

SPF级实验小鼠4种致病菌多重PCR方法的建立及优化*

张越华 郑秀青

(厦门大学实验动物中心, 厦门 361100)

摘要:目的 建立一种可同时检测4种SPF级屏障环境常见致病菌的多重PCR方法。方法 本研究针对鼠伤寒沙门氏菌 *invA* 基因、肺炎克雷伯杆菌 *khe* 基因、嗜肺巴斯德菌 *16SrRNA* 基因、铜绿假单胞菌 *ecfX* 基因序列分别设计合成特异性引物,构建可同时鉴别4种菌的多重PCR反应体系,优化后测定其特异性、灵敏性并人工模拟感染样本。结果 建立的4重PCR方法能对同一样品中的4种致病菌模板进行特异性扩增,无交叉反应;对4种目的菌的检测灵敏度为 10^{-3} ng/ μ L;也可从混合感染的病料中特异性地检测出4种致病菌。结论 本试验建立的多重PCR方法具有快速、简便、灵敏的特点,为4种致病菌的快速诊断和监控提供了有效的技术支持。

关键词: 多重PCR; 沙门氏菌; 肺炎克雷伯杆菌; 嗜肺巴斯德菌; 铜绿假单胞菌

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2018)04-0049-07

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2018.04.009

实验动物广泛地应用于医学、生物、公共卫生、食品、国防和军事科学等方面,其质量直接影响到我们的生产和生活质量。近几年来随着实验动物的需求量与饲养规模日益扩大,检测数量也随之大大增加,任务越来越繁重^[1-4]。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, SE)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, KPN)、嗜肺巴斯德菌(*Pasteurella pneumotropica*, PP)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是造成SPF实验小鼠污染的常见致病菌,这些致病菌可引起啮齿类等哺乳动物呼吸系统的隐性感染甚至死亡,在实验动物质量检测工作中时有阳性结果的发生,对动物质量的控制造成困扰^[5-6]。目前屏障环境实验动物微生物检验检疫主要依据中华人民共和国国家标准《实验动物微生物学等级及监测》(GB14922.2-2001)的检验流程进行操作,其本质上主要依靠传统的分离培养鉴定方法,不仅耗时长、花费大、特异性低,而且无法对人工难以培养的致病细菌进行检测。但PCR方法可以弥补细菌学培养的不足,并可在数小时内检测出病原菌,尤其是多重PCR方法既能节省试剂用量又能缩短检测时间。而目前,这四种SPF

实验小鼠常见致病菌的检测主要依赖于单一的PCR检测^[7-8],同时检测该四种病原微生物的多重PCR的方法尚未建立,本研究旨在建立一种能同时检测鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德菌、铜绿假单胞菌的多重PCR方法,为其在SPF级实验小鼠微生物检测应用中提供良好的检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 标准菌株:实验菌株为鼠伤寒沙门氏菌 CMCCCB50115、肺炎克雷伯杆菌 ATCC700603、嗜肺巴斯德菌 ATCC35149、铜绿假单胞菌 ATCC27853 由厦门大学实验动物中心质检部保存以及提供。

1.1.2 培养基及试剂: 营养肉汤购自广东环凯微生物科技有限公司; Taq DNA聚合酶、dNTPS、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒采购于厦门艾碧康生物科技有限公司; 琼脂糖购自上海生工生物工程股份有限公司; 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; 其

收稿日期: 2017-12-11

* 基金项目: 福建省科技计划重点项目(No. 2014Y0083)

作者简介: 张越华(1986—),女,硕士,研究方向: 实验动物微生物检测。E-mail: yuehua678@163.com

通信作者: 郑秀青(1979—),女,硕士,研究方向: 实验动物微生物检测。E-mail: zxq2993208@sina.com

他试剂均为市售分析纯试剂。

1.1.3 主要仪器设备: T100 Thermal Cycler PCR 仪、PowerPac 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司) 凝胶成像系统。

1.1.4 实验动物: 42 只 18 ~ 22 g 雄性 SPF 级 KM 小鼠,来源于厦门大学实验动物中心合格证号:【SCXK(闽) 2013-0001】并饲养在该中心 ABSL-2 生物安全实验室负压 IVC 中,其感染过程在生物安全柜内操作。

