



## 基于聚合酶螺旋反应技术快速检测铜绿假单胞菌

朱渊<sup>1</sup> 戴云山<sup>2</sup> 王俊虎<sup>1</sup> 王萍<sup>1</sup> 吕凤霞<sup>3</sup> 顾秋琴<sup>\*1</sup>

1 泰州市食品药品检验所 江苏 泰州 225300

2 泰州市食品药品监督管理局 江苏 泰州 225300

3 南京农业大学食品学院 江苏 南京 210095

**摘要:**【背景】铜绿假单胞菌是一种重要的水源和食源性致病菌,可引起急性肠道炎、脑膜炎、败血症和皮肤炎症等疾病。加强铜绿假单胞菌的快速检测,对保障食品安全具有重要的意义。【目的】建立聚合酶螺旋反应(Polymerase spiral reaction, PSR)方法快速检测铜绿假单胞菌。【方法】针对铜绿假单胞菌外毒素 A 调控基因——ETA 基因(*toxA*)设计引物,通过引入加速引物、优化反应条件和筛选颜色指示剂,建立快速检测铜绿假单胞菌的 PSR 方法,并研究方法的特异性、敏感性和可靠性。【结果】建立的方法在等温 65 °C 条件下,40 min 内可完成 PSR 反应,且可通过钙黄绿素和羟基萘酚蓝直接判读结果。方法特异性强、灵敏度高,最低检出限分别为 20 CFU/mL 细菌和 1.011 5 pg/μL 基因组 DNA。可视化 PSR 方法检测包装饮用水来源的分离菌株与传统生化方法检测结果一致。【结论】研究建立的可视化 PSR 方法为铜绿假单胞菌 DNA 快速检测提供了一种可行的有效手段。

**关键词:** 铜绿假单胞菌, 聚合酶螺旋反应, 等温扩增, DNA 快速检测

## Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by polymerase spiral reaction (PSR)

ZHU Yuan<sup>1</sup> DAI Yun-Shan<sup>2</sup> WANG Jun-Hu<sup>1</sup> WANG Ping<sup>1</sup> LÜ Feng-Xia<sup>3</sup> GU Qiu-Qin<sup>\*1</sup>

1 Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou, Jiangsu 225300, China

2 Taizhou Food and Drug Administration, Taizhou, Jiangsu 225300, China

3 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

**Abstract:** [Background] *Pseudomonas aeruginosa* is an important water- and food-borne pathogenic bacterium causing acute enteritis, meningitis, sepsis and skin inflammation. It is important to detect rapidly *P. aeruginosa* for food safety. [Objective] A rapid and simple method for detection of *P. aeruginosa* using polymerase spiral reaction (PSR) technique was established. [Methods] The primers were designed according to the *P. aeruginosa* exotoxin A gene—ETA gene (*toxA*), the visual PSR method for rapid detection of *P. aeruginosa* comprised primer screening, accelerated primer introduction, reaction conditions optimization and color indicator screening. The specificity, sensitivity and reliability of the method were evaluated. [Results] The PSR assay to detect *toxA* of *P. aeruginosa* could fulfill within

**Foundation items:** Scientific Research Program (Technical) of Jiangsu Food and Drug Administration (20170227); Science and Technology Support Program (Social Development) of Taizhou (TS201811)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-523-86200632; E-mail: guqiuqin@tzifdc.onaliyun.cn

**Received:** 09-10-2018; **Accepted:** 29-12-2018; **Published online:** 29-01-2019

**基金项目:** 江苏省食品药品监督管理局科研项目(技术类)(20170227); 泰州市科技支撑计划(社会发展)(TS201811)

**\*通信作者:** Tel: 0523-86200632; E-mail: guqiuqin@tzifdc.onaliyun.cn

**收稿日期:** 2018-10-09; **接受日期:** 2018-12-29; **网络首发日期:** 2019-01-29

40 min at 65 °C, and visualize the results by Calcein and HNB. This method specifically detected *P. aeruginosa* without showing cross-reaction with closely related *Pseudomonas* species or other bacteria. The sensitivity of the method was high, with detection limit 20 CFU/mL bacteria and 1.011 5 pg/μL genomic DNA. The detection of isolated strain of packaged drinking water showed that the PSR method was consistent with the results of traditional biochemical methods for the *P. aeruginosa* detection. **[Conclusion]** The established visual PSR method provides a potential method to be used for rapid detection in the field.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, Polymerase spiral reaction (PSR), Isothermal amplification, DNA rapid detection

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种重要的水源性致病菌,广泛存在于各种水源中,对消毒剂、干燥、紫外线等理化因素具有很强的抵抗力,可引起急性肠道炎、脑膜炎、败血症和皮肤炎症等疾病<sup>[1]</sup>。桶(瓶)装水中有机物质含量极低,且刚出厂的产品中铜绿假单胞菌数量较少,但桶(瓶)装水消费周期较长,保存期至少半个月以上,兼性化能自养代谢而对有机营养要求低的铜绿假单胞菌可生长繁殖达到 10<sup>4</sup> CFU/mL<sup>[2]</sup>。水质卫生管理方面,美国、加拿大、巴西、日本、欧洲各国及世界卫生组织/粮农组织等,均限定瓶装饮用水(包括天然矿泉水水源)中铜绿假单胞菌最大可能数(Most probable number, MPN)<3/L 或每 250 mL 中不得检出<sup>[3]</sup>。我国实施的《GB 19298-2014 食品安全国家标准包装饮用水》和《GB 8537-2008 饮用天然矿泉水》标准中也明确规定每 250 mL 包装饮用水和饮用天然矿泉水中不得检出铜绿假单胞菌<sup>[3-4]</sup>。近年来,随着国内桶装饮用水消费量的不断上升,有关铜绿假单胞菌污染桶装水的报道逐渐增多,引起了诸多学者和消费者的普遍关注<sup>[5-9]</sup>。

目前我国规定的包装饮用水铜绿假单胞菌检测方法为传统国标法,其检验程序费时费力、繁琐复杂,需要 2-7 d 才能得到检验结果<sup>[3]</sup>。近年来,普通 PCR、荧光定量 PCR 和环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等分子检测方法逐步建立起来,应用于水样快速检测<sup>[3,10]</sup>。但普通 PCR 和荧光定量 PCR 都需要复杂的具有变温功能的仪器,荧光定量 PCR 还需要特异性探针,价格昂贵。LAMP 法是在 PCR 的基

