

• 论 著 •

基于实时荧光重组酶聚合酶扩增技术的铜绿假单胞菌快速检测方法的建立

幸运¹, 张炎², 周道红¹, 钟秋¹, 蒋元素¹, 黄庆¹, 郑百慧^{1△}

1. 中国人民解放军陆军特色医学中心检验科, 重庆 400042; 2. 重庆市江津区中医院检验科, 重庆 402260

摘要:目的 针对铜绿假单胞菌毒力基因 *exoS*, 建立一种实时荧光重组酶聚合酶扩增(RPA)技术检测方法, 并评价该方法的特异性、灵敏度及实用性。方法 根据铜绿假单胞菌毒力基因 *exoS* 的特异性保守区域, 设计 RPA 特异性引物和探针, 对提取的目标 DNA 进行检测, 确定 RPA 方法的特异性和灵敏度; 建立实时荧光定量 PCR(qPCR)法, 对目标 DNA 进行检测, 比对不同检测方法对铜绿假单胞菌的检出限; 通过临床样本性能验证试验, 进一步确定 RPA 技术检测铜绿假单胞菌的可行性。结果 建立的 RPA 检测方法特异性良好, 仅对铜绿假单胞菌有特异扩增曲线, 对其他细菌无特异扩增曲线; RPA 方法检测病原菌的灵敏度为 5×10^2 cfu/mL, 该方法与 qPCR 法检出限一致且结果可靠; RPA 方法检测时间仅需 30 min, 明显短于传统方法的检测时间。结论 该研究建立的铜绿假单胞菌 RPA 检测方法特异性强、灵敏度高, 相对于传统检测方法明显缩短检测时间, 可用于临床标本中铜绿假单胞菌的快速检测。

关键词:铜绿假单胞菌; *exoS* 基因; 实时荧光重组酶聚合酶扩增

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.19.005

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2024)19-2329-05

文献标志码:A

Establishment of a rapid detection method for *Pseudomonas aeruginosa* based on real-time fluorescent recombinase polymerase amplification technology

XING Yun¹, ZHANG Yan², ZHOU Daohong¹, ZHONG Qiu¹, JIANG Yuansu¹,
HUANG Qing¹, ZHENG Baihui^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Army Medical Center of Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400042, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Jiangjin District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402260, China

Abstract: Objective To establish a real-time fluorescent recombinase polymerase amplification (RPA) technology for the detection of the virulence gene *exoS* of *Pseudomonas aeruginosa*, and evaluate the specificity, sensitivity and practicability of the method. **Methods** According to the specific conserved region of the virulence gene *exoS* of *Pseudomonas aeruginosa*, the specific primers and probes of RPA were designed, and the extracted target DNA was detected to determine the specificity and sensitivity of RPA. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was established to detect the target DNA, and the detection limits of different detection methods for *Pseudomonas aeruginosa* were compared. The feasibility of RPA in detecting *Pseudomonas aeruginosa* was further confirmed by the performance verification test of clinical samples. **Results** The established RPA detection method had good specificity. Only *Pseudomonas aeruginosa* had specific amplification curve, but no specific amplification curve for other bacteria. The sensitivity of RPA was 5×10^2 cfu/mL, which was consistent with the detection limit of qPCR and the results were reliable. The detection time of RPA method was only 30 min, which was significantly lower than that of the traditional method. **Conclusion** The RPA method for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* established in this study has high specificity and sensitivity, and significantly shortens the detection time compared with the traditional detection method. It can be used for the rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical specimens.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *exoS* gene; real-time fluorescent recombinase polymerase amplification

铜绿假单胞菌作为一种医院感染的常见病原菌^[1],其存在对人类健康构成严重威胁。因此,建立一种快速、准确的铜绿假单胞菌检测方法具有迫切的需求。当前常用的铜绿假单胞菌检测方法主要包括传统培养法、生物化学方法和分子生物学方法^[2]。传统培养法是最常见的一种铜绿假单胞菌检测方法,然而,传统培养法需要较长的培养周期,通常需要 24~48 h 才能得到结果,且存在一定的误检率和漏检率;生物化学方法是利用铜绿假单胞菌特有的代谢产物进行检测的方法,该方法具有操作简单、结果快速的优点^[3],但其准确性和特异性较低,容易受到其他菌种的干扰;分子生物学方法是近年来发展起来的一种铜绿假单胞菌检测方法^[4],其中,基于实时荧光重组酶聚合酶扩增(RPA)技术的铜绿假单胞菌快速检测方法成为新的研究热点。RPA 技术是一种在恒温条件下进行的核酸扩增技术,其灵敏度高、特异性强^[5],能够快速检测样品中的铜绿假单胞菌。该方法通过引物与靶标 DNA 特异性结合,并在恒温条件下进行酶聚合酶扩增,产生荧光信号来检测铜绿假单胞菌的存在^[6]。RPA 技术具有快速、高效、准确的特点,可以在 30 min 内得到结果,且具有较低的误检率和漏检率^[7]。本研究通过基于 RPA 技术的铜绿假单胞菌快速检测方法的建立,旨在提供一种快速、准确且操作简便的检测方法。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株 包括实验室保存的质控菌株和临床分离菌株,所有菌株均经过质谱仪鉴定确证,具体信息见表 1。

