

# 16S rDNA 用作荧光定量 PCR 靶基因快速检测铜绿假单胞菌 Rapid Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by the Fluorescence Quantitative PCR Assay Targetting 16S rDNA

薛利军,王永智,任浩,童一民,赵平,朱诗应,戚中田\*

XUE Li-Jun, WANG Yong-Zhi, REN Hao, TONG Yi-Min, ZHAO Ping, ZHU Shi-Ying and  
QI Zhong-Tian\*

第二军医大学微生物学教研室,全军医学微生物学重点实验室,上海 200433

Department of Microbiology, PLA Key Laboratory for Medical Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**摘 要** 对 20 余种细菌 16S rDNAs 进行多序列比对与进化树分析,设计铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 特异性引物。提取 PA 基因组 DNA,以特异性引物扩增 16S rDNA 靶片段,并构建重组质粒 pMDT-Pfr。将梯度稀释的 pMDT-Pfr 质粒作为模板,用于建立定量标准曲线。以 SYBR Green I 荧光染料建立 20 $\mu$ L 反应体系,对不同浓度的 PA DNA 样品进行 FQ-PCR 检测。同时,以金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、福氏志贺菌、变形杆菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌和结核杆菌的基因组 DNA 作阴性对照,验证 FQ-PCR 方法检测 PA 的特异性。结果显示,设计的 FQ-PCR 引物的靶向序列,仅对 PA 16S rDNA 有高度同源性,FQ-PCR 方法检测 PA,其灵敏度达 3.6pg/ $\mu$ L 的基因组 DNA 或  $(2.1 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^2)$  拷贝/ $\mu$ L 的 16S rDNA 基因,并且具有很强的特异性;从细菌 DNA 提取到 FQ-PCR 检测,可在 2h 左右完成 PA 鉴定。较传统的培养鉴定法而言,以 16S rDNA 作为 FQ-PCR 靶基因快速检测 PA,具有很好的研究价值与应用前景。

**关键词** 铜绿假单胞菌, 16S rDNA, 荧光定量 PCR, 检测

中图分类号 Q939.11; R378.99 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0789-06

**Abstract** The 16S rDNA specific primers were designed for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) by the fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) assay, based upon multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis of the 16S rDNAs of over 20 bacteria. After extraction of PA genomic DNA, the target 16S rDNA fragment was amplified by PCR with specific primers, and used to construct recombinant pMDT-Pfr plasmid, the dilution gradients of which were subjected to the standard quantitation curve in FQ-PCR assay. Different concentrations of PA genomic DNA were detected by FQ-PCR in a 20 $\mu$ L of reaction system with SYBR Green I. At the same time, various genomic DNAs of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, and *Mycobacterium tuberculosis* were used as negative controls to confirm specificity of the FQ-PCR detection assay. Results demonstrated that the predicted amplified product of designed primers was of high homology only with PA 16S rDNA, and that sensitivity of the FQ-PCR assay was of 3.6pg/ $\mu$ L of bacterial DNA or  $(2.1 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^2)$  copies/ $\mu$ L of 16S rDNA, accompanied with high specificity, and that the whole

Received: April 24, 2006; Accepted: June 7, 2006.

This work was supported by a grant from the Special Medical Research Project of CPLA in the 11th Five-Year Plan (No. 06Z026).

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-25070312; E-mail: qizt@smmu.edu.cn

军队“十一五”医学专项课题资助 (No. 06Z026)

detection process including DNA extraction could be completed in about two hours. In contrast to traditional culture method, the FQ-PCR assay targeting 16S rDNA gene can be used to detect PA rapidly, which exhibits perfect application prospect in future.

