

包装饮用水中铜绿假单胞菌实时荧光 定量 PCR 快速检测

Study on the rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time
fluorescence quantitative PCR in packaged drinking water

王芳妹^{1,2} 徐 越¹ 林 丹¹

WANG Fang-mei^{1,2} XU Yue¹ LIN Dan¹

朱秋燕¹ 洪振柏¹ 蒋 伟¹

ZHU Qiu-yan¹ HONG Zhen-bai¹ JIANG Wei¹

(1. 湖南省产商品质量检验研究院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南师范大学生命科学学院蛋白质化学与
发育生物学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081)

(1. Hunan Province Produced Commodity Quality Inspection Institute, Changsha, Hunan 410007, China;
2. Key Laboratory of Protein Chemistry and Development Biology of State Education Ministry of China,
College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)

摘要:目的:有效弥补传统微生物学检验方法的缺陷。方
法:针对 GB 8538—2022 中铜绿假单胞菌的毒力基因
pcrL 和 16S rRNA 基因的 V3~V4 区保守序列设计合成
引物和探针,建立实时荧光 PCR 方法。结果:该方法可以
有效扩增常见标准储备菌株的 16S rRNA 基因,且对铜绿
假单胞菌标准储备菌株的毒力基因 *pcrL* 的检测效果良
好,观察到明显的“S”型扩增曲线,但对常见的食源性致病
菌无扩增曲线。当菌液浓度<10 CFU/mL 时,*pcrL* 基因
仍有扩增曲线,其检测范围为 $10 \sim 10^7$ CFU/mL,检测限为
10 CFU/mL;不同菌液浓度下毒力基因 *pcrL* 的 Ct 平均
值为 18.0~38.6。对近 3 年湖南省 14 个县、市抽查检验
(瓶)桶装水中铜绿假单胞菌不合格样品进行进一步检
测,符合率达到 100%。结论:该方法对铜绿假单胞菌携
带毒力因子 *pcrL* 检测的灵敏度较高;且操作简便、特异
性强,具有良好的实用性。

关键词:铜绿假单胞菌;实时荧光定量 PCR;毒力基因;
pcrL;16S rRNA;饮用水

Abstract: Objective: The molecular biological test has the
advantage of fast and sensitive, which can effectively make up for

the defects of the traditional microbial test method. **Methods:**
According to the conserved sequences of the V3~V4 region of
the virulence gene *pcrL* and the universal gene 16S rRNA of
Pseudomonas aeruginosa in GB 8538—2022, primers and probes
were designed and synthesized, and a real-time fluorescent PCR
kit was established in this study. **Results:** The results showed
that the common standard reserve strain 16S rRNA was
amplified, and the virulence gene *pcrL* was only effective for
nucleic acid detection of *Pseudomonas aeruginosa* standard
reserve strain, and obvious "S" type amplification curve could be
observed, while no amplification curve was found for common
food-borne pathogens in this study. Gene *pcrL* still has
amplification curve, when the concentration of bacterial solution
was less than 10 CFU/mL, the detection range was $10 \sim$
 10^7 CFU/mL, and the detection limit was 10 CFU/mL. The Ct
mean value of virulence gene *pcrL* under different bacterial
solution concentrations ranged from 18.0 to 38.6. The results
showed that this method was highly sensitive to the detection of
the virulence factor *pcrL* carried by *Pseudomonas aeruginosa*. In
the past three years, the unqualified *Pseudomonas aeruginosa*
samples in 14 counties and cities of Hunan Province were further
detected, and the coincidence rate reached 100%. **Conclusion:**
This method is highly sensitive to detect the virulence factor *pcrL*
carried by *Pseudomonas aeruginosa*. It has the advantages of
simple operation, strong specificity, high sensitivity and good
practicability.