1.2 仪器与试剂 增菌培养基、3 号麦康凯琼脂培养基、嗜血杆菌巧克力琼脂选择培养基购自赛默飞世尔生物有限责任公司,DNA 恒温快速扩增试剂盒(荧光型)购自安普未来生物科技有限公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,GoTaq[®] qPCR Master Mix 购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司,CFX96 实时荧光定量 PCR (qPCR)仪购自美国 BIORAD 公司,NanoDrop 1000 紫外分光光度计购自美国 Thermo Scientific 公司,化学发光成像系统 ChemiDoc XRS 购自美国 BIORAD 公司,电泳仪购自美国 BIORAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上铜绿假单胞菌 *exoS* 基因的核酸序列和查阅相关文献,选择其特异性保守区域设计 RPA、qPCR 的特异性引物和探针。所有引物探针均由北京六合华大基因科技有限公司合成,引物序列见表 2。

1.3.2 基因组 DNA 的提取 试剂盒 DNA 的提取法:将铜绿假单胞菌 ATCC27853 接种到增菌培养基

中,37 ℃ 培养 24 h,接种环挑取少量纯菌落,配置 0.5 麦氏单位浓度的菌液,另准备 1.5 mL 无菌 EP 管,加入菌液 1 mL,11 500 r/min 离心 1 min,分离取出上清液,后按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作进行 DNA 的提取,使用 NanoDrop 1000 紫外分光光度计测定浓度,-20 ℃ 保存备用。

普通细菌 DNA 的粗提取法:通过金属浴加热法提取细菌 DNA。用接种环刮取 1~2 环黄豆大小的加入含 500 μL 无菌水的 EP 管中,混匀,于 120 ℃ 金属浴中加热 5 min,立即取出,在 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min,分离取出上清液,-20 ℃ 保存备用。

表 1 实验菌株信息

序号	菌株名称	数量 (n)	菌株来源
1	铜绿假单胞菌 ATCC27853	1	实验室质控菌株
2	霍氏肠杆菌 ATCC700327	1	实验室质控菌株
3	大肠埃希菌 ATCC25922	1	实验室质控菌株
4	产气肠杆菌 ATCC13048	1	实验室质控菌株
5	光滑念珠菌 ATCC2950	1	实验室质控菌株
6	粪肠球菌 ATCC29212	1	实验室质控菌株
7	金黄色葡萄球菌 ATCC25923	1	实验室质控菌株
8	铜绿假单胞菌	20	临床分离
9	荧光假单胞菌	8	临床分离
10	大肠埃希菌	8	临床分离
11	肺炎克雷伯菌	6	临床分离
12	鲍曼不动杆菌	8	临床分离
13	阴沟肠杆菌	4	临床分离
14	奇异变形杆菌	4	临床分离
15	白色假丝酵母菌	2	临床分离
16	人葡萄球菌	2	临床分离
17	金黄色葡萄球菌	2	临床分离
18	粪肠球菌	2	临床分离
19	尿肠球菌	2	临床分离
20	星座链球菌	1	临床分离

1.3.3 RPA 法的建立 以 1.3.2 制备的铜绿假单胞菌 ATCC27853 DNA 为模板,采用引物 RPA-F/R 和探针,使用实时 RPA 反应体系(50 μL):RPA-F/R(10 μmol/L)各 2.0 μL,探针(10 μmol/L)0.6 μL,A buffer 29.4 μL,DNA 模板 5 μL,ddH₂O 8.5 μL,将其混匀,加至装有冻干酶制剂的反应管中,吹吸至完全溶解,再加入 2.5 μL B buffer,盖紧管盖,瞬时离心并涡旋后,放入 CFX96 qPCR 仪,39 ℃ 反应 40 次循环。在扩增过程中实时收集检测荧光信号,目的基因扩增后荧光信号会明显增加。

