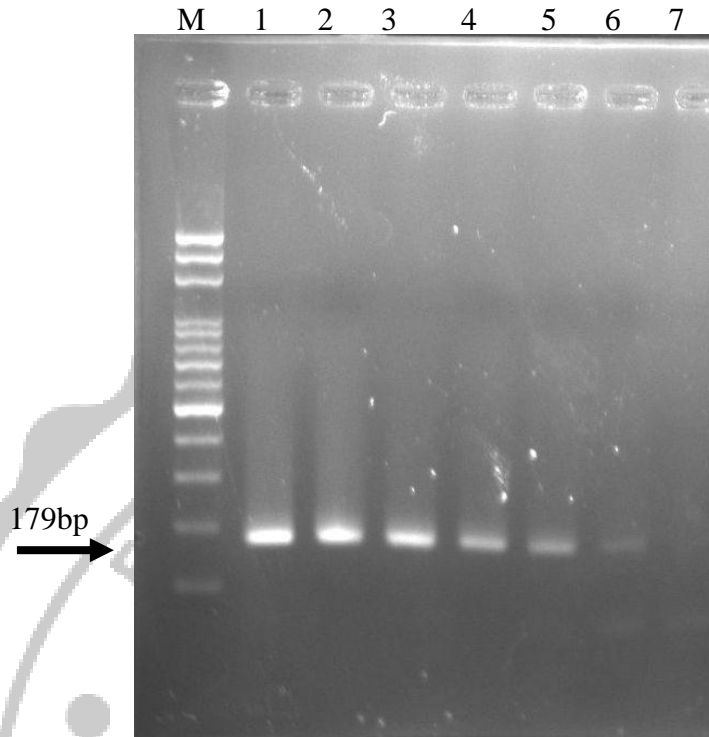
圖七、*S. carnosus* 於純水中靈敏度測試結果(108bp)。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 $N \times 10^6$ cfu/mL，Lane2 為 $N \times 10^5$ cfu/mL，Lane3 為 $N \times 10^4$ cfu/mL，Lane4 為 $N \times 10^3$ cfu/mL，Lane5 為 $N \times 10^2$ cfu/mL，Lane6 為 $N \times 10^1$ cfu/mL，Lane7 為 $N \times 10^0$ cfu/mL。



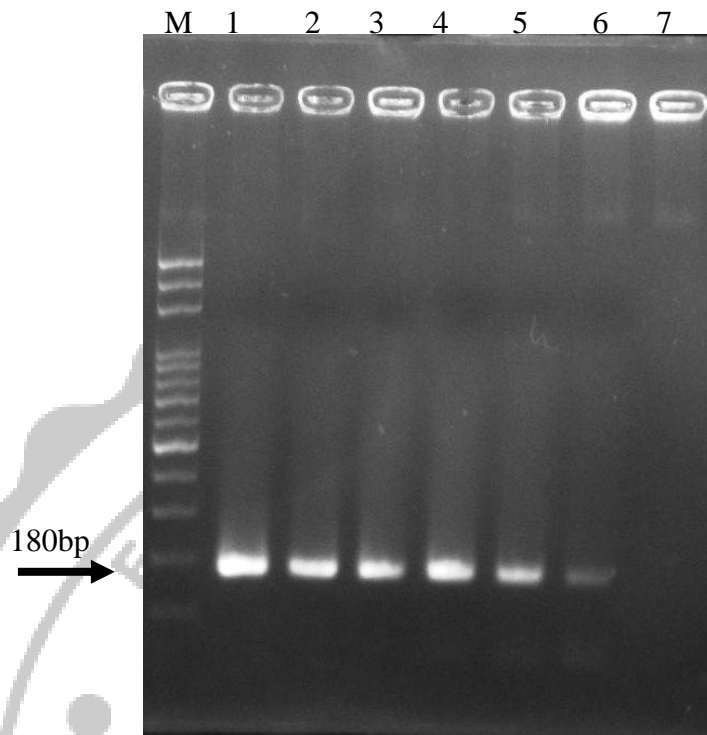
圖八、*S. hyicus* 於純水中靈敏度測試結果(192bp)。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 $N \times 10^6$ cfu/mL，Lane2 為 $N \times 10^5$ cfu/mL，Lane3 為 $N \times 10^4$ cfu/mL，Lane4 為 $N \times 10^3$ cfu/mL，Lane5 為 $N \times 10^2$ cfu/mL，Lane6 為 $N \times 10^1$ cfu/mL，Lane7 為 $N \times 10^0$ cfu/mL。



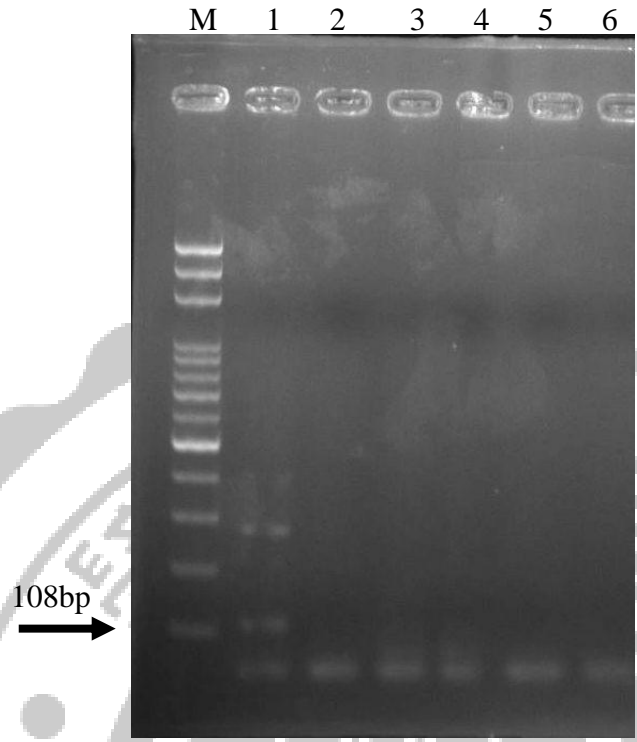
圖九、*S. intermedius* 於純水中靈敏度測試結果(179bp)。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 $N \times 10^6$ cfu/mL，Lane2 為 $N \times 10^5$ cfu/mL，Lane3 為 $N \times 10^4$ cfu/mL，Lane4 為 $N \times 10^3$ cfu/mL，Lane5 為 $N \times 10^2$ cfu/mL，Lane6 為 $N \times 10^1$ cfu/mL，Lane7 為 $N \times 10^0$ cfu/mL。



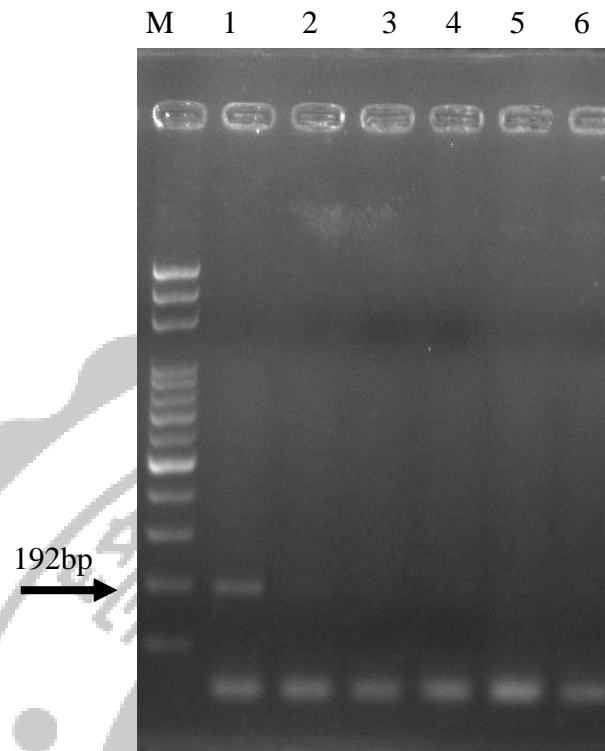
圖十、*S. xylosus* 於純水中靈敏度測試結果(180bp)。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 $N \times 10^6$ cfu/mL，Lane2 為 $N \times 10^5$ cfu/mL，Lane3 為 $N \times 10^4$ cfu/mL，Lane4 為 $N \times 10^3$ cfu/mL，Lane5 為 $N \times 10^2$ cfu/mL，Lane6 為 $N \times 10^1$ cfu/mL，Lane7 為 $N \times 10^0$ cfu/mL。



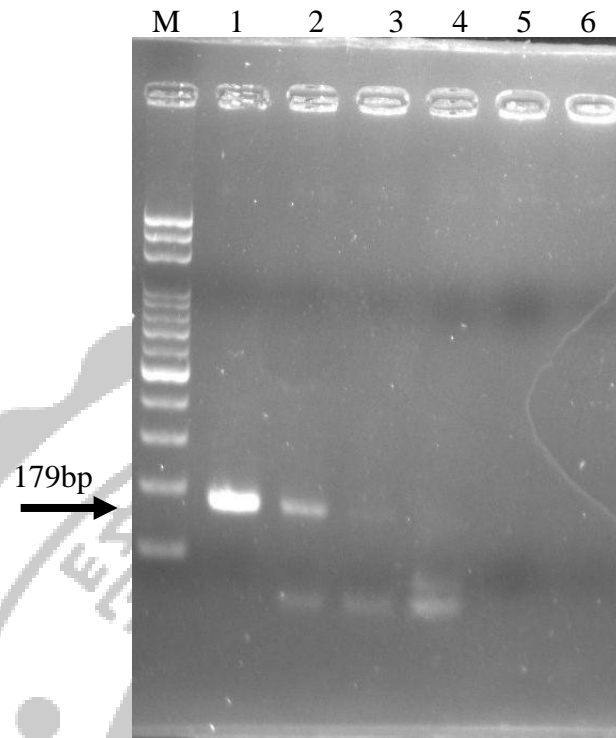
圖十一、*S. carnosus* 於牛乳中靈敏度測試結果(108bp)。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 $N \times 10^5$ cfu/mL，Lane2 為 $N \times 10^4$ cfu/mL，Lane3 為 $N \times 10^3$ cfu/mL，Lane4 為 $N \times 10^2$ cfu/mL，Lane5 為 $N \times 10^1$ cfu/mL，Lane6 為 $N \times 10^0$ cfu/mL。



