

# EMA-PCR 方法快速检测铜绿假单胞菌活菌研究\*

方梅<sup>1</sup>, 陆巧荣<sup>1</sup>, 王国庆<sup>2</sup>, 张宏斌<sup>1</sup>, 李建<sup>3△</sup>

1. 江苏省昆山市疾病预防控制中心(昆山 215300); 2. 四川大学华西公共卫生学院(成都 610041);

3. 江苏省苏州市疾病预防控制中心(苏州 215004)

**【摘要】** 目的 探讨将叠氮溴乙锭(ethidium monoazide bromide, EMA)选择渗透性与 PCR 技术相结合(EMA-PCR),建立有效快速检测铜绿假单胞菌活菌的方法。方法 以铜绿假单胞菌 *oprI* 基因为 PCR 检测靶基因,纯培养物提取模板进行 PCR,检测 PCR 灵敏度、EMA 使用浓度和曝光时间优化试验。结果 PCR 检测灵敏度为  $3 \times 10^3$  CFU/mL;曝光处理时间为 10 min;EMA 浓度  $\leq 5 \mu\text{g/mL}$  对活菌 DNA 扩增没有明显抑制,终浓度为  $1 \mu\text{g/mL}$  EMA 能有效抑制  $3 \times 10^6$  CFU/mL 死菌扩增;1%活菌混合体系检测结果阳性。结论 EMA-PCR 方法能有效快速检测铜绿假单胞菌活菌,能避免 PCR 检测可能造成的假阳性结果。

**【关键词】** 铜绿假单胞菌 EMA-PCR 活菌检测

**Study on Rapid Detecting of Live *Pseudomonas Aeruginosa* by EMA-PCR** FANG Mei<sup>1</sup>, LU Qiao-rong<sup>1</sup>, WANG Guo-qing<sup>2</sup>, ZHANG Hong-bin<sup>1</sup>, LI Jian<sup>3△</sup>. 1. Kunshan Center of Disease Control and Prevention of Jiangsu Province, Kunshan 215300, China; 2. West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Suzhou Center of Disease Control and Prevention of Jiangsu Province, Suzhou 215004, China

△ Corresponding author, E-mail: 1055729273@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To establish a effective and rapid method by Ethidium Monoazide Bromide(EMA) in combination with PCR(EMA-PCR) for the detection of live *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** The *oprI* gene was used as the target gene for PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa*, and PCR amplification was carried out by utilizing its pure isolates as the template. Sensitivity, EMA concentration and exposure time were optimized. **Results** The sensitivity of PCR detection was  $3 \times 10^3$  CFU/mL, exposure time was 10 min. when the EMA concentration was not more than  $5 \mu\text{g/mL}$ , no obvious inhibition to the amplification of DNA derived from viable bacteria was observed. The PCR amplification of DNA derived from  $3 \times 10^6$  CFU/mL dead cells could be inhibited effectively by EMA at the final concentration of  $1 \mu\text{g/mL}$ . The results demonstrated the established method could detect 1% live bacteria from a mixed bacterial population. **Conclusion** EMA-PCR can detect live bacteria of *Pseudomonas aeruginosa* effectively and avoid false positive result of the PCR detection.

**【Key words】** *Pseudomonas aeruginosa* EMA-PCR Detection of viable bacteria

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是重要水源性和食源性致病菌之一,在自然界中分布广泛,对消毒剂、干燥、紫外线等理化因素有极强抵抗力,可引起急性肠道炎、脑膜炎、败血症和皮肤炎症等疾病<sup>[1,2]</sup>,食入含铜绿假单胞菌的水或食品可能被感染,并导致严重疾病。目前,国内有关铜绿假单胞菌污染饮用天然矿泉水及桶装水的报道逐渐增多,检出率  $7.65\% \sim 35.42\%$ <sup>[3-6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>显示,现行桶装饮用水铜绿假单胞菌检验方法对处于逆境下不可培养状态的铜绿假单胞菌无法检出;在桶装水中有大量死菌存在时,以 DNA 为模板的传统 PCR 方法可以从样本中扩增出目的基因,使死菌或细胞