础上建立起来的一种常温核酸扩增技术<sup>[11]</sup>,目前已被应用于各种致病菌的快速检测<sup>[12-16]</sup>。但是 LAMP 法需要针对靶序列上 6-8 个片段设计引物,一般需要 6 条引物,引物设计较复杂,这 6 条引物都要规避突变点区域,因此对靶序列的要求高,并且日本的公司特别注重对其专利产权的保护,我国在转化应用上有很大的局限性<sup>[17-18]</sup>。

聚合酶螺旋反应(Polymerase spiral reaction, PSR)是一种新型核酸等温扩增法,利用具有链转移活性的 DNA 聚合酶(*Bst* DNA 聚合酶)在等温条件下进行扩增<sup>[17-19]</sup>。该法从 LAMP 引物设计中得到启示,并融合 PCR 引物设计简便的优点,仅在 PCR 引物的基础上从目标序列上再取一段序列,将这段序列加到 PCR 引物的 5'端,构成正反复合引物,满足了简便快速、高灵敏度和特异性的要求<sup>[17]</sup>。目前已有研究人员应用 PSR 技术进行细菌、真菌和病毒的临床现场检测工作,其中包括以 *toxA* 为靶基因 PSR 检测铜绿假单胞菌的研究<sup>[17-22]</sup>。本研究以铜绿假单胞菌外毒素 A 调控基因——ETA 基因(*toxA*)为靶基因,基于 PSR 技术建立铜绿假单胞菌的快速检测法,从而为铜绿假单胞菌的快速检测提供有力手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

各种标准菌株铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) CGMCC1.10274、志贺氏菌(*Shigella flexneri*) CGMCC1.10599、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) CGMCC1.4245、沙门氏菌(*Salmonella enterica*)

CGMCC1.10603、阪崎杆菌(*Cronobacter sakazakii*) CGMCC1.6765、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) CGMCC1.1997、粪肠球菌(*Enterococcus faecium*) CGMCC 1.101、马红球菌(*Rhodococcus equi*) CGMCC1.4262、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CGMCC 1.10559、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*) CGMCC1.2465 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,恶臭假单胞菌(*P. putida*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)<sup>[23]</sup>由本实验室提供,铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)分离株(16株)从包装饮用水中分离纯化,按照国家食品安全风险监测工作手册(GB/T 8538-2008)检验方法检测,并使用 VITECK2 Compact 微生物鉴定仪进行结果确认。

1.1.2 主要试剂和仪器

营养肉汤、CN 琼脂平板,北京陆桥技术有限公司; *Bst* DNA 聚合酶, NEB 公司; 甜菜碱、吐温-20、钙黄绿素、氯化锰、羟基萘酚蓝、二甲基亚砷, Sigma 公司; MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit、*ExTaq*<sup>®</sup> DNA Polymerase, TaKaRa 公司; 石蜡油,百奥莱博公司; 氢氧化钾、Tris-HCl、氯化钾、硫酸铵、硫酸镁,国药集团化学试剂有限公司; Nuclease-Free Water、dNTP Mixture, 生工生物工程(上海)股份有限公司; QX Alignment Marker 15 kb/3kb、QX Size Marker 0.1–2.5 kb, Qiagen 公司。

低温高速离心机, Beckman 公司; PCR 仪, ABI 公司; 紫外分光光度计, Shimadzu 公司; 恒

温水浴锅, 杭州博日科技有限; 全自动核酸蛋白分析仪, Qiagen 公司; DensiCHEK™ 比浊仪, Bio Merieux 公司; NanoDrop One 超微量分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 中公布的铜绿假单胞菌 *toxA* 基因序列(登录号为 NC\_002516.2), 在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析后,基于 *toxA* 基因的特异性区域,利用软件 Primer premier 5 设计 PSR 反应的 4 条特异性引物,分别为引物 Ft/Bt, 加速引物 IF/IB。同时设计 PCR 反应的引物 *toxA*-1f/*toxA*-1r, 见表 1。引物交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 细菌基因组 DNA 提取

在 CN 琼脂平板上取细菌单菌落接入营养肉汤<sup>[9]</sup>中,培养 12 h 到对数期。取 1.0 mL *OD*<sub>600</sub> 为 0.15 的菌悬液, 12 000×*g* 离心 2 min, 轻轻倒掉上清。向革兰氏阳性细菌沉淀中加入 500 μL BS 缓冲液和 50 μL 溶菌酶(20 mg/mL), 充分混匀沉淀, 37 °C 水浴 60 min, 12 000×*g* 离心 2 min (革兰氏阴性细菌省去此步骤)。向细菌沉淀中加入 20 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL)和 10 μL RNase A (10 mg/mL), 180 μL GL 裂解液, 充分混匀沉淀, 56 °C 水浴 10 min, 之后严格按照 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 操作步骤提取细菌基因组 DNA。

基因组 DNA 的质量浓度和纯度检测: 取 DNA 溶液 1 μL, 用 NanoDrop One 超微量分光光

表 1 特异性检测引物序列

Table 1 Primers used for PSR in the study

引物名称	检测方法	引物序列	基因位置
Primers	Detection methods	Primer sequences (5'→3')	Gene locations
Ft*	PSR	gtcgatggccagcttgagcgATCGCCGACACCAACGG	258–238, 175–192
Bt*		gcgagttcgaccggtagctgGCCAGTTCAGCGACCAACT	238–258, 360–379
IF		GTAGTGCAGCACGCCCTG	210–192
IB		CGCTACAGCTACACGCG	331–348
<i>toxA</i> -1f	PCR	AGATGGGCGACGAGTTGCTG	482–501
<i>toxA</i> -1r		GACTGATGACCGTGGGCTTGAT	811–789

注: \*: Ft 与 Bt 分别由 Nr (小写字母)和 F (大写字母)、N (小写字母)和 B (大写字母)组成。

Note: \*: Ft and Bt consist of Nr (lowercase) and F (uppercase), N (lowercase) and B (uppercase), respectively.

