

实时荧光环介导等温扩增检测铜绿假单胞菌

曾思思, 杨丽霞*

(长沙市食品药品检验所, 长沙 410016)

摘要: **目的** 建立一种实时荧光与环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)相结合的铜绿假单胞菌检测方法。**方法** 利用铜绿假单胞菌的外毒素 A 基因(*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, *PEA*)序列, 设计 LAMP 引物, 对该方法的特异性、灵敏度及其在人工污染矿泉水中的检出限进行评价。**结果** 该方法与其他菌株无交叉反应, 特异性强, 对纯菌液和人工污染矿泉水的检出限均可达到 5.2 CFU/mL。**结论** 该方法快速、灵敏、操作简便, 为水样中铜绿假单胞菌的检测提供了一种有效的手段。

关键词: 实时荧光环介导等温扩增; 铜绿假单胞菌; 矿泉水

Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time loop-mediated isothermal amplification

ZENG Si-Si, YANG Li-Xia*

(Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha 410016, China)

ABSTRACT: Objective To establish a detection method for *Pseudomonas aeruginosa* by real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Methods** The LAMP primers were designed for the sequence of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (*PEA*). The specificity, sensitivity and detection limit of artificially polluted mineral water were measured to evaluate applicability of the LAMP assay. **Results** This method had no cross-reaction with other strains, which had strong specificity to *P. aeruginosa*. The detection limit in pure cultures and artificially-contaminated mineral water samples without enrichment was 5.2 CFU/mL. **Conclusion** This method is rapid, sensitive and easy to operate, which is suitable for detection of *P. aeruginosa* in water samples.

KEY WORDS: real-time loop-mediated isothermal amplification; *Pseudomonas aeruginosa*; mineral water

1 引言

铜绿假单胞菌在自然界分布广泛, 是一种革兰氏阴性条件致病菌。免疫功能缺陷及术后或某些治疗的患者容易感染本菌。它被认为是囊性纤维化患者发病和死亡的主要原因, 也是导致医院感染的主要病菌之一^[1]。由于铜绿假单胞菌具有一系列环境适应及对多种抗生素产生耐药性的机制, 感染其可能会危及生命, 正成为全球范围内的公

共卫生威胁^[2]。因此, 对铜绿假单胞菌进行快速准确地检测, 是对预防免疫功能低下患者感染铜绿假单胞菌最有效的策略^[3]。传统的铜绿假单胞菌检测方法主要有细菌培养法^[4]、免疫学方法^[5]和分子生物学法^[6]。然而这些方法都有一些缺点, 如细菌培养法耗时长, 免疫学方法不准确。市场上出现的生化检测试剂盒, 如 API 20 NE, 通常用于生化鉴定, 但会出现较高的氧化酶假阳性检出率^[7]。分子生物学方法如 PCR 技术发展迅速, 是一种快速、高效的检测方法, 而

基金项目: 长沙市科技计划项目(kq1801151)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Changsha (kq1801151)

*通讯作者: 杨丽霞, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全分子生物学。E-mail: yanglixia612@163.com

*Corresponding author: YANG Li-Xia, Ph.D, Senior Engineer, Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha 410016, China. E-mail: yanglixia612@163.com

普通 PCR 和荧光定量 PCR 都需要通过繁琐的变温程序进行检测, 且普通 PCR 后续需要电泳才能观察结果^[8-10]。

环介导等温扩增(loop mediated isothermal amplification, LAMP)是一种通过优化改良的基因扩增方法, 于 2000 年被 Notomi 等^[11]报道。LAMP 技术主要基于设计一组具有至少 4 个特异性的引物, 来识别目的基因的 6 个特定区域^[12,13]。具有操作简单、灵敏度高等优点, 是一种可行的、经济有效的分子诊断替代手段^[14]。目前已广泛应用于食源性致病菌、肉类掺假等检测^[15-17]。LAMP 技术后续需要通过肉眼观察是否产生焦磷酸镁沉淀, 来判断实验的进展。而实时荧光 LAMP 技术在原 LAMP 技术的基础上进行改良, 将实时荧光技术与环介导等温扩增相结合, 直观地通过荧光扩增曲线来判断反应进程。实时荧光 LAMP 技术较常规荧光定量 PCR 法更灵敏, 方法准确度高, 人工成本降低^[18]。目前已应用于动物疫病诊断^[19]、真假动物鉴别^[20]等。在本研究中, 通过对铜绿假单胞菌的 *PEA* 基因特异性序列设计引物, 建立一种高效、准确的实时荧光 LAMP 方法, 为矿泉饮用水及食品中铜绿假单胞菌快速检测提供有力手段。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