1.3.4 qPCR 法的建立 以 1.3.2 制备的铜绿假单

胞菌 ATCC27853 DNA 为模板,采用引物 PCR-F/R 和探针 TaqMan Probe 建立 qPCR 体系:GoTaq® Probe qPCR Master Mix 10. 0 μL, PCR-F/R (10 μmol/L)各 1. 0 μL, PCR-Probe (10 μmol/L) 1 μL, DNA 模板 5 μL,补水至 20 μL。将上述体系充分振荡混匀后,瞬时离心,放入 CFX96 qPCR 仪,反应程序为:95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃延伸 35 s, 40 个循环,60 ℃收集荧光信号。

1. 3. 5 RPA 方法特异性和灵敏度试验 通过 1. 3. 3 建立的 RPA 方法,将表 1 中部分质控菌株和临床分离菌株,共计 13 株菌株作为研究对象,设立阴阳性对照各一个,用来验证 RPA 方法检测铜绿假单胞菌的特异性。

制备浓度为 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10 cfu/mL 的含有病原菌的标本,采用 DNA 提取试

剂盒分别提取待测细菌标本的 DNA,以提取的基因组 DNA 为模板进行 RPA 扩增,设立阴性对照一个,根据 1. 3. 3 建立的方法进行检测,以确定 RPA 方法检测铜绿假单胞菌的灵敏度。

1. 3. 6 qPCR 方法的灵敏度试验 将 1. 3. 5 制备的 5 个浓度的待测细菌标本 DNA 作为研究对象,设立阴性对照一个,采用 1. 3. 4 建立的方法进行检测,以确定 qPCR 方法检测铜绿假单胞菌的灵敏度。

1. 3. 7 RPA 和 qPCR 方法的临床验证试验 将表 1 中所有临床分离菌株,共计 69 株菌株作为研究对象,通过 1. 3. 2 建立的普通细菌 DNA 的粗提取法,提取所有细菌的基因组 DNA,以提取的基因组 DNA 为模板,通过 1. 3. 3、1. 3. 4 建立的 RPA 和 qPCR 方法同时检测,作为临床标本性能验证。

表 2 基因检测用引物探针列表

方法	引物/探针名称	序列(5'-3')	长度(bp)
RPA	exoS-F1	GCTTCAGCAGAGTCCGTCTTTCGCCGTCGA	30
	exoS-F2	AATCGCTTCAGCAGAGTCCGTCTTTCGCCG	30
	exoS-R1	TTTGGGACAGATTGAGGCCCGCCAGGTCGC	30
	exoS-R2	GGGCTCAATCTGTCCCAAACGCCCACTGG	30
	exoS-P1	TTTCGC [FAM-dT] CGTCGAATTG [THF] [BHQ1-dT] CACCAGGCCGCCAGTG [C3Spacer]	65
qPCR	exoS-F	GGGCGTTTGGGACAGATTGA	20
	exoS-R	TCCATGATCGCCACGAACG	19
	exoS-P	FAM-GCCGAAGGGTGAGGGGCTGCTCGCTCGCCT-BHQ1	39

2 结 果

2. 1 引物及探针的筛选 将设计合成的 4 对 RPA 引物(F1/R1、F1/R2、F2/R1、F2/R2)同时进行扩增,经过筛选,引物对 F1/R2 反应的荧光曲线最优;最终确定 F1/R2 为试验引物,见图 1。

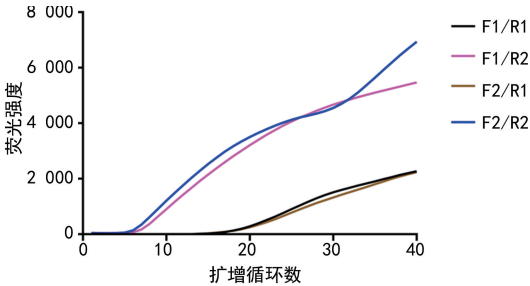


图 1 RPA 法检测铜绿假单胞菌的引物筛选

2. 2 RPA 法的特异性检验 仅铜绿假单胞菌 ATCC27853 和阳性对照孔有特异性扩增曲线,其余 12 种非铜绿假单胞菌基因组和阴性对照均无特异性扩增曲线,重复试验结果一致。表明 RPA 方法检验铜绿假单胞菌的特异性良好,见图 2。

