

# 绿脓杆菌 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

宋月<sup>1,2</sup>, 程琨<sup>1</sup>, 梁秀丽<sup>3</sup>, 王亚宾<sup>2</sup>, 付彤<sup>2</sup>, 韩立强<sup>2</sup>, 魏战勇<sup>1</sup>

(1. 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002;

3 安阳工学院, 河南 安阳 455000)

**摘要:**为了建立绿脓杆菌的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法, 以便更加快捷、方便的检测绿脓杆菌, 根据 16S rDNA 高度保守的特性, 在绿脓杆菌 16S rDNA 保守区设计 1 对引物, 利用普通 PCR 技术扩增出绿脓杆菌 16S rDNA 保守区 277 bp 的片段, 并克隆到 pMD-18 T 载体上, 纯化的质粒作为模板进行 SYBR Green I 荧光定量 PCR 扩增并制作标准曲线, 建立了绿脓杆菌的荧光定量 PCR 检测方法。并对方法的灵敏性、特异性、重复性进行评价, 又进一步在临床实践中进行检验。结果显示, 所建立的方法对标准样品的最小检出浓度为 28 拷贝/ $\mu$ L。并且特异性检验结果显示与常见的菌群没有交叉反应, 重复性良好。在临床中检测疑似绿脓杆菌感染病料 55 份, 用所建立的荧光定量方法检测出阳性病料 40 份, 而普通的 PCR 方法检测出阳性病料 32 份。表明建立的实时荧光定量 PCR 具有特异、敏感、快速、定量、重复性好等优点, 可以在临床中用于绿脓杆菌的检测。

**关键词:**绿脓杆菌; 16S rDNA; 荧光定量 PCR

**中图分类号:**S855.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)03-0059-05

## Development and Preliminary Application of a SYBR Green I Real-time PCR Method for Detection of *Pseudomonas aeruginosa*

SONG Yue<sup>1,2</sup>, CHENG Kun<sup>1</sup>, LIANG Xiu-li<sup>3</sup>, WANG Ya-bin<sup>2</sup>, FU Tong<sup>2</sup>,  
HAN Li-qiang<sup>2</sup>, WEI Zhan-yong<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Animal-derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 3. Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, China)

**Abstract:** To develop the SYBR Green I real-time quantitative PCR assay for detection of *Pseudomonas aeruginosa* quicker and more convenient. According to the characteristics of highly conserved of *Pseudomonas aeruginosa* 16S rDNA, we designed a pair of primers to establish the quantitative PCR methods. We got a 277 bp region of the *Pseudomonas aeruginosa* 16S rDNA was amplified using normal PCR. Then sub-cloned to pMD-18 T vector and acquired the recombinant plasmid, which served as template to conduct the standards curve of the SYBR Green I real-time PCR. And the sensitivity, specificity and reproducibility of our method were evaluated, and further testing was done in clinical practice. The sensitivity analysis showed that the developed SYBR Green I real-time PCR could detect 28 copies/ $\mu$ L. Specificity testing results showed that it has no cross-react with common environmental bacteria. Then the established method was used to detect the clinical samples. The results showed that 40 positive samples out of 55 suspicious positive samples could be observed by real-time PCR and 32 positive samples could be detected by normal PCR. These results indicated that the SYBR Green I real-time PCR we established in present study showed the characteristics of sensitivity and specificity, and could be used in clinical diagnosis and epidemiological investigation for *Pseudomonas aeruginosa*.