实验所用菌种: 铜绿假单胞菌、阪崎肠杆菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌(美国典型菌种保藏中心); 宋内志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、 β -溶血性链球菌、沙门氏菌(中国医学细菌保藏管理中心); 大肠杆菌 O157:H7(英国典型菌种保藏中心)。

干式恒温器 K30B(杭州奥盛仪器有限公司); BD-1000 超微量核酸蛋白分析仪(北京五洲东方科技发展有限公司); 7500 FAST 型实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]; DNA 等温扩增试剂盒(广州迪澳生物科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 细菌培养

菌种接种于 CN 培养基, 36 °C 培养 24 h 后挑取典型菌落于 SCDLP(soya casein digest lecithin polysorbate broth)增菌液, 继续培养 16~18 h; 采用麦氏比浊法初测细菌数目, 用生理盐水稀释成不同浓度的菌液, 备用。

2.2.2 细菌基因组 DNA 提取

取菌液 1 mL, 按照 DNA 提取说明书进行操作。

2.2.3 引物设计

针对铜绿假单胞菌 *PEA* 基因序列, 利用 LAMP 引物专用设计软件设计引物(见表 1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

引物名称	序列(5'→3')
PEA-F3	GGTGCCTACAGCTACAC
PEA-B3	CCAGGTATCGTCGAGGTT
PEA-LF	GATGGTGTAGATCGGCGAC
PEA-LB	AAGGTGTTGTGCTGCTC
PEA-FIP	TTCGCCAGCAACTCGTCGTTTCAAGGTGTTT ATCCACGAA
PEA-BIP	GGTCAGCGTGGTCATGGCTTTTTCGAGGTTAG TTGTAGACC

2.2.4 LAMP 反应体系及条件

LAMP 反应体系(25 μ L): 2 \times 反应缓冲液 12.5 μ L, F3/B3 引物各 0.5 μ L(10 μ mol/L), FIP/BIP 引物各 2 μ L(20 μ mol/L), LF/LB 引物各 2 μ L(10 μ mol/L), Bst DNA 聚合酶 1 μ L, 荧光染料 I 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 补足至 25 μ L。于 63 °C 反应 45 min., 收集荧光。

2.2.5 特异性分析

为了鉴定铜绿假单胞菌 LAMP 引物的特异性, 分别对铜绿假单胞菌、阪崎肠杆菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、宋内志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、 β -溶血性链球菌、沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7 进行 DNA 提取, 按照上述的 LAMP 反应体系进行扩增, 验证本实验的特异性。

2.2.6 灵敏度分析

将铜绿假单胞菌新鲜菌液进行平板菌落计数, 测得菌液浓度为 5.2×10^{10} CFU/mL。采用 0.85% 生理盐水将增菌液制成菌悬液, 并对菌悬液依次进行 10 倍梯度稀释, 分别形成 5.2×10^6 、 5.2×10^5 、 5.2×10^4 、 5.2×10^3 、 5.2×10^2 、 5.2×10^1 、 5.2×10^0 、 5.2×10^{-1} CFU/mL 的菌悬液。将每个浓度的菌悬液各取 1 mL 提取 DNA, ddH₂O 作为阴性对照, 进行 LAMP 实验的灵敏度分析。

2.2.7 实际样品检测

取经国标法检测无铜绿假单胞菌的矿泉水样品 9 mL, 加入 1 mL 铜绿假单胞菌菌液的梯度稀释液($5.2 \times 10^6 \sim 5.2 \times 10^{-1}$ CFU/mL), 充分混匀后, 立即按照 2.2.2 的方法提取细菌总 DNA, 根据 2.2.4 的反应体系进行 LAMP 检测。