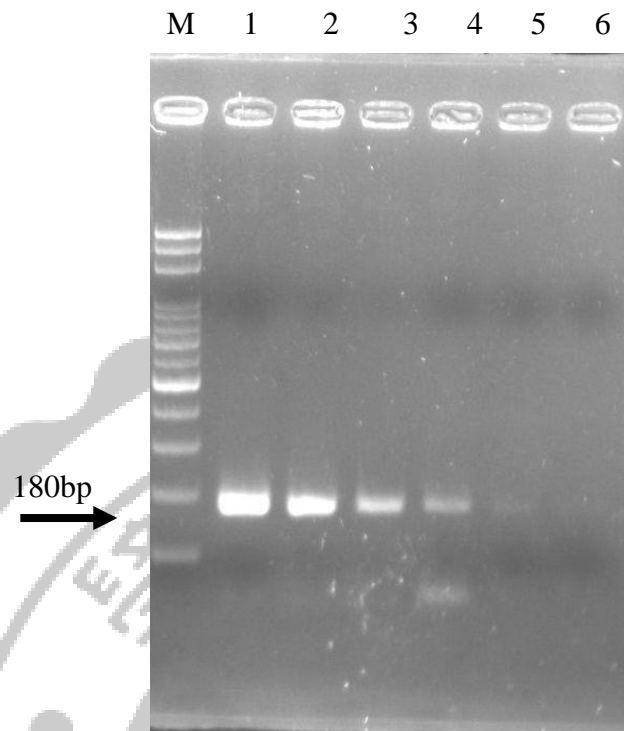
圖十二、*S. hyicus* 於牛乳中靈敏度測試結果(192bp)。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 $N \times 10^5$ cfu/mL，Lane2 為 $N \times 10^4$ cfu/mL，Lane3 為 $N \times 10^3$ cfu/mL，Lane4 為 $N \times 10^2$ cfu/mL，Lane5 為 $N \times 10^1$ cfu/mL，Lane6 為 $N \times 10^0$ cfu/mL。



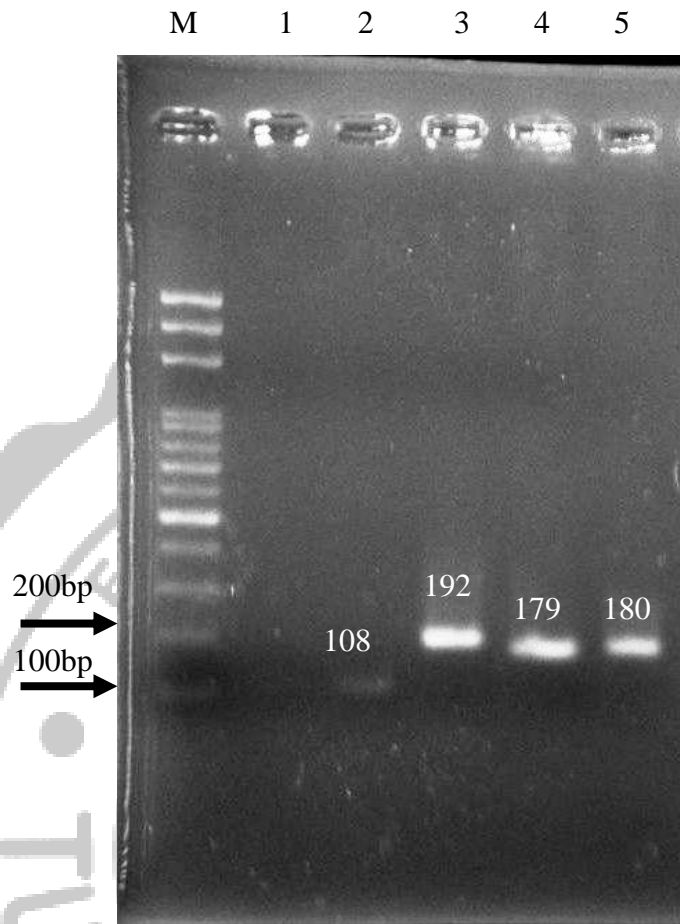
圖十三、*S. intermedius* 於牛乳中靈敏度測試結果(179bp)。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 $N \times 10^5$ cfu/mL，Lane2 為 $N \times 10^4$ cfu/mL，Lane3 為 $N \times 10^3$ cfu/mL，Lane4 為 $N \times 10^2$ cfu/mL，Lane5 為 $N \times 10^1$ cfu/mL，Lane6 為 $N \times 10^0$ cfu/mL。



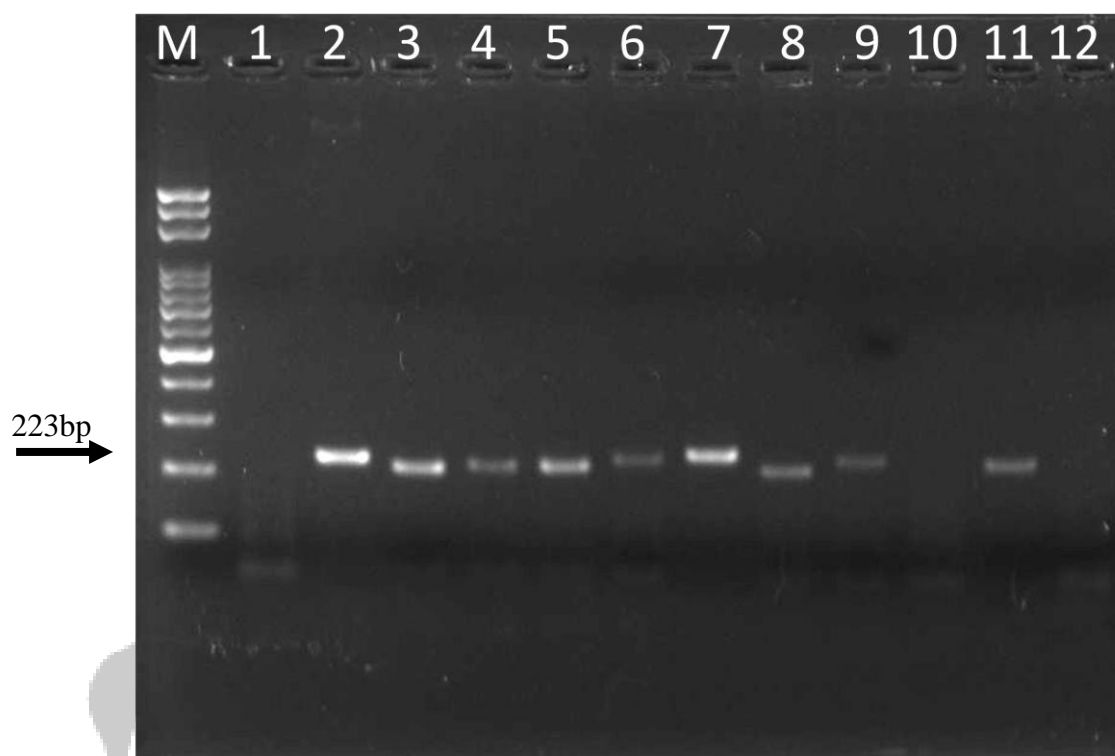
圖十四、*S. xylosus* 於牛乳中靈敏度測試結果(180bp)。

Lane M 為 100bp ladder，Lane1 為 $N \times 10^5$ cfu/mL，Lane2 為 $N \times 10^4$ cfu/mL，Lane3 為 $N \times 10^3$ cfu/mL，Lane4 為 $N \times 10^2$ cfu/mL，Lane5 為 $N \times 10^1$ cfu/mL，Lane6 為 $N \times 10^0$ cfu/mL。



圖十五、牛乳靈敏度經過 TSB 增菌培養檢測結果。

LaneM 為 100bp ladder，Lane1 為 TSB 空白對照組，Lane2 為 *S. carnonus*(108bp) $N \times 10^0$ cfu/mL，Lane3 為 *S. hyicus*(192bp) $N \times 10^0$ cfu/mL，Lane4 為 *S. intermedium* (179bp) $N \times 10^0$ cfu/mL，Lane5 為 *S. xylosum*(180bp) $N \times 10^0$ cfu/mL。