基金项目:湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号:
2022KJJH49)

作者简介:王芳妹(1985—),女,湖南省产商品质量检验研究院工
程师,博士。E-mail:wfmmeimei@163.com

收稿日期:2023-02-08 **改回日期:**2023-05-23

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; real-time fluorescence quantitative PCR; *pcrL*; virulence genes; 16S rRNA; drinking water

铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)俗称绿脓杆菌,是一种让免疫受损的机会性感染病原菌,一般影响肺部及泌尿道,或由伤口进入血液感染引起败血病。该菌广泛存在于各种水环境中,是评价水体微生物污染状况的重要指标^[1-4]。铜绿假单胞菌是一种重要的机会致病菌,广泛存在于各种环境中,包括水和土壤,是医院感染的主要病原体之一^[5-7]。

中国饮用水标准 GB 8537—2018 和 GB 19298—2014 规定,同批次 5 个独立包装的饮用水中,均不得检出铜绿假单胞菌^[8-9];美国、加拿大等发达国家对饮用水卫生标准也做了类似规定;世界卫生组织(WTO)的食品安全保障体系(HACCP)评估明确指出铜绿假单胞菌是婴儿瓶装饮用水的危害指示菌^[10]。对湖南省 2020—2022 年 14 个县、市抽查检验(瓶)桶装水样品的检测数据显示(表 1),铜绿假单胞菌污染情况较为严重,这引起了人们对饮用水中微生物污染状况的关注,凸显了确保饮用水质量的紧迫性。

表 1 湖南省 3 年来瓶(桶)装饮用水中铜绿假单胞菌的抽检情况

Table 1 Detection of *P. aeruginosa* in bottled drinking water in Hunan Province during the past 3 years

年份	样品数/批	不合格数/批	不合格率/%
2020	653	99	15.2
2021	658	69	10.5
2022	599	61	10.2

GB 8538—2022 中铜绿假单胞菌的检测方法采用的是传统的形态学和生物生化方法,存在一定的漏洞,一定程度上可能造成误判、漏判。张帆等^[11-15]发现一些非铜绿假单胞菌的野生分离株也会产荧光且产氨试验为阳性,而部分铜绿假单胞菌却出现产荧光但产氨试验为阴性,或是表型为绿色菌落但绿脓菌素测定试验为阴性。因此,为了保证检测结果的准确性,实际检测过程中经常需要用到分子生物学手段进行辅助检测。

冯秀娟等^[16-17]利用核酸等温环介导(LAMP)荧光检测法检测包装饮用水中的铜绿假单胞菌,该方法对引物设计要求较高,需 4 条引物,如引物特异性不足会严重影响结果的判读;吴春明等^[18]使用 SYBRGreen 实时 RT-PCR 定量方法检测铜绿假单胞菌,该方法扩增的序列特异性不佳,与任何双链 DNA 可结合,容易产生假阳性信号;黄河等^[19-22]利用 Taqman 实时定量 PCR 方法检测铜

绿假单胞菌,有效解决了常规生化检测的低效、漏检等缺点,检出限为 100 CFU/L。目前市场上现有的商品化试剂盒质量参差不齐,大多操作步骤繁琐,成本较高,对于需要考虑经济效益,又需要准确、快速、简便同时大批量检测样品的检测检验机构或公司并不适用。研究拟采用 TaqMan 探针技术,针对铜绿假单胞菌的毒力基因 *pcrL* 和 16S rRNA 基因的 V₃~V₄ 区保守序列设计合成引物和探针,同时使用多种标准储备菌株对方法的特异性、灵敏度、准确度等进行验证,并对近 3 年的湖南省国家级、省级食品安全监督抽查、风险监测和委托检验的不合格样品进行对比验证检测,旨在为桶装水企业或检验检疫机构的检测或监测提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

Chelex-100 提取液、Taq PCR Master Mix(2×):宝生物工程(大连)有限公司;

脑心浸液培养基、CN 琼脂、十六烷三甲基溴化铵、绿脓菌素琼脂、平板计数琼脂(PCA)等培养基:北京陆桥技术股份有限公司;

引物、探针:上海生工生物工程有限公司;

GN/GP 卡:生物梅里埃美国股份有限公司;

试验所用标准储备菌株:美国菌株保存中心(ATCC)和中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC);

冷冻离心机:FRESCO 17 型,美国/赛默飞世尔科技;

不锈钢多联过滤系统:HTY-30B 隔膜型,浙江泰林生物技术股份有限公司;

漩涡混匀器:VXMNAL 型,奥豪斯仪器(常德)有限公司;