度计测定以上提取的 DNA 在波长 260 nm 和 280 nm 处的紫外吸收值,通过  $OD_{260}/OD_{280}$  和浓度值判断 DNA 的纯度和浓度。

1.2.3 PSR 反应体系的建立及优化

扩增反应体系参考 Liu 等<sup>[19]</sup>的方法并进行一定优化。RM 储备液(20×): KCl 1.49 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.64 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.95 g, 吐温-20 2.0 mL, 加水溶解并定容至 100 mL。RM 反应液(2×): RM 储备液(20×) 200 μL, Tris-HCl (1.5 mol/L, pH 8.8) 53.33 μL, dNTPs (10 mmol/L, Each) 560 μL, 甜菜碱溶液(0.375 g/mL) 1.0 mL, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 2 mL。25 μL 反应体系:RM 反应液(2×) 12.5 μL,引物 Ft/Bt (50 μmol/L, Each) 1.6 μL,模板 DNA 2 μL, *Bst* DNA 聚合酶(8 U/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.9 μL。再加入石蜡油 10 μL 后的反应混合液放入水浴锅中 65 °C 反应 90 min,毛细管凝胶电泳检测扩增结果。

为使 PSR 反应更加迅速,25 μL 反应体系中引入加速引物 IF/IB,上述 25 μL 反应体系中加入加速引物 IF/IB (50 μmol/L, Each) 0.8 μL。同时对 DNA 双链解链的关键物质——甜菜碱的浓度进行优化。PSR 反应体系中其他物质浓度不变,设置甜菜碱浓度梯度 0.2、0.5、0.8、1.1、1.3 mol/L,摸索最佳浓度。同时,为避免气溶胶污染,确保实验准确性,PSR 反应前在反应液液面上加入 10 μL 石蜡油,上层形成的石蜡油密封层能有效阻止反应过程中产生的气溶胶污染。

1.2.4 PSR 反应结果的可视化研究

为符合等温扩增法简便、快捷的特点,进行

PSR 反应结果的可视化研究,即在 PSR 反应体系中加入颜色指示剂,通过阴、阳性反应的颜色差异快速判断实验结果。

钙黄绿素(Calcein)作指示剂:设立钙黄绿素(6.5 mmol/L, DMSO 配制)和氯化锰(130 mmol/L)不同组别见表 2,在 25 μL PSR 反应体系中加入不同组别的钙黄绿素指示剂 1 μL,分别设立阳性组与阴性组,65 °C 反应后取出于黑背景下观察结果。PSR 反应阳性,溶液由橙色变成绿色;PSR 反应阴性,溶液保持橙色不变。当肉眼观察无法清晰分辨绿色和橙色时,可在紫外光下观察,可见阳性样品管发绿色荧光,阴性样品管无荧光发出。

羟基萘酚蓝(HNB)作指示剂:参考 Goto 等<sup>[24]</sup>方法,采用 0.2% HNB 指示剂溶液,在 25 μL PSR 反应体系中加入 1.0 μL HNB 溶液,65 °C 反应后白色背景下观察溶液的变化。PSR 反应阳性,溶液由紫色变成天蓝色;PSR 反应阴性,溶液保持紫色不变。

1.2.5 PSR 反应特异性和灵敏度检测

提取铜绿假单胞菌和 12 株非铜绿假单胞菌基因组 DNA,以此为模板进行 PSR 反应,验证方法特异性。

将提取的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)原菌液总 DNA 测定浓度后,对 DNA 进行 10 倍比梯度稀释,最后选取 10.115 fg、101.15 fg、1.011 5 pg、10.115 pg、101.15 pg、1.011 5 ng、10.115 ng/μL 共 7 个浓度梯度,取 2 μL 各浓度梯度的 DNA 为模板进行 PSR 反应检测纯培养铜绿假单胞菌灵敏度。

表 2 不同组别的钙黄绿素指示剂

Table 2 Calcein indicators of different groups

组别 Group	钙黄绿素体积 Calcein (μL/mL)	氯化锰体积 MnCl <sub>2</sub> (μL/mL)	钙黄绿素终浓度 Final concentration of calcein (μmol/L)	氯化锰终浓度 Final concentration of MnCl <sub>2</sub> (mmol/L)	钙黄绿素与氯化锰摩尔比 Calcein:MnCl <sub>2</sub> (M/M)
1	100	100	25	0.5	1:20
2	100	80	25	0.4	1:16
3	100	60	25	0.3	1:12
4	100	40	25	0.2	1:8
5	200	200	50	1.0	1:20
6	200	160	50	0.8	1:16
7	200	120	50	0.6	1:12
8	200	80	50	0.4	1:8

### 1.2.6 PCR 和 PSR 反应在包装饮用水中的灵敏度检测

为保证检测结果的准确性,经国标 GB/T 8538-2008 方法验证试验所用包装饮用水不含铜绿假单胞菌。取新鲜培养 12 h 的铜绿假单胞菌(CGMCC1.10274),用生理盐水充分洗涤培养基,10 倍比梯度系列稀释。取各稀释度菌液 1 mL 加入到 100 mL 包装饮用水样品中,使包装饮用水中菌液浓度达到  $2 \times 10^0$ 、 $2 \times 10^1$ 、 $2 \times 10^2$ 、 $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$  CFU/mL,充分混合,作为人工污染包装饮用水样品。

取各菌液浓度的人工污染包装饮用水样品 1 mL,提取样品 DNA,同时取不加铜绿假单胞菌的包装饮用水样品 1 mL 作为阴性对照。分别进行 PCR 和 PSR 反应,比较两种方法的检测灵敏度。按照 *ExTaq*<sup>®</sup> DNA Polymerase 说明书进行 PCR 扩增反应。

### 1.2.7 PSR 反应在实际样本检测中的应用

将实际检验工作中分离纯化的包装饮用水来源的 16 株铜绿假单胞菌菌株提取核酸分别进行 PSR 反应,同时以无菌水和铜绿假单胞菌阴性的包装饮用水样本为对照,观察检测结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 PSR 反应体系的建立及优化

以铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板,按 PSR 反应体系配制反应液,以无菌水为阴性对照。毛细管凝胶电泳检测结果显示,65 °C 水浴反应 90 min 后呈现出特异性梯状条带,且肉眼观察可见反应溶液处于浑浊状态,阴性对照溶液澄清且无梯状条带(图 1)。结果表明 PSR 能且只能在有特定核酸及能与特定核酸序列结合的引物时发生反应,验证了 PSR 反应的可行性。

PSR 反应体系中使用 Ft/Bt 一对引物时,反应时间要在 60 min 之后,不能满足快速检测的要求,因此引入加速引物 IF/IB。为使 Ft/Bt 首先与靶序列结合,加速引物 IF/IB 使用浓度(终浓度 0.8  $\mu$ mol/L)

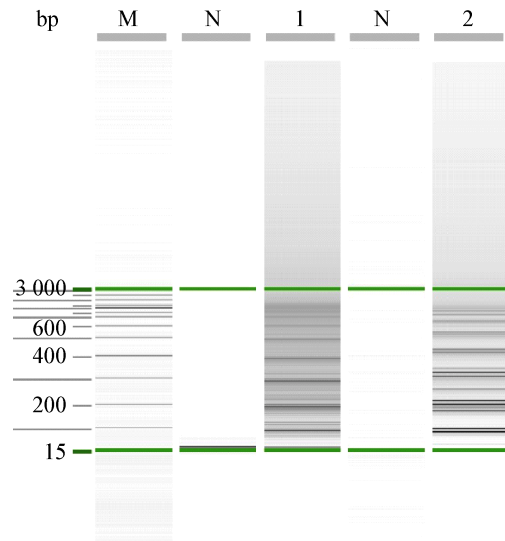


图 1 铜绿假单胞菌 PSR 反应毛细管凝胶电泳结果

Figure 1 The capillary gel electrophoresis results of PSR

注: M: Alignment marker 15 kb/3 kb; N: 阴性对照; 1: 引物 Ft/Bt; 2: 引物 Ft/Bt+IF/IB.