1.2 方法

1.2.1 细菌 DNA 提取: 所有菌株分别接种于营养

肉汤培养基中,37 °C、150 r/min 振荡培养过夜,按试剂盒说明书要求提取细菌 DNA 基因组,采用紫外分光光度计测定模板 DNA 的浓度与纯度,将获得的 DNA 样品于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 多重 PCR 引物设计与合成: 选择鼠伤寒沙门氏菌 *invA* 基因、肺炎克雷伯杆菌 *khe* 基因、嗜肺巴斯德菌 *16SrRNA* 基因、铜绿假单胞菌 *ecfX* 基因作为特征靶基因,应用 Primer premier 5.0 及 Oligo 6.0 软件设计 4 对特异性引物,并由上海生工生物工程股份有限公司合成,其序列见表 1。

表 1 靶基因与引物序列
Table 1 Target gene and primer sequences

病原菌	靶基因	引物序列	目的片段长度/bp
鼠伤寒沙门氏菌	<i>invA</i>	F1: 5' -GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA-3' R1: 5' -TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	284
肺炎克雷伯杆菌	<i>khe</i>	F2: 5' -TGATTGCATTCCGCACTGG-3' R2: 5' -GGTCAACCCAACGATCCTG-3'	428
嗜肺巴斯德菌	<i>16SrRNA</i>	F3: 5' -CTACGGGAGGCAGCACTGGGGAATA-3' R3: 5' -TCCGTATTACCGCGGCTG-3'	198
铜绿假单胞菌	<i>ecfX</i>	F4: 5' -ATGGATGAGCGCTTCCGTG-3' R4: 5' -TCATCCTTCGCCTCCCTG-3'	528

1.2.3 单重 PCR 检测方法的建立: 为了确定单重 PCR 扩增的最佳条件及检测单基因 PCR 扩增的特异性,分别以 4 个标准菌的 DNA 为模板,用相应的引物进行单重 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2 μL 模板 DNA, 0.5 μL 50 μmol/L 上、下游引物, 4 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 1.5 μL 1 mol/L MgCl₂, Taq 酶 2.5 U, 5 μL 10 × PCR buffer, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。其次为了摸索不同退火温度的影响,将退火温度设定为: 45.8 °C、48.4 °C、51.5 °C、54.0 °C、56.8 °C、59.5 °C、62.1 °C、64.5 °C,进行 PCR 反应,以确定单重 PCR 反应的最佳退火温度。PCR 反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 多重 PCR 反应条件优化: 以鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德菌、铜绿假单胞菌混合 DNA 为模板,以等量添加不同标准菌的引物对为原则,优化多重 PCR 的反应条件。初始反应体系为: 5 μL 10 × PCR buffer, 1.5 μL 1 mol/L MgCl₂, 4 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 2.0 μmol/L 4 对引物各 1.0 μL, Taq 酶 2.5 U, 加 ddH₂O 至 50 μL。对多重 PCR 的退火温度、引物浓度和 Mg²⁺ 浓度进行优化。PCR

反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 多重 PCR 反应特异性试验: 分别以 4 种细菌基因组 DNA 的混合样本、单一样本及其他阴性菌的 DNA 样本为模板,同时加入 4 对引物,用优化后的反应体系及条件进行多重 PCR 扩增。

1.2.6 多重 PCR 反应敏感性试验: 将提取的 4 种标准菌的 DNA 模板浓度稀释至 100 ng/μL 浓度。按 10⁰ ~ 10⁻⁹ ng/μL 梯度进行倍比稀释,以优化后的多重 PCR 条件进行扩增,测定多重 PCR 反应的灵敏性。