实时荧光定量 PCR 仪:7500 Fast Real-Time PCR System 型,美国 ABI 公司。

1.2 引物和探针的设计与合成

首先在 NCBI 网站中查找铜绿假单胞菌的毒力基因为 *pcrL* 和涉及表 2 中实验室标准储备菌株 16S rRNA 的多个 Genbank 序列号的基因序列,其中 16S rRNA 包含 9 个可变 V 区和 10 个保守 C 区,对 16S rRNA 基因 V₃~V₄ 区进行设计,通过 Genbank 软件和 BLAST 分析菌种间 16S rRNA 基因的同源性和变异性,确定各毒力基因的保守区域,采用 Primer Premier 5.0 和 DNASTAR 软件在保守区域中各自设计引物与探针^[23-24],将设计的引物和探针委托上海生工生物工程有限公司人工合成。

1.3 模板制备

1.3.1 菌种活化和计数 将包括铜绿假单胞菌在内的食品中常见致病菌的标准储备菌株(见表 3)在 BHI 培养基中培养 18 h,取 1 mL 收集提取核酸;另取 1 mL 铜绿假

表 2 铜绿假单胞菌毒力基因的引物和探针序列[†]

Table 2 Primers and probe sequences of virulence genes of *P. aeruginosa*

名称	基因	片段编号	引物和探针序列
铜绿假单胞菌毒力基因	<i>pcrL</i>	ID:882991	F:GACGGCAGCCTGAGCGA
			R:GCTTCCGGCTTCAGGTCG
			T: FAM-AAGCCGCTCTGCGTGCATCACCA-BHQ1
通用引物	16S rRNA	V ₃ ~V ₄	F:CCTACGGGNGGCWGCAG
			R:GACTACHVGGGTATCTAATCC
			T:FAM-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-BHQ1

[†] F 为上游引物;R 为下游引物;T 为探针;FAM 为荧光基团;BHQ1 为淬灭基团。

表 3 食源性致病菌标准储备菌株

Table 3 Standard reserve strains of food-borne pathogenic bacteria

菌株名称	菌种库编号	携带毒力基因
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	<i>pcrL</i>
荧光假单胞菌 <i>P. Fluorescens</i>	ATCC13525	/
单增李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	ATCC19115	/
阪崎肠杆菌 <i>E. sakazakii</i>	ATCC25944	/
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	ATCC6538	/
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	ATCC11778	/
鼠伤寒沙门菌 <i>S. typhimurium</i>	ATCC14028	/
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC17802	/
恶臭假单胞菌 <i>P.seudomonas putida</i>	CICC20576	/

单胞菌(或恶臭假单胞菌)液逐级稀释至 10⁻⁷,选择 7 个稀释度(10⁻¹,10⁻²,10⁻³,10⁻⁴,10⁻⁵,10⁻⁶,10⁻⁷)分别吸取 1 mL 加入 250 mL 无菌水中,使用不锈钢多联过滤系统通过孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤,将滤膜贴在 CN 平板中,36 ℃ 培养 1~2 d 后计数,其他常见致病菌逐级稀释后,分别吸取 1 mL 于 PCA 平板中,36 ℃ 培养 2 d 后计数。

1.3.2 核酸提取 取 1 mL 已活化的实验室标准储备菌液至 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 3 min。弃上清,加入 Chelex-100 裂解液 20 μL,混匀,煮沸 8 min 后于冰上冷却,12 000 r/min 离心 3 min,取上清备用。

1.4 实时荧光 PCR 聚合酶链式反应体系

根据铜绿假单胞菌的毒力基因及其探针的荧光报告基团,按表 4 设计引物和探针进行实时荧光 PCR 扩增,扩增条件:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 34 s,40 个循环。

1.5 特异性分析

取 1 mL 已活化的鼠伤寒沙门氏菌、荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、副溶血性弧菌、单增李斯特氏菌、阪崎肠

表 4 PCR 扩增反应体系

Table 4 PCR amplification reaction system

项目	体积/μL
PCR 反应体系	25.0
预混合 Taq PCR Master Mix(2×)	12.5
引物-F	0.5
引物-R	0.5
探针	1.0
菌株 DNA	2.0
ROX	0.5
dd H ₂ O	8.0

杆菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌菌液,按 1.3.2 的方法提取核酸。对常见食源性致病菌的基因组 DNA 进行检测,Ct 值报告为“Undet”或无明显的“S”型扩增曲线,判定为阴性;Ct 值报告<40,且扩增曲线呈典型的“S”型扩增曲线,判定为阳性。