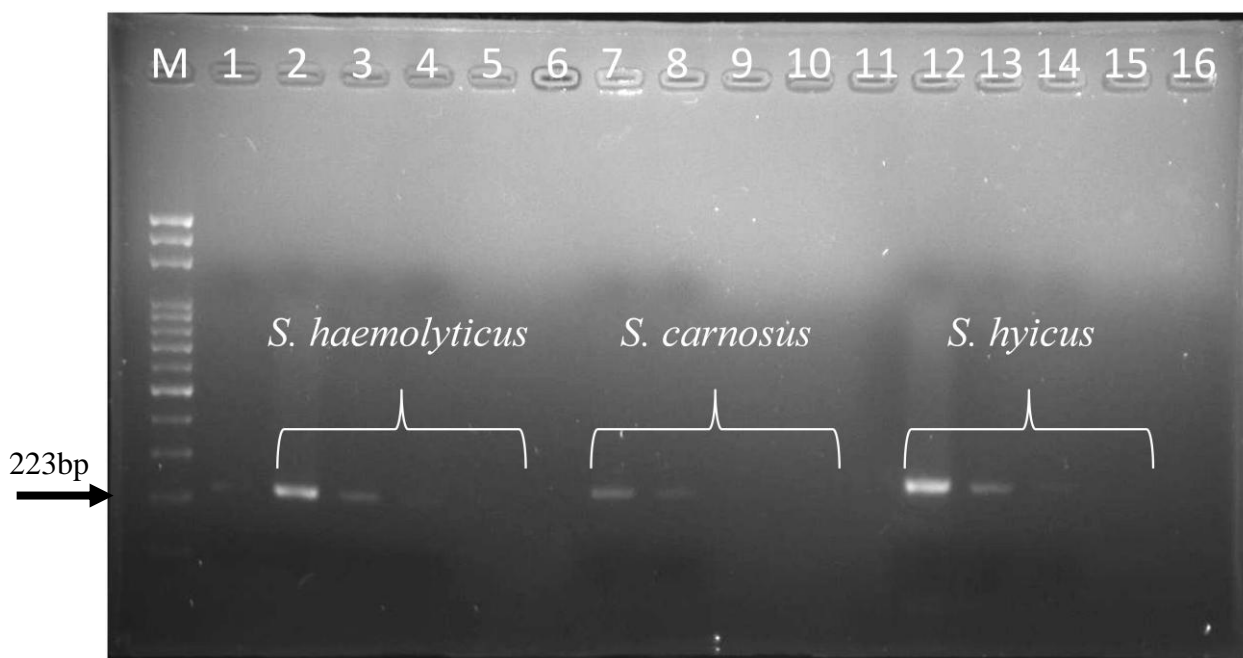
圖十六、Universal primer 針對 *Staphylococci* 檢測結果。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為空白對照組，Lane2 為 *S. aureus* ATCC700699，Lane3 為 *S. epidermidis* BCRC12228，Lane4 為 *S. saprophylicoccus* ATCC15305，Lane5 為 *S. haemolyticus* BCRC15240，Lane6 為 *S. carnosus* BCRC12922，Lane7 為 *S. hyicus* BCRC12925，Lane8 為 *S. intermedius* BCRC15235，Lane9 為 *S. xylosus* BCRC15442，Lane10 為 *S. cohnii* BCRC 12155，Lane11 為 *S. warneri*，Lane12 為 BCRC 12929 *S. simulans* BCRC 10778



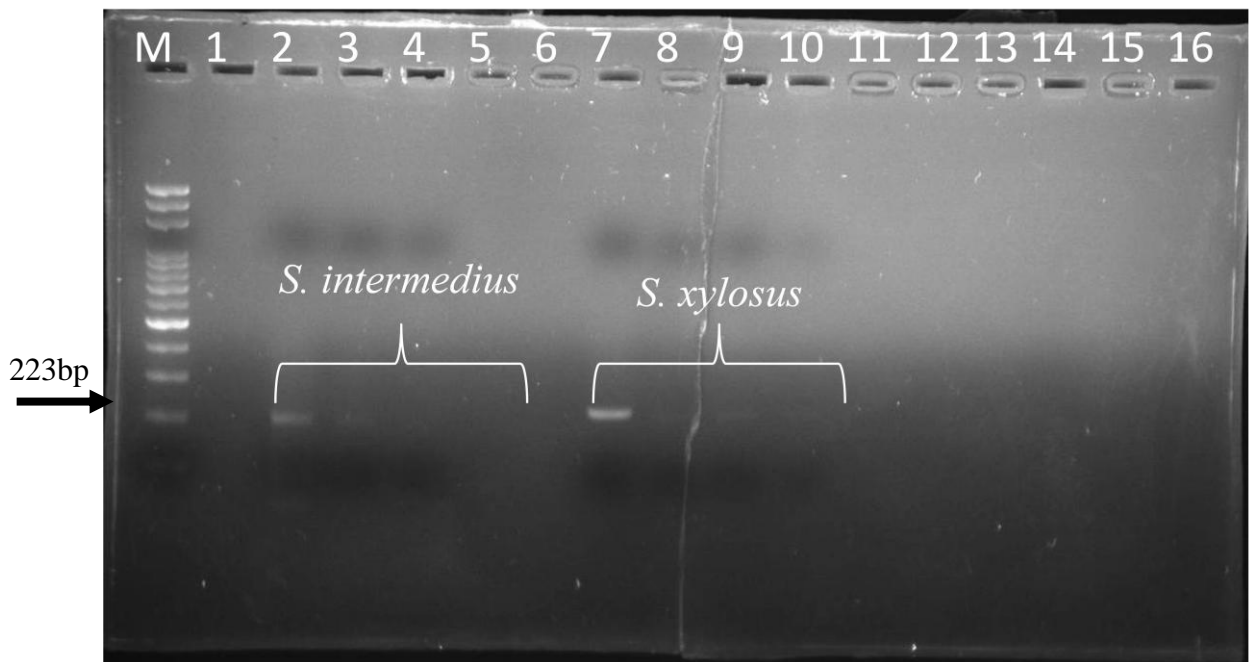
圖十七、 Universal primer 針對 Staphylococci 牛乳靈敏度檢測結果。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 Blank，Lane2~6 為 *S. aureus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ ，Lane7~11 為 *S. epidermidis* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ ，Lane12~16 為 *S. saprophylicoccus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ 。



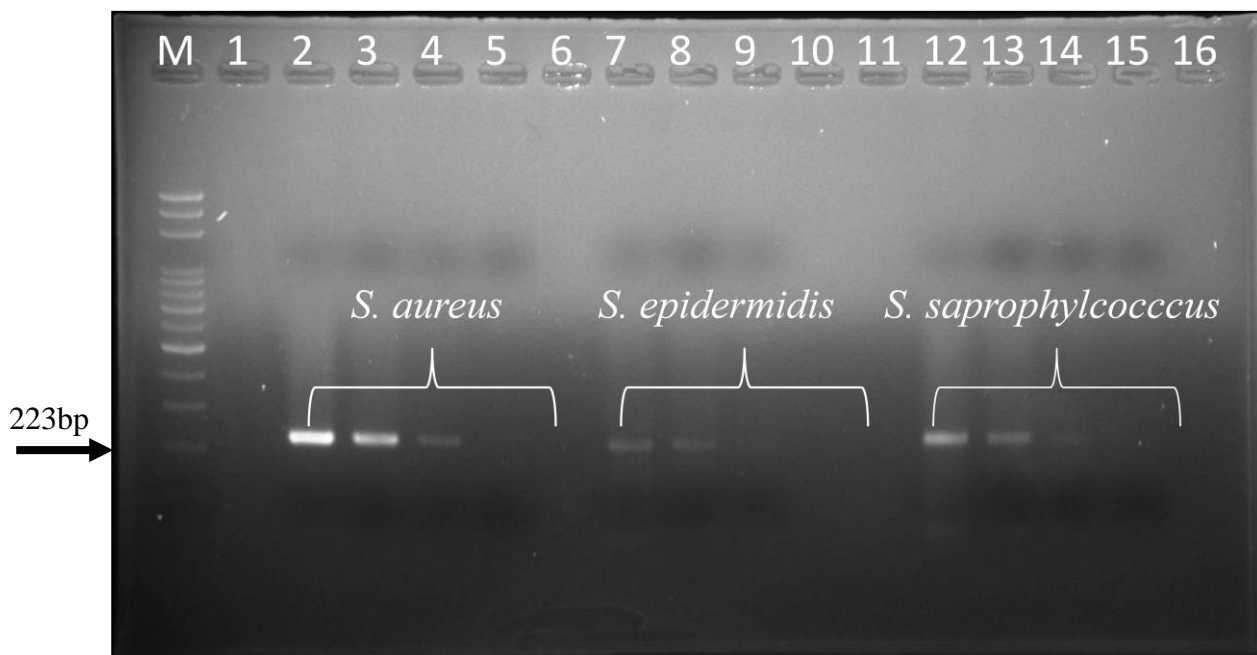
圖十八、Universal primer 針對 *Staphylococci* 牛乳靈敏度檢測結果

Lane M 為 100bp Ladder, Lane 1 為 Blank, Lane 2~6 為 *S. haemolyticus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$, Lane 7~11 *S. carnosus* 為 $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$, Lane 12~16 為 *S. hyicus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ 。



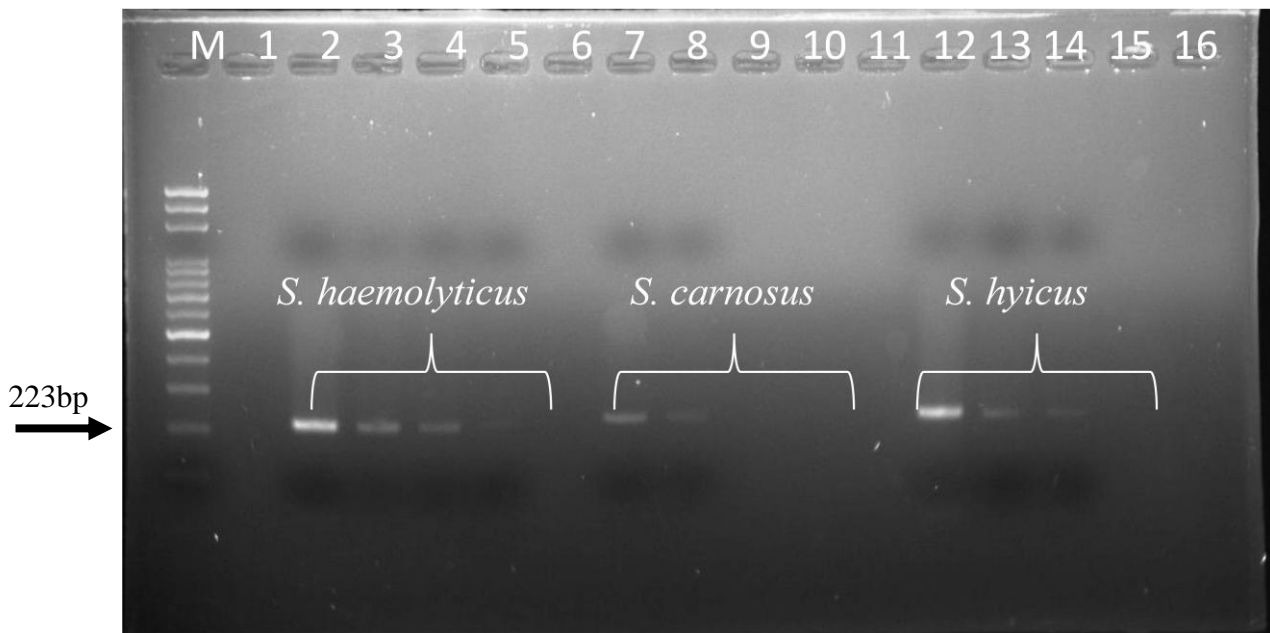
圖十九、Universal primer 針對 *Staphylococci* 牛乳靈敏度檢測結果。