1.2.7 多重 PCR 的初步应用: 42 只 4 周龄昆明小鼠被随机分为 7 组(1 ~ 7),每组 6 只,分别腹腔注射鼠伤寒沙门氏菌(0.5 mL);铜绿假单胞菌(0.5 mL);肺炎克雷伯杆菌 + 嗜肺巴斯德菌 + 铜绿假单胞菌 + 鼠伤寒沙门氏菌(每种菌 0.12 mL);嗜肺巴斯德菌 + 铜绿假单胞菌(每种菌 0.25 mL);鼠伤寒沙门氏菌 + 铜绿假单胞菌(每种菌 0.25 mL);嗜肺巴斯德菌 + 鼠伤寒沙门氏菌 + 肺炎克雷伯杆菌(每种菌 0.17 mL);另设生理盐水(0.5 mL)作为阴性对照组。7 组小鼠饲养在 ABSL-2 生物安全实验室负压 IVC 内,并在生物安全柜内进行感染操作。观察其发病及死亡情况,饲养 10 d 后,将 7 组小鼠解剖,无菌采集其肝、肺、肠等部位,并置于肉汤中进行过

夜培养,所获得的菌液作为模板,按照前述提取细菌DNA,采用已优化好的多重PCR方法进行检测。

2 结果

2.1 单重PCR扩增结果

分别以SE、KPN、PP、PA的基因组DNA为模板,在不同的退火温度下进行单一PCR反应。凝胶电

泳检测结果显示:在不同的退火温度下,SE、KPN、PP、PA均能扩增出相应分子量大小的目的片段(分别为284 bp、428 bp、198 bp和528 bp),且无其他非特异性条带,其中嗜肺巴斯德杆菌和绿脓杆菌在退火温度高于59.5℃时扩增效率降低,片段变弱;绿脓杆菌则在低于54.0℃扩增效率降低;而对另外两种菌的扩增效率无明显影响。因此最终确定单基因PCR扩增的最佳退火温度为54.0~59.5℃(图1)。

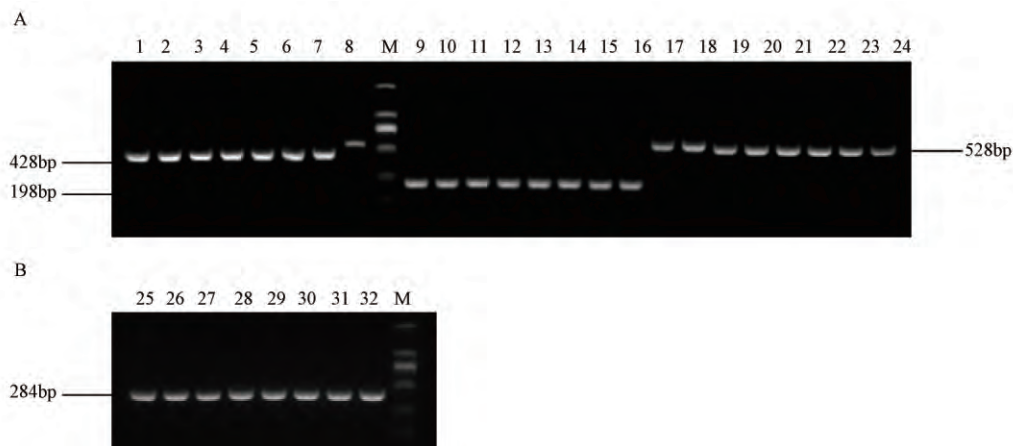


图1 单重PCR扩增及退火温度的优化

注: M: DL2000 marker; 1~8 肺炎克雷伯杆菌; 9~16 嗜肺巴斯德菌; 17~24 绿脓杆菌; 25~32 鼠伤寒沙门氏菌; 退火温度从1~8、9~16、17~24、25~32依次为45.8℃, 48.4℃, 51.5℃, 54.0℃, 56.8℃, 59.5℃, 62.1℃, 64.5℃

Fig. 1 Single PCR products and optimal annealing temperature

Note: M: DNA Marker DL2000; 1-8 *Klebsiella Pneumoniae*; 9-16 *Pasteurella pneumotopica*; 17-24 *Pseudomonas Aeruginosa*; 25-32 *Salmonella typhimurium*; Annealing temperatures were 45.8℃, 48.4℃, 51.5℃, 54.0℃, 56.8℃, 59.5℃, 62.1℃, 64.5℃.