1.6 灵敏度分析

将已计数的铜绿假单胞菌进行 10 倍梯度稀释,取 1 mL 稀释液,按 1.3.2 的方法提取核酸,对各梯度稀释液的核酸进行检测,Ct 值报告为“Undet”或无明显的“S”型扩增曲线,判定为阴性;Ct 值报告<40,且扩增曲线呈典型的“S”型扩增曲线,判定为阳性。

1.7 涉及的检测方法

按照饮用天然矿泉水标准(GB 8537—2018)和包装饮用水标准(GB 19298—2014)对微生物限量进行评价,铜绿假单胞菌检验严格遵循《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》(GB/T 8538—2022)中 57 条款铜绿假单胞菌的滤膜法,评价标准为同批次 5 个独立包装的饮用水中铜绿假单胞菌均为 0 CFU/250 mL。

1.8 样本验证

对湖南省 2020—2022 年 14 个县、市抽查检验(瓶)桶装水不合格样品,分别使用试验建立的实时荧光 PCR 扩增体系和传统的检测方法进行同步检测,分析两种方法检测结果,统计阳性与阴性符合率情况。

2 结果与分析

2.1 核酸提取质量监测

针对包括铜绿假单胞菌在内的 9 种常见食源性致病菌的 16S rRNA 的 $V_3 \sim V_4$ 区基因设计相应的含有 18 bp 随机标签序列的扩增引物及其探针:上游引物为 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3',下游引物 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3',探针为 5'-FAM-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3'^[25]。以该 9 种菌标准菌株的 DNA 文库为模版,使用 ABI7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪扩增目的基因。由图 1 可知,所有被测样本均有明显的“S”型扩增曲线,并且 Ct 值基本一致,为 15~35,说明使用该方法提取的细菌核酸质量良好,可以保障后续试验有效进行。

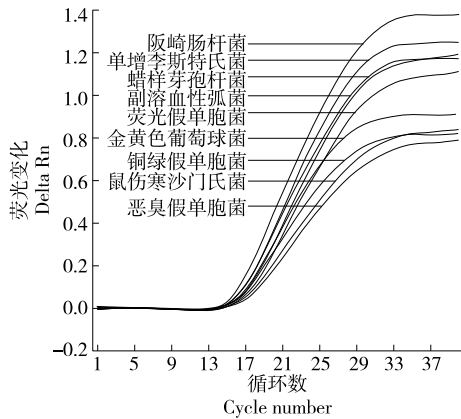


图 1 食源性致病菌标准储备菌株 16S rRNA 的扩增图谱

Figure 1 16S rRNA amplification profiles of food-borne pathogenic bacteria

2.2 引物特异性验证

为确保 *pcrL* 基因引物的特异性,以包括铜绿假单胞菌在内的 9 种常见食源性致病菌标准菌株的 DNA 文库为模版,以 16S rRNA 基因为内参,使用 *pcrL* 毒力基因引物进行扩增。由图 2 和表 5 可知,只有铜绿假单胞菌有明显的“S”型扩增曲线,且 Ct 值为 18.7,位于 15 与 35 之间,其余菌株包括与铜绿假单胞菌较多生理生化现象相似的荧光假单胞菌和不动容杆菌均未见扩增曲线,说明毒力基因 *pcrL* 在假单胞菌属中为铜绿假单胞菌所特有,可作为检出铜绿假单胞菌的标志物,并且引物的特异性良好,不会引起非特异性扩增。说明试验建立的铜绿假单胞菌检测方法准确可行。

2.3 体系灵敏度检测

由图 3 可知,当菌液浓度 <10 CFU/mL 时,*pcrL* 基因仍有扩增曲线,因此其检测范围大致为 $10 \sim 10^7$ CFU/mL。毒力基因 *pcrL* 扩增的 Ct 值在不同菌液