**Key words** *Pseudomonas aeruginosa*, 16S rDNA, fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR), detection

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)广泛分布于自然界,是临床上重要的条件致病菌,也是烧伤、肿瘤、早产儿及重症肺结核等免疫功能低下者并发感染的最常见致病菌之一<sup>[1,2]</sup>。近年来,由于广谱抗生素、免疫抑制剂的广泛应用以及机械通气等侵袭性诊疗操作的大量开展,PA感染出现增多趋势,并且随着耐药菌株的流行,PA感染导致了较高的死亡率<sup>[3,4]</sup>。因此,对可疑感染者或易感染者作出快速的定性、定量诊断,有利于及时、有效地进行临床干预,继而对控制PA感染、降低死亡率具有重要意义。然而,目前作为金标准的细菌分离培养方法加上药物敏感试验通常需要2d~3d,在诊断时效性上存在明显欠缺<sup>[5,6]</sup>。

目前,荧光定量PCR(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)技术在HBV、HIV、SARS-CoV及炭疽杆菌、鼠疫杆菌等病毒或细菌的快速检测方面进展很快,已有针对其特异性靶基因的FQ-PCR试剂盒应用到临床、食品或安全检验检疫中。对细菌、衣原体和支原体等病原微生物而言,看家基因16S rDNA分布的普遍性及其序列的种内保守性,使其成为微生物快速分类鉴定的理想靶基因<sup>[7-9]</sup>。本研究通过对数十种致病细菌的16S rDNA序列进行生物信息学分析,设计了PA 16S rDNA特异性引物,并建立了敏感、特异的FQ-PCR快速检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与培养基** PA标准菌株PA01、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)、福氏志贺杆菌(*Shigella flexneri*)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)及大肠杆菌(*Escherichia coli*)等菌株均由本室保存;结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)标准株H37Rv由解放军309医院庄玉辉教授惠赠。细菌LB培养基按《分子克隆(第三版)》配方配制,结核杆菌以改良罗氏斜面培养基(上海临床检验中心)培养。

**1.1.2 分子生物学试剂** 细菌基因组DNA提取试剂盒 Genomic-tip 100/G及质粒小量提取试剂盒购自

Qiagen, 胶回收纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, Taq DNA聚合酶购自上海申能博彩生物科技有限公司, dNTP mix(dATP、dGTP、dCTP及dTTP各0.2mmol/L)为Sangon公司产品,基因克隆载体pMD18-T与SYBR Green I荧光染料预混试剂SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>均购自TaKaRa。

**1.1.3 主要仪器** Biophotometer分光光度计(Eppendorf), PTC-100<sup>™</sup>自动热循环PCR仪(MJ Research, Inc.), Rotor Gene 3000荧光定量PCR仪(Corbett Research)。

### 1.2 方法

**1.2.1 PA 16S rDNA特异性引物的设计与合成** 在线登录GenBank([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))获得PA标准菌株PA01的16S rDNA序列(NC\_002516);同时分别获得包括金黄色葡萄球菌(NC\_002758)、肠伤寒杆菌(NC\_003198)、鼠伤寒杆菌(NC\_003197)、福氏志贺杆菌(NC\_004337)、变形杆菌(J01874)、表皮葡萄球菌(AJ717377)、大肠杆菌(DQ118017)以及结核杆菌(NC\_000962)等在内的25种(约50株)细菌的16S rDNA序列。通过MegAlign软件对各细菌16S rDNAs进行多序列比对分析,选择PA特异性位点设计上、下游FQ-PCR引物Pf和Pr,并将Pf-Pr引物靶向的16S rDNA扩增序列,与PA及其它25种细菌的16S rDNA序列进行进化树分析,以验证该引物用于PA特异性检测的可行性。引物合成由北京奥科生物技术有限公司上海分公司完成。

**1.2.2 细菌基因组DNA模板的制备** 分别挑取PA、金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、福氏志贺杆菌、变形杆菌、表皮葡萄球菌和大肠杆菌的单克隆菌落,以LB液体培养基培养过夜,结核杆菌以罗氏斜面培养基培养(37℃, 2周),并经高压灭菌。细菌基因组DNA以Genomic-tip 100/G试剂盒提取、纯化,并以分光光度计测定浓度与纯度, -20℃保存备用。