2.2 多重PCR反应条件的优化

以SE、KPN、PP、PA的混合DNA为模板进行扩增,分别对多重PCR的退火温度、引物浓度和 Mg^{2+} 浓度进行优化。结果表明,退火温度在59.5~64.5℃时,4条目的条带均最清晰,确定为最佳温度范围(见图2);引物浓度在5~10 pmol/ μ L时最佳(见图3); Mg^{2+} 浓度在2~4 mmol/L时最佳(见图4)。因此,确定同时检测4种目的菌的多重PCR方法的最佳反应体系如下:10×PCR buffer 5 μ L, 3 μ L $MgCl_2$ (1 mol/L), 2 μ L dNTP (2.5 mmol/L), 2.0 μ mol/L 4对引物各0.75 μ L, Taq酶1 U, 加ddH₂O至50 μ L。PCR反应程序:95℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 62.1℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 34个循环;72℃延伸10 min。此优化后的多重PCR反应体系在后续的特异性实验中得到进一步的验证,如图

5(B)。

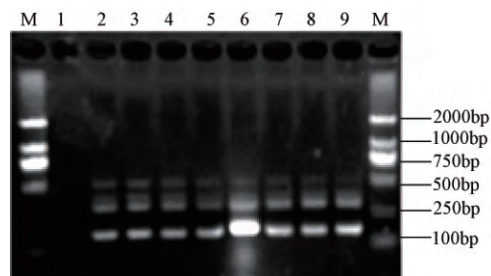


图2 多重PCR退火温度优化

注: M: DL2000 marker; 1 阴性对照; 2~9 退火温度依次为64.5℃、62.1℃、59.5℃、56.8℃、54.0℃、51.5℃、48.4℃、45.8℃

Fig. 2 The optimal annealing temperature in multiplex PCR

Note: M: DNA Marker DL2000; 1 Negative control; 2-9 Annealing temperatures were 64.5℃, 62.1℃, 59.5℃, 56.8℃, 54.0℃, 51.5℃, 48.4℃, 45.8℃

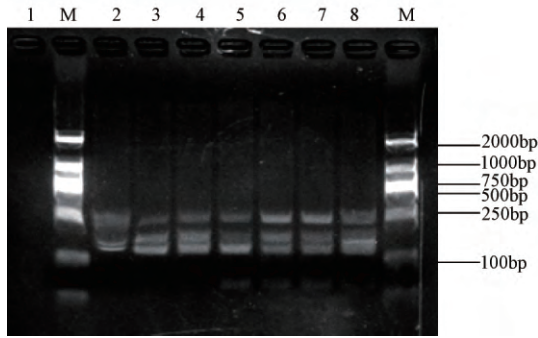


图3 多重 PCR 引物浓度优化

注: M: DL2000 marker; 1: 阴性对照; 2~8: 不同引物浓度优化, 引物浓度依次为 35、20、15、10、8、5、2 pmol/μL

Fig.3 The optimal primer concentration used in multiplex PCR

Note: M: DNA Marker DL2000; 1: Negative control; 2-8: Primers concentrations were 35 , 20 , 15 , 10 , 8 , 5 , 2 pmol/μL

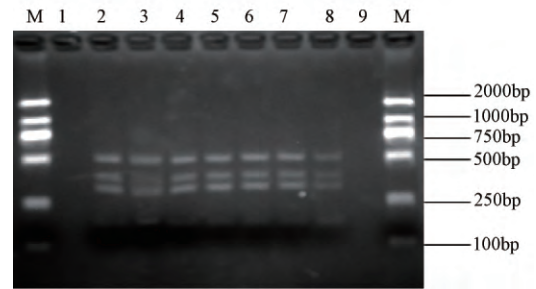


图4 多重 PCR 镁离子浓度优化

注: M: DL2000 marker; 1: 阴性对照; 2~9: 不同 Mg²⁺ 浓度依次为 5、4、5、4、3、5、3、2、1、0.5 mmol/L

Fig.4 The optimal Mg²⁺ concentration used in multiplex PCR

Note: DNA Marker DL2000; 1: Negative control; 2-9: Mg²⁺ concentration were 5 , 4.5 , 4 , 3.5 , 3 , 2 , 1 , 0.5 mmol/L