Lane M 為 100bp Ladder, Lane1 為 Blank, Lane2~6 為 *S. intermedius* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$, Lane7~11 為 *S. xylosus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ 。



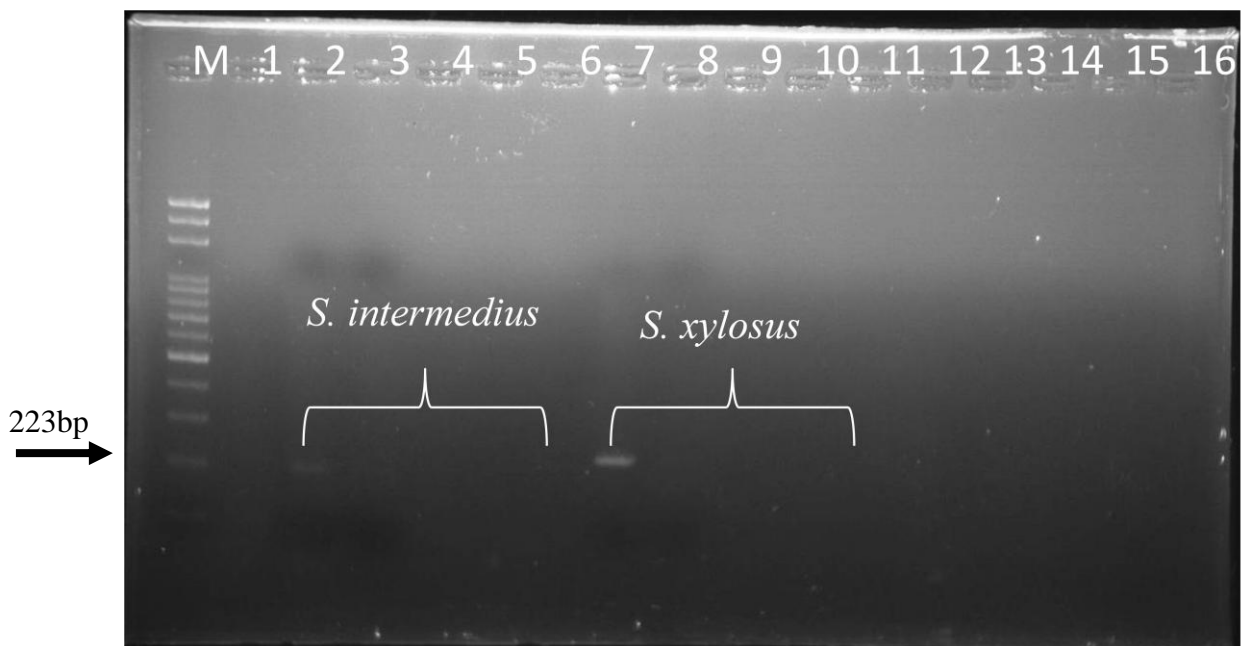
圖二十、Universal primer 針對 *Staphylococci* 尿液靈敏度檢測結果。

Lane M 為 100bp Ladder，Lane1 為 Blank，Lane2~6 為 *S. aureus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ ，Lane7~11 為 *S. epidermidis* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ ，Lane12~16 為 *S. saprophylicoccus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ 。



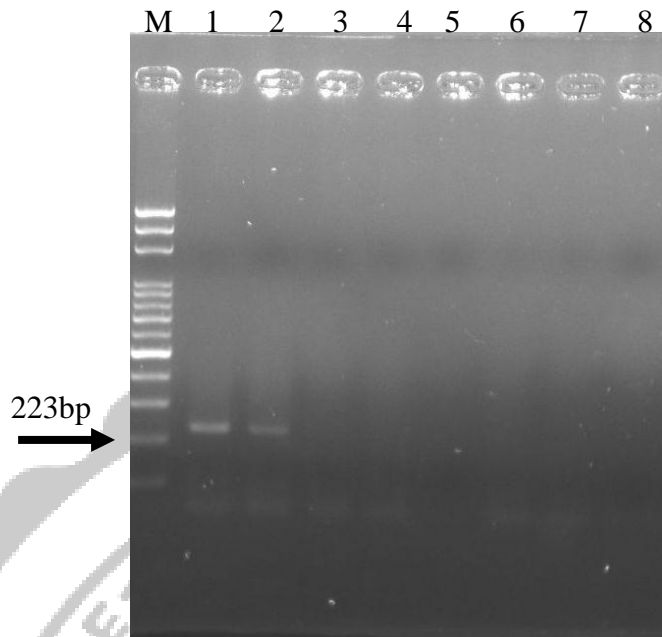
圖二十一、Universal primer 針對 *Staphylococci* 尿液靈敏度檢測結果。

Lane M 為 100bp Ladder, Lane 1 為 Blank, Lane 2~6 為 *S. haemolyticus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$, Lane 7~11 為 *S. carnosus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$, Lane 12~16 為 *S. hyicus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ 。

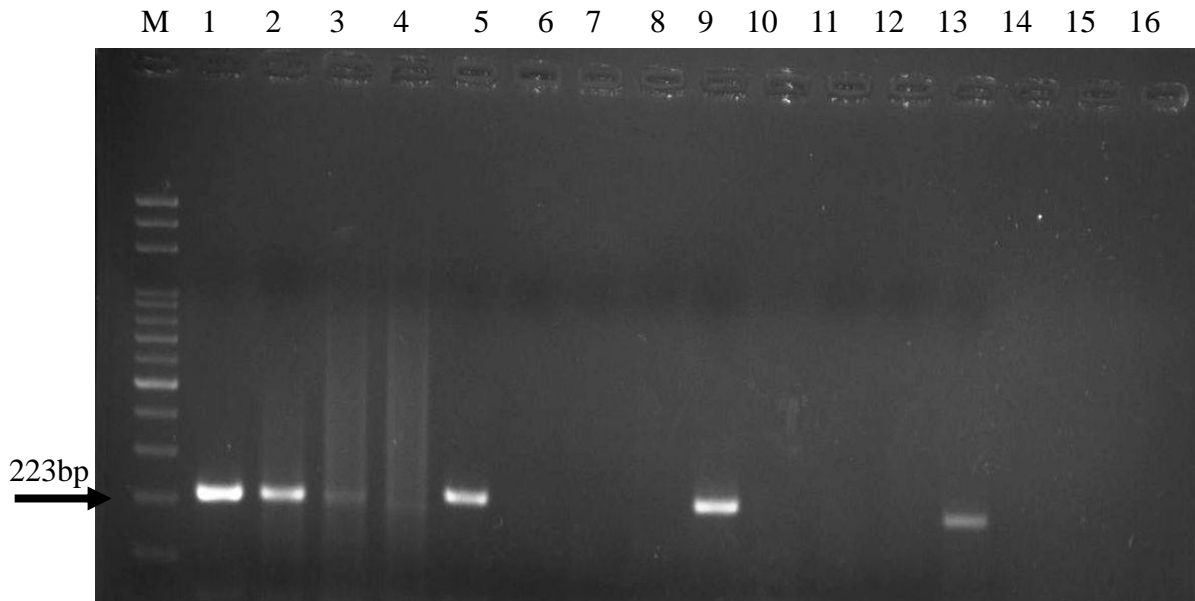


圖二十二、Universal primer 針對 *Staphylococci* 尿液靈敏度檢測結果。

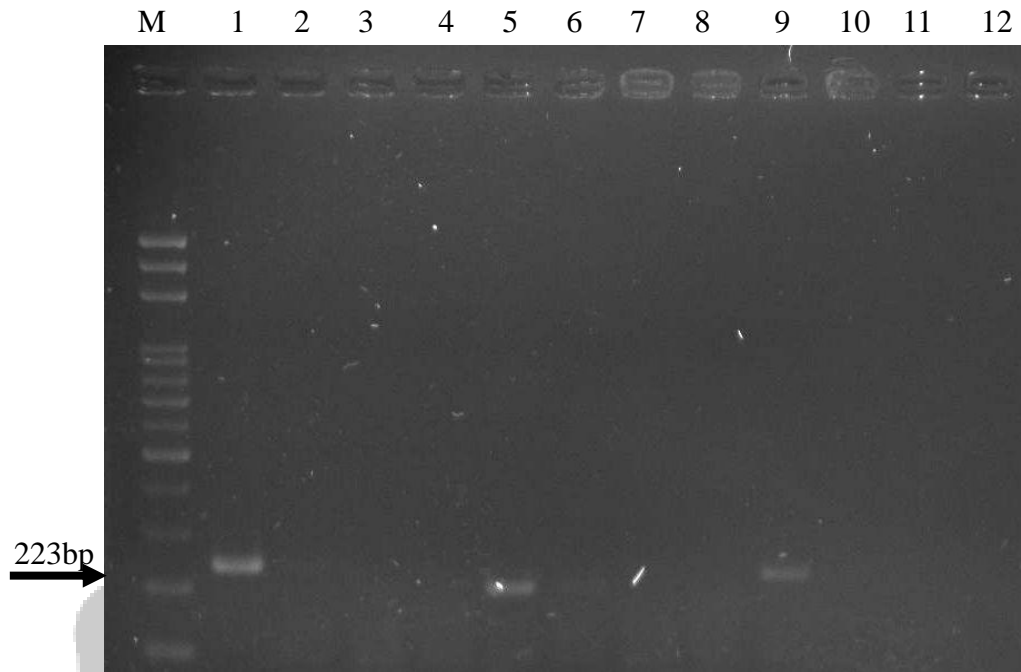
LaneM 為 100bp Ladder, Lane1 為 Blank, Lane2~6 為 *S. intermedius* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$, Lane7~11 為 *S. xylosus* $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$ 。