**1.2.3 PA 16S rDNA标准质粒的构建** 通过Pf和Pr引物对PA 16S rDNA靶片段进行PCR扩增,并对扩增终产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳。扩增体系25 $\mu$ L,含10 $\times$  Taq缓冲液(MgSO<sub>4</sub> 20mmol/L)2.5 $\mu$ L, dNTP mixture 1 $\mu$ L, Pf及Pr引物(30 $\mu$ mol/L)各0.2 $\mu$ L, Taq DNA聚合酶(2.5u/4)0.5 $\mu$ L, PA基因组DNA

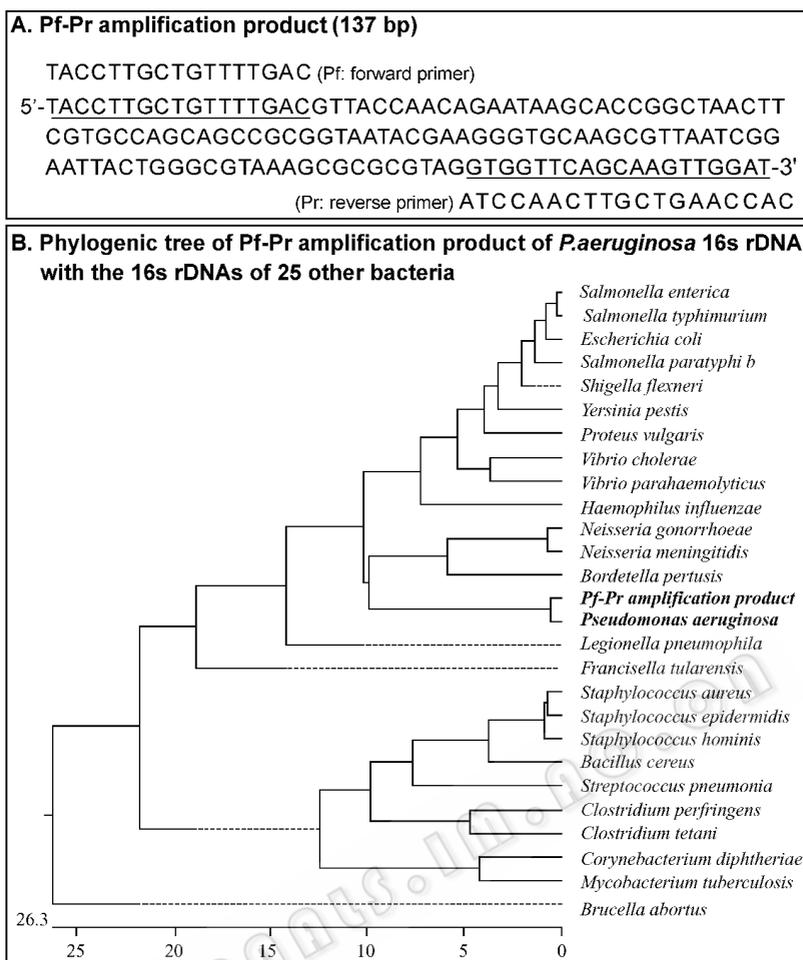


图 1 Pf, Pr 引物扩增产物的序列及其进化树分析

Fig. 1 The amplification product's sequence of PA 16S rDNA by PCR with Pf and Pr primers (A) and the phylogenetic tree of Pf-Pr amplification product of PA 16S rDNA with 16S rDNAs of other 25 bacteria (B)

A: the underlined nucleotides at 5' and 3' termini correspond to the forward and reverse primers (Pf and Pr), respectively; B: the phylogenetic tree was made by the MegAlign software.