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 河南省重大科技专项(111100110300); 国家质检总局科技计划项目(2013QK233)

作者简介: 宋月(1989-), 女, 河南郑州人, 在读硕士, 主要从事动物疾病分子诊断研究。

通讯作者: 魏战勇(1975-), 男, 河南安阳人, 副教授, 博士, 主要从事动物分子免疫学研究。

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; 16S rDNA; Real-time quantitative PCR

绿脓杆菌(*Bacillus pyocyaneus*) 学名铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 是一种在自然界广泛分布的革兰氏阴性菌。绿脓杆菌在分类学上属于假单胞菌科假单胞菌属, 是一种常见条件性致病菌, 人和动物均可患病。在兽医临床上, 绿脓杆菌可以引起多种动物疾病, 如奶牛的乳腺炎和子宫内膜炎<sup>[1]</sup>、羊的呼吸道和消化道疾病<sup>[2]</sup>、雏禽的败血症和角膜炎<sup>[3-6]</sup>、水貂的出血性肺炎<sup>[7]</sup>、家兔的传染性鼻炎、腹泻病<sup>[8]</sup>等。近年来, 随着集约化程度的不断提高, 绿脓杆菌病的发病呈现出群体性急性暴发的特点, 死亡率逐渐增高。

目前, 对绿脓杆菌病的病原检测多是采用细菌学方法, 传统的病原菌分离鉴定方法繁琐、耗时、费力, 且检出效率低, 易出现假阴性。尤其是铜绿假单胞菌的一些菌株不产色素或产生特殊颜色的色素<sup>[9]</sup>, 需要进行更加复杂的微生物学试验进行鉴定。实时荧光定量 PCR 具有敏感、特异、高效和重复性好等优点, 是一种将常规 PCR 技术与荧光检测相结合基因水平的检测技术, 结果准确直观, 在病原体检测中的应用越来越广泛<sup>[10-12]</sup>。本试验根据 GenBank 上绿脓杆菌 16S rDNA 保守序列区间设计合成了特异性引物, 以期建立 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测绿脓杆菌的方法, 为快速检测绿脓杆菌病提供新的诊断手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种与临床样品

所用菌株: 绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)、肠球菌(*Enterococcus*, ATCC 29212)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*, ATCC 12453)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, ATCC 13124)、枯草芽孢杆菌、链球菌和乳酸乳球菌为河南省动物性食品安全重点实验室保存菌种。临床样品来自河南省各地市及其周边地市的养殖场。

### 1.2 主要试剂及仪器

Roche 公司 Light Cycler 2.0 型荧光定量 PCR 仪, M J Research 公司 PTC-200 PCR 扩增仪; SYBR Green I 等荧光 PCR 试剂、pMD-18 T 载体等购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司, 培养基购自广东环凯生物技术公司, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.3 引物设计

参考 GenBank 上绿脓杆菌 16S rDNA 序列, 根据其保守区间序列设计合成特异性引物, 上游: 5'-AGACACCGTCCAGACTCCTAC-3', 下游: 5'-CCAACTTGCTGAACCACCTAC-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 扩增目的片段长度为 277 bp。

### 1.4 细菌核酸的获取

将各种细菌在合适的培养条件下培养过夜, 用传统的酚-氯仿抽提法获取细菌基因组 DNA, 贮存于 -20 °C 备用。

### 1.5 质粒模板标准品的制备

以提取的绿脓杆菌基因组 DNA 为模板, 用优化的条件扩增 16S DNA 片段。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用胶回收试剂盒回收目的产物。按照载体连接试剂盒将目的片段与 pMD-18 T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑选白色菌落, 进行菌液 PCR 鉴定后, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序正确的阳性质粒作为 DNA 标准品, 用分光光度计测定浓度后进行 10 倍系列稀释, 用于构建标准曲线。

### 1.6 荧光定量 PCR 条件的优化

采用 SYBR Premix Ex Taq 推荐的反应体系, 以出现最高荧光值、出现最小的样本阈值循环数(*Ct* 值)以及在融解曲线分析中不出现非特异性峰为指标, 对退火温度、循环条件和循环次数等进行优化。

### 1.7 标准曲线的制作

将 10 倍系列梯度稀释后的标准质粒作为扩增模板, 根据优化后的反应条件进行实时荧光定量 PCR 扩增。以拷贝数的对数作为横坐标, 循环阈值(*Ct*)作为纵坐标绘制标准曲线。根据标准曲线所得数据分析拷贝数与 *Ct* 值之间的关系, 并建立数学模型, 检验相关性。同时, 对溶解温度进行分析。