圖二十三、為 Universal primer 針對 *Staphylococci* 血液靈敏度檢測結果。
Lane M 100bp Ladder，Lane 1 ~7 為 *S. aureus* ATCC700699 $N \times 10^6 \sim N \times 10^0$ 。



圖二十四、Universal primer 針對 *Staphylococci* 血液靈敏度檢測結果。
 LaneM 為 100bp Ladder，Lane1~4 為 *S. epidermidius* $N \times 10^6 \sim N \times 10^3$ 、Lane5~8 為 *S. saprophyticus* $N \times 10^6 \sim N \times 10^3$ 、Lane9~12 為 *S. haemolyticus* $N \times 10^6 \sim N \times 10^3$ 、Lane13~16 為 *S. carnosus* $N \times 10^6 \sim N \times 10^0$

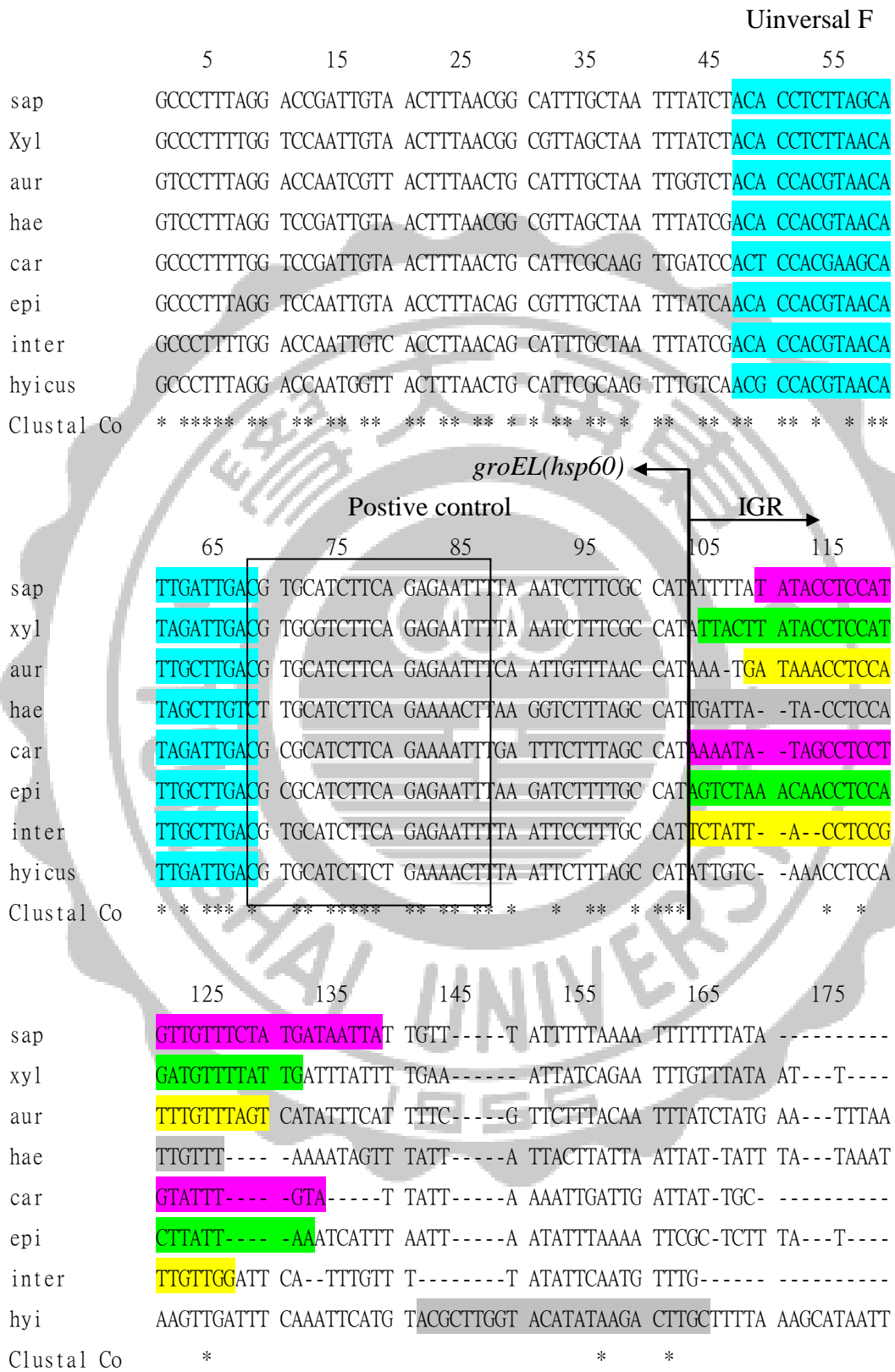


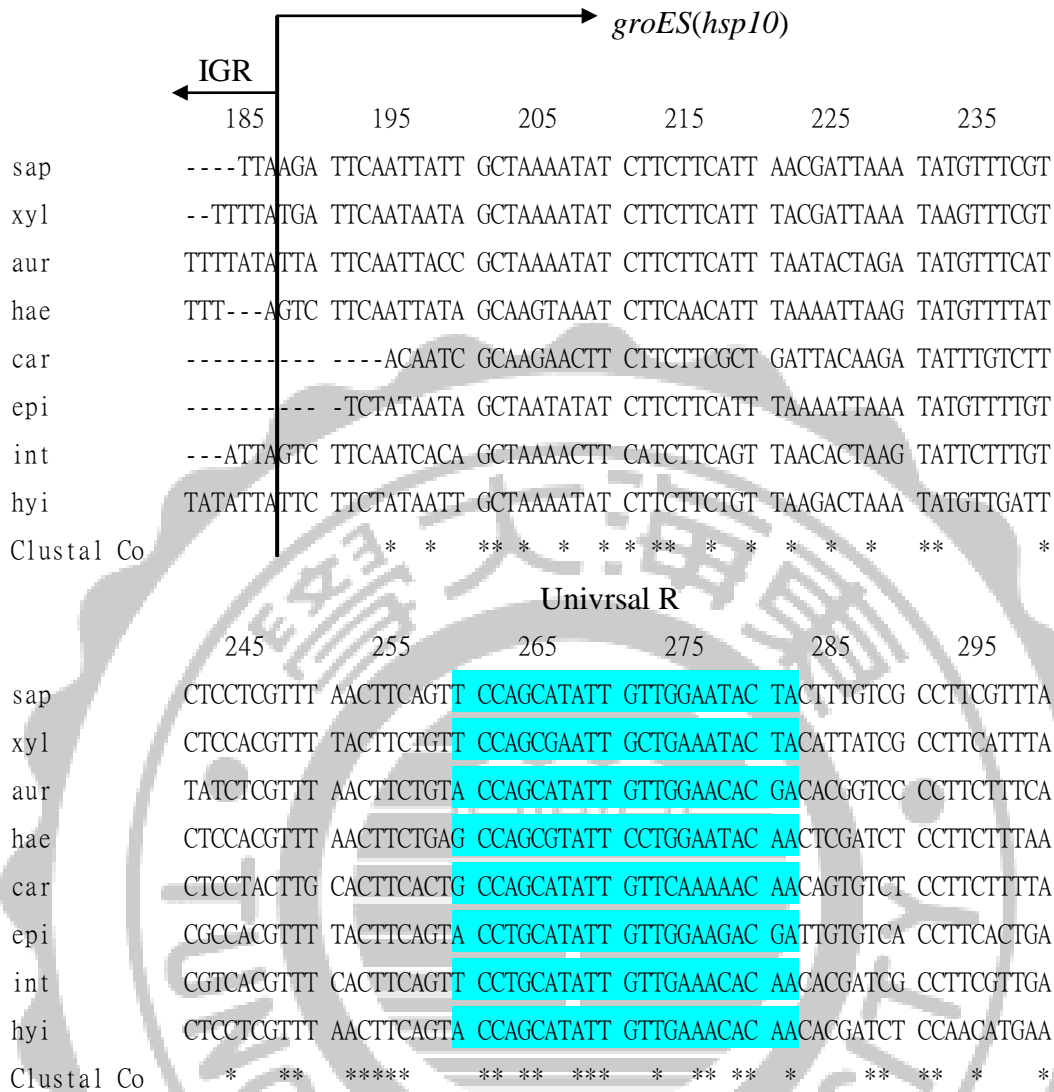
圖二十五、Universal primer 針對 *Staphylococci* 血液靈敏度檢測結果。
 LaneM 為 100bp Ladder，Lane1~4 為 *S. hyicus* $N \times 10^6 \sim N \times 10^3$ 、Lane5~8 為 *S. intermedius* $N \times 10^6 \sim N \times 10^3$ 、Lane9~12 為 *S. xylosus* $N \times 10^6 \sim N \times 10^3$