膜破损丧失致病力的细菌仍被检出,即假阳性,导致得出与国标检测方法不一致的结果,成为普通 PCR 方法作为食源性致病菌检测手段的障碍。为解决样品致病菌检测中出现此种困境情况,国内外有研究者开展将叠氮溴乙锭(ethidium monoazide bromide, EMA)结合 PCR 方法选择性检测样品中活菌的研究<sup>[8,9]</sup>,EMA 是一种能渗透进入细胞壁(膜)不完整菌体内的 DNA 结合染料<sup>[10]</sup>,可与死菌基因组 DNA 共价结合,使其不能作为模板进行 PCR 扩增反应,提高活菌检测准确性<sup>[9]</sup>。本研究通过观察 EMA 对 PCR 检测铜绿假单胞菌死菌和活菌的影响,拟建立一种快速有效检测铜绿假单胞菌活菌方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、主要试剂与仪器设备

\* 苏州市饮用水安全与水性疾病监测公共服务平台 2012 年开放课题(No. SZPT2012002)资助

△ 通讯作者, E-mail: 1055729273@qq.com

铜绿假单胞菌 ATCC27853 购自广东环凯微生物科技有限公司。EMA (Sigma), Go Taq Green Master Mix (Promega), 1 000 bp Marker (TaKaRa), SCDLP 肉汤、十六烷三甲基溴化铵培养基、营养肉汤、营养琼脂(北京路桥技术有限责任公司)。仪器: PCR 仪 (Bio-Rad), 凝胶成像系统 (Kodak), 650 W 卤素灯 (Osram)。

## 1.2 增菌培养

将铜绿假单胞菌接种于营养肉汤, 37 °C, 150 r/min 培养 16 h, 调整菌悬液浓度为  $3 \times 10^6$  CFU/mL 制成活菌悬液。

## 1.3 活菌热致死时间的确定

从 1.2 制备的浓度为  $3 \times 10^6$  CFU/mL 活菌悬液, 分别取 1 mL 至 5 支 1.5 mL EP 管中, 95 °C 水浴分别加热 3、5、8、10、15 min, 处理后菌悬液冷却至室温后, 倾注平板, 37 °C 培养 48 h 计数。试验重复 3 次。

## 1.4 PCR 反应

根据 GenBank 中铜绿假单胞菌 *oprI* 基因序列设计特异性引物, 由上海闪晶生物技术公司合成引物。引物序列为 F: 5'-GCAGCCACTCCAAGA AACC-3'; R: 5'-GGCACGCTCGTTAGCCTC-3', 扩增产物片段长度 158 bp。菌悬液 12 000 r/min 离心 2 min 去上清液, 加 500  $\mu$ L 去离子水洗涤, 12 000 r/min 离心 2 min 去上清液, 加 100  $\mu$ L 超纯水重悬沉淀, 100 °C 沸水浴 10 min, 冷却至室温, 12 000 r/min 离心 2 min, 上清转至另一 EP 管中作为 PCR 模板, -20 °C 保存。PCR 反应体系: 2  $\times$  Taq MasterMix 12.5  $\mu$ L, 引物各 1  $\mu$ L (终浓度为 0.4  $\mu$ mol/L), DNA 模板 1.5  $\mu$ L, 无菌去离子水补足至 25  $\mu$ L。循环参数: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 终延伸 72 °C 2 min。PCR 产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

## 1.5 PCR 反应灵敏度试验

将新鲜培养的铜绿假单胞菌作 10 倍梯度稀释, 取适当稀释度菌液各 1 mL 制备模板 DNA, 进行 PCR 扩增。同时, 取相应稀释度菌液 1 mL 倾注平板, 37 °C 培养 24 h 计数。

## 1.6 EMA-PCR 反应及条件优化

**1.6.1 EMA 最佳处理浓度确定** 分别取 1 mL 铜绿假单胞菌活菌悬液 ( $3 \times 10^6$  CFU/mL) 于离心管, 离心后超纯水重悬, 加入 EMA 使其终浓度分别为 0、1、5、10、20、40、80  $\mu$ g/mL, 混匀, 避光室温放置 10 min, 离心管置冰上且打开管盖, 距 650 W 卤

素灯 20 cm, 曝光照射 10 min, 再按 1.4 的方法提取模板, 进行 PCR 扩增, 确定不抑制活菌 PCR 扩增的 EMA 浓度。

分别取 1 mL 经加热致死的铜绿假单胞菌菌悬液 ( $3 \times 10^6$  CFU/mL) 于离心管, 离心后超纯水重悬, 加入 EMA 使其终浓度分别为 0、0.1、0.5、1、10、50  $\mu$ g/mL, 经同样处理后提取模板进行 PCR 扩增, 确定能有效抑制死菌 PCR 扩增的 EMA 浓度。

