

重组酶聚合酶快速扩增法测定瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌

刘 辉, 张 娟*, 张 燕, 赵丹霞, 吴胜泽

(广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528300)

摘 要: **目的** 建立重组酶聚合酶扩增法(recombinase polymerase amplification, RPA)检测瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的分析方法。**方法** 通过基因组 DNA 提取、RPA 扩增反应方法对样品进行检测。**结果** 该方法能够在 20 min 内特异地检测出铜绿假单胞菌, 方法检出限为 10 pg/μL 铜绿假单胞菌基因组模板, 对人工污染的水样最低检出限为 36 CFU/mL, 且重复性良好。**结论** 本研究建立的 RPA 检测方法能特异、准确、高效地检测出铜绿假单胞菌, 而且操作简单、耗时短, 为瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌的快速诊断提供技术参考。

关键词: 瓶(桶)装水; 铜绿假单胞菌; 重组酶聚合酶扩增法

Establishment of a recombinase polymerase amplification technology to detect *Pseudomonas aeruginosa* in bottled (or barreled) water

LIU Hui, ZHANG Juan*, ZHANG Yan, ZHAO Dan-Xia, WU Sheng-Ze

(Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled (or barreled) water by recombinase polymerase amplification (RPA) technology. **Methods** The samples were detected by genomic DNA extraction and RPA amplification. **Results** The method could detect *Pseudomonas aeruginosa* within 20 min and the method detection limit was 10 pg/μL. The minimum detection limit of artificial pollution water sample was 36 CFU/mL. The method repeatability was good. **Conclusion** The established RPA detection method can detect *Pseudomonas aeruginosa* specifically, accurately and efficiently, and it is simple to operate and less time-consuming. It will provide a technical reference for the rapid diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled (or barreled) water.

KEY WORDS: bottled (or barreled) water; *Pseudomonas aeruginosa*; recombinase polymerase amplification

基金项目: 广州市科技计划项目(201804010244)、广州市科技计划项目(201904010102)、农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(广州)暨广东省食品质量安全重点实验室开放课题(2019KF007)

Fund: Supported by Guangzhou Science and Technology Project (201804010244), Guangzhou Science and Technology Project (201904010102), and the Open Funding from the Risk Evaluation Key Laboratory of Agricultural Products in Storage, and Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety (2019KF007)

***通讯作者:** 张娟, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。E-mail: zjsss205@163.com

***Corresponding author:** ZHANG Juan, Senior Engineer, Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, No.1, Desheng West Road, Shunde District, Foshan 528300, China. E-mail: zjsss205@163.com

1 引言

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种重要的水源性致病菌,广泛存在于各类型水体中,可用于评价水体的微生物污染状况。随着人们生活水平的提高,高品质的水越来越受到消费者的青睐,但成品水中时有曝出检出铜绿假单胞菌。Vargal^[1]在匈牙利 492 份成品水中 7 份检出铜绿假单胞菌,问题发现率为 1.4%。魏磊等^[2]在全国 9 个省 36 家水厂采集 108 份样品,其中 34 份水样检出铜绿假单胞菌,问题发现率为 31.5%。王全新等^[3]为了了解禹州市居民桶装饮用水中铜绿假单胞菌污染状况,调查了 30 份桶装饮用水,其中 14 份检出铜绿假单胞菌,检出率为 46.7%,表明桶装水的生产工艺不规范,未严格按照 GMP 进行操作。张晓丽^[4]对实验室接受的委托送检的(瓶)桶装饮用水产品进行检验发现,103 份样品中 23 份检出铜绿假单胞菌,污染率为 22.3%。骆业巧^[5]对宿迁市市售包装饮用水中铜绿假单胞菌的污染情况进行调查发现,88 份样品中 22 份样品检出铜绿假单胞菌,检出率为 25.6%。钟菲菲^[6]通过抽取企业生产的 135 份桶装水进行检测,发现 17 份检出铜绿假单胞菌,检出率达 12.6%。刘思超等^[7]对惠州市 223 份桶装天然矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌的污染状况进行检测分析,24 份样品检出铜绿假单胞菌,存在 3 种典型菌株的菌落形态,总阳性率为 10.76%。马群飞等^[8]采集检测福建省 77 个生产厂家已投入灌装生产的 80 处饮用天然矿泉水水源,铜绿假单胞菌检出阳性率为 22.5%,其检出率与水源的菌落总数和大肠菌群无显著相关性。李莉等^[9]对连云港市区内桶装饮用水进行铜绿假单胞菌检测,150 份水样 39 份检出铜绿假单胞菌,检出率为 26.0%,与菌落总数的检出率比较,差异有统计学意义,而与大肠菌群的差异无统计学意义。周臣清等^[10]对广州市售瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌的污染状况进行分析发现,392 份样品中铜绿假单胞菌检出率为 5.1%。国内外各地水源中铜绿假单胞菌的检出率虽有不同,但均显示了一定程度的污染,增加了消费者健康危害的风险。如何控制铜绿假单胞菌的污染,现已成为生产企业重点关注的问题。