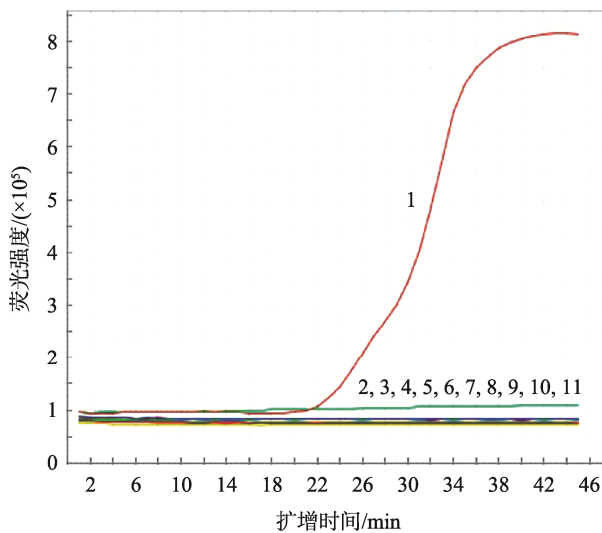
3 结果与分析

3.1 实时荧光 LAMP 的特异性分析

实时荧光 LAMP 引物的特异性分析见表 2。从表 2 可以看出, 对铜绿假单胞菌在内的 11 株菌种进行实时荧光 LAMP 实验, 仅有铜绿假单胞菌有扩增曲线, 结果为阳性, 其他菌株均为阴性(见图 1), 表明建立的方法特异性强。

表2 特异性分析结果
Table 2 Results of LAMP specific amplification

菌种编号	菌种名称	拉丁文名称	特异性检测结果
ATCC27853	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
ATCC29004	阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-
ATCC29212	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
ATCC6538	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
ATCC17802	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
CMCC(B)32210	β -溶血性链球菌	β -hemolytic streptococcus	-
CMCC(B)54002	单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
CMCC(B)50115	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
CMCC(B)51592	宋内志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	-
CMCC(B)63303	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	-
NCTC12900	大肠杆菌 O157: H7	<i>Escherichia coli</i> O157: H7	-



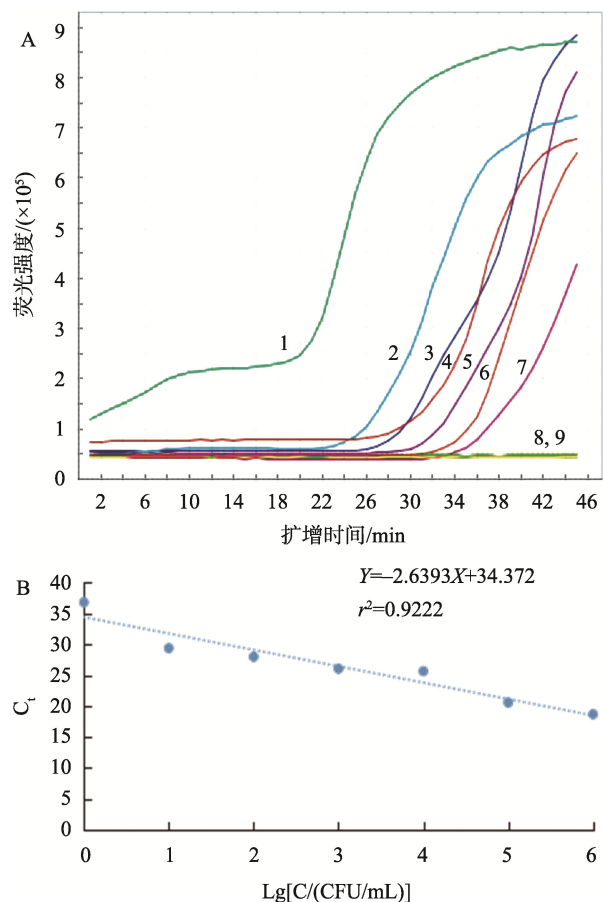
注: 1: 铜绿假单胞菌, 2: β -溶血性链球菌, 3: 鼠伤寒沙门氏菌, 4: 大肠杆菌 O157:H7, 5: 蜡样芽孢杆菌, 6: 宋内志贺氏菌, 7: 阪崎肠杆菌, 8: 副溶血性弧菌, 9: 金黄色葡萄球菌, 10: 粪肠球菌, 11: 单核细胞增生李斯特氏菌。