### 1.8 敏感性试验

以 10 倍系列梯度稀释后的标准质粒作为扩增模板, 对不同稀释度的标准质粒分别进行扩增, 确定最低检出量。

### 1.9 特异性试验

对所设计的引物和目的片段序列进行 Blast 比对分析, 表明序列有很高的特异性。用建立好的扩增方法以提取的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌、产气荚膜梭菌、链球菌、乳酸乳球菌等菌株基因组 DNA 为模板进行扩

增, 检验引物的特异性。

### 1.10 重复性试验

使用构建好的阳性质粒模板, 选取不同的稀释度作为模板, 用优化好的荧光定量 PCR 方法进行 PCR 扩增, 重复 3 次, 计算  $C_t$  值的变异系数。

### 1.11 临床应用

对来自河南及其周边地区的 34 份患乳腺炎的奶牛所产的牛奶和 21 份疑似绿脓杆菌病的雏禽剖检样品按照实验室常规方法进行处理后, 分别用新建立的荧光定量 PCR 方法和常规的 PCR 方法进行检测, 比较 2 种方法的阳性检出率和符合率, 并用统计学方法进行结果分析。

牛奶样品处理: 分别取 1 mL 奶样于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 沉淀用 PBS 溶液洗涤 1 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 最后加入 600  $\mu$ L 无菌的三蒸水重悬沉淀, 用传统的酚-氯仿抽提法获取细菌基因组 DNA。

雏禽剖检样品处理: 无菌条件下取雏禽肝脏和脾脏各 0.5 g, 在无菌条件下加 PBS 溶液 5 mL 研磨; 取研磨液 600  $\mu$ L, 用传统的酚-氯仿抽提法获取细菌基因组 DNA。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光定量 PCR 反应条件的优化

通过多个批次的重复试验, 证明在 25  $\mu$ L 体系中, 扩增参数为 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 5 s, 55  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次, 此时扩增效率最高, 扩增动力学曲线 (图 1)。溶解曲线如图 2, 溶解温度分别为 87.98, 87.87, 87.90, 87.72, 87.58  $^{\circ}$ C, 均值为 87.81  $^{\circ}$ C, 标准差为 0.16, 变异系数为 0.18%。统计分析结果表明溶解温度特异性好。

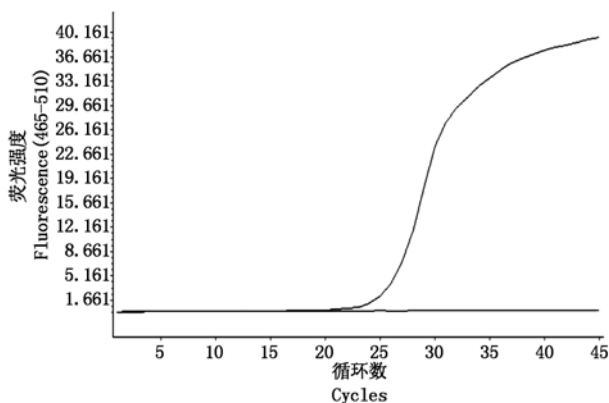


图 1 绿脓杆菌扩增动力学曲线

Fig.1 Curve of Real-time PCR

### 2.2 标准曲线的建立

经测定计算得出重组质粒拷贝数为  $5.66 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu$ L。经 10 倍系列稀释后, 选取  $5.66 \times 10^5 \sim$

$5.66 \times 10^2$  拷贝/ $\mu$ L 的重组质粒作为标准品按照优化好的条件进行荧光定量 PCR 扩增, 结果显示良好的线性关系。标准曲线如图 3, 以  $C_t$  值为纵坐标, 拷贝数的对数为横坐标绘制相关性曲线, 斜率为 -4.058, 截距为 43.99, 相关系数  $R^2$  为 0.981。所建立的标准曲线有良好的线性关系。