目前,铜绿假单胞菌的实验室检测方法主要是传统的分离培养法。但传统的检测方法因为周期长、步骤繁琐、试剂有毒等特点,远不能满足现代检测的需求。随着分子生物学检测技术的发展,各种快速检测技术应运而生,缩短了检测时间,提高了检测效率^[11-13]。但这些技术存在需要使用复杂的仪器,对操作人员要求高等问题,限制了其在应急检测中的应用。核酸恒温扩增技术由于无需特殊设备,反应速度快,灵敏度高等特点,在诸多领域已经得到广泛应用。重组酶聚合酶扩增法(recombinase polymerase amplification, RPA)作为一种新型的恒温扩增技术,反应模式与 PCR 类似,但不需要加热变性步骤,而是利用重组酶代替高温解链,采用单链结合蛋白防止 DNA 复性,整个反

应仅需 15~20 min 完成。相对比较成熟的环介导等温扩增技术, RPA 引物设计简单,无需加热反应,扩增产物可进行后续分析。本研究以铜绿假单胞菌为研究对象,建立快速、灵敏的 RPA 检测方法,弥补和完善现有快速检测技术的缺憾,为进一步推进我国食源性致病菌的快速监测发展提供有效的技术支持。

2 材料与方法

2.1 实验菌株

铜绿假单胞菌标准菌株(ATCC 27853)、产气荚膜梭菌标准菌株(ATCC 13124)、大肠埃希氏菌标准菌株(ATCC 25922)(广东环凯微生物科技有限公司); 荧光假单胞菌标准菌株(CICC 21620)(中国工业微生物菌种保藏管理中心); 桶装水中分离并鉴定的 3 株铜绿假单胞菌(Pac-1、Pac-2、Pac-3)。

2.2 实验材料与仪器

实验标准菌株、乙酰胺肉汤(广东环凯微生物科技有限公司); 0.45 μm 滤膜(美国 Millipore 公司); 细菌基因组提取试剂盒(美国 Omega Bio-Tek 公司); 铜绿假单胞菌 RAA 荧光检测试剂盒(杭州众测生物科技有限公司)。

HTY-30B 不锈钢六联过滤系统(浙江泰林生物技术股份有限公司); GHP-9160 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); CL-40M 高压蒸汽灭菌锅(日本 ALP 公司); Quant Studio 7 Flex 实时荧光定量 PCR 仪、Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