2.3 多重 PCR 的特异性

分别对 SE、KPN、PP、PA 的基因组 DNA 混合模板、单一模板、其他阴性菌模板及空白对照进行

PCR 扩增,结果见图 5。由图可知,所建立的 PCR 能有效地同时检测本研究所涉及的 4 种致病菌中的一种或多种,表明所建方法特异性良好。

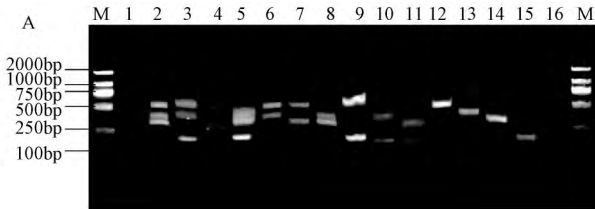


图5 多重 PCR 特异性试验结果

图5(A) M: DL2000 Marker; 1: 嗜肺巴斯德菌、鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、绿脓杆菌四种菌模板; 2: 鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、绿脓杆菌三种菌模板; 3: 嗜肺巴斯德菌、肺炎克雷伯杆菌、绿脓杆菌三种菌模板; 4: 嗜肺巴斯德菌、鼠伤寒沙门氏菌、绿脓杆菌三种菌模板; 5: 嗜肺巴斯德菌、鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌三种菌模板; 6: 肺炎克雷伯杆菌、绿脓杆菌两种菌模板; 7: 鼠伤寒沙门氏菌、绿脓杆菌两种菌模板; 8: 鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌两种菌模板; 9: 嗜肺巴斯德菌、绿脓杆菌两种菌模板; 10: 嗜肺巴斯德菌、肺炎克雷伯杆菌两种菌模板; 11: 嗜肺巴斯德菌、鼠伤寒沙门氏菌两种菌模板; 12: 绿脓杆菌单模板; 13: 肺炎克雷伯菌单模板; 14: 鼠伤寒沙门氏菌单模板; 15: 嗜肺巴斯德菌单模板; 16: 阴性对照;

图5(B) M: DL2000 Marker; 1: 金黄色葡萄球菌; 2: 肺炎链球菌; 3: 乙型溶血性链球菌; 4: 李斯特杆菌; 5: 支气管鲍特杆菌; 6: 鼠棒状杆菌; 7: 大肠埃希杆菌; 8: 志贺杆菌; 9: 嗜肺巴斯德菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、绿脓杆菌

Fig.5 The specificity of multiplex PCR

A: DNA Marker DL2000; 1: *Pasteurella pneumotropica* ,*Salmonella typhimurium* ,*Klebsiella Pneumoniae* ,*Pseudomonas Aeruginosa* mix template; 2: *Salmonella typhimurium* ,*Klebsiella Pneumoniae* ,*Pseudomonas Aeruginosa* mix template; 3: *Pasteurella pneumotropica* ,*Klebsiella Pneumoniae* ,*Pseudomonas Aeruginosa* mix template; 4: *Pasteurella pneumotropica* ,*Klebsiella Pneumoniae* ,*Pseudomonas Aeruginosa* mix template; 5: *Pasteurella pneumotropica* ,*Salmonella typhimurium* ,*Klebsiella Pneumoniae* mix template; 6: *Klebsiella Pneumoniae* ,*Pseudomonas Aeruginosa* mix template; 7: *Salmonella typhimurium* ,*Pseudomonas Aeruginosa* mix template; 8: *Salmonella typhimurium* ,*Klebsiella Pneumoniae* mix template; 9: *Pasteurella pneumotropica* ,*Pseudomonas Aeruginosa* mix template; 10: *Pasteurella pneumotropica* ,*Klebsiella Pneumoniae* mix template; 11: *Pasteurella pneumotropica* ,*Salmonella typhimurium* mix template; 12: *Pseudomonas Aeruginosa* template; 13: *Klebsiella Pneumoniae* template; 14: *Salmonella Spp* template; 15: *Pasteurella pneumotropica* template; 16: Negative control

B: DNA Marker DL2000; 1: *Staphylococcus aureus*; 2: *Streptococcus pneumoniae*; 3: *Beta hemolytic streptococcus*; 4: *Liszt bacillus*; 5: *Bordetella bronchiseptica*; 6: *Corynebacterium kutscheri*; 7: *Escherichia coli*; 8: *Shiga bacillus*; 9: *Pasteurella pneumotropica* ,*Salmonella typhimurium* ,*Klebsiella Pneumoniae* ,*Pseudomonas Aeruginosa*