( $1\mu\text{g}$ ) $1\mu\text{L}$ ,去离子水  $19.6\mu\text{L}$ 。扩增条件  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30s,  $50^{\circ}\text{C}$  退火 40s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1min, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5min。以胶回收试剂盒回收、纯化 Pf-Pr 扩增片段,将其连入 pMD18-T 载体。将所得重组质粒 pMDT-Pfr 转化 DH5 $\alpha$  菌,挑单克隆菌落培养,以质粒提取试剂盒提取质粒,进行酶切 (*Eco*RI/*Hind* III) 电泳鉴定与 DNA 测序(北京奥科生物技术有限公司上海分公司),并将测序结果与 GenBank 序列比对。之后,以分光光度计测定 pMDT-Pfr 浓度与纯度,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 1.2.4 PA 16S rDNA 的 FQ-PCR 检测:

①反应体系与反应条件:以 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂建立  $20\mu\text{L}$  反应体系,包括 SYBR Green I 荧光染料预混试剂  $10\mu\text{L}$ , Pf 和 Pr 引物各  $0.15\mu\text{L}$ , 梯度

稀释后的 DNA 模板  $2\mu\text{L}$  和双蒸去离子水  $7.7\mu\text{L}$ 。反应条件 (1)  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10s (2)  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5s,  $50^{\circ}\text{C}$  退火 20s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10s,在延伸步骤未采集荧光信号,共 40 个循环 (3) 熔解曲线分析,  $65^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$ , 第一步保温 45s, 后续步骤保温 5s。

②定量标准曲线的建立:以 pMDT-Pfr 作为 PA 16S rDNA 标准质粒,用于建立 FQ-PCR 检测的标准曲线。根据 pMDT-Pfr 质粒的分子量与质量浓度,计算其拷贝数浓度 ( $1.7 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ),并梯度稀释至 ( $1.7 \times 10^7 \sim 1.7 \times 10^4$ ) 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,利用 Rotor Gene 3000 荧光定量 PCR 仪检测 4 个反应管的循环阈值 (threshold cycle, Ct)。通过 3 次重复实验,建立反映 Ct 值与质粒拷贝数浓度对应关系的定量标准曲线。

③敏感性与特异性检测:将 PA 基因组 DNA 模

板梯度稀释至  $(3.6 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^{-1}) \text{ pg}/\mu\text{L}$ , 按上述反应体系与反应条件, 检测 FQ-PCR 方法的敏感性。同时, 考虑到一些常见的 PA 共存菌<sup>[10-12]</sup>, 以金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、福氏志贺菌、变形杆菌、表皮葡

萄球菌、大肠杆菌和结核杆菌的基因组 DNA 模板 ( $3.6 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ) 作阴性细菌对照, 以双蒸去离子水作无模板对照 (no template control, NTC), 验证 FQ-PCR 方法检测 PA 的特异性。实验重复 3 次。

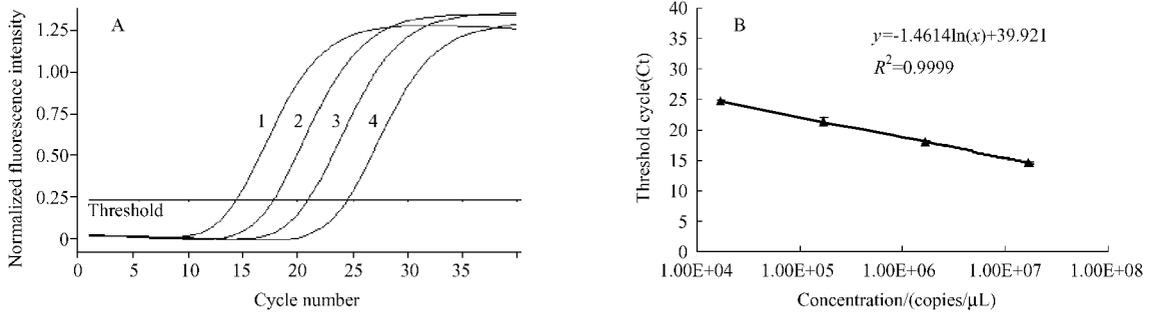


图 2 pMDT-Pfr 质粒的扩增曲线及标准曲线

Fig.2 The fluorescence amplification curves (A) and corresponding standard quantitation curve (B) of dilution gradients of recombinant pMDT-Pfr plasmid detected by the FQ-PCR assay