**1.6.2 光处理时间的优化** 分别取 1 mL 铜绿假单胞菌活菌悬液和死菌悬液 ( $3 \times 10^6$  CFU/mL) 于离心管中, 经离心重悬加入 EMA 使终浓度达到 1  $\mu$ g/mL, 避光室温放置 10 min, 离心管置冰上且打开管盖, 距 650 W 卤素灯 20 cm, 分别曝光照射 0、1.5、10、15 和 20 min, 按 1.4 的方法提取模板, 进行 PCR 扩增和电泳分析。

**1.6.3 EMA 对不同死、活菌比例的铜绿假单胞菌混悬液的影响** 将铜绿假单胞菌活细胞菌悬液和死细胞菌悬液 (浓度均为  $3 \times 10^6$  CFU/mL) 按不同比例混合配制成含有 1%、2%、5%、10%、20%、50% 和 100% 的活细胞菌悬液混合体系。分别加入终浓度 1  $\mu$ g/mL EMA, 避光室温放置 10 min, 离心管置冰上且打开管盖, 曝光处理 10 min, 进行 PCR 扩增和电泳分析。

## 2 结果

### 2.1 铜绿假单胞菌热致死时间的确定

结果显示, 95 °C 热处理铜绿假单胞菌 10 min, 平板菌落数为 0, 该菌完全失活。后续试验以此条件处理铜绿假单胞菌得到死菌。

### 2.2 PCR 反应灵敏度

随菌液浓度递减, 条带亮度减弱, 至第 7 条带已基本无显影, 此条带对应的平板计数结果为  $3 \times 10^3$  CFU/mL, 因而 PCR 检测灵敏度为  $3 \times 10^3$  CFU/mL, 见图 1。

### 2.3 不同浓度 EMA 对铜绿假单胞菌活菌和死菌 PCR 检测的影响

结果表明 (图 2A), 本试验条件下, 随着 EMA 浓度逐渐增加, 活菌 PCR 扩增条带逐渐变弱, 当 EMA 浓度为 40  $\mu$ g/mL 时, 对活菌 DNA 扩增完全抑制, 电泳未见相应条带; 当 EMA 浓度为 10  $\mu$ g/mL 时, 电泳相应条带亮度明显减弱, EMA 对活菌 DNA 扩增产生抑制作用; EMA 浓度不大于 5  $\mu$ g/mL 对活菌 DNA 扩增没有明显抑制作用。

由图 2B 可见, 当 EMA 浓度为 0.1  $\mu$ g/mL 时,

可明显抑制菌悬液死细胞 DNA 扩增,当 EMA 浓度不小于 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,电泳未见相应条带。EMA 浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,即可有效抑制铜绿假单胞菌死菌 PCR 扩增。

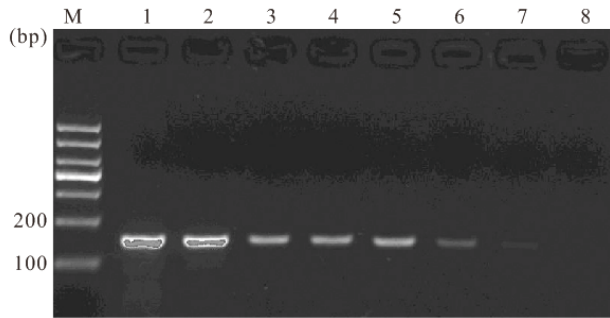


图 1 PCR 检测铜绿假单胞菌灵敏度

Fig 1 The detection limit of PCR for *Pseudomonas aeruginosa*

M: DL 1 000 DNA marker; 1-7:  $3 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$  CFU/mL; 8: Negative control

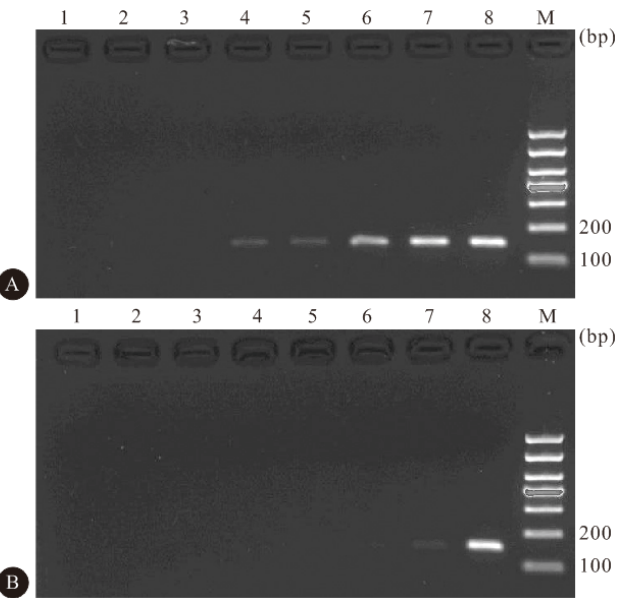


图 2 EMA 浓度对 EMA-PCR 检测铜绿假单胞菌活菌(A)和死菌(B)的影响

Fig 2 Effect of EMA concentration on the detection of live(A) and dead(B) *Pseudomonas aeruginosa*