表七、本實驗所使用之探針

Target organism	Oligonucleotide sequence (5'-3')	探針濃度	來源
<i>S. aureus</i>	ACTAAACAAATGGAGGTTTATCTTTTTTTTTTTTTTTTT	20nmol/μ L	(張予馨 2009)
<i>S. carnosus</i>	TTTTTTTTTTTTTTTTAAAATATAGCCTCCTGTATTTGTA	20nmol/μ L	(This study)
<i>S. epidermidis</i>	TTTTTTTTTTTTTTTTAATAAGTGGAGGTTGTTTAGACTT	20nmol/μ L	(張予馨 2009)
<i>S. haemolyticus</i>	TTTTTTTTTTTTTTTTATTTAAACAATGGAGGTATAATCA	20nmol/μ L	(張予馨 2009)
<i>S. hyicus</i>	TTTTTTTTTTTTTTTTTCGCTTGGTACATATAAGACTTGC	20nmol/μ L	(This study)
<i>S. intermedius</i>	CCAACAACGGAGGTAATAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	20nmol/μ L	(This study)
<i>S. saprophyticus</i>	TAATTATCATAGAAACAACATGGAGGTATTTTTTTTTTTT	20nmol/μ L	(張予馨 2009)
<i>S. xylosus</i>	CAATAAAACATCATGGAGGTATAAGTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	20nmol/μ L	(This study)
Positive	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAARTTYTCTGAAGATGCRCG	50nmol/μ L	(This study)

圖二十六、探針共通性引子組示意圖





本圖為使用 clustalx 方法比對結果

sap:*S. saprophyticus*

xyl:*S. xylosus*

aur:*S. aureus*

hae:*S. haemolyticus*

car:*S. carnosus*

epi:*S. epidermidius*

int:*S. intermedius*

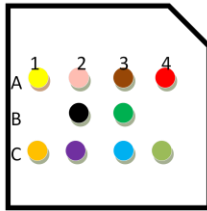
hyi:*S. hyicus*











□ 為 positive control 設計處

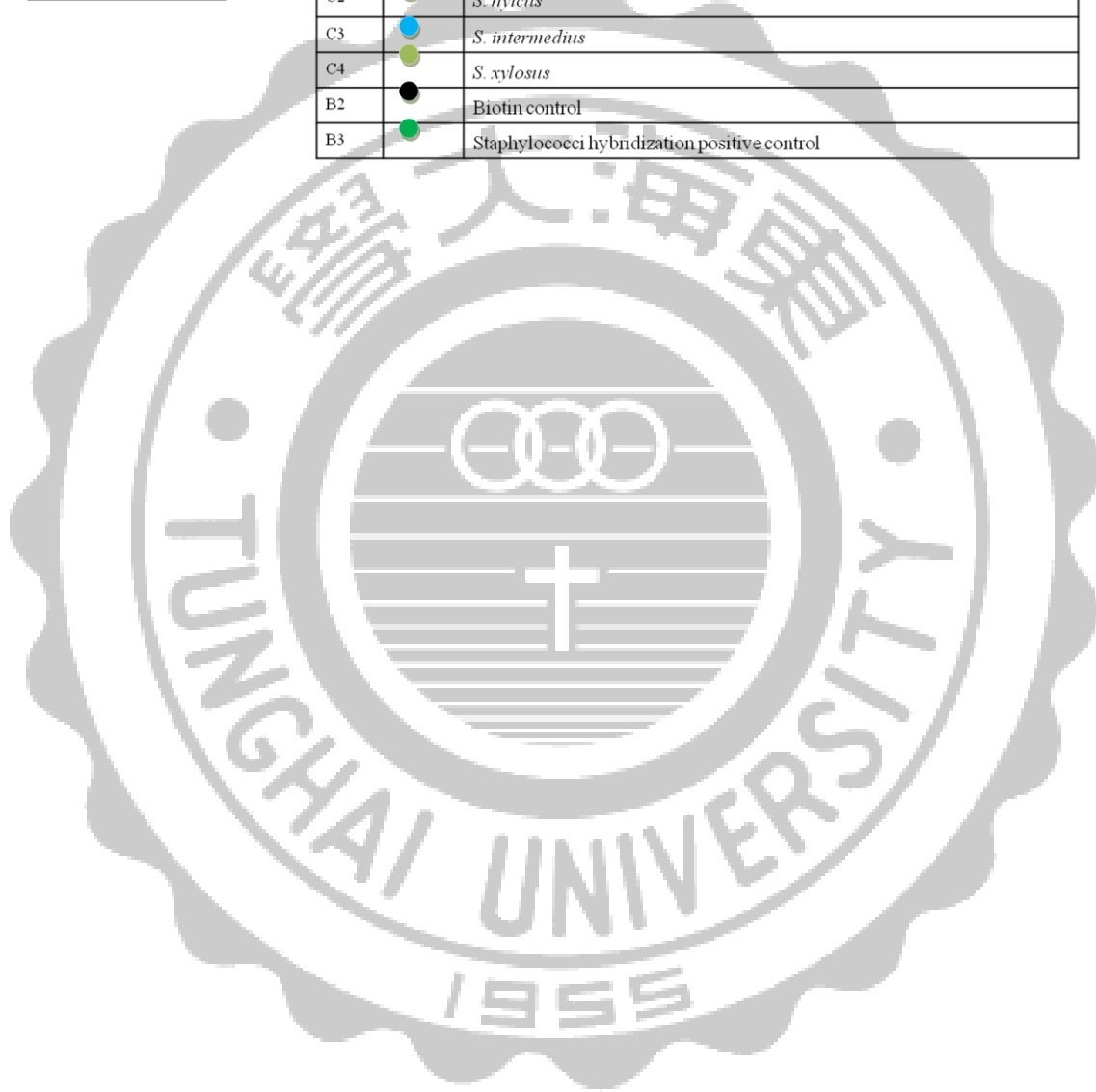
IGR 標記處，即為該菌種探針位置

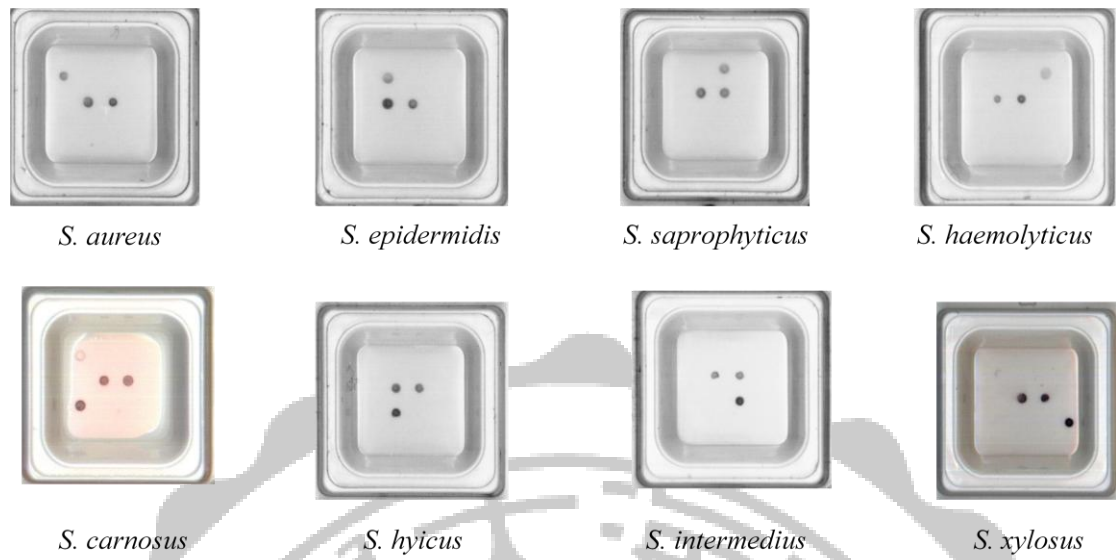
表八、Staphylococci 晶片探針規格

葡萄球菌整合8種葡萄球菌之探針，佈點方式如下所示。



A1		<i>S. aureus</i>
A2		<i>S. epidermidis</i>
A3		<i>S. saprophyticus</i>
A4		<i>S. haemolyticus</i>
C1		<i>S. carnosus</i>
C2		<i>S. hyicus</i>
C3		<i>S. intermedius</i>
C4		<i>S. xylosus</i>
B2		Biotin control
B3		Staphylococci hybridization positive control





圖二十七 *Staphylococci* 晶片於 45°C 檢測結果。

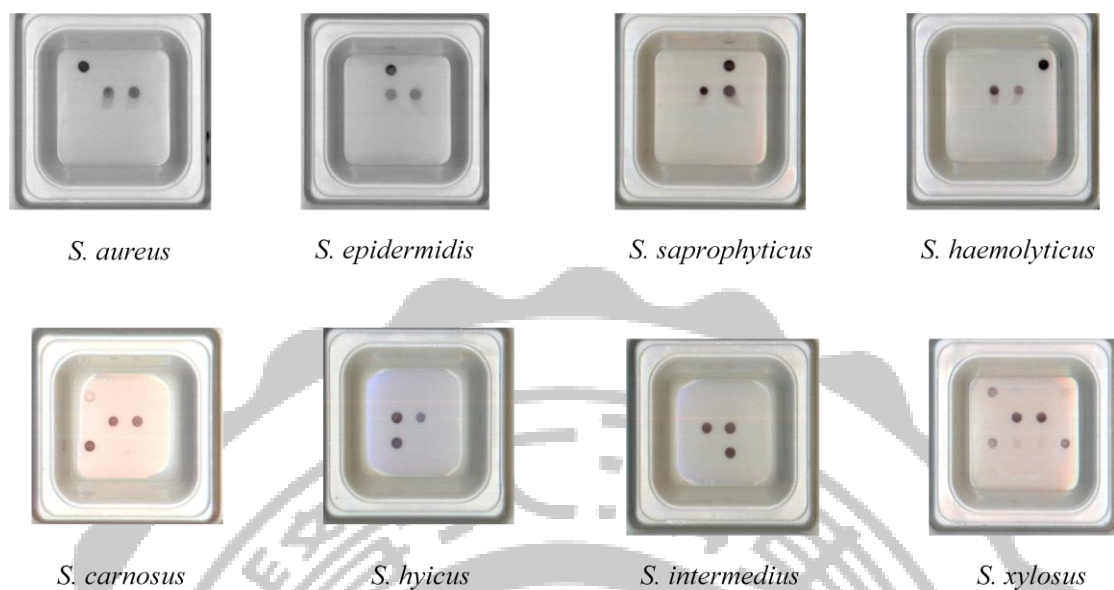
S. aureus、*S. epidermidis*、*S. saprophyticus*、*S. haemolyticus*、*S. carnosus*、*S. hyicus*、*S. intermedius*、*S. xylosus*。