2.3 实验方法

2.3.1 基因组 DNA 提取

取 3 mL 过夜增菌的培养基在室温下 4000 g 离心 10 min, 吸走上层培养基, 加入 100 μL TE 缓冲液, 涡旋混匀, 再加入 10 μL 溶菌酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 孵育完毕后加入 100 μL BTL 缓冲液和 20 μL 蛋白酶 K 溶液涡旋混匀, 55 $^{\circ}\text{C}$ 振荡水浴 1 h; 水浴完后 10000 g 离心 2 min, 转移上清液至 1.5 mL 离心管中, 在此过程中注意不要吸取到下层沉淀物; 加入 220 μL BDL 缓冲液, 涡旋混匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 再加入 220 μL 无水乙醇, 以最大转速涡旋 20 s 混匀; 将硅胶柱放入 2 mL 收集管中, 转移全部样品提取液至硅胶柱中, 10000 g 离心 1 min, 弃掉滤液和收集管; 将硅胶柱重新放入 1 个新的收集管中, 加入 500 μL HBC 缓冲液, 10000 g 离心 1 min; 弃掉滤液后重复使用收集管, 加入 700 μL DNA 洗脱液, 10000 g 离心 1 min, 弃掉滤液后再重复此步骤 1 次; 弃掉滤液后, 把硅胶柱重新放入收集管中, 以最大转速(≥ 10000 g)离心 2 min 以干燥硅胶柱, 然后弃掉收集管, 将硅胶柱放入 1 个新灭菌的 1.5 mL 离心管中, 加入预热至 65 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱液 100 μL , 放置室温 3~5 min, 然后 10000 g 离心 1 min 洗脱 DNA。DNA 提取纯化后

保存于-20℃备用。

2.3.2 RPA 扩增反应

按照 RPA 荧光检测试剂盒说明书进行操作。反应体系为 50 μL, 向装有干粉酶制剂的反应管中加入 45.5 μL 反应缓冲液, 再分别加入 2.0 μL 待测 DNA、阳性对照(铜绿假单胞菌标准菌株的基因组)或阴性对照(灭菌的去离子水), 在反应管盖上加 2.5 μL 的醋酸镁溶液, 盖上管盖, 上下颠倒充分混匀 5~6 次, 低速离心 10 s。RPA 反应干粉酶制剂包含 SSB 单链结合蛋白、重组酶蛋白、DNA 聚合酶、Exo 核酸外切酶和辅酶等。

扩增反应程序: 预热, 39℃, 40 s, 一个循环; 扩增, 39℃, 30 s, 30 个循环, 收集荧光信号。

2.3.3 灵敏度检测

以铜绿假单胞菌标准菌株基因组 DNA 为模板评价 RPA 反应的灵敏度。将初始浓度为 98 ng/μL 的铜绿假单胞菌基因组 DNA 稀释至 10 ng/μL, 然后再进行梯度稀释, 分别得到浓度为 10 ng/μL、1.0 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1.0 pg/μL 的铜绿假单胞菌基因组 DNA 样本, 各取 2.0 μL 模板 DNA 进行 RPA 反应。

2.3.4 特异性检测

以从食品中分离并鉴定的铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌标准菌株、产气荚膜梭菌标准菌株、大肠埃希氏菌标准菌株基因组为模板, 用铜绿假单胞菌引物和探针进行扩增, 评价 RPA 方法的特异性。

2.3.5 重复性验证

以 2.3.3 中能检测出的最低基因组 DNA 浓度, 进行 3 组生物学重复, 验证检测方法的重复性。

2.3.6 人工污染样品检测

铜绿假单胞菌(ATCC 27853)经过纯培养后, 用生理

盐水稀释至浓度约为 1.1 麦氏浊度, 然后进行 10 倍梯度稀释。将不同稀释度的 1 mL 菌液分别添加到 250 mL 桶装水样中(样品预先按照 GB 8538-2016《食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验方法》^[14]检测, 未检出铜绿假单胞菌), 用拍击式均质器连续均质 1~2 min, 用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤, 将滤膜转移至 100 mL LB 肉汤, 均质, 分别取 1 mL 模拟样品, 采用稀释平板法, 测定其活菌添加范围为 36~3.6×10⁵ CFU/mL, 同时各另取 1 mL 模拟样品按照 2.3.1 提取基因组, 然后进行检测。

3 结果与分析

3.1 灵敏度

以不同浓度梯度(10 ng/μL、1.0 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL)铜绿假单胞菌标准菌株基因组 DNA 为模板, 进行 RPA 检测方法的灵敏度验证实验。如图 1 所示, 浓度为 10 ng/μL 时在 10 min 时即可观察到扩增, 不同浓度基因组 DNA 的扩增均可在 20 min 之内完成, 但随着浓度的降低, 扩增起峰时间也随之延迟, 最低可检出 10 pg/μL 的基因组 DNA。空白及阴性对照均无扩增曲线出现。重复检测 3 次均取得一致结果。