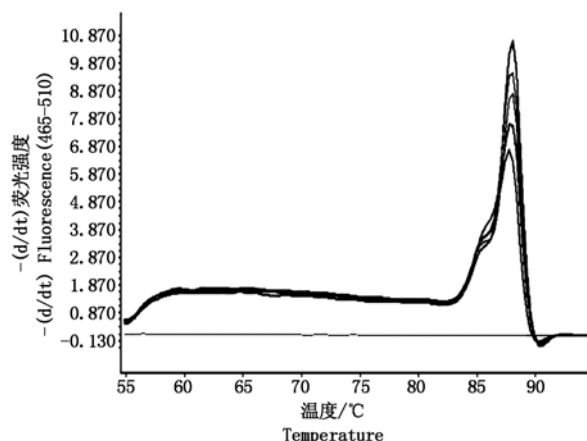


图 2 绿脓杆菌扩增溶解曲线

Fig.2 The melting curves of Real-time PCR

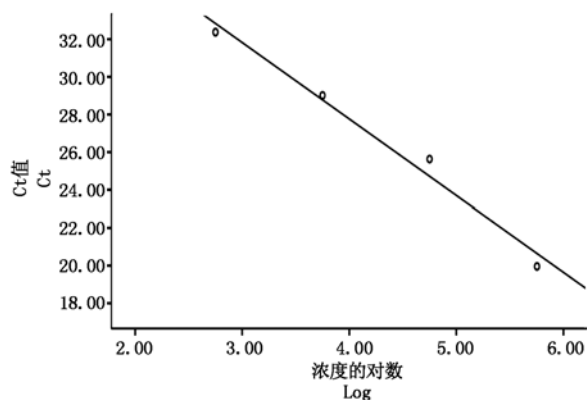


图 3 绿脓杆菌荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.3 Standard curve of Real-time PCR

### 2.3 敏感性试验结果

检测结果表明, 所建立的荧光定量 PCR 方法对绿脓杆菌 16s rDNA 的最低检测量为 28 拷贝/ $\mu$ L, 敏感性高 (图 4)。

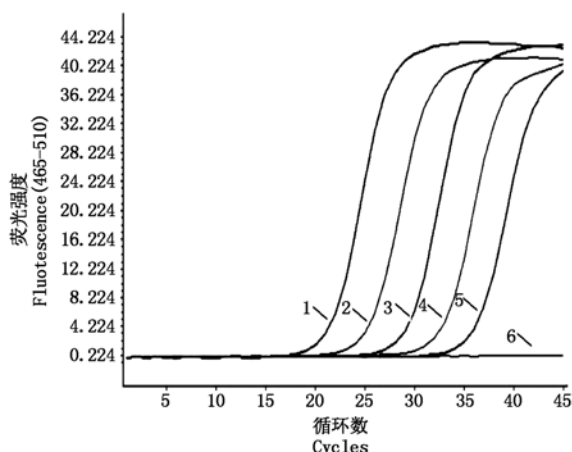
### 2.4 特异性试验结果

扩增结果显示, 只有绿脓杆菌扩增为阳性, 其他常见菌株, 如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠球菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌、链球菌, 以及阴性对照扩增结果均为阴性 (图 5)。只有绿脓杆菌在优化条件下可以扩增, 其他细菌无扩增曲线。试验表明该方法具有较好的特异性。

### 2.5 重复性试验结果

扩增曲线如图 6, 试验结果如表 1。从表可以看出, 3 次重复试验  $C_t$  值之间的变异系数均小于 1%, 说明建立的荧光定量 PCR 具有较好的重复性, 在检

验中具有较好的稳定性。



1~6 分别为:  $2.8 \times 10^5$ ,  $2.8 \times 10^4$ ,  $2.8 \times 10^3$ ,  $2.8 \times 10^2$ ,  $2.8 \times 10^1$  拷贝/ $\mu$ L, 阴性对照。  
1~6.  $2.8 \times 10^5$ ,  $2.8 \times 10^4$ ,  $2.8 \times 10^3$ ,  $2.8 \times 10^2$ ,  $2.8 \times 10^1$  Copies/ $\mu$ L, negative control.