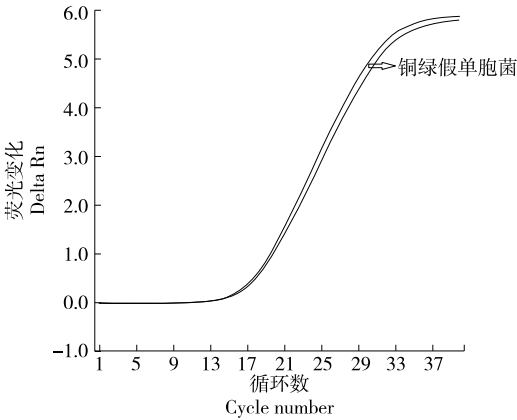


图 2 食源性致病标准储备菌株扩增毒力基因 *pcrL* 图谱
Figure 2 Amplified virulence gene *pcrL* mapping of standard reserve strains of food-borne pathogenic bacteria

表 5 食源性致病标准储备菌株基因的检测结果[†]
Table 5 Test results of genes of each standard reserve strain of food-borne pathogenic bacteria

菌株	16S rRNA	<i>pcrL</i>
荧光假单胞菌	+	-
铜绿假单胞菌	+	+
恶臭假单胞菌	+	-
不动容杆菌	+	-
金黄色葡萄球菌	+	-
蜡样芽孢杆菌	+	-
鼠伤寒沙门氏菌	+	-
副溶血性弧菌	+	-
单增李斯特氏菌	+	-
阪崎肠杆菌	+	-

† “+”表示有扩增曲线;“-”表示未见扩增曲线。

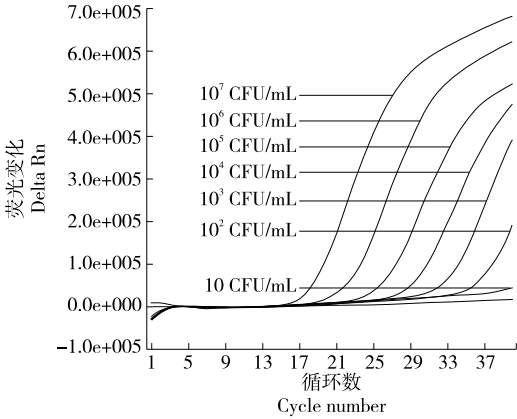


图 3 不同浓度下铜绿假单胞菌携带毒力因子 *pcrL* 扩增图谱
Figure 3 Amplification profiles of *P. aeruginosa* carrying virulence factor *pcrL* at different concentrations

浓度下的平均值为 18.0~38.6,表明试验建立的检测方法对铜绿假单胞菌携带毒力因子 *pcrL* 的灵敏度较高,检出限为 10 CFU/mL,适合检测包装饮用水中存留的微量铜绿假单胞菌。

2.4 实际样品检测

分别使用试验建立的实时荧光 PCR 扩增体系和传统检测方法同步对 2020—2022 年湖南省 14 个县、市抽查检验(瓶)桶装水不合格样品进行检测,其符合率为 100%(表 6),说明两种方法的检测结果完全一致,进一步表明试验建立的实时荧光定量 PCR 方法具有良好的实用性。

表 6 不同方法对样品检出阳性的检测结果⁺
Table 6 Test results of samples in a different way

年份	实时荧光 PCR(探针法)		GB 8538—2022		符合率/ %
	+	—	+	—	
2020	99	653	99	653	100
2021	69	658	69	658	100
2022	61	599	61	599	100

⁺ “+”为检出铜绿假单胞菌;“—”为未检出铜绿假单胞菌。

3 结论

以铜绿假单胞菌特有的毒力因子基因 *pcrL* 为靶标,建立了铜绿假单胞菌的实时荧光定量 PCR 技术。结果表明,该方法不仅特异性好,能排除形态和生化特征相似的如荧光假单胞菌等的干扰,并且灵敏度极高,检出限可达 10 CFU/mL,能有效降低漏检风险。此外,试验方法还克服了传统微生物检测方法周期长、操作较繁琐、人为因素干扰强等缺点。但试验方法不能有效区分死菌;样品中细菌被杀死破裂后,释放出的 DNA 等内容物在一定时间内仍能被 PCR 检测到,造成假阳性结果;无法精确定量;现有技术只能利用拷贝数目保守的如 16S rRNA 基因作为内参,根据荧光的相对强度得出一个估算结果。后续将优化条件、增加样本数目,得到更多可行性数据以完善方法。

参考文献

[1] 蒋明方. 铜绿假单胞菌感染与免疫[J]. 国外医学:微生物学分册, 1990, 13(2): 72-74, 79.
JIANG M F. Infection and immunity of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Med Abroad: Microbiol, 1990, 13(2): 72-74, 79.

