

学校编码：10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号：21620141152500

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

实时 PCR 技术在败血症病原体  
检测中的应用

Application of Real-time PCR Technology on the Detection  
of Pathogenic Bacteria of Septicemia

吴玉珍

指导教师姓名：李庆阁教授

专业名称：细胞生物学

论文提交日期：2017 年 4 月

论文答辩时间：2017 年 5 月

学位授予日期： 年 月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2017 年 05 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目录

摘 要 .....	1
Abstract .....	2
第一章 绪论 .....	4
第一节 血流感染 .....	4
1.1 血流感染概述 .....	4
1.2 败血症临床表现 .....	4
1.3 败血症发病诱因 .....	5
1.4 致病菌的病原学及变迁 .....	6
1.5 抗菌药物治疗 .....	8
第二节 败血症常用诊断技术 .....	10
2.1 血培养及生化鉴定 .....	10
2.2 PCR 检测技术 .....	11
2.3 基因芯片技术 .....	11
2.4 TOF MS 技术 .....	11
第三节 本论文的研究目的和内容 .....	12
参考文献 .....	14
第二章 实时 PCR 技术在败血症病原体检测中的应用 .....	20
第一节 败血症病原体定量检测体系 .....	20
1.1 引言 .....	20
1.1.1 败血症病原体分布 .....	20
1.1.2 荧光定量 PCR 技术 .....	21
1.1.3 本节研究内容 .....	23
1.2 材料与方法 .....	24
1.2.1 仪器与试剂 .....	24

1.2.2 临床分离株.....	24
1.2.3 DNA 提取.....	24
1.2.4 质粒标准品的构建.....	25
1.2.5 引物和探针的设计.....	25
1.2.6 引物筛选.....	29
1.2.7 引物和探针用量优化.....	29
1.2.8 荧光定量 PCR 程序优化.....	31
1.2.9 分析灵敏度考察.....	31
1.2.10 特异性考察.....	31
1.2.11 稳定性考察.....	31
1.3 结果与分析.....	31
1.3.1 荧光定量 PCR 检测体系引物筛选.....	32
1.3.2 分析灵敏度考查.....	32
1.3.3 荧光定量检测体系稳定性.....	35
1.4 讨论.....	<b>36</b>
<b>第二节 多重媒介探针熔解曲线分析技术在败血症病原体诊断中的应用.....</b>	<b>38</b>
2.1 引言.....	38
2.1.1 全自动血培养和表型鉴定.....	38
2.1.2 多重媒介探针熔解曲线分析技术原理.....	38
2.1.3 HAND 系统原理.....	39
2.1.4 本课题的研究内容.....	40
2.2 材料与方法.....	41
2.2.1 仪器与试剂.....	41
2.2.2 标本收集.....	41
2.2.3 DNA 提取.....	42
2.2.4 质粒标准品的构建.....	42
2.2.5 引物和探针设计.....	42



2.2.6 单重体系的建立.....	45
2.2.7 多重检测体系的建立.....	46
2.2.8 分析灵敏度考察.....	48
2.2.9 特异性考察.....	49
2.2.10 重复性考察.....	49
2.2.11 临床评价.....	49
2.2.12 统计方法.....	50
2.3. 结果与分析.....	50
2.3.1 败血症两管四色检测体系的设计.....	50
2.3.2 败血症单重检测体系的建立.....	52
2.3.3 败血症多重检测体系的建立.....	53
2.3.4 分析灵敏度考察.....	55
2.3.5 特异性考察.....	58
2.3.6 重复性考察.....	59
2.3.7 临床标本评价.....	62
2.4 讨论.....	68
<b>参考文献 .....</b>	<b>71</b>
<b>附表 .....</b>	<b>79</b>
<b>英文缩写索引 .....</b>	<b>79</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>81</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

---

**CONTENTS**

<b>Abstract (In Chinese) .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract (In English) .....</b>	<b>2</b>
<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>4</b>
<b>Section 1 Bloodstream infection .....</b>	<b>4</b>
1.1 Bloodstream infections overview .....	4
1.2 Clinical manifestations of sepsis.....	4
1.3 Onset of sepsis .....	5
1.4 Etiology and change of pathogenic bacteria .....	6
1.5 Antibiotic therapy.....	8
<b>Section 2 Commonly diagnostic techniques for sepsis .....</b>	<b>10</b>
2.1 Blood culture and identification.....	10
2.2 PCR detection technology.....	11
2.3 Gene chip technology .....	11
2.4 TOF MS technology.....	11
<b>Section 3 The purpose and content of the research.....</b>	<b>12</b>
<b>Reference .....</b>	<b>14</b>
<b>Chapter 2 Application of Real-time PCR Technology on the Detection of Pathogenic Bacteria of Septicemia .....</b>	<b>20</b>
<b>Section 1 Quantitative detection system for septicemia.....</b>	<b>20</b>
1.1 Introduction.....	20
1.1.1 Distribution of pathogenic bacteria in septicemia .....	20
1.1.2 Fluorescent quantitative PCR technique.....	21
1.1.3 The content of this chapter.....	23
1.2 Materials and Methods.....	24