图1 实时荧光 LAMP 检测铜绿假单胞菌的特异性

Fig.1 Specificity detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time loop-mediated isothermal amplification

3.2 实时荧光 LAMP 的灵敏度分析

实时荧光 LAMP 检测铜绿假单胞菌的灵敏度见图 2。由图 2-A 可知, 当铜绿假单胞菌浓度为 $5.2 \times 10^6 \sim 5.2 \times 10^0$ CFU/mL 时, 荧光曲线出现明显的扩增峰, 结果为阳性。随着菌体浓度的降低, C_t 值不断增大, 且二者呈现出良好的线性关系(见图 2-B), 线性方程为 $Y = -2.6393X + 34.372$, 相关系数 $r^2 = 0.9222$ 。当浓度为 5.2×10^{-1} CFU/mL 时, 荧光曲线趋于平缓, 没有出现扩增曲线, 结果为阴性。故实时荧光 LAMP 技术检测铜绿假单胞菌的检出限为 5.2 CFU/mL。



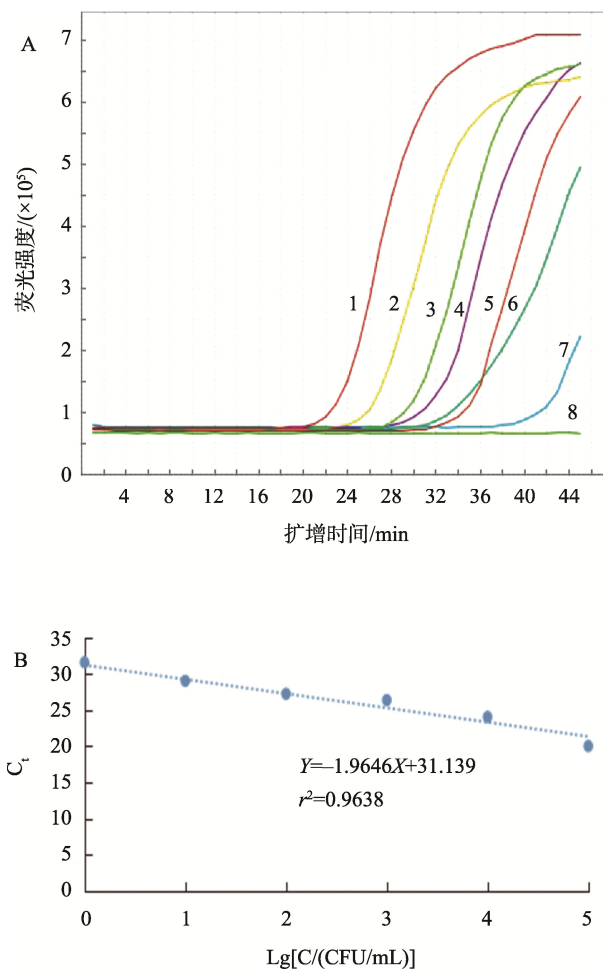
注: A 实时荧光 LAMP 扩增曲线。1: 5.2×10^6 CFU/mL, 2: 5.2×10^5 CFU/mL, 3: 5.2×10^4 CFU/mL, 4: 5.2×10^3 CFU/mL, 5: 5.2×10^2 CFU/mL, 6: 5.2×10^1 CFU/mL, 7: 5.2×10^0 CFU/mL, 8: 5.2×10^{-1} CFU/mL, 9: 阴性对照。

B 实时荧光 LAMP 标准曲线。

图2 实时荧光 LAMP 检测铜绿假单胞菌的灵敏度
Fig.2 Sensitivity detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time loop-mediated isothermal amplification