表九、共通性引子組及晶片靈敏度結果

Methods	Milk		Urine		Blood ^a		Blood ^b	
	Universal primer	Bio Chip	Universal primer	Bio Chip	Universal primer	Bio Chip	Universal primer	Bio Chip
<i>S. aureus</i>	10 ⁴	10 ²	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ³	10 ²	10 ²
<i>S. carnosus</i>	10 ⁵	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ²	10 ²
<i>S. epidermidis</i>	10 ⁵	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁵	10 ³	10 ²	10 ²
<i>S. haemolyticus</i>	10 ⁴	10 ²	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ²	10 ²
<i>S. hyicus</i>	10 ⁴	10 ²	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁶	10 ²	10 ²
<i>S. intermedius</i>	10 ⁵	10 ²	10 ⁵	10 ²	10 ⁵	10 ⁵	10 ²	10 ²
<i>S. saprophyticus</i>	10 ⁵	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ²	10 ²
<i>S. xylosus</i>	10 ⁵	10 ²	10 ⁵	10 ²	10 ⁶	10 ⁶	10 ²	10 ²

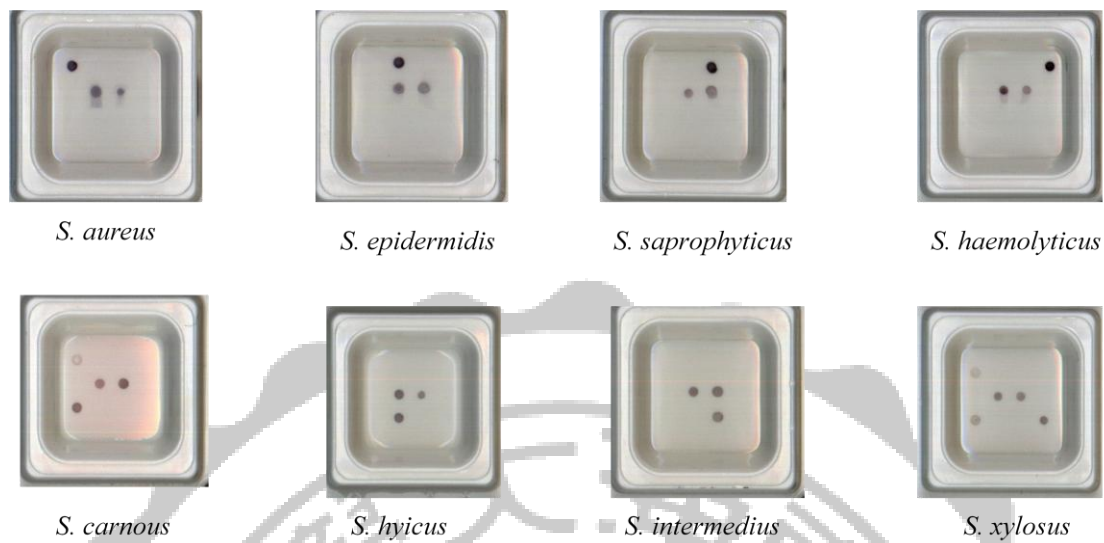
a: Blood sample no enrichment.

b: Blood sample after TSB enrichment for 18-24 hr.



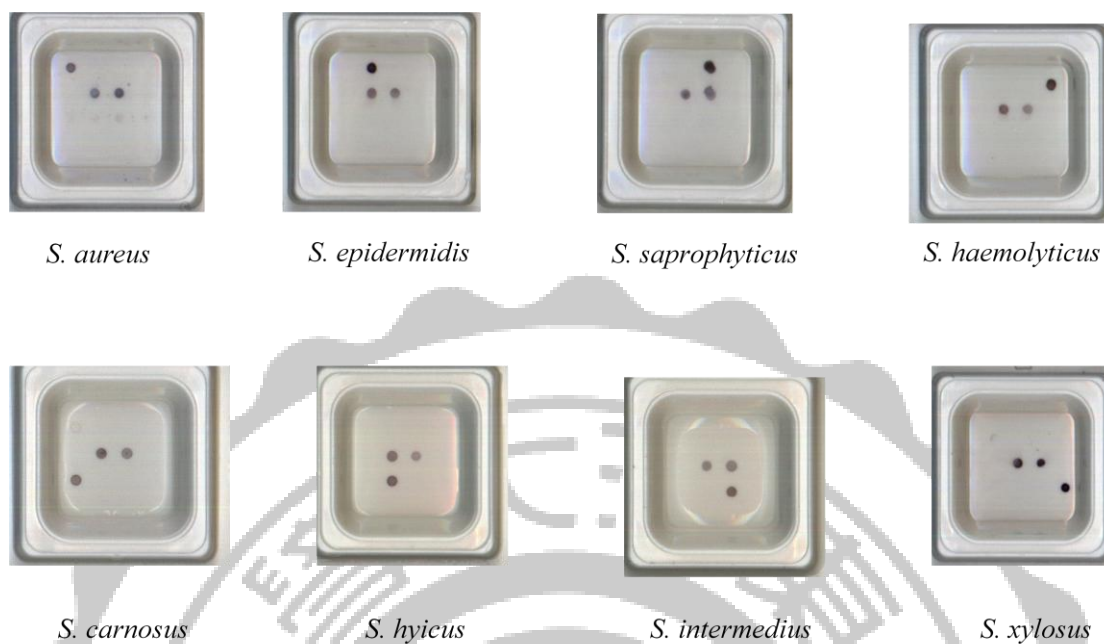
圖二十八、牛乳晶片靈敏度於 45°C 檢測結果。

S. aureus 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. epidermidis* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. saprophyticus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. haemolyticus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. carnosus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. hyicus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. intermedius* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. xylosus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL。



圖二十九、尿液晶片於 45°C 檢測結果

S. aureus 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. epidermidis* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. saprophyticus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. haemolyticus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. carnosus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. hyicus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. intermedius* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. xylosus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL。



圖三十、血液晶片靈敏度於 45°C 檢測結果。

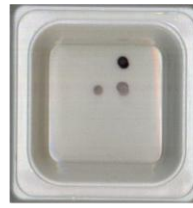
S. aureus 靈敏度 $N \times 10^3$ CFU/mL、*S. epidermidis* 靈敏度 $N \times 10^3$ CFU/mL、*S. saprophyticus* 靈敏度 $N \times 10^5$ CFU/mL、*S. haemolyticus* 靈敏度 $N \times 10^5$ CFU/mL、*S. carnosus* 靈敏度 $N \times 10^5$ CFU/mL、*S. hyicus* 靈敏度 $N \times 10^6$ CFU/mL、*S. intermedius* 靈敏度 $N \times 10^5$ CFU/mL、*S. xylosus* 靈敏度 $N \times 10^6$ CFU/mL。



S. aureus



S. epidermidis



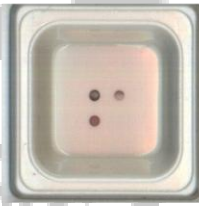
S. saprophyticus



S. haemolyticus



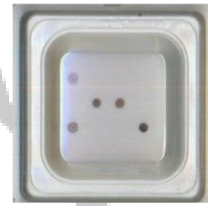
S. carnosus



S. hyicus



S. intermedius



S. xylosum

圖三十一、血液檢體經過增菌培養後於晶片 45°C 雜交結果。

S. aureus 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. epidermidis* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. saprophyticus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. haemolyticus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. carnosus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. hyicus* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. intermedius* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL、*S. xylosum* 靈敏度 $N \times 10^2$ CFU/mL。

陸、参考文献

1. Ahrens P & Andresen LO. 2004. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. J Bacteriol 186(6):1833-1837.
2. Al-Soud WA, Jonsson LJ & Radstrom P. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. J Clin Microbiol 38(1):345-350.
3. Alarcon B, Vicedo B & Aznar R. 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. J Appl Microbiol 100(2):352-364.
4. Bannoehr J, Ben Zakour NL, Waller AS, Guardabassi L, Thoday KL, van den Broek AH & Fitzgerald JR. 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. J Bacteriol 189(23):8685-8692.
5. Bautista L, Gaya P, Medina M & Nunez M. 1988. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk *staphylococci*. Appl Environ Microbiol 54(2):566-569.
6. Ben-Ami R, Navon-Venezia S, Schwartz D & Carmeli Y. 2003. Infection of a ventriculoatrial shunt with phenotypically variable *Staphylococcus epidermidis* masquerading as polymicrobial bacteremia due to various coagulase-negative Staphylococci and *Kocuria varians*. J Clin Microbiol 41(6):2444-2447.
7. Bickley J, Short JK, McDowell DG & Parkes HC. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. Lett Appl Microbiol 22(2):153-158.
8. Blaiotta G, Pennacchia C, Ercolini D, Moschetti G & Villani F. 2003. Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S-23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian fermented sausages. Syst Appl Microbiol 26(3):423-433.
9. Brakstad OG, Aasbakk K & Maeland JA. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol 30(7):1654-1660.
10. Brown TJ & Anthony RM. 2000. The addition of low numbers of 3' thymine bases can be used to improve the hybridization signal of