A: the curves from 1 to 4 represent  $(1.7 \times 10^7 \sim 1.7 \times 10^4)$  copies/ $\mu\text{L}$  of pMDT-Pfr plasmid, respectively;

B: the standard curve and related formula were made by Microsoft Excel based on the data of 3 independent experiments.

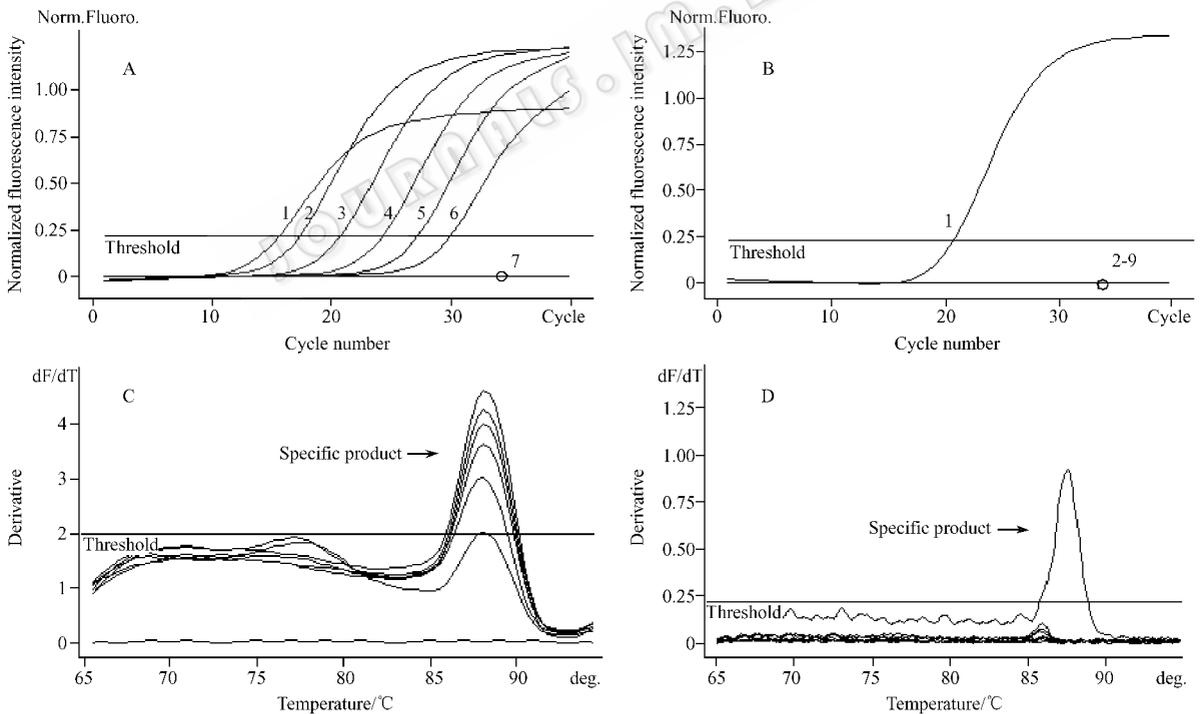


图 3 FQ-PCR 检测 PA 基因组 DNA 的敏感性与特异性实验

Fig.3 Fluorescence amplification curves of dilution gradients of PA genomic DNA (A) and control bacterial DNAs (B) detected by FQ-PCR

A: the sensitivity detection. Curves from 1 to 6 represent  $(3.6 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^{-1}) \text{ pg}/\mu\text{L}$  of the PA genomic DNA, respectively, with the curve 7 being NTC. B: the specificity detection. Curves from 1 to 8 represent  $3.6 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$  of the genomic DNAs of PA, *S. aureus*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *P. vulgaris*, *S. epidermidis*, *E. coli*, and *M. tuberculosis*,

respectively, with the curve 9 being NTC. C and D: dissociation curves corresponding to A and B, respectively.