3.2 特异性

以荧光假单胞菌标准菌株、产气荚膜梭菌标准菌株、大肠埃希氏菌标准菌株、铜绿假单胞菌标准菌株和从桶装水中分离的 3 株铜绿假单胞菌(Pac-1、Pac-2、Pac-3)基因组为模板, 验证 RPA 检测方法的特异性。结果表明, 只有铜绿假单胞菌标准菌株和分离的铜绿假单胞菌株出现特异性的扩增曲线, 空白对照和其他细菌均未出现相应的扩增, 如图 2 所示。重复独立检测 3 次均取得一致性结果。

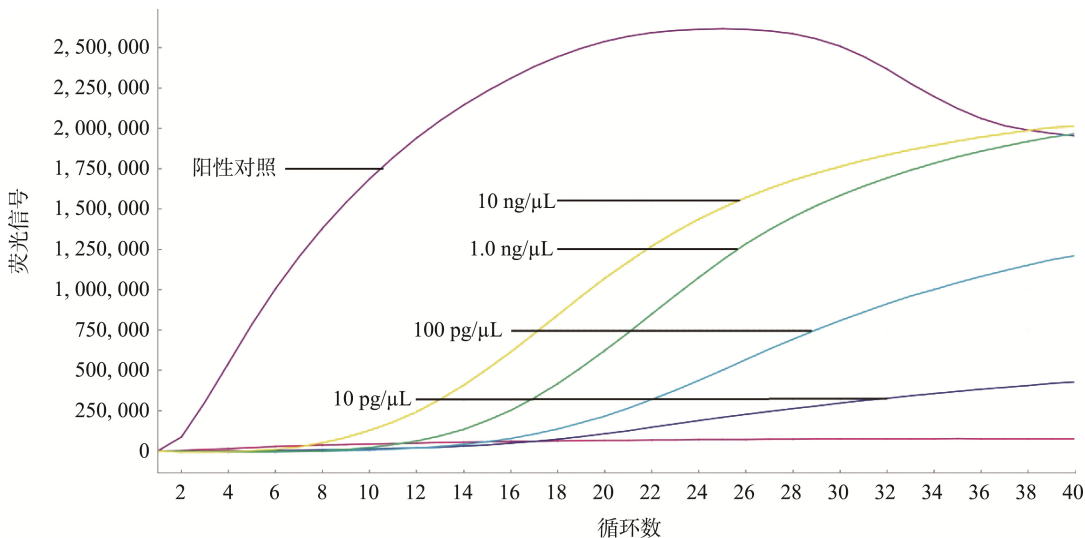


图 1 铜绿假单胞菌灵敏度实验结果(n=3)
Fig.1 Sensitivity results of *Pseudomonas aeruginosa*(n=3)