M: DL 1 000 DNA marker; 1: Negative control; 2-8 in fig A: EMA 80,40,20,10,5,1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 2-8 in fig B: EMA 50,10,5,1,0.5,0.1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$

### 2.4 光处理时间优化结果

将浓度为  $3 \times 10^6$  CFU/mL 的铜绿假单胞菌活菌悬液加入终浓度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 EMA,分别曝光 0、1、5、10、15 和 20 min 处理后,均能扩增出 158 bp 目的基因(图 3A)。浓度为  $3 \times 10^6$  CFU/mL 的铜绿假单胞菌死菌悬液同样处理后,PCR 扩增,曝光照射 5 min 以上无扩增产物(图 3B)。结果表明,菌液

中加入终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 EMA,曝光照射 5 min 以上,可完全抑制  $3 \times 10^6$  CFU/mL 死细胞 DNA 扩增。本试验选择曝光处理时间为 10 min,保证多余 EMA 全部被光分解,不影响 PCR 扩增结果。

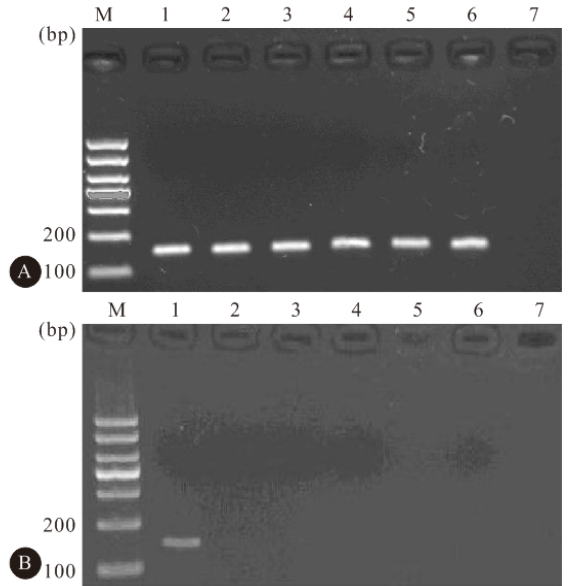


图 3 不同光处理时间对铜绿假单胞菌活菌(A)和死菌(B)EMA-PCR 反应的影响

Fig 3 Effect of different light processing time on the result of the EMA-PCR detection of live(A) and dead(B) *Pseudomonas aeruginosa*

M: DL 1 000 DNA marker; 1-6: 0,1,5,10,15 and 20 min; 7: Negative control

### 2.5 EMA 处理不同活菌比例的铜绿假单胞菌混悬液

由图 4 可见,用终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EMA 处理  $3 \times 10^6$  CFU/mL 活菌和死菌悬液配制的 1%、2%、5%、10%、20%、50% 和 100% 活细胞混合体系,随着活菌比例减低,其扩增产物条带亮度逐渐减弱。本研究显示,当活菌在混合菌液中的占比为 1% 时,仍能扩增出相应特异性条带。

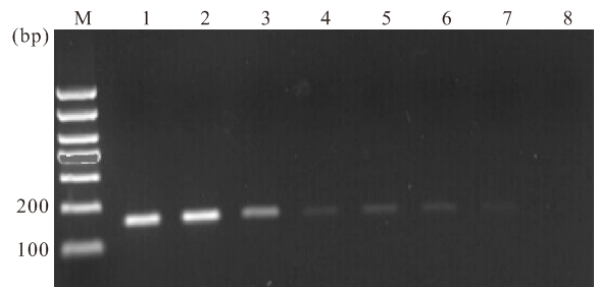


图 4 EMA-PCR 对铜绿假单胞菌活菌/死菌混合物的检测

Fig 4 The EMA-PCR detection of the mixed bacterial communities with live and dead *Pseudomonas aeruginosa*

M: DL 1 000 DNA marker; 1-7: The proportion of live bacterial in the mixed bacterial communities 100%, 50%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%; 8: Negative control