Note: M: Alignment marker 15 kb/3 kb; N: Negative control; 1: Primer Ft/Bt; 2: Primer Ft/Bt+IF/IB.

是引物 Ft/Bt 使用浓度(终浓度 1.6  $\mu$ mol/L)的一半。结果显示引入加速引物后,65 °C 水浴反应 40 min 即可观察到溶液呈现浑浊状态,毛细管凝胶电泳检测结果显示出特异性梯状条带(图 1)。

甜菜碱是恒温下使 DNA 双链解链的关键物质, RM 反应液中其他物质浓度不变,甜菜碱浓度分别为 0.2、0.5、0.8、1.1、1.3 mol/L 时,65 °C 水浴反应 40 min 均能观察到溶液浑浊状态。毛细管凝胶电泳检测结果显示,同等时间下,甜菜碱浓度为 0.8 mol/L 时梯状条带更加清晰(图 2),表示其反应效率更高,因此 0.8 mol/L 可作为 PSR 反应下一步试验的甜菜碱浓度。

### 2.2 PSR 反应结果的可视化研究

按 PSR 反应的可视化方法(表 2),使用不同浓度组合的钙黄绿素指示剂(组别 1–8)进行 PSR 反应,观察其产物在可见光下(图 3A)和紫外光激发下的荧光情况(图 3B)。钙黄绿素指示剂低浓度组(组别 2、3、4)和高浓度组(组别 8)的阳性组溶液呈现绿色,阴性组保持橙色不变,肉眼即可分辨

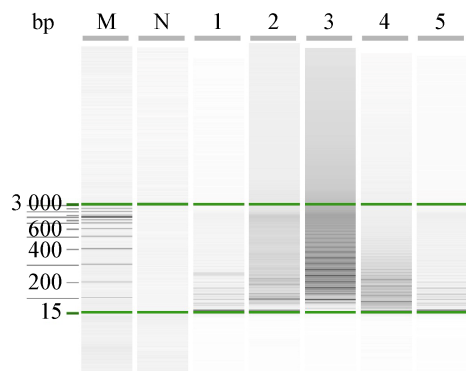


图 2 甜菜碱浓度筛选结果

Figure 2 The betaine concentration of PSR

注: M: Alignment marker 15 kb/3 kb; N: 阴性对照; 1: 甜菜碱 0.2 mol/L; 2: 甜菜碱 0.5 mol/L; 3: 甜菜碱 0.8 mol/L; 4: 甜菜碱 1.1 mol/L; 5: 甜菜碱 1.3 mol/L.

Note: M: Alignment marker 15 kb/3 kb; N: Negative control; 1: Betaine 0.2 mol/L; 2: Betaine 0.5 mol/L; 3: Betaine 0.8 mol/L; 4: Betaine 1.1 mol/L; 5: Betaine 1.3 mol/L.

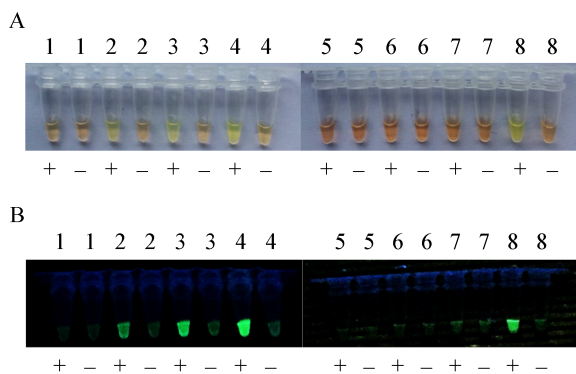


图 3 钙黄绿素指示剂显色(A)和荧光素(B)结果

Figure 3 Indicating results of Calcein indicators by coloration (A) and fluorescence (B)

注: +: 阳性组; -: 阴性组; 1-8: 组别 1-8.

Note: +: Positive group; -: Negative group; 1-8: Group 1-8.

表 3 PSR 反应不同组别钙黄绿素指示结果

Table 3 The different groups Calcein indicating results of PSR

Indicating method	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
Coloration	-	+	+	+	-	-	-	+
	-	+	+	+	-	-	-	+
	-	+	+	+	-	-	-	+
Fluorescence	-	+	+	+	-	-	-	+
	-	+	+	+	-	-	-	+
	-	+	+	+	-	-	-	+

注: +: 阳性组; -: 阴性组.

Note: +: Positive group; -: Negative group.

(图 3A), 且在紫外灯下可见绿色荧光(图 3B). 为确保检测结果的准确性, 进行 3 次重复实验, 数据统计如表 3 所示. 结果表明氯化锰终浓度低于 0.5 mmol/L (组别 4、3、2、8)时, 建立的 PSR 反应正常进行. 但氯化锰终浓度高于 0.4 mmol/L (组别 1、7、6、5)时, 过量的锰离子可能对 PSR 反应有抑制作用. 同时组别 8 阴、阳性颜色对比与组别 2、3、4 相比, 视觉差异更加明显, 而且显色时间更短. 因此, 组别 8 (钙黄绿素 50  $\mu$ mol/L、氯化锰 0.4 mmol/L)可作为钙黄绿素指示剂的使用浓度.

同时羟基萘酚蓝指示剂(HNB)结果显示, 阳性组溶液反应 40 min 后由紫色变成天蓝色, 而阴性组溶液保持紫色不变(图 4), 因此 0.2% HNB 可作为 HNB 指示剂的使用浓度.

2.3 PSR 反应特异性和灵敏度检测

根据建立的 PSR 反应体系, 对包括铜绿假单胞菌在内的 13 株常见细菌进行 PSR 特异性检测. 只有 *P. aeruginosa* 的基因组 DNA 呈现阳性结果(钙黄绿素指示剂显绿色, HNB 指示剂显蓝色且电泳呈特异性梯状条带). 其他 12 个对照样品, 分别为 *Shigella flexneri*、*Escherichia coli*、*Salmonella enterica*、*Cronobacter sakazakii*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Enterococcus faecium*、*Rhodococcus equi*、*Bacillus cereus*、*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*、*P. putida*、*P. fluorescens*、*P. stutzeri* 以及阴性对照(添加无菌水)呈现阴性结果(图 5). 实验结果表明, 基于 *tox A* 建立的 PSR 检测法对 *P. aeruginosa* 具有较高的特异性.