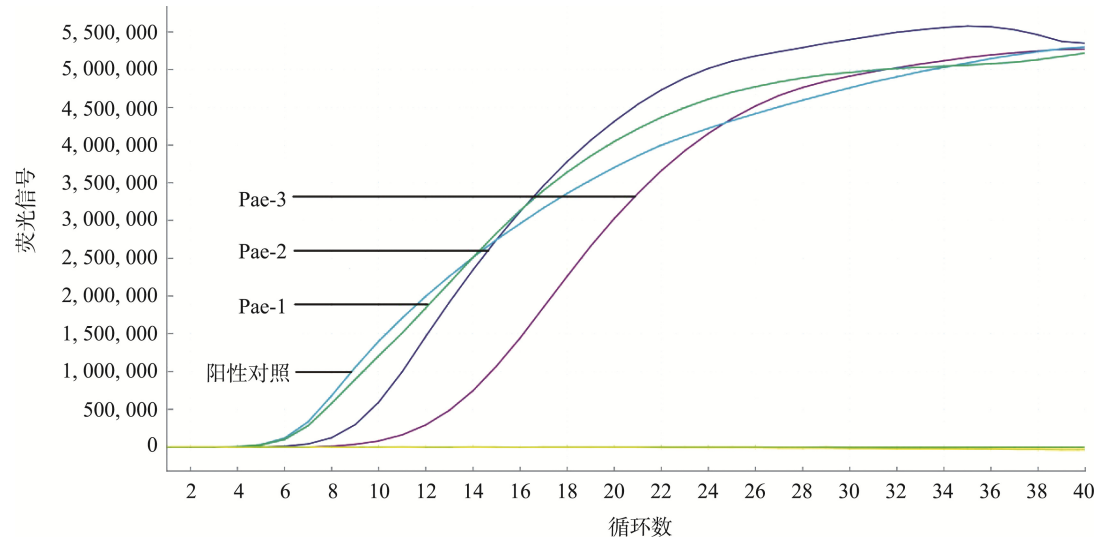


图 2 铜绿假单胞菌特异性实验结果($n=3$)
Fig.2 Specific results of *Pseudomonas aeruginosa*($n=3$)

3.3 重复性

以最低检测模板浓度($10\text{ pg}/\mu\text{L}$), 进行 3 组平行实验, 验证 RPA 检测方法的重复性。结果表明, 3 组平行均出现扩增曲线, 而空白对照和阴性对照无扩增曲线(如图 3 所示), 说明 RPA 检测方法具有较好的稳定性。重复独立检测 3 次均取得一致性检测结果。

3.4 人工污染样品的检测结果

如图 4 所示, 人工污染铜绿假单胞菌的桶装饮用水的检测结果表明, 当污染量 $\geq 36\text{ CFU}/\text{mL}$, real-time RPA 即可在 $8\sim 20\text{ min}$ 时检出饮用水中的铜绿假单胞菌, 全部反应均可在 20 min 内完成。重复独立检测 3 次均取得一致结果。

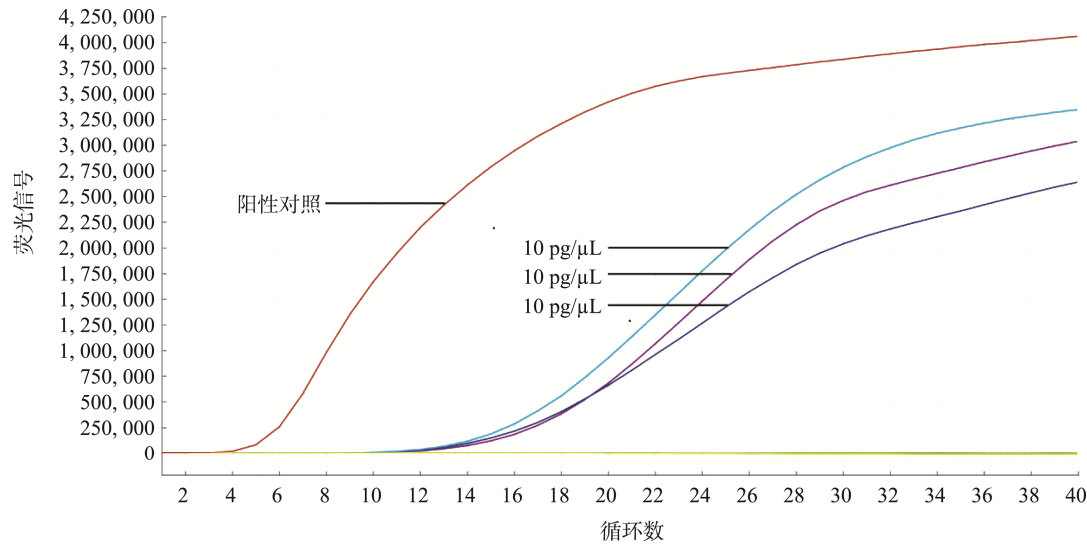
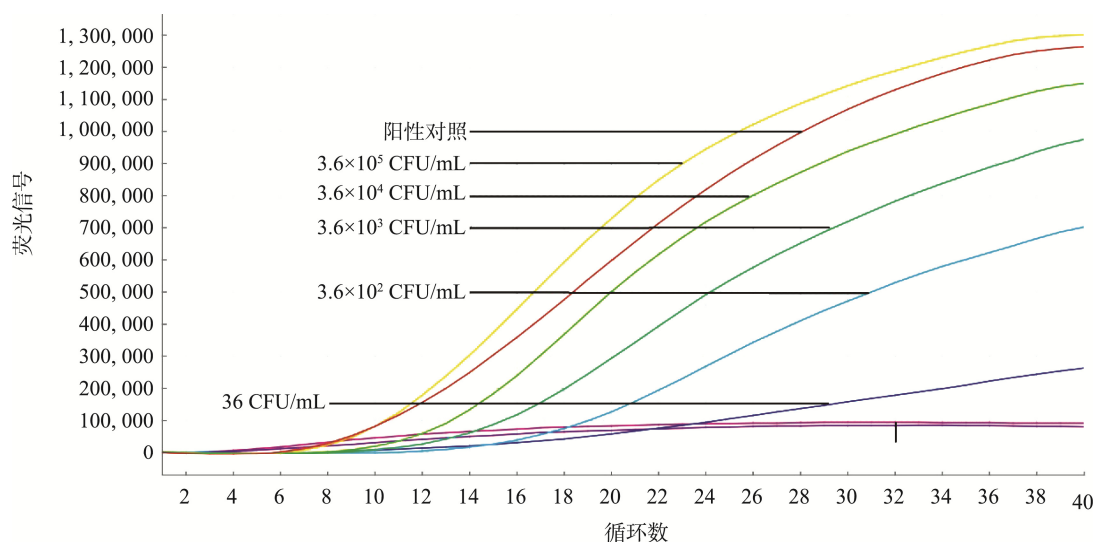