---

1.2.1 Instruments and reagents.....	24
1.2.2 Clinical isolates .....	24
1.2.3 Extraction DNA .....	24
1.2.4 Plasmid construction.....	25
1.2.5 Design of primers and probes .....	25
1.2.6 Primer screening .....	29
1.2.7 Optimization of primers and probes .....	29
1.2.8 Fluorescent quantitative PCR program optimization.....	31
1.2.9 Sensitivity analysis.....	31
1.2.10 Specificity of system.....	31
1.2.11 Stability investigation .....	31
1.3 Results and analysis .....	31
1.3.1 Screening of primers for fluorescent quantitative PCR detection system .....	32
1.3.2 Sensitivity of system.....	32
1.3.3 stability of system .....	35
1.4 Discussion .....	<b>36</b>
<b>Section 2 Application of multiple media probe melting curve analysis in the diagnosis of septicemia pathogen .....</b>	<b>38</b>
2.1 Introduction.....	38
2.1.1 Automatic blood culture and phenotype identification.....	38
2.1.2 The principle of multi media probe melting curve analysis.....	38
2.1.3 Principle of HAND system .....	39
2.1.4 The content of this chapter.....	40
2.2 Materials and Methods.....	41
2.2.1 Instruments and reagents.....	41
2.2.2 Specimen collection .....	41
2.2.3 Extraction DNA .....	42
2.2.4 Plasmid construction.....	42

---

2.2.5 Design of primers and probes .....	42
2.2.6 Establishment of uniplex PCR assay .....	45
2.2.7 Establishment of multiplex PCR assay .....	46
2.2.8 Sensitivity analysis.....	48
2.2.9 Specific investigation.....	49
2.2.10 Repeated investigation .....	49
2.2.11 Clinical evaluation .....	49
2.2.12 Statistical method.....	50
2.3. Results and analysis .....	50
2.3.1 The design of two color detection system for septicemia.....	50
2.3.2 Establishment of uniplex PCR assay for sepsis .....	52
2.3.3 Establishment of multiple PCR assay for sepsis.....	53
2.3.4 Sensitivity analysis.....	55
2.3.5 Specific investigation.....	58
2.3.6 Repeated examination.....	59
2.3.7 Clinical specimen evaluation .....	62
2.4 Discussion.....	68
<b>Reference .....</b>	<b>71</b>
<b>Supplemental tables.....</b>	<b>79</b>
<b>English abbreviation index .....</b>	<b>79</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>81</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘 要

血液中感染微生物，称之为血流感染（BSI）；当微生物在血液中能够生长繁殖，并且产生毒素，引起全身性感染时，称之为败血症(Septicemia)。近年来，败血症发病率和死亡率逐年增长，已严重威胁人类生命健康，检测败血症中感染的病原体种类对其治疗至关重要。本论文利用实时 PCR 技术围绕败血症病原体诊断展开了研究，以建立一种快速、准确、成本低、操作简便的微生物鉴定方法。我们使用媒介探针技术结合探针熔解曲线法，建立了适合临床快速鉴定败血症病原体种类的检测体系。

第一章，介绍了败血症的背景、临床表现、发病诱因，病原学变迁、抗菌治疗，然后比较了常见的败血症诊断方法及其优缺点，包括血培养及生化鉴定、PCR 检测技术、基因芯片技术和 TOF MS 技术，最后提出了本论文的研究目的、内容和意义。

第二章第一节中，我们以实时 PCR 技术为平台，建立了败血症中 18 种主要病原体和 2 个耐药基因的定量检测体系。每个病原体和耐药基因的定量检测灵敏度均能达到 5 拷贝/反应，并具有良好的特异性和稳定性。

第二章第二节中，在败血症病原体定量检测体系的基础上，利用媒介探针熔解曲线分析技术，建立了两管四色败血症病原体多重检测体系，第一管体系检测 16 种病原体，第二管体系检测 9 种病原体和 2 个最常见的耐药基因。该体系灵敏度达到 50 拷贝/反应，个别病原体可达到 5 拷贝/反应。体系重复性良好（CV<1%），对 347 份败血症临床标本的检测结果表明，我们的方法与血培养方法的一致率为 87.03%（302/347），证实了该检测体系的可靠性和准确性。

本论文利用实时 PCR 技术建立了败血症病原体分子检测体系，用于快速鉴定败血症中感染的病原体种类，是迄今检测病原体数目最多的体系。

**关键词：**败血症；媒介探针；实时 PCR

厦门大学博硕士学位论文摘要库



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库