图4 敏感性扩增曲线

Fig. 4 Sensitivity detection of Real-time PCR

表1 绿脓杆菌重复性扩增结果

Tab. 1 The results of repeatability detection

样品序号 Sample number	Ct 值 Ct value			平均值 Mean	标准差 Standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
	1	2	3			
1	11.37	11.24	11.29	11.30	0.066	0.58
2	15.63	15.87	15.82	15.77	0.130	0.82
3	20.04	20.15	20.26	20.15	0.110	0.55
4	24.33	24.19	24.36	24.29	0.090	0.37

表2 临床检测结果

Tab. 2 The results of clinical detection

		荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR		合计/% Total	符合率/% Coincidence	t 检验 t test
		阳性 Positive	阴性 Negative			
普通 PCR Regular PCR	阳性 Positive	32/55	0/55	32/55 (58.18)	85.45	$P=0.004$ $P<0.05$
	阴性 Negative	8/55	15/55	23/55 (41.82)		
合计/% Total		40/55 (72.73)	15/55 (27.27)	55 (100)		

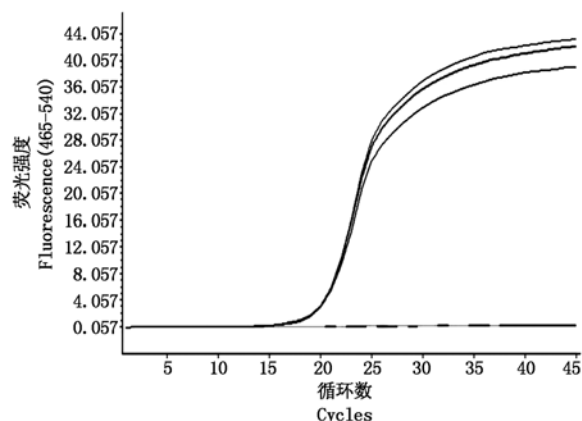
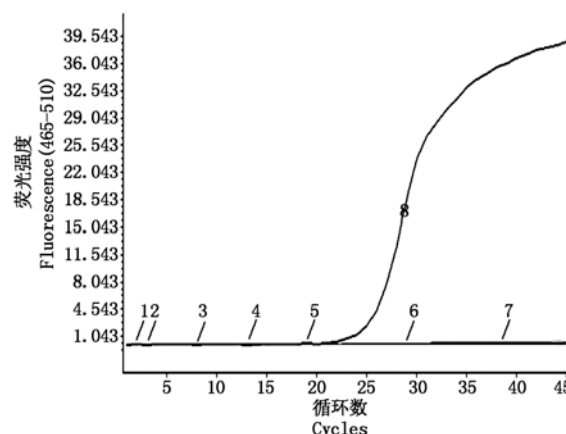


图6 重复性扩增曲线

Fig. 6 Repeatability detection of Real-time PCR

## 2.6 临床检测结果

对总共 55 份样品的检测结果如表 2。荧光定



1~8 分别为: 阴性对照、链球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌、肠球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌。  
1~8. Negative control, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

图5 特异性扩增曲线

Fig. 5 Specific detection of Real-time PCR

量法和普通 PCR 检测双阳性病料 32 份, 双阴性病料 15 份, 单阳性病料 8 份。二者的符合率为 85.45%, 荧光定量 PCR 的检出率比普通方法高 14.54%。用统计学的方法进行分析, 采取配对样品  $t$  检验, 得到 2 种方法的  $P$  值为 0.004, 差异极显著, 荧光定量检测的敏感性明显高于普通方法。

## 3 讨论

近年来, 随着绿脓杆菌病的不断报道, 该病在国内外均已引起了广泛的重视, 对防治绿脓杆菌感染做了大量的工作, 如何快速准确的检测绿脓杆菌的存在也是研究的重要方向之一。实时荧光定量 PCR 是一种核酸定量技术, 既具有普通 PCR 快速、灵敏特点, 又可实时监测, 比普通 PCR 具有更高效