3.3 实际样品测定

人工污染矿泉水的实际样品实验结果见图3。由图3-A可知,铜绿假单胞菌的浓度越高, C_t 值越小。添加铜绿假单胞菌实验的检出限为 5.2×10^0 CFU/mL。当加入样品中的铜绿假单胞菌的菌液浓度在 $5.2 \times 10^5 \sim 5.2 \times 10^0$ CFU/mL 变化范围时, C_t 值与铜绿假单胞菌浓度的对数值呈现出较好的线性关系(见图3-B), 线性方程为 $Y = -1.9646X + 31.139$, 相关系数 $r^2 = 0.9638$ 。



注: A 实时荧光 LAMP 扩增曲线。1: 5.2×10^5 CFU/mL, 2: 5.2×10^4 CFU/mL, 3: 5.2×10^3 CFU/mL, 4: 5.2×10^2 CFU/mL, 5: 5.2×10^1 CFU/mL, 6: 5.2×10^0 CFU/mL, 7: 5.2×10^{-1} CFU/mL, 8: 阴性对照。B 实时荧光 LAMP 标准曲线。

图3 实时荧光 LAMP 检测铜绿假单胞菌人工添加实际样品
Fig.3 Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in samples by real-time loop-mediated isothermal amplification

4 结论与讨论

通过将实时荧光与 LAMP 技术相结合,建立了一种快速检测铜绿假单胞菌的方法。该方法对纯培养铜绿假单胞菌及人工污染矿泉水的检测灵敏度均可达到 5.2×10^0 CFU/mL,

并且与其他研究^[21,22]相比,灵敏度高,其中实时荧光 PCR 检测铜绿假单胞菌的检出限为 1×10^3 CFU/mL,普通 PCR 反应的灵敏度为 1.5×10^5 CFU/mL,PCR-变性高效液相色谱技术(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)的检测灵敏度为 10^2 CFU/mL。而国家标准 GB 8538-2016 采用滤膜法对铜绿假单胞菌进行检测,因滤膜面积有限,其检出限最高可达 0.4 CFU/mL,但其对样品有一定的富集作用,可根据可疑菌落在不同培养基的生化反应进行验证。本研究建立的实时荧光 LAMP 方法针对靶基因的 8 个区域设计 6 条特异性引物,提高了检测的特异性,也降低了假阳性率。同时只需在恒温条件下进行,检测速度快,无需开盖,与传统的 PCR 及 LAMP 电泳等终点检测方法相比,避免了气溶胶污染,也减少了繁琐的电泳步骤,缩短了检测时间,可有效检测铜绿假单胞菌。

参考文献

- [1] Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence [J]. *Frontiers Cell Infect Microbiol*, 2017, (7): 39.
- [2] Nathwani D, Raman G, Sulham K, et al. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: A systematic review and meta-analysis [J]. *Anti Microb Resist In*, 2014, 3(1): 32.
- [3] Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology [J]. *Int J Antimicrob Ag*, 2015, 45(6): 568-585.
- [4] 张淑红, 吴清平, 徐晓可, 等. 桶装水中铜绿假单胞菌检测方法的比较 [J]. *现代食品科技*, 2011, 27(11): 1403-1405, 1335. Zhang SH, Wu QP, Xu QK, et al. Comparison of detection of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2011, 27(11): 1403-1405, 1335.
- [5] Al-Ahmadi GJ, Roodsari RZ. Fast and specific detection of *Pseudomonas aeruginosa* from other pseudomonas species by PCR [J]. *Ann Burns Fire Disasters*, 2016, 29(4): 264.
- [6] Deschaght P, De Baere T, Van Simaey L, et al. Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients [J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9(1): 244.
- [7] Ghosh R, Nagavardhini A, Sengupta A, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris-wilt pathogen of chickpea [J]. *BMC Res Notes*, 2015, 8(1): 40.
- [8] Duš I, Dobosz T, Manzin A, et al. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research-new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, 67(9): 261-218.
- [9] 张昕悦, 张秀军, 何聪芬, 等. 绿脓杆菌分子生物学检测的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2012, (12): 401-404. Zhang XY, Zhang XJ, He CF, et al. Research advances in molecular detection of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012,