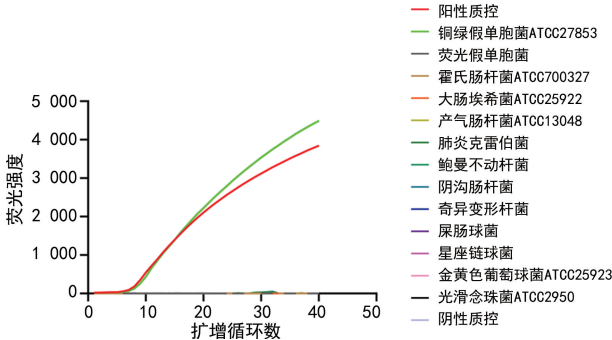


图 2 RPA 法检测铜绿假单胞菌的特异性验证

2. 3 RPA 法的灵敏度检验 根据 1. 3. 3 建立的方法检测 RPA 方法的灵敏度。通过荧光反应曲线可知, 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 cfu/mL 这 4 个浓度的菌悬液均有特异性扩增曲线, 5×10 cfu/mL 浓度的菌悬液和阴性对照孔无特异性扩增曲线,重复试验结果一致。证实通过 RPA 方法检测铜绿假单胞 ATCC27853 的最低检测限为 5×10^2 cfu/mL,见图 3。

2. 4 qPCR 法灵敏度检验 根据 1. 3. 5 建立的方法

检测 qPCR 方法的灵敏度。通过荧光反应曲线可知, 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 cfu/mL 这 4 个浓度的菌悬液均有特异性扩增曲线, 5×10 cfu/mL 浓度的菌悬液和阴性对照无特异性扩增曲线, 重复试验结果一致。证实 RPA 方法和 qPCR 方法检测铜绿假单胞最低检测限一致, 见图 4。

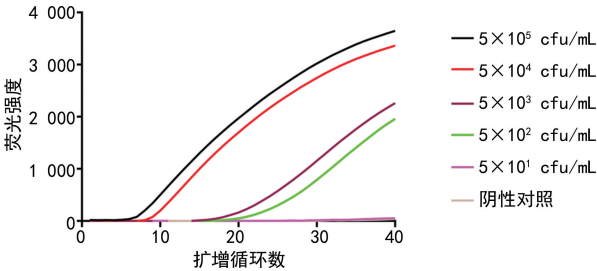


图 3 RPA 法检测铜绿假单胞菌的灵敏度验证

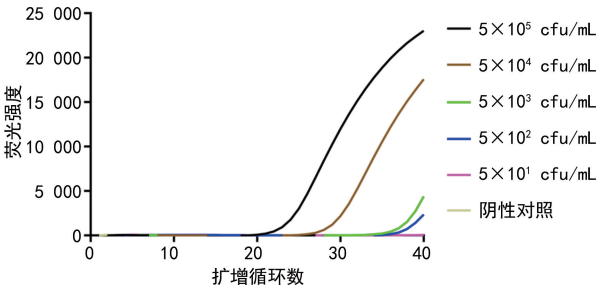


图 4 qPCR 方法检测铜绿假单胞菌的灵敏度验证

2.5 RPA 法与 qPCR 法的临床样本性能验证 通过 1.3.3、1.3.4 建立的 RPA 和 qPCR 方法分别对 69 株待测菌株进行检测, 20 株铜绿假单胞菌均有特异性扩增曲线, 其余 49 株非铜绿假单胞菌基因组和阴性对照均无特异性扩增曲线, 重复试验结果一致。本研究建立的 RPA 方法检测铜绿假单胞菌结果稳定可靠, 可为其成为临床常规检测手段提供有力依据。见表 3。

表 3 两种检测方法临床样本性能验证

细菌名称	细菌来源	检测数量 (n)	RPA 方法 阳性数量 (n)	qPCR 方法 阳性数量 (n)
铜绿假单胞菌	临床分离	20	20	20
荧光假单胞菌	临床分离	8	0	0
大肠埃希菌	临床分离	8	0	0
肺炎克雷伯菌	临床分离	6	0	0
鲍曼不动杆菌	临床分离	8	0	0
阴沟肠杆菌	临床分离	4	0	0
奇异变形杆菌	临床分离	4	0	0
白色假丝酵母菌	临床分离	2	0	0
人葡萄球菌	临床分离	2	0	0
金黄色葡萄球菌	临床分离	2	0	0
粪肠球菌	临床分离	2	0	0
屎肠球菌	临床分离	2	0	0
星座链球菌	临床分离	1	0	0