灵敏的特点,被广泛应用于病原微生物的检测中<sup>[13-17]</sup>。目前,已经有利用 SYBR Green I 实时定量 PCR 扩增建立的病原检测方法的报道<sup>[18]</sup>,这一技术得到了广泛的认可。本试验以绿脓杆菌 16S rDNA 保守区的特异性序列为参考,设计扩增片段,并且成功构建标准质粒,建立了可用于绿脓杆菌检测的 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法。该方法的最低检出量为 28 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,具有较高的敏感性。在特异性检验中,对常见的环境菌群进行扩增,均为阴性,表明该方法在绿脓杆菌的检测中具有很强的特异性。在重复性检验中,多次重复扩增的 Ct 值误差都在统计学允许的范围内,变异系数均小于 1%。在实际临床应用中,用新建立的荧光 PCR 与常规 PCR 检测方法进行比较。结果显示,新建立的荧光定量 PCR 方法的阳性检出率比普通 PCR 方法高 14.54%,*P* 值大小为 0.004,说明这 2 种方法的灵敏性差异极显著。新建立的荧光定量 PCR 方法在临床检测绿脓杆菌中具有灵敏度高、方便省时的优点,且可以对样品中的绿脓杆菌进行定量检测,对临床中绿脓杆菌的检测具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 王 斌,李旭廷,黄 伟,等. 急性临床型奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 中国奶牛,2012(5):37-39.
- [2] 韦志锋,李智红,陶 立,等. 山羊支原体和绿脓杆菌混合感染的诊治[J]. 中国畜禽种业,2011,7(3):112-113.
- [3] 李翠蓉. 初生雏鸭绿脓杆菌感染[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(12):221-223.
- [4] 靳双星,陈理盾,段继永. 雏鸡绿脓杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(7):230-232.
- [5] 陈红梅,程龙飞,万春和,等. 死亡番鸭胚中绿脓杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医杂志,2012,48(12):40-42.
- [6] 吴异健. 乳鸽绿脓杆菌病的诊疗报告[J]. 福建畜牧兽医,2010,32(1):57-58.
- [7] 杨培培,王 颖,胡继明,等. 水貂铜绿假单胞菌鞭毛分型及分离株 *fliC* 基因的克隆与序列分析[J]. 中国预防兽医学报,2012,34(9):749-751.
- [8] 鲍国连,佟承刚,韦 强,等. 家兔绿脓杆菌病原特性和致病作用的研究[J]. 中国养兔,2001(5):3-4.
- [9] 蔡双福,周芳梅,黄楚妮. 水样中绿脓杆菌产色素的初步研究[J]. 现代食品科技,2011,27(6):640-642.
- [10] 吴晨璐,施春雷,周 敏,等. 食源性肠球菌荧光定量 PCR 检测方法的建立与评价[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(5):779-787.
- [11] Shin S W, Cha S B, Lee W J, et al. Application of SYBR Green real-time PCR assay for the specific detection of *Salmonella* spp [J]. Korean Journal of Veterinary Research, 2013, 53(1):25-28.
- [12] 李明凤,魏战勇,王学斌,等. 猪细小病毒 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法的建立[J]. 浙江农业学报,2009,21(3):220-224.
- [13] 胡兴娟,王淑娜,周向阳,等. 水产品中的副溶血弧菌和霍乱弧菌双重荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J]. 河南农业科学,2010(9):121-124.
- [14] 赵绪永,宁豫昌,赵 丽,等. 多重实时定量 PCR 快速检测 PRRSV、CSFV 和 PCV2 混合感染方法的建立[J]. 河南农业科学,2013,42(2):123-127.
- [15] 李碧侠,赵 芳,任守文,等. 猪 *SIRT1* 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 华北农学报,2011,26(增刊):44-46.
- [16] 张 莉,王英珍,鄢明华,等. 羊流产衣原体的 PCR 检测方法研究[J]. 天津农业科学,2009,15(2):14-16.
- [17] 樊振华,王娟萍,孟 帆,等. 猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 山西农业科学,2012,40(10):1102-1106.
- [18] 高 旭,鲁 承,杜秋明. 鹅细小病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 河南农业科学,2010(12):121-124.