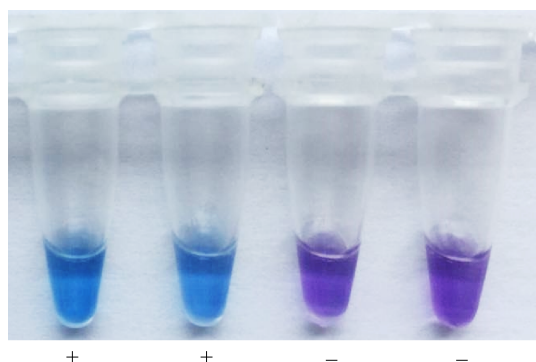


图4 羟基萘酚蓝指示剂显色结果

Figure 4 Indicating results of HNB indicator

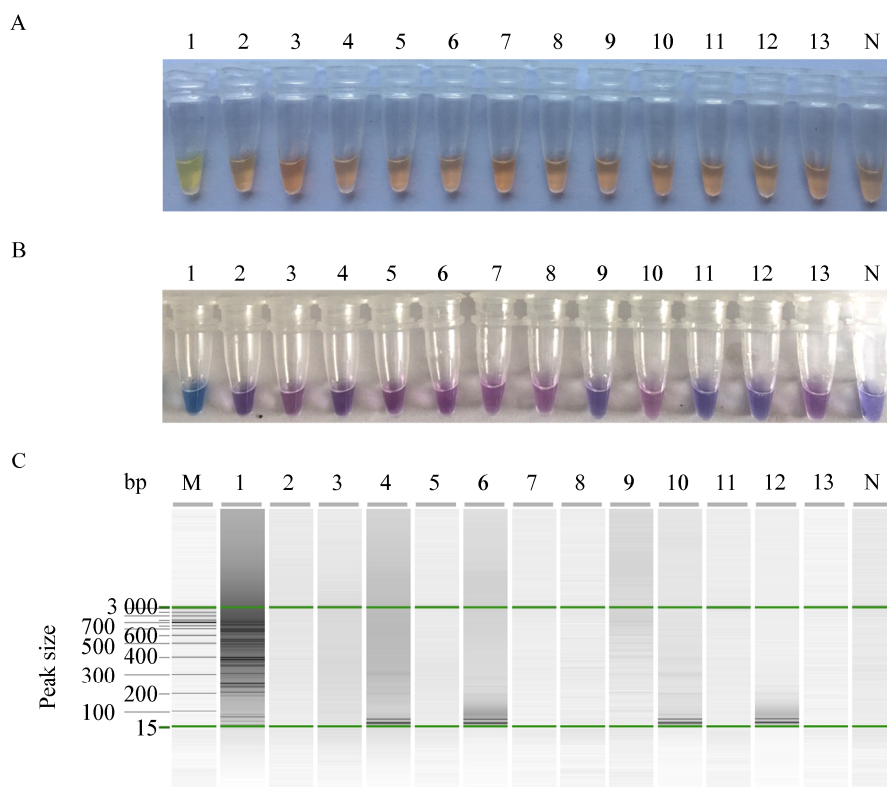
注: +: 阳性组; -: 阴性组.

Note: +: Positive group; -: Negative group.

提取纯培养铜绿假单胞菌基因组 DNA 作为阳性模板, 对模板进行 10 倍比梯度稀释, 检测 PSR 反应的灵敏度。由图 6 可知, PSR 检测 *toxA* 的灵敏度为 1.011 5 pg/μL。

## 2.4 PCR 和 PSR 反应在包装饮用水中的灵敏度检测

对人工污染包装饮用水样品提取 DNA 进行 PSR 和 PCR 灵敏度检测。由图 7 可知, PSR 反应灵敏度达到 20 CFU/mL (图 7, A6、B6、C6), PCR 反应灵敏度达到 200 CFU/mL (图 7, D5)。结果表明建立的 PSR 方法灵敏度较高, 是 PCR 反应灵敏度的 10 倍。

图5 基于铜绿假单胞菌 *toxA* 基因 PSR 检测对其他不同病原菌的特异性Figure 5 The product specificity of *toxA* targeted PSR for different pathogens

注: A: 钙黄绿素显色结果; B: 羟基萘酚蓝显色结果; C: 毛细管凝胶电泳结果. M: Alignment marker 15 kb/3 kb; 1: 铜绿假单胞菌; 2: 志贺氏菌; 3: 大肠埃希菌; 4: 沙门氏菌; 5: 阪崎杆菌; 6: 副溶血弧菌; 7: 粪肠球菌; 8: 马红球菌; 9: 蜡状芽孢杆菌; 10: 金黄色葡萄球菌; 11: 恶臭假单胞菌; 12: 荧光假单胞菌; 13: 施氏假单胞菌; N: 阴性对照.

Note: A: Visualized with Calcein; B: HNB; C: Capillary gel electrophoresis. M: Alignment marker 15 kb/3 kb; 1: *P. aeruginosa*; 2: *Shigella flexneri*; 3: *Escherichia coli*; 4: *Salmonella enterica*; 5: *Cronobacter sakazakii*; 6: *Vibrio parahaemolyticus*; 7: *Enterococcus faecium*; 8: *Rhodococcus equi*; 9: *Bacillus cereus*; 10: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*; 11: *P. putida*; 12: *P. fluorescens*; 13: *P. stutzeri*; N: Negative control.

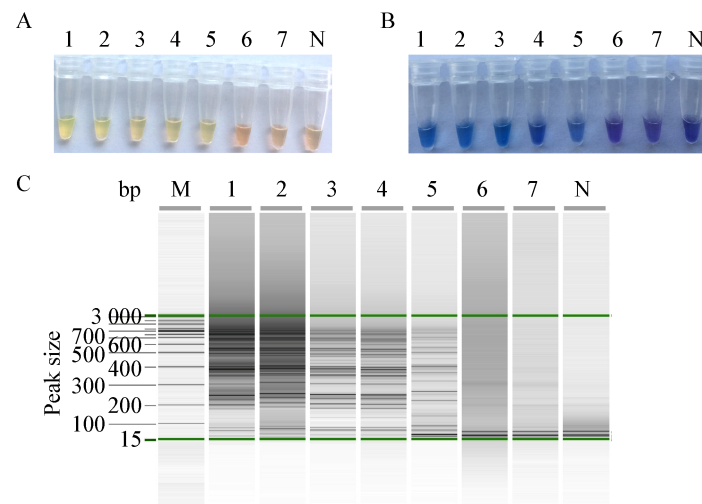


图 6 PSR 灵敏性检测钙黄绿素显色结果(A)、羟基萘酚蓝显色结果(B)和毛细管凝胶电泳结果(C)

Figure 6 The detection sensitivity of PSR visualized with Calcein (A), HNB (B) and capillary gel electrophoresis (C)

Note: M: Alignment marker 15 kb/3 kb; 1: 10.115 ng/μL; 2: 1.0115 ng/μL; 3: 101.15 pg/μL; 4: 10.115 pg/μL; 5: 1.0115 pg/μL; 6: 101.15 fg/μL; 7: 10.115 fg/μL; N: Negative control.