3 讨论

RPA 技术是一种在低温下进行的扩增技术, 灵敏度高、特异性强, 其原理基于一种聚合酶酶体, 该酶体由重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶组成^[8]。在 RPA 反应中, 首先在低温下, 引物与目标 DNA 序列特异性结合, 然后酶体的单链结合蛋白解开 DNA 的双链结构, 并引导 DNA 聚合酶合成新的 DNA 链, 最后, 实时荧光信号被检测到, 从而实现了目标 DNA 的快速检测^[9]。细菌分泌系统目前已知的至少有 6 型, 其中Ⅲ型分泌系统广泛存在于致病菌中^[10]。铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统主要分泌 4 种毒素: exoS、exoT、exoY、exoU。CHEN 等^[11] 研究报道, 有大约 95% 的铜绿假单胞菌携带 exoS 基因。

本研究建立了基于 RPA 技术的铜绿假单胞菌快速检测方法, 收集了 76 株待测菌株, 包括临床分离株 (69 株) 和实验室标准菌株 (7 株)。这些菌株被保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温条件下, 以保持其活性和稳定性。首先, 本研究从这些标本中提取了菌株的基因组 DNA; 接着, 根据 GenBank 上铜绿假单胞菌 exoS 基因的核苷酸序列, 选择其特异性保守区域设计 RPA、qPCR 方法的特异性引物和探针, 通过 RPA 方法及引物电泳结果, 筛选出最佳引物组合 F1/R2; 最后, 使用该引物组合进行本研究后续 RPA 试验。通过 RPA 方法对 13 株待测菌株进行检测, 仅铜绿假单胞 ATCC27853 和阳性对照孔有特异性扩增曲线, 其余 12 种非铜绿假单胞菌基因组和阴性对照均无特异性扩增曲线, 表明 RPA 方法检验铜绿假单胞 ATCC27853 的特异性良好, 该方法能够通过设计的特异性引物, 实现对目标序列的高度选择性扩增, 这种特异性使得 RPA 技术在复杂样品中的检测具有较低的误检率和误报率, 提高了检测结果的准确性。接着, 通过建立的 RPA 和 qPCR 方法, 比较二者检测铜绿假单胞菌 ATCC27853 的灵敏度, 通过荧光反应曲线可知, 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 cfu/mL 这 4 个浓度的菌悬液均有特异性扩增曲线, 5×10 cfu/mL 浓度的菌悬液和阴性对照孔无特异性扩增曲线, 证实 RPA 和 qPCR 方法检测铜绿假单胞菌 ATCC27853 的灵敏度一致, 均为 5×10^2 cfu/mL。RPA 使用独特的荧光标记和酶聚合酶, 使得其能够检测到极低浓度的目标分子, 本试验证实 RPA 方法在低浓度病原菌浓度检测中的可靠性。最后, 为了验证 RPA 技术的准确性, 笔者与 qPCR 技术进行了比较, 通过 RPA 方法对 69 株待测细菌进行检测, 20 株铜绿假单胞菌均有特异性扩增曲线, 其余 49 株非铜绿假单胞菌和阴性对照均无特异性扩增曲线, 与预期结果一致。本研究建立的 RPA 方法检测铜绿假单胞菌结果稳定可靠, 可为其成为临床常规检测手段提供有力依据。

本研究高效性方面体现在其快速检测的能力上,

相比传统的基因扩增方法,RPA 技术无须进行烦琐的 DNA 提取步骤^[12],可以直接在菌落、培养基或者样品中进行反应,这样一来,整个检测过程可以在 30 min 内完成,明显缩短了检测时间;其次,在准确性方面具有明显优势,RPA 技术利用荧光探针实时监测扩增过程中产生的信号,可以实时、定量地检测目标基因序列的扩增情况^[13],这种实时监测的方式避免了传统方法中由于末端标记引起的假阳性结果,提高了检测结果的准确性^[14];最后,在灵敏度方面,RPA 技术与传统 PCR 方法检出限一致,在低浓度的目标基因序列存在下仍能够进行高效的扩增,可以检测到浓度非常低的铜绿假单胞菌。这种高灵敏度的特点使得该方法在对样品进行预处理时无需进行样品富集步骤,降低了操作的复杂性和成本^[15]。