## 2 结果

### 2.1 PA 16S rDNA 引物设计及其靶向序列的进化树分析

设计的 PA 16S rDNA 引物为 P(上游引物)和 Pr(下游引物),其序列分别为 5'-TACCTTGCTGT TTTGAC-3' 和 5'-ATCCAACCTTGCTGAACCAC-3'。对 Pf-Pr 预期的扩增产物序列(图 1, A)以 MegAlign 软件(Clustal 算法)进行进化树分析。结果显示,除 PA 外, Pf-Pr 扩增产物与其它 25 种细菌的 16S rDNA 序列均无进化同源性(图 1, B),提示 Pf、Pr 引物及其靶向序列对 PA 有很强的特异性,可用于 PA 的 FQ-PCR 快速检测。

### 2.2 PA 16S rDNA 标准质粒的构建

酶切及电泳分析表明,质粒 pMDT-PfPr 可切出大小为 137bp 的目的片段(结果未显示)。DNA 测序结果显示, pMDT-PfPr 质粒所含 PA 16S rDNA 序列与 GenBank(NC\_002516)公布序列(图 1, A)完全一致。

### 2.3 FQ-PCR 检测 PA 16S rDNA 标准曲线的建立

以梯度稀释至( $1.7 \times 10^7 \sim 1.7 \times 10^4$ )拷贝/ $\mu\text{L}$ 的 pMDT-PfPr 质粒  $2\mu\text{L}$  作为模板,分别建立 4 管标准品反应体系,进行 FQ-PCR 检测。根据各反应管所测 Ct 值( $y$ )与所含质粒拷贝数浓度( $x$ )之间的对应关系,得到 FQ-PCR 检测 PA 16S rDNA 的标准曲线: $y = -1.4614 \ln(x) + 39.921$ ( $R^2 = 0.9999$ ) (图 2)。

表 1 FQ-PCR 方法检测 PA 16S rDNA 的敏感性实验

Table 1 Sensitivity of FQ-PCR assay in the detection of PA 16S rDNA

Sample number <sup>a</sup>	Bacterial genomic DNA dilution( pg/ $\mu\text{L}$ )	Threshold cycle (Ct) value <sup>b</sup>	Calculated concentration (copies/ $\mu\text{L}$ ) <sup>c</sup>
1	$3.6 \times 10^4$	$15.70 \pm 0.09$	$6.8 \times 10^6 \pm 5.1 \times 10^5$
2	$3.6 \times 10^3$	$17.67 \pm 0.13$	$1.8 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^5$
3	$3.6 \times 10^2$	$20.91 \pm 0.04$	$2.0 \times 10^5 \pm 9.9 \times 10^3$
4	$3.6 \times 10^1$	$24.75 \pm 0.47$	$1.4 \times 10^4 \pm 4.1 \times 10^3$
5	3.6	$27.53 \pm 0.27$	$2.1 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^2$
6	$3.6 \times 10^{-1}$	$30.51 \pm 0.22$	$5.0 \times 10^2 \pm 1.1 \times 10^2$

a: sample numbers correspond to the curve numbers in Fig. 3A;

b, c: the values are means  $\pm$  standard deviations for three independent experiments.