- oligonucleotides for use within arrays on nylon supports. *J Microbiol Methods* 42(2):203-207.
11. Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S & Morange M. 1992. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia* 48(7):629-634.
 12. Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Falcone M, Giannella M, Venditti M & Stefani S. 2008. In vitro activity of daptomycin against methicillin- and multi-resistant *Staphylococcus haemolyticus* invasive isolates carrying different mec complexes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61(2):227-231.
 13. Carretto E, Barbarini D, Couto I, De Vitis D, Marone P, Verhoef J, De Lencastre H & Brisse S. 2005. Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. *Clin Microbiol Infect* 11(3):177-184.
 14. Chiang YC, Pai WY, Chen CY & Tsen HY. 2008. Use of primers based on the heat shock protein genes *hsp70*, *hsp40*, and *hsp10*, for the detection of bovine mastitis pathogens *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus bovis*. *Mol Cell Probes* 22(4):262-266.
 15. Chotar M, Vidova B & Godany A. 2006. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. *Folia Microbiol (Praha)* 51(6):639-646.
 16. Cunha Mde L, Lopes CA, Rugolo LM & Chalita LV. 2002. [Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates]. *J Pediatr (Rio J)* 78(4):279-288.
 17. Detweiler CS, Cunanan DB & Falkow S. 2001. Host microarray analysis reveals a role for the *Salmonella* response regulator *phoP* in human macrophage cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10):5850-5855.
 18. Di Maria S, Basso AL, Santoro E, Grazia L & Coppola R. 2002. Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage. *J Appl Microbiol* 92(1):158-164.
 19. Dordet-Frisoni E, Talon R & Leroy S. 2007. Physical and genetic map of the *Staphylococcus xylosus* C2a chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 266(2):184-193.
 20. Elouennass M, Sahnoun I, Zrara A, Bajjou T & Elhamzaoui S. 2008.

- [Epidemiology and susceptibility profile of blood culture isolates in an intensive care unit (2002-2005)]. *Med Mal Infect* 38(1):18-24.
21. Forsman P, Tilsala-Timisjarvi A & Alatossava T. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143 (Pt 11):3491-3500.
 22. Futagawa-Saito K, Ba-Thein W & Fukuyasu T. 2009. Antimicrobial susceptibilities of exfoliative toxigenic and non-toxigenic *Staphylococcus hyicus* strains in Japan. *J Vet Med Sci* 71(5):681-684.
 23. Futagawa-Saito K, Ba-Thein W, Higuchi T, Sakurai N & Fukuyasu T. 2007. Nationwide molecular surveillance of exfoliative toxigenic *Staphylococcus hyicus* on pig farms across Japan. *Vet Microbiol* 124(3-4):370-374.
 24. Garcia-Varona M, Santos EM, Jaime I & Rovira J. 2000. Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *Int J Food Microbiol* 54(3):189-195.
 25. George JN, Thoi LL, McManus LM & Reimann TA. 1982. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* 60(4):834-840.
 26. Ghebremedhin B, Layer F, Konig W & Konig B. 2008. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *J Clin Microbiol* 46(3):1019-1025.
 27. Gonzalez-Rey C, Belin AM, Jorbeck H, Norman M, Krovacek K, Henriques B, Kallenius G & Svenson SB. 2003. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26(1):25-35.
 28. Goto M, Takahashi H, Segawa Y, Hayashidani H, Takatori K & Hara-Kudo Y. 2007. Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. *J Food Prot* 70(1):90-96.
 29. HAJEK V. 1976. *Staphylococcus intermedius*, a New Species Isolated from Animals. *Int J Syst Bacteriol* 26(4):401-480.
 30. Hamels S, Gala JL, Dufour S, Vannuffel P, Zammattéo N & Remacle J. 2001. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *Biotechniques* 31(6):1364-1366, 1368, 1370-1362.
 31. Heller MJ. 2002. DNA microarray technology: devices, systems, and

- applications. *Annu Rev Biomed Eng* 4:129-153.
32. Jayaraman A, Hall CK & Genzer J. 2007. Computer simulation study of probe-target hybridization in model DNA microarrays: effect of probe surface density and target concentration. *J Chem Phys* 127(14):144912.
 33. Karenlampi RI, Tolvanen TP & Hanninen ML. 2004. Phylogenetic analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial *groEL* gene sequences. *J Clin Microbiol* 42(12):5731-5738.
 34. Kelesidis T & Tsiodras S. 2010. *Staphylococcus intermedius* is not only a zoonotic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva. *Int J Infect Dis* 14(10):e838-841.
 35. Klein E, Smith DL & Laxminarayan R. 2007. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis* 13(12):1840-1846.
 36. Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H, Kumano M, Morikawa K, Higashide M, Maruyama A, Inose Y, Matoba K, Toh H, Kuhara S, Hattori M & Ohta T. 2005. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(37):13272-13277.
 37. Kwok AY & Chow AW. 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 1):87-92.
 38. Kwok AY, Su SC, Reynolds RP, Bay SJ, Av-Gay Y, Dovichi NJ & Chow AW. 1999. Species identification and phylogenetic relationships based on partial *HSP60* gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 3:1181-1192.
 39. Lee KH, Lee JW, Wang SW, Liu LY, Lee MF, Chuang ST, Shy YM, Chang CL, Wu MC & Chi CH. 2008. Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. *J Vet Diagn Invest* 20(4):463-471.
 40. Li Z & Srivastava P. 2004. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol* Appendix 1:Appendix 1T.
 41. Maggi RG & Breitschwerdt EB. 2005. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* 43(3):1171-1176.

42. Martineau F, Picard FJ, Menard C, Roy PH, Ouellette M & Bergeron MG. 2000. Development of a rapid PCR assay specific for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *J Clin Microbiol* 38(9):3280-3284.
43. Modun BJ, Cockayne A, Finch R & Williams P. 1998. The *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* transferrin-binding proteins are expressed in vivo during infection. *Microbiology* 144 (Pt 4):1005-1012.
44. Monecke S & Ehricht R. 2005. Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin Microbiol Infect* 11(10):825-833.
45. Morot-Bizot S, Talon R & Leroy-Setrin S. 2003. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosum*, a species used in food fermentation. *J Microbiol Methods* 55(1):279-286.
46. Neubauer H & Gotz F. 1996. Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* 178(7):2005-2009.
47. Neubauer H, Pantel I & Gotz F. 1999. Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* 181(5):1481-1488.
48. Pavon MA, Gonzalez I, Rojas M, Pegels N, Martin R & Garcia T. 2011. PCR Detection of *Alternaria* spp. in Processed Foods, Based on the Internal Transcribed Spacer Genetic Marker. *J Food Prot* 74(2):240-247.
49. Pirkkala L, Nykanen P & Sistonen L. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15(7):1118-1131.
50. Rather PN, Davis AP & Wilkinson BJ. 1986. Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase-negative staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 23(5):858-862.
51. Raz R, Colodner R & Kunin CM. 2005. Who are you--*Staphylococcus saprophyticus*? *Clin Infect Dis* 40(6):896-898.
52. Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V & Qazi GN. 2008. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus*

- aureus* by polymerase chain reaction. Food Microbiol 25(3):452-459.
53. Rosenstein R, Nerz C, Biswas L, Resch A, Raddatz G, Schuster SC & Gotz F. 2009. Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. Appl Environ Microbiol 75(3):811-822.
 54. Rossi F, Tofalo R, Torriani S & Suzzi G. 2001. Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. J Appl Microbiol 90(3):365-371.
 55. Saunders NA & Holmes A. 2007. Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. Methods Mol Biol 391:71-85.
 56. Schoenfelder SM, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S & Ziebuhr W. 2010. Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. Int J Med Microbiol 300(6):380-386.
 57. Schuenck RP, Pereira EM, Iorio NL & Dos Santos KR. 2008. Multiplex PCR assay to identify methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. FEMS Immunol Med Microbiol 52(3):431-435.
 58. Sears PM & McCarthy KK. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 19(1):171-185, vii.
 59. Shittu A, Lin J, Morrison D & Kolawole D. 2004. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. J Med Microbiol 53(Pt 1):51-55.
 60. Snopkova S, Gotz F, Doskar J & Rosypal S. 1994. Pulsed-field gel electrophoresis of the genomic restriction fragments of coagulase-negative *staphylococci*. FEMS Microbiol Lett 124(2):131-139.
 61. Talan DA, Staatz D, Staatz A, Goldstein EJ, Singer K & Overturf GD. 1989. *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. J Clin Microbiol 27(1):78-81.
 62. Tsai JC, Hsueh PR, Lin HM, Chang HJ, Ho SW & Teng LJ. 2005. Identification of clinically relevant enterococcus species by direct sequencing of *groES* and spacer region. J Clin Microbiol

- 43(1):235-241.
63. Villard L, Kodjo A, Borges E, Maurin F & Richard Y. 2000. Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosus* by 16-23S spacer amplification. FEMS Microbiol Lett 185(1):83-87.
 64. Wegener HC, Watts JL, Salmon SA & Yancey RJ, Jr. 1994. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. J Clin Microbiol 32(3):793-795.
 65. Wilson IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 63(10):3741-3751.
 66. Wilson IG, Cooper JE & Gilmour A. 1991. 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 57(6):1793-1798.
 67. Wormser GP, Onorato IM, Preminger TJ, Culver D & Martone WJ. 1990. Sensitivity and specificity of blood cultures obtained through intravascular catheters. Crit Care Med 18(2):152-156.
 68. 王聖予, 李麗俐 & 吳秀玲. 2002. 最新醫用微生物學 (上).211-244.
 69. 張予馨. 2009. 利用熱休克蛋白基因及其區間序列設計 *Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus saprophyticus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus haemolyticus*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus uberis*、*Streptococcus bovis* 之特異性 PCR 引子組與生物晶片開發及應用.
 70. 蔣育錚. 2005. 食品病原菌與金黃色葡萄球菌腸毒素檢測用生物晶片之發展以及金黃色葡萄球菌之分子分類與即時聚合酶鏈反應.