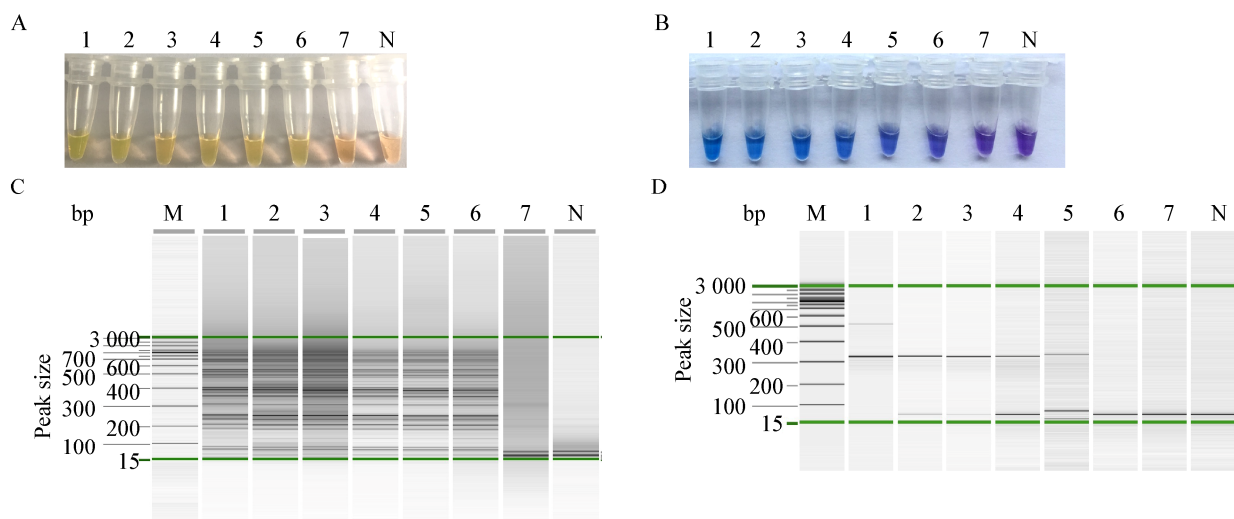


图 7 人工接种铜绿假单胞菌污染的包装饮用水 PSR (A、B、C)和 PCR (D)反应灵敏度对比

Figure 7 The *toxA* detection sensitivity by PSR (A, B, C) and PCR (D) for artificial contamination of *P. aeruginosa* in packaged drinking water

注: A: PSR 钙黄绿素显色结果; B: PSR 羟基萘酚蓝显色结果; C: PSR 毛细管电泳结果; D: PCR 毛细管凝胶电泳结果. M: Alignment marker 15 kb/3 kb; 1:  $2 \times 10^6$  CFU/mL; 2:  $2 \times 10^5$  CFU/mL; 3:  $2 \times 10^4$  CFU/mL; 4:  $2 \times 10^3$  CFU/mL; 5:  $2 \times 10^2$  CFU/mL; 6:  $2 \times 10^1$  CFU/mL; 7:  $2 \times 10^0$  CFU/mL; N: 阴性对照.

Note: A: Calcein; B: HNB; C: Capillary electrophoresis; D: PCR capillary gel electrophoresis. M: Alignment marker 15 kb/3 kb; 1:  $2 \times 10^6$  CFU/mL; 2:  $2 \times 10^5$  CFU/mL; 3:  $2 \times 10^4$  CFU/mL; 4:  $2 \times 10^3$  CFU/mL; 5:  $2 \times 10^2$  CFU/mL; 6:  $2 \times 10^1$  CFU/mL; 7:  $2 \times 10^0$  CFU/mL; N: Negative control.

## 2.5 PSR 反应检测样本分离株

对 16 株包装饮用水来源的铜绿假单胞菌分离株提取基因组 DNA, 以无菌水和铜绿假单胞菌阴性的包装饮用水样本为对照, 进行 PSR 检测。由

图 8 可知, 从包装饮用水中分离纯化到的 16 株铜绿假单胞菌菌株都被 PSR 反应检测出来, 检出率 100%。实验结果表明 PSR 反应可以用来检测实际样本可能存在的铜绿假单胞菌。