图 3 铜绿假单胞菌重复性实验结果($n=3$)
Fig.3 Repetitive results of *Pseudomonas aeruginosa*($n=3$)

图 4 铜绿假单胞菌人工污染样品的实验结果($n=3$)Fig.4 Artificially contaminated samples results of *Pseudomonas aeruginosa*($n=3$)

4 结论与讨论

本研究初步建立了铜绿假单胞菌的 real-time RPA 检测方法, 其检测灵敏度、特异性和重复性完全满足相关行业的日常检测要求。在不降低检测灵敏度的情况下, 相比同是恒温扩增的环介导恒温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), real-time RPA 方法仅需一对引物和一条探针在接近常温的条件下即可完成扩增反应, 因此更适合核酸的快速检测领域。

目前瓶(桶)装饮用水的铜绿假单胞菌检测主要以传统的生化培养为主, 鲜见其他快速检测方法的研发。张淑红等^[15]曾采用传统国标法 GB/T 8538 滤膜法、PCR 和 LAMP 方法进行比较发现, 国标法相比其他 2 种方法具有较低的阳性检出率而且操作耗时, PCR 和 LAMP 具有更加快速灵敏的特点。GB 8537-2018《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水》^[16]明确规定饮用天然矿泉水中铜绿假单胞菌不得检出, 这就对我国的饮用水企业的生产工艺提出了更高的质控要求, 但是现有的传统方法无法适应企业的生产需求, 同时传统方法对人员的技术要求也更高, 无法实现大批量水样的快速检测。为了提高检测效率, 进一步拓展和应用分子生物学方法, 本研究建立了基于恒温扩增的实时荧光 RPA, 相比 LAMP 扩增法, 具有更适合于生产企业铜绿假单胞菌快速出厂检验的优势。

参考文献

- [1] Varga L. Bacteriological quality of bottled natural mineral waters commercialized in Hungary [J]. Food Control, 2011, 22(3): 591-595.
- [2] 魏磊, 吴清平, 张菊梅, 等. 矿泉水和山泉水中铜绿假单胞菌污染调查及分离菌株毒力基因与耐药性分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 125-132.