2.4 多重 PCR 的敏感性

将相同浓度的 4 种菌混合后 10 倍梯度稀释,采用已经优化好的多重 PCR 反应体系进行扩增。结果表明,所建立的多重 PCR 对鼠伤寒沙门氏菌、肺

炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德菌、铜绿假单胞菌最低检出量分别为 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-4} ng/ μ L,可得到多重 PCR 的最低检出量为 10^{-3} ng/ μ L,见图 6。

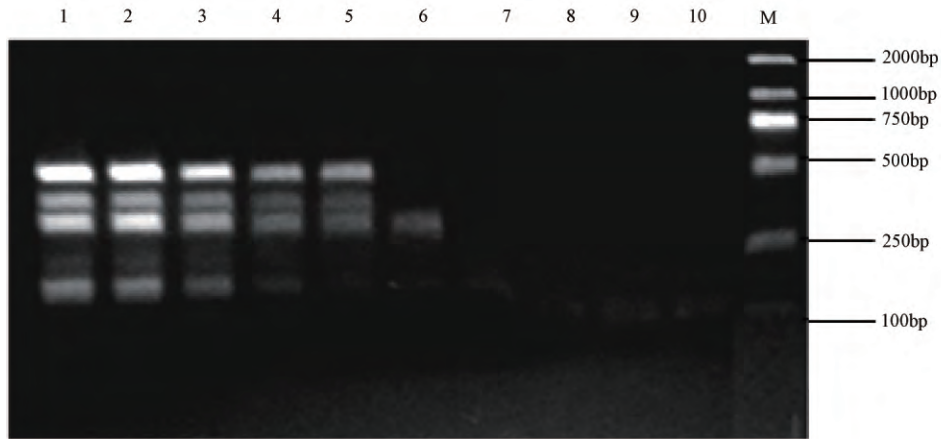


图 6 多重 PCR 灵敏性检测

注: M: DL2000 Marker; 1 ~ 10 依次模板浓度为: 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} ng/ μ L

Fig. 6 The sensitivity test of the multiplex PCR

Note: DNA Marker DL2000; 1 - 10 Primer concentration were 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ng/ μ L

2.5 多重 PCR 的初步应用

采用 4 种致病菌单一或者混合感染昆明小鼠,其中细菌感染组的小鼠在 24 ~ 72 h 内均有 2 ~ 3 只死亡,及时将其装入无菌封口袋后放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,而生理盐水对照组的小鼠全部存活。试验结束后将剩余存活的动物采样后处以二氧化碳安死

术,无菌操作获取小鼠肝、肺、肠等组织后进行肉汤培养并提取 DNA,按照已优化好的多重 PCR 方法进行扩增。结果如图 7: 每份细菌感染组的样本均扩增出了对应的特异条带,而生理盐水对照组无扩增条带,证明建立的多重 PCR 方法可应用于临床检测,见图 7。

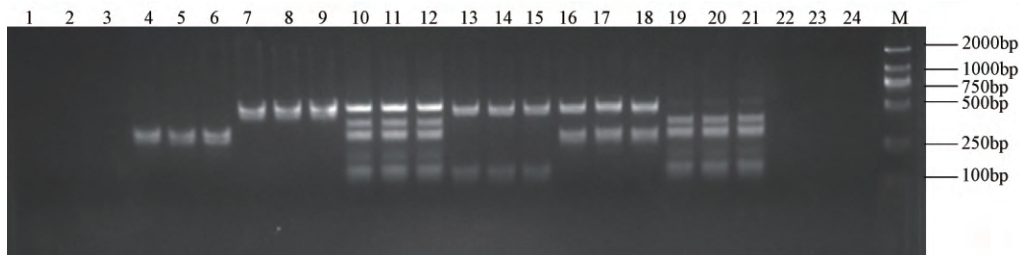


图 7 人工模拟试验多重 PCR 检测结果

注: M: DL2000 Marker; 1 ~ 3、22 ~ 24: 阴性对照; 4 ~ 6: 鼠伤寒沙门氏菌; 7 ~ 9: 绿脓杆菌; 10 ~ 12: 嗜肺巴斯德菌、鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、绿脓杆菌四种菌; 13 ~ 15: 嗜肺巴斯德和绿脓杆菌; 16 ~ 18: 鼠伤寒沙门氏菌和绿脓杆菌; 19 ~ 21: 嗜肺巴斯德菌、鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌三种菌