- (12): 401–404.
 Yang Y, Yang Q, Ma X, *et al.* A novel developed method based on single primer isothermal amplification for rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice [J]. *Food Control*, 2017, (75): 187–195.
- [10] 王振国, 刘金华, 徐宝梁, 等. 应用实时荧光 PCR 检测致病性蜡样芽胞杆菌[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(1): 40–42.
 Wang ZG, Liu JH, Xu BL, *et al.* Development of a SYBR green I real time PCR assay for detection of moribific *Bacillus scereus* strains [J]. *Lett Bionol*, 2006, 17(1): 40–42.
- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): 63.
- [12] Karthik K, Rathore R, Thomas P, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for specific and rapid detection of *Brucella abortus* in cattle [J]. *Vet Quart*, 2014, 34(4): 174–179.
- [13] Lee PLM. DNA amplification in the field: Move over PCR, here comes LAMP [J]. *Mol Ecol Resour*, 2017, 17(2): 138–141.
- [14] Feng J, Tang S, Liu L, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and specific detection of common genetically modified organisms (GMOs) [J]. *Int J food Sci Nutr*, 2015, 66(2): 186–196.
- [15] Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Recent progress in research and development [J]. *J Infect Chemother*, 2013, 19(3): 404–411.
- [16] 杨丽霞, 邱华丽, 蒋成, 等. 可视化环介导等温扩增技术检测鸡鸭源性成分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, (2): 624–628.
 Yang LX, Qiu HL, Jiang C, *et al.* Visual detection of chicken and duck derived components by loop-mediated isothermal amplification method [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, (2): 624–628.
- [17] 田纯见, 杨舒展, 段喻燕, 等. 非洲猪瘟病毒非结构基因实时荧光 LAMP 检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(11): 1–5.
 Tian CJ, Yang SZ, Duan YY, *et al.* Establishment of real-time fluorescence LAMP assay for detection of non-structural DNA polymerase gene of African Swine fever virus [J]. *Prog Vet Med*, 2017, 38(11): 1–5.
- [18] 徐淑菲, 孔繁德, 苗丽, 等. LAMP 技术研究进展及其在动物疫病检测中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2017, (1): 75–80.
 Xu SF, Kong FD, Miao L, *et al.* Research progress of LAMP technology and its application in animal diseases detection [J]. *China Anim Health Inspect*, 2017, (1): 75–80.
- [19] 宋涛平, 杨丽霞, 邱华丽, 等. 动物源性成分实时等温扩增检测方法的建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(8): 3207–3212.
 Song TP, Yang LX, Qiu HL, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification assay for identification of animal derived materials [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(8): 3207–3212.
- [20] 杨滴, 刘彦泓, 刘岑杰, 等. 食品中铜绿假单胞菌实时荧光 PCR 检测的研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(21): 154–157.
 Yang D, Liu YH, Liu CJ, *et al.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by fluorescence real-time PCR method [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(21): 154–157.
- [21] 王宇, 李碧, 阳明贤, 等. 奶牛隐性乳房炎三种致病菌的多重 PCR 检测方法的建立[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(1): 20–29.
 Wang Y, Li B, Yang MX, *et al.* Establishment of a multiplex PCR assay for three pathogenic bacteria in cows with recessive mastitis [J]. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2019, 31(1): 20–29.
- [22] 曹际娟, 郑秋月, 孙哲平, 等. 变性高效液相色谱检测乳制品和化妆品中绿脓杆菌的研究[J]. *食品科学*, 2009, 2(9): 30.
 Cao JJ, Zheng QY, Sun ZP, *et al.* Denaturing high-performance liquid chromatography coupled with polymerase chain reaction for detecting *Pseudomonas aeruginosa* in dairy and cosmetic products [J]. *Food Sci*, 2009, 2(9): 30.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



曾思思, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 349807931@qq.com



杨丽霞, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全分子生物学。

E-mail: yanglixia612@163.com