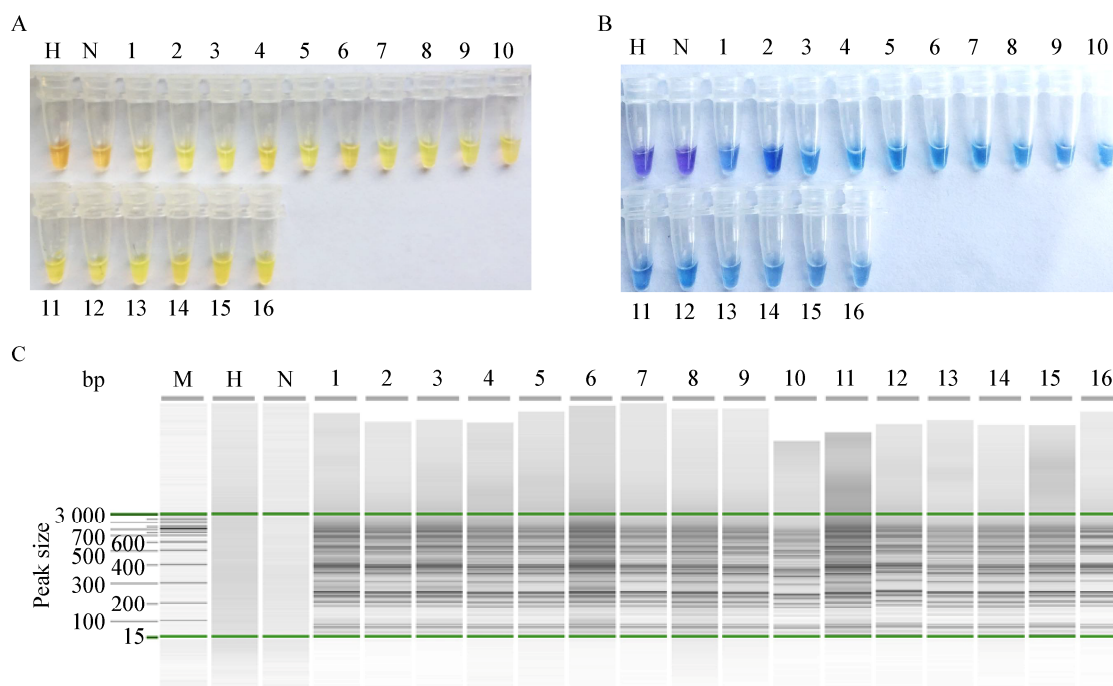


图 8 PSR 反应检测样本分离结果

Figure 8 PSR test results of packaged drinking water isolates

注: A: 钙黄绿素显色结果; B: 羟基萘酚蓝显色结果; C: 毛细管凝胶电泳结果. M: Alignment marker 15 kb/3 kb; 1-16: 样本分离株 1-16; H: H<sub>2</sub>O; N: 阴性对照.

Note: A: Calcein; B: HNB; C: Capillary electrophoresis. M: Alignment marker 15 kb/3 kb; 1-16: Isolate 1-16; H: H<sub>2</sub>O; N: Negative control.

### 3 讨论与结论

绿脓杆菌外毒素 A (ETA) 是 *P. aeruginosa* 最具毒性的胞外产物, 95% 以上的临床分离株都会分泌该种毒素<sup>[25]</sup>. 外毒素 A 调控基因——ETA 基因(*toxA*) 在 *P. aeruginosa* 中高度保守<sup>[26]</sup>, 已被应用于 PCR 和 RT-PCR 法检测 *P. aeruginosa* 的工作中<sup>[10,27-30]</sup>. 本研究中利用生物信息学技术对 *toxA* 基因进行分析, 选取 175–379 bp 的基因片段作为 PSR 扩增的靶基因片段(表 1), BLAST 结果显示选取的基因片段高度保守. 针对该 *toxA* 片段设计了一对特异性扩增引物(Ft/Bt), 该引物不同于其他研究引物<sup>[17]</sup>, 扩增结果证明了 PSR 反应的可行性(图 1), 且灵敏度得到提升. 同时为满足快速检测的要求, 我们又设计了一对特异性的加速引物(IF/IB), 将 PSR 反应时间由 90 min 缩短至 40 min (图 1). 在 *toxA* 基因、扩增引物、加速引物的高度特异性的三重保证下, 检测更为准确, 特异性实验结果显示基于 *toxA*

基因的 PSR 检测具有很好的特异性(图 5).

我们建立的 PSR 方法是利用具有链置换活性的高效 *Bst* DNA 聚合酶, 使反应在等温(65 °C)条件下快速进行, 因此等温条件下使 DNA 双链解链的关键物质甜菜碱的浓度变化至关重要. 甜菜碱浓度梯度实验结果显示浓度为 0.8 mol/L 时, PSR 反应效率最高(图 2). 气溶胶污染是困扰整个核酸扩增领域的难题, PSR 反应扩增效率高, 反应剧烈, 也不免会形成带有大量核酸的气溶胶. 为防止气溶胶污染, 确保实验准确性, 反应前将 10 μL 石蜡油加入到反应管中, 反应过程中有效地阻止了气溶胶的挥发, 并且对扩增反应无任何影响.

PSR 反应过程中, 大量 DNA 和不溶性的焦磷酸镁被合成, 导致溶液浊度增加, 浊度达到一定浓度时, 可通过凝胶电泳观察形成特异性“梯形条带”<sup>[19]</sup>. 因此 PSR 扩增产物的检测法主要有浊度仪检测和凝胶电泳检测. 为符合快速简单的检测要

求, 我们采用钙黄绿素和羟基萘酚蓝为指示剂。钙黄绿素是一种螯合剂, 在  $\text{Mn}^{2+}$  存在时被淬灭不发光。随着 PSR 反应的进行, 阳性反应形成的焦磷酸根与钙黄绿素竞争  $\text{Mn}^{2+}$ , 当钙黄绿素游离出来便可自发荧光, 由原本的橘黄色变成亮绿色。本实验中, 我们研究了不同浓度比的钙黄绿素与氯化锰(表 2)的显色效果, 实验结果显示钙黄绿素  $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、氯化锰  $0.4\text{ mmol/L}$  时显色效果最佳, 显色时间最短(图 3)。羟基萘酚蓝(HNB)是一种金属离子指示剂, 高浓度金属离子环境下溶液呈紫色, 低浓度金属离子环境下溶液呈天蓝色。在 PSR 反应开始前, 游离的  $\text{Mg}^{2+}$  浓度较高( $8\text{ mmol/L}$ ), 加入 HNB 后溶液呈紫色, 而当发生 PSR 反应后, 游离的  $\text{Mg}^{2+}$  不断消耗生成焦磷酸镁沉淀, 导致溶液由紫色变为天蓝色。我们参考 Goto 等<sup>[24]</sup>的方法, 采用  $0.2\%$  HNB, 能有效地显示 PSR 反应结果(图 4)。两种颜色指示剂均在反应前添加, 使得反应从开始至结束均不需要打开反应管, 可避免产生假阳性, 检测时间短, 直接观察颜色变化, 肉眼即可判读结果。

通过灵敏度检测发现, PSR 灵敏性高, 最低检测限度可达到  $1.011\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (图 6)。同时, 通过人工污染包装饮用水样品检测发现, PSR 对包装饮用水样品中铜绿假单胞菌的检测限度可达  $20\text{ CFU/mL}$ , 是常规 PCR 反应灵敏度的 10 倍(图 7)。通过建立的 PSR 方法检测包装饮用水来源的铜绿假单胞菌分离株, 检出率为  $100\%$  (图 8), 表明该法可应用于实际的检测工作中。据我们所知, 本研究首次实现对包装饮用水样品实现高灵敏度快速可视化检测。综上所述, 本研究所建立的 PSR 检测技术, 引物设计简单, 只需一种酶, 无需反复加样, 能在恒温条件下完成反应, 具有良好的特异性、敏感性、易操作性。同时使用适用于该技术的扩增结果快速判读方法, 在反应基础上不再借助于浊度仪、电泳槽等任何检测仪器, 直接通过肉眼观察即可判读实验结果, 具有方便、快速的优点。