### 2.4 FQ-PCR 检测 PA 的敏感性

以梯度稀释至( $3.6 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^{-1}$ )pg/ $\mu\text{L}$ 的 PA 基因组 DNA  $2\mu\text{L}$  作为模板,分别建立 6 管 FQ-PCR 反应体系,通过 3 次重复实验检测各管 Ct 值,并根据上述定量标准曲线分别计算出对应的 16S

rDNA 基因拷贝数。结果显示(图 3, A 和 C, 表 1)基于 Pf、Pr 引物的 FQ-PCR 方法,检测灵敏度达  $3.6 \text{ pg}/\mu\text{L}$  的 PA 基因组 DNA 或( $2.1 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^2$ )拷贝/ $\mu\text{L}$  的 16S rDNA 基因(以 Ct < 30 为阳性)。

### 2.5 FQ-PCR 检测 PA 的特异性

分别以  $3.6 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$  的 PA、金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、福氏志贺菌、变形杆菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌和结核杆菌的基因组 DNA 作为待检样品,以双蒸去离子水为 NTC,进行 FQ-PCR 特异性检测。结果表明(图 3, B 和 D),除 PA 样品呈阳性结果(Ct =  $20.91 \pm 0.04$ )外,其它细菌样品均为阴性(Ct 值为 0)。

## 3 讨论

PA 是医院内感染的主要病原因子之一。患者一旦发生严重感染(如肺炎和菌血症),由于传统培养鉴定方法的局限性,常导致不能及时诊断,加上经验性治疗多缺乏针对性,因而常引起较高的死亡率,如何实现快速检测则是解决这一问题的关键<sup>[3,5,13]</sup>。目前,以 16S rDNA 为靶基因进行 PCR 扩增,已广泛应用于细菌、衣原体、支原体、立克次体和螺旋体的鉴定<sup>[14]</sup>。尽管 PCR 方法本身速度快、敏感性高且操作简便,但其扩增产物还需要通过核酸杂交、酶切电泳或 DNA 测序分析等方可做出细菌学鉴定<sup>[8,10,15]</sup>,后续步骤在一定程度上影响了整个检测的时效性。

细菌 16S rDNA 是应用分子生物学方法进行微生物快速分类与鉴定的理想靶基因。该基因由可变区和保守区组成,保守区为所有细菌共有,可变区则具有种属的特异性<sup>[16]</sup>。因此,设计高度特异的 16S rDNA 引物,是建立 PA FQ-PCR 检测方法的关键。在对 PA 等数十种细菌 16S rDNA 序列进行比对分析的基础上,本研究选取细菌 16S rDNA 同源性较低的区域设计了一对 FQ-PCR 引物 Pf 和 Pr。进化树分析显示, Pf-Pr 扩增产物序列与金黄色葡萄球菌等 25 种细菌的 16S rDNA 序列均无进化同源性; FQ-PCR 检测结果也显示,在使用等量 DNA 模板的情况下, Pf、Pr 引物仅对 PA 样品有阳性扩增,而对常见的金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、福氏志贺菌、变形杆菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌和结核杆菌样品检测均呈阴性。上述结果表明, Pf 和 Pr 引物对 PA 有很强的特异性,完全可以满足 PA 检测的需要。

由定量标准曲线可见,各梯度模板的浓度对数

值与  $C_t$  值之间有良好的线性关系。基于该标准曲线,本研究以 FQ-PCR 方法检测 PA DNA 样品,其检出下限可达  $3.6 \text{ pg}/\mu\text{L}$  的细菌基因组 DNA 或  $(2.1 \times 10^3 \pm 3.1 \times 10^2)$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 16S rDNA 基因。鉴于 PA 全基因组(GenBank 序列号:AE004091)含 4 个拷贝的 16S rDNA 基因,因此,本研究建立的 FQ-PCR 方法其检测下限相当于  $(5.3 \times 10^2 \pm 7.8 \times 10^1)$  CFU/ $\mu\text{L}$  略低于 Pimay 等报道的 FRET(荧光共振能量传递)探针法的灵敏度<sup>[17]</sup>,但具有引物设计相对简单及成本低廉等优点。