值得指出的是,虽然本研究在方法开发和性能评估方面取得了令人满意的结果,但仍然存在一些不足之处。首先,荧光信号分析的准确性受到环境因素的影响,因此需要在实际应用中进一步考虑这些因素。其次,尽管本方法在特异性上表现出色,但后期研究可增加微生物种类,与其他靶菌进行比较以验证其检测范围。

随着科学技术的进步,RPA 技术将不断完善和发展,使得该方法在未来更加成熟和可靠,并且有望成为一种标准方法。另外,该方法已被报道应用于环境监测,例如水源、土壤、空气等中的铜绿假单胞菌检测,对于环境污染的监测和防控具有重要意义^[16]。

总之,本研究建立了一种基于 RPA 技术的铜绿假单胞菌快速检测方法。该方法特异性强、灵敏度高,未来有望在临床上广泛应用,为铜绿假单胞菌感染的早期诊断和治疗提供有力支持。

参考文献

- [1] SANTOS E D,JIMÉNEZ C M,RÍO-CARBAJO L D,et al. Treatment of severe multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Med Intensiva (Engl Ed),2022, 46(9):508-520.
- [2] HU J,WANG Y,DING H,et al. Recombinase polymerase amplification with polymer flocculation sedimentation for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food samples[J]. Int J Food Microbiol,2020,331:108691.
- [3] MADDEN D E,OLAGOKE O,BAIRD T,et al. Express yourself:quantitative real-time PCR assays for rapid chromosomal antimicrobial resistance detection in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2022,66(5):e0020422.
- [4] 龙慧,帅淑芬,龙永艳,等. 基于多重荧光定量 PCR 技术快速检测桶装水中大肠埃希氏菌和铜绿假单胞菌[J]. 现代食品,2022,28(23):180-184.
- [5] 徐健皓,李佳欣,白欣茹,等. 基于实时荧光重组酶聚合酶

扩增(RPA)技术的金黄色葡萄球菌快速检测方法的建立[J]. 军事医学,2022,46(6):441-446.

- [6] ABED W H,KAREEM S M. Molecular detection of *gyrA* and *mexA* genes in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Mol Biol Rep,2021,48(12):7907-7912.
- [7] MADDEN D E,MCCARTHY K L,BELL S C,et al. Rapid fluoroquinolone resistance detection in *Pseudomonas aeruginosa* using mismatch amplification mutation assay-based real-time PCR[J]. J Med Microbiol,2022,71(10): 01593.
- [8] KANITCHINDA S,SRISALA J,SUEBSING R,et al. CRISPR-Cas fluorescent cleavage assay coupled with recombinase polymerase amplification for sensitive and specific detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* [J]. Biotechnol Rep (Amst),2020,27:e00485.
- [9] JI T,ZHANG J L,GAO Y Z,et al. A rapid and visual detection of *Staphylococcus haemolyticus* in clinical specimens with RPA-LFS[J]. Analytica Chimica Acta,2023, 1273:341534.
- [10] 常彦斌,游灵玲,张晓兵. 阿奇霉素对铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统 *exoS* 和 *exoU* 基因表达的影响[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(13):1584-1588.
- [11] CHEN Y,CHENG N,XU Y,et al. Point-of-care and visual detection of *P. aeruginosa* and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor[J]. Biosens Bioelectron,2016,81:317-323.
- [12] LIU S,HUANG S,LI F,et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by recombinase polymerase amplification combined with CRISPR-Cas12a biosensing system [J]. Front Cell Infect Microbiol,2023,13:1239269.
- [13] OLANIRAN O B,DONIA A,ADELEKE O E,et al. Prevalence of type Ⅲ secretion system (T3SS) and biofilm development in genetically heterogeneous clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Nigeria[J]. Curr Microbiol,2023,80(11):349.
- [14] JU Y,LIN Y,YANG G,et al. Correction to:development of recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Meloidogyne incognita*,*M. javanica*,*M. arenaria*,and *M. enterolobii* [J]. Eur J Plant Pathol,2020,156 (4):1239.
- [15] SOLIMAN M,SAID H S,EL-MOWAFY M,et al. Novel PCR detection of CRISPR/Cas systems in *Pseudomonas aeruginosa* and its correlation with antibiotic resistance [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106 (21): 7223-7234.
- [16] 王帅,杨艳歌,吴占文,等. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学,2023,44(9):297-305.