## REFERENCES

- [1] Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(4): 1306-1311
- [2] Niu ST. Microbiological quality of bottled water on the market and related regulations[J]. *Foreign Medical Sciences (Section of Hygiene)*, 1994, 21(1): 31-34 (in Chinese)  
牛胜田. 市售瓶装水的微生物学质量及有关条例[J]. *国外医学卫生学分册*, 1994, 21(1): 31-34
- [3] Zhang SH, Wu QP, Xu XK, et al. Comparison of detection of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(11): 1403-1405, 1335 (in Chinese)  
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
- [4] Zhang XD. Interpretation of *National Food Safety Standard Packaged drinking water* (GB 19298-2014)[J]. *The Beverage Industry*, 2016, 19(2): 7-9 (in Chinese)  
张旭东. 《食品安全国家标准 包装饮用水》(GB 19298-2014)标准解读[J]. *饮料工业*, 2016, 19(2): 7-9
- [5] Guo LP, Ren YH, Niu SW. Pollution investigation of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled drinking water of Luohe City between 2013 and 2014[J]. *Chinese Journal of Public Health Engineering*, 2017, 16(1): 33-35 (in Chinese)  
郭辽朴, 仁蕴慧, 牛世文. 2013-2014 年漯河市桶装饮用水中铜绿假单胞菌污染状况调查[J]. *中国卫生工程学*, 2017, 16(1): 33-35
- [6] Wang WJ, Yan Y, Luo YB, et al. Analysis of the contamination status of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water and packed drinking water in Jiangxi province[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2017, 27(3): 419-421 (in Chinese)  
王文娟, 颜瑛, 罗玉彬, 等. 江西省矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(3): 419-421
- [7] Chen S, Li H, Li DH, et al. Analysis of the contamination of barreled drinking water with *P. aeruginosa*[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2015, 42(6): 1129-1130, 1135 (in Chinese)  
陈松, 李红, 李德华, 等. 桶装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况分析[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(6): 1129-1130, 1135
- [8] Wang YM, Tang Z, Qiao X, et al. Survey of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in barreled water in Jiangsu province[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2015, 25(12): 2019-2020 (in Chinese)  
王燕梅, 唐震, 乔昕, 等. 江苏省桶装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况调查[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(12): 2019-2020
- [9] Luo YQ. Analysis of the microbial contaminations of packaged drinking purified water[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(1): 360-363 (in Chinese)  
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
- [10] Xiao XL, Zhang JW, Gong J, et al. Rapid detection of

- Pseudomonas aeruginosa* by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targeting *ETA* gene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(4): 581-585 (in Chinese)
- 肖性龙, 张经纬, 龚俊, 等. *ETA* 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测铜绿假单胞菌的研究[J]. 生物工程学报, 2008, 24(4): 581-585
- [11] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. Nature Protocols, 2008, 3(5): 877-882
- [12] Wang H, Huang Q, Huang JF, et al. Rapid detections of *OprD2* gene in *Pseudomonas aeruginosa* using loop-mediated isothermal amplification[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2013, 36(6): 543-547 (in Chinese)
- 王欢, 黄庆, 黄君富, 等. 铜绿假单胞菌 *OprD2* 基因环介导等温扩增快速检测技术的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(6): 543-547
- [13] Xu YM, Zou DY, Tang F, et al. Design and analysis of LAMP primers used in differentially detecting *Yersinia enterocolitica* and *Brucella* spp.[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2013, 17(1): 19-22 (in Chinese)
- 徐云明, 邹德颖, 唐峰, 等. 区别检测小肠结肠炎耶尔森氏菌与布鲁氏菌 LAMP 引物的设计与分析[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(1): 19-22
- [14] Xiao LP. Application and study of LAMP technique in the detection of *Salmonella* in infectious diarrhea[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(24): 4240-4242 (in Chinese)
- 肖丽萍. 环介导技术在感染性腹泻沙门菌检测中的应用与研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(24): 4240-4242
- [15] Zhou Y, Wan Q, Cai ZH, et al. Loop-mediated isothermal amplification-based rapid detection for *Shigella dysenteriae* in food samples[J]. Microbiology China, 2017, 44(9): 2247-2254 (in Chinese)
- 周杨, 万强, 蔡芷荷, 等. 环介导等温扩增技术在食品中痢疾志贺氏菌快速检测[J]. 微生物学通报, 2017, 44(9): 2247-2254
- [16] Ding WC, Hu JR, Shi YH, et al. Establishment of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2009, 42(1): 70-76 (in Chinese)
- 丁文超, 胡健饶, 史雨红, 等. 环介导恒温扩增技术快速检测溶藻弧菌[J]. 分子细胞生物学报, 2009, 42(1): 70-76
- [17] Dong DR, Zou DY, Liu H, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* targeting the *toxA* gene in intensive care unit patients from Beijing, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1100
- [18] Dong DR. The study of a new nucleic acid amplification technology termed Polymerase Spiral Reaction (PSR) and application in POCT detection[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Academy of Military Medical Sciences, 2016 (in Chinese)
- 董德荣. 一种新型核酸恒温扩增方法的研究及其在现场检测中的应用[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院博士学位论文, 2016
- [19] Liu W, Dong DR, Yang Z, et al. Polymerase Spiral Reaction (PSR): a novel isothermal nucleic acid amplification method[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12723
- [20] Dong DR, Liu W, Li H, et al. Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 519
- [21] Liu W, Xu YH, Dong DR, et al. Survey and rapid detection of *Bordetella pertussis* in clinical samples targeting the BP485 in China[J]. Frontiers in Public Health, 2015, 3: 39
- [22] Kidd TJ, Grimwood K, Ramsay KA, et al. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(1): 263-268.
- [23] Wang P, Zhang ZL, Qiao YS. Differentiation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and its interference strains by Fourier transform-infrared spectroscopy[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(4): 302-305 (in Chinese)
- 王萍, 张占林, 乔勇升. 傅立叶变换红外光谱技术对铜绿假单胞菌及其干扰菌的分类鉴定[J]. 食品科技, 2017, 42(4): 302-305
- [24] Goto M, Honda E, Ogura A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue[J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167-172
- [25] Igilewski BH, Kabat D. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975, 72(6): 2284-2288
- [26] Gray GL, Smith DH, Baldridge JS, et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(9): 2645-2649
- [27] Zhang W, Li W, Zhang WW, et al. The methodological study on rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* based on PCR technique[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(9): 1065-1067 (in Chinese)
- 张伟, 李闻, 张伟尉, 等. 基于 PCR 技术的绿脓杆菌快速检测方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1065-1067
- [28] Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(10): 3739-3745.
- [29] Qin X, Emerson J, Stapp J, et al. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(9): 4312-4317
- [30] Xu JR, Moore JE, Murphy PG, et al. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa*—comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF)[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2004, 3: 21