总之,本研究以 16S rDNA 为靶基因,基于 SYBR Green I 荧光染料和 Pf/Pr 引物进行 FQ-PCR 反应,检测 PA 特异性强、灵敏度高,并且具有很好的重复性。从提取待检样品 DNA 到完成 FQ-PCR 反应,可在 2 h 左右实现对 PA 的快速鉴定。考虑到实验中采用的细菌均为纯的分离菌株,而临床标本更为复杂多样。因此,在本研究建立的 FQ-PCR 方法基础上,进一步针对临床标本优化反应条件,将有助于该检测方法产生更好的应用前景。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW *et al.* Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, **171**( 11 ): 1209 - 1223
- [ 2 ] Pandit DV, Gore MA, Saileshwar N *et al.* Laboratory data from the surveillance of a burns ward for the detection of hospital infection. *Burns*, 1993, **19**( 1 ): 52 - 55
- [ 3 ] Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, 2005, **11** Suppl ( 4 ): 17 - 32
- [ 4 ] Kolak J, van Saene HK, de la Cal MA *et al.* Control of bacterial pneumonia during mechanical ventilation. *Croat Med J*, 2005, **46**( 2 ): 183 - 196
- [ 5 ] Andriessi GI, Verhoef J. Nosocomial pneumonia: rationalizing the approach to empirical therapy. *Treat Respir Med*, 2006, **5**( 1 ): 11 - 30
- [ 6 ] Jaffe RI, Lane JD, Bates CW. Real-time identification of *Pseudomonas aeruginosa* direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction ( PCR ). *J Clin Lab Anal*, 2001, **15**( 3 ): 131 - 137
- [ 7 ] Sun CP, Liao JC, Zhang YH *et al.* Rapid, species-specific detection of uropathogen 16S rDNA and rRNA at ambient temperature by dot-blot hybridization and an electrochemical sensor array. *Mol Genet Metab*, 2005, **84**( 1 ): 90 - 99
- [ 8 ] Shen DX(沈德新), Du J(杜江), Feng ZC(封志纯). Rapid diagnosis of common pathogenic bacteria infection in newborn infants by 16SrDNA oligonucleotide array. *Chinese Journal of Pediatrics* (中华儿科杂志), 2004, **42**( 9 ): 668 - 672
- [ 9 ] Burton MJ, Holland MJ, Jeffries D *et al.* Conjunctival chlamydial 16S ribosomal RNA expression in trachoma: is chlamydial metabolic activity required for disease to develop? *Clin Infect Dis*, 2006, **42**( 4 ): 463 - 470
- [ 10 ] Lu JJ, Perng CL, Lee SY *et al.* Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**( 6 ): 2076 - 2080
- [ 11 ] Higaki S, Kitagawa T, Kagoura M *et al.* Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from skin infections. *Drugs Exp Clin Res*, 2001, **27**( 4 ): 121 - 126
- [ 12 ] Mohammadi T, Pietersz RN, Scholtalbers LA *et al.* Optimal sampling time after preparation of platelet concentrates for detection of bacterial contamination by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Vox Sang*, 2005, **89**( 4 ): 208 - 214
- [ 13 ] Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2005, **4**( Suppl 2 ): 37 - 43
- [ 14 ] Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn*, 2001, **6**( 4 ): 313 - 321
- [ 15 ] Spilker T, Coenye T, Vandamme P *et al.* PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**( 5 ): 2074 - 2079
- [ 16 ] Bertilsson S, Cavanaugh CM, Polz MF. Sequencing-independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable primers. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**( 12 ): 6077 - 6086
- [ 17 ] Pimay JP, De Vos D, Duinslaeger L *et al.* Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid 'real-time' polymerase chain reaction. *Crit Care*, 2000, **4**( 4 ): 255 - 261