### 3 讨论

鉴于目前关于铜绿假单胞菌污染饮用水报道增多,而我国饮用水都会经水消毒处理后到达终端用户,饮用水中微生物处于死亡状态,对人体不具有危害性,只有残留的活性致病菌才是有害的并需要检测。传统 PCR 技术是基于 DNA 扩增的方法,最大缺陷是无法区分水中死亡状态致病菌所残留的 DNA 和活菌 DNA<sup>[7]</sup>,本研究利用 EMA 结合 PCR 技术选择性扩增铜绿假单胞菌活菌;同时,EMA 结合 PCR 技术选择性扩增致病菌活细胞 DNA 的研究不多,到目前为止报道集中于对沙门氏菌、肠出血性大肠杆菌 O157、副溶血性弧菌的检测<sup>[8,9,11,12]</sup>,尚未见到 EMA-PCR 技术应用于易导致饮用水污染的铜绿假单胞菌活菌检测的研究报道。

本研究利用 EMA-PCR 方法分别对相同浓度铜绿假单胞菌活菌和死菌悬液进行检测时发现,当 EMA 浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,对活菌 DNA 扩增产生抑制作用,当 EMA 浓度增大至 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,活菌 DNA 扩增完全被抑制,只有当 EMA 浓度不大于 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,对活菌 DNA 扩增不会产生抑制;当 EMA 浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,即可明显抑制死菌 DNA 扩增,EMA 浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,可完全抑制死菌 DNA 扩增,与赵瑜等<sup>[11]</sup>的研究结果一致,本研究最终选择 EMA 使用浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,能够使死菌 DNA 扩增完全被抑制,同时不会抑制活菌 DNA 扩增。在 EMA 处理不同活菌比例的铜绿假单胞菌混悬液试验中,随着死菌比例升高,因死菌 DNA 被 EMA 抑制,即能作为 PCR 模板的 DNA 含量逐渐减少,扩增产物条带亮度也随着降低,试验结果证明 EMA 能特异性抑制混合体系中死菌 DNA 扩增,当活菌比例低至 1% 时,仍能出现特异性扩增条带,可见本研究建立的铜绿假单胞菌活菌检测方法灵敏度高,在今后的食源性致病菌检测工作中有应用前景。

本研究建立的 EMA-PCR 方法能有效快速检

测铜绿假单胞菌活菌,能避免 PCR 技术用于样品检测时可能造成假阳性的失真试验结果,本方法可为铜绿假单胞菌污染食品及饮用水引起的食物中毒事件提供高效准确的检测技术和处理依据。

### 参 考 文 献

- Huang YC, Lin TY, Wang CH. Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in previously healthy infants and children: analysis of forty-three episodes. *Pediatr Infect Dis*, 2002; 21(11): 1049-1052.
- 何时军, 金益梅, 黄爱蓉等. 儿童社区获得性铜绿假单胞菌致感染性休克九例分析. *中华儿科杂志*, 2008; 46(5): 333-338.
- 邓梅清, 张菊梅, 郭伟鹏等. 矿泉水中铜绿假单胞菌污染状况调查研究. *中国卫生检验杂志*, 2009; 19(11): 2672-2673.
- 陈倩, 陆峥, 杨玉芝. 北京市瓶装矿泉水铜绿假单胞菌污染调查. *中国食品卫生杂志*, 1995; 7(4): 38-39.
- 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. *环境与健康杂志*, 2001; 18(3): 157-159.
- 张永清, 吴清平, 彭飞艇等. 矿泉水中铜绿假单胞菌及溴酸盐污染情况分析. *食品与生物技术学报*, 2012; 31(10): 1322-1327.
- 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. *现代食品科技*, 2011; 27(11): 1403-1405, 1335.
- 祝儒刚, 吕淑霞, 刘月萍等. 基于 DNA 染料 EMA 的 RT-PCR 技术定量检测海产品中病原性副溶血弧菌活细胞. *食品科学*, 2011; 32(8): 219-225.
- Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71(2): 1018-1024.
- Bolton PH, Kearns DR. Spectroscopic properties of ethidium monoazide: a fluorescent photoaffinity label for nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 1978; 5(12): 4891-4903.
- 赵瑜, 李金磊, 董鹏等. EMA 与 PCR 结合检测沙门氏菌方法的研究. *饲料与畜牧科学*, 2013; 34(11): 113-115.
- 黄偲颖, 方梅, 罗影殊等. EMA-PCR 技术检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7. *四川大学学报(医学版)*, 2014; 45(1): 152-155.

(2014-05-20 收稿, 2014-09-09 修回)

编辑 沈进