- Wei L, Wu QP, Zhang JM, et al. The pollution survey of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water and spring water and the analyses of virulence genes and antibiotic resistance of the isolates [J]. Microbiology, 2015, 42(1): 125-132.
- [3] 王全新, 马红朋, 王海欣, 等. 禹州市桶装饮用水直饮水铜绿假单胞菌污染状况调查[J]. 医药论坛杂志, 2016, 37(2): 78-79.
- Wang QX, Ma HP, Wang HX, et al. The investigation of *Pseudomonas aeruginosa* contamination of bottled and direct drinking water in Yuzhou [J]. J Med Forum, 2016, 37(2): 78-79.
- [4] 张晓丽. (瓶)桶装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况分析[J]. 节能环保, 2017, 8: 18-19.
- Zhang XL. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in bottled drinking water [J]. Low Carbon World, 2017, 8: 18-19.
- [5] 骆业巧. 包装饮用纯净水微生物污染情况分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 360-363.
- Luo YQ. Analysis of the microbial contamination of packaged drinking purified water [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(1): 360-363.
- [6] 钟菲菲. 包装饮用水铜绿假单胞菌的污染与预防[J]. 现代食品, 2017, (1): 88-90.
- Zhong FF. Pollution and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water [J]. Mod Food, 2017, (1): 88-90.
- [7] 刘思超, 徐励琴, 罗泽燕, 等. 223 份桶装天然矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌的检测结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2016, 32(10): 1071-1075.
- Liu SC, Xu LQ, Luo ZY, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* detection of 223 samples of barreled drinking natural mineral water and packaged drinking water [J]. J Prev Med Inform, 2016, 32(10): 1071-1075.
- [8] 马群飞, 林坚, 陈美兰, 等. 饮用天然矿泉水水源铜绿假单胞菌污染调查[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(3): 157-159.
- Ma QF, Lin J, Chen ML, et al. Investigation on contamination of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water sources for drinking [J]. J Environ Health, 2001, 18(3): 157-159.

- [9] 李莉, 朱晓霞, 马会会. 桶装饮用水中铜绿假单胞菌的检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(3): 409-410.
- Li L, Zhu XX, Ma HH. Detection and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled drinking water [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 26(3): 409-410.
- [10] 周臣清, 张娟, 黄宝莹, 等. 广州市售瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌污染现状及其耐药现象研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(12): 168-171.
- Zhou CQ, Zhang J, Huang BY, et al. Contamination status of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water and barreled water in Guangzhou and analysis of its antimicrobial resistance [J]. China Brew, 2017, 36(12): 168-171.
- [11] 陆星羽, 张宏斌, 张梦寒, 等. EMA-PCR 方法检测饮用水中 3 种食源性致病菌活菌研究[J]. 现代预防医学, 2015, 42(10): 1845-1849, 1885.
- Lu XY, Zhang HB, Zhang MH, et al. Detection of 3 live food-borne pathogenic bacteria in drinking water by EMA-PCR [J]. Mod Prev Med, 2015, 42(10): 1845-1849, 1885.
- [12] 刘冬虹, 王德莲, 郭燕华, 等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. 检验检疫学刊, 2016, 26(5): 65-68.
- Liu DH, Wang DL, Guo YH, et al. Advances in recombinase polymerase amplification [J]. J Inspect Quarant, 2016, 26(5): 65-68.
- [13] 孙魁, 邢微微, 徐东刚. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. 军事医学, 2015, 39(10): 802-807.
- Sun K, Xing WW, Xu DG. Advances in recombinase polymerase amplification [J]. Mil Med Sci, 2015, 39(10): 802-807.
- [14] GB 8538-2016 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法[S].
- GB 8538-2016 National food safety standard-Testing methods for drinking natural mineral water [S].
- [15] 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 XK, et al. Comparison of detection of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(11): 1403-1405, 1335.
- [16] GB 8537-2018 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水[S].
- GB 8537-2018 National food safety standard-Drinking natural mineral water [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介

刘 辉, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。
E-mail: lh403@163.com

张 娟, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。
E-mail: zjsss205@163.com