[2] BASSETTI M, VENA A, CROXATTO A, et al. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Drugsin Context, 2018, 7: 1-18.

[3] WEI L, WU Q, ZHANG J, et al. Prevalence and genetic diversity of

enterococcus faecalis isolates from mineral water and spring water in China[J]. Front Microbiol, 2017, 16(8): 1 109.

[4] FENG W, LI W, YUE L, et al. Molecular analysis of bacterial community in the tap water with different water ages of a drinking water distribution system[J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2018, 12(3): 6.

[5] SAMIE A, MASHAO M B, BESSONG P O, et al. Diversity and antibiograms of bacterial organisms isolated from samples of household drinking-water consumed by HIV-positive individuals in rural settings, South Africa[J]. Journal of Health Population & Nutrition, 2012, 30(3): 241-249.

[6] LU J, STRUEWING I, VEREEN E, et al. Molecular detection of *Legionella* spp. and their associations with *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(2): 509-521.

[7] DRISCOLL J A, BRODY S L, KOLLEF M H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Drugs, 2007, 63(3): 351-368.

[8] 桑雨同. 危害性分析与关键控制点系统(HACCP)的建立与实施[J]. 肉品卫生, 1999(6): 22-23.
SANG Y T. Establishment and implementation of hazard analysis and critical control point system[J]. Journal of Meat Hygiene, 1999(6): 22-23.

[9] 张旭东. 《食品安全国家标准 包装饮用水》(GB 19298—2014)解读[J]. 饮料工业, 2015(2): 73.
ZHANG X D. Interpretation of "National Standard for Food Safety Packaged Drinking Water" (GB 19298—2014) [J]. Beverage Industry, 2015(2): 73.

[10] WEI L, WU Q, ZHANG J, et al. Prevalence, virulence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from drinking water in China[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 544653.

[11] 张帆, 李树垚, 张子豪, 等. 铜绿假单胞菌检测方法的比较与优化[J]. 生物技术通报, 2018, 34(3): 67-74.
ZHANG F, LI S Y, ZHANG Z H, et al. Comparison and optimization of detection methods for *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Bulletin of Biotechnology, 2018, 34(3): 67-74.

[12] 王文娟, 陈文青, 章明, 等. 包装饮用水中铜绿假单胞菌检测关键技术分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(14): 1 790-1 792.
WANG W J, CHEN W Q, ZHANG M, et al. Analysis of key techniques for detection of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water[J]. Chinese Journal of Health Laboratory, 2022, 32(14): 1 790-1 792.

[13] PEREIRA F D E S, BONATTO C, LOPES C A P, et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic

- surfaces[J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 86: 32-37.
- [14] 王萍, 朱渊, 乔勇升, 等. 包装饮用水中铜绿假单胞菌 4 种鉴定方法的比较[J]. 生物加工过程, 2020, 18(3): 397-402, 408.
WANG P, ZHU Y, QIAO Y S, et al. Comparison of four methods for identification of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water[J]. Bioprocessing, 2020, 18(3): 397-402, 408.
- [15] 慕妮, 何薛纯, 樊青青, 等. 包装饮用水中铜绿假单胞菌检测方法的比较分析[J]. 生物化工, 2021, 7(6): 151-155.
MU N, HE X C, FAN Q Q, et al. Comparative analysis of detection methods for *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water[J]. Biochemistry, 2021, 7(6): 151-155.
- [16] 冯秀娟, 高俊峰, 董川. 核酸等温环介导荧光检测法检测包装饮用水中的铜绿假单胞菌[J]. 食品科技, 2023, 48(1): 310-314.
FENG X J, GAO J F, DONG C. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water by nucleic acid isothermal ring mediated fluorescence detection [J]. Food Science and Technology, 2023, 48(1): 310-314.
- [17] 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.
- [18] 吴春明, 李洪涛, 覃慧敏, 等. 建立 SYBR Green 实时 RT-PCR 定量方法检测铜绿假单胞菌 MexAB-OprM mRNA 水平[J]. 中华医院感染学杂志, 2007(11): 1 349-1 352.
WU C M, LI H T, QIN H M, et al. A SYBR Green real-time RT-PCR method was established for the determination of *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-levels of OprM mRNA [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2007(11): 1 349-1 352.
- [19] 黄河, 易晓明, 王铁军, 等. 一种铜绿假单胞菌核酸荧光 PCR 检测试剂盒及检测方法: CN106520984A[P]. 2017-03-22.
HUANG H, YI X M, WANG T J, et al. A fluorescence PCR detection kit and detection method for *Pseudomonas aeruginosa* nucleic acid: CN106520984A[P]. 2017-03-22.
- [20] 徐璇, 钟礼立, 张兵, 等. 荧光实时定量 PCR 检测铜绿假单胞菌方法建立及价值[J]. 中国医师杂志, 2006(12): 1 614-1 617.
XU X, ZHONG L L, ZHANG B, et al. Establishment and value of fluorescence real-time quantitative PCR method for detection of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Medical Sciences, 2006(12): 1 614-1 617.
- [21] 钟杰. 包装饮用水中铜绿假单胞菌检测[J]. 造纸装备及材料, 2020, 49(3): 227-234.
ZHONG J. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water[J]. Paper Equipment & Materials, 2020, 49(3): 227-234.
- [22] 杨曼琼. 荧光实时定量 PCR 检测铜绿假单胞菌 *oprI* 基因方法的建立及运用[D]. 长沙: 中南大学, 2007: 1-22.
YANG M Q. Establishment and application of fluorescence real-time quantitative PCR method for detecting *Pseudomonas aeruginosa oprI* gene [D]. Changsha: Central South University, 2007: 1-22.
- [23] 韩娜, 彭贤慧, 张婷婷, 等. 一种新的定量 16S rRNA 基因扩增子测序方法[J]. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2 548-2 555.
HAN N, PENG X H, ZHANG T T, et al. A novel method for quantitative 16S rRNA gene amplicon sequencing [J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2020, 36(12): 2 548-2 555.
- [24] ZHANG J Y, DING X, GUAN R, et al. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake[J]. Sci Total Environ, 2018, 618: 1 254-1 267.
- [25] CHAKRAVORTY S, HELB D, BURDAY M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria[J]. J Microbiol Methods, 2007, 69(2): 330-339.
-
- (上接第 54 页)
- [12] 黄小波, 刘维平. 基于 QuEChERS 的 UHPLC-MS/MS 同时检测鸡蛋中 19 种农药残留量[J]. 食品与机械, 2021, 37(10): 56-60.
HUANG X B, LIU W P. Simultaneous determination of 19 pesticide residues in eggs by UHPLC-MS/MS Based on QuEChERS[J]. Food & Machinery, 2021, 37(10): 56-60.
- [13] 周碧青, 张金彪. 高效液相色谱法快速测定蜂王浆中四环素类抗生素残留[J]. 福建分析测试, 2015, 24(4): 10-13.
ZHOU B Q, ZHANG J B. Rapid determination of tetracycline antibiotic residues in royal jelly by HPLC[J]. Fujian Analytical Testing, 2015, 24(4): 10-13.
- [14] 唐小兰, 魏仲珊, 王亮亮, 等. 鲜冻水产品中违禁兽药残留高效液相色谱—串联质谱法比较与改进研究[J]. 现代食品, 2015(17): 35-42.
TANG X L, WEI Z S, WANG L L, et al. Comparison and improvement of HPLC tandem mass spectrometry for prohibited veterinary drug residues in fresh frozen aquatic products [J]. Modern Food, 2015(17): 35-42.
- [15] 闫顺华, 王亚丽, 夏依拉·艾尼. 液相色谱—质谱/质谱法测定猪肉中 4 种磺胺类药物残留量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2021, 37(7): 69-75, 86.
YAN S H, WANG Y L, XIAYILA A. Evaluation of uncertainty in the determination of four sulfonamides residues in pork by liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2021, 37(7): 69-75, 86.
- [16] ZHANG L, JIA Q, LIAO G, et al. Multi-residue determination of 244 chemical contaminants in chicken eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after effective lipid clean-up[J]. Agriculture, 2022, 12(6): 869.