Fig. 7 The artificial simulation test of the multiplex PCR assay

Note: DNA Marker DL2000; 1 - 3, 22 - 24: Negtive contral; 4 - 6: *Salmonella typhimurium*; 7 - 9: *Pseudomonas Aeruginosa*;

10 - 12: *Pasteurella pneumotropica*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella Pneumoniae* and *Pseudomonas Aeruginosa*;

13 - 15: *Pasteurella pneumotropica* and *Pseudomonas Aeruginosa*; 16 - 18: *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas Aeruginosa*;

19 - 21: *Pasteurella pneumotropica*, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella Pneumoniae*

3 讨论

多重 PCR 能够在一个反应体系中同时检测多种病原微生物,以其快速、准确、低成本等优势在多个检测领域中得到广泛的应用,尤其在实验动物的微生物质量控制过程中,具有极高的应用价值。然而,多重 PCR 并不是单纯的混合体系反应,在检测过程中会受到多种因素的制约影响:首先,引物设计是多重 PCR 反应是否成功的关键^[9],各引物对必须高度特异,避免非特异扩增。本研究在前人单重 PCR 研究的基础上,选取编码鼠伤寒沙门氏菌侵袭蛋白的 *invA* 基因^[10]、编码肺炎克雷伯杆菌体外溶血酵素的 *khe* 基因^[11] 以及铜绿假单胞菌的内标基因 *Ecfx* 基因^[12] 和嗜肺巴斯德的 16S *rRNA* 基因^[13] 作为目的基因,在其高度保守区设计引物,建立多重 PCR 体系,结果显示所设计多对引物的特异性较好;其次,退火温度、引物浓度、镁离子浓度等为影响 PCR 的重要因素,多重 PCR 体系由于存在多对引物、多个模板因而更加复杂,基于此,本研究通过实验优化多重 PCR 反应的条件后,最终确定多重 PCR 的最佳退火温度为 59.5 °C,最佳引物浓度 6 pmol/μL,最佳镁离子浓度 3 mmol/L;此外,本实验中的多重 PCR 能检测沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德菌、铜绿假单胞菌最低检出量为 10⁻³ ng/μL,说明该方法具有较高的敏感性。在实际样本检测过程中,一般采取适当的增菌来获得足量的、杂质含量少的菌量,同时降低由于检测灵敏度较高而扩增造成假阳性的可能,本实验的初步应用通过将小鼠的组织样本浸润在致病菌相应的液体培养基中进行过夜振荡增菌(约 16 h)培养获得足量的菌量,以减少出现假阳性结果。

综上所述,本试验建立的多重 PCR 方法具有快速、准确、简便、灵敏、稳定性高等优点,具有较高的实际应用价值,为 SPF 级实验动物沙门氏菌、肺炎

克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德菌、铜绿假单胞菌的常规监测、感染早期诊断、新种源引进的隔离检疫等提供了新的快速检测方法。

参考文献

- [1] 恽时锋,胡玉红,田小芸,等.屏障环境中实验鼠微生物质量控制[J].医学研究生学报,2005,18(9):834-836.
- [2] 宁磊,张新创.实验动物的质量管理与控制[J].微生物学免疫学进展,2014,42(1):82-86.
- [3] 李红.我国实验动物细菌学质量检测中亟待解决的若干问题[J].中国实验动物学杂志,2002,12(6):364-367.
- [4] 田永刚,程杰,席晓霞,等.SPF级实验动物生产过程中质量控制的探索[J].实验室研究与探索,2013,32(12):251-253.
- [5] 魏杰,林建伟,付瑞,等.2009—2013年北京地区实验动物质量抽检结果分析[J].实验动物科学,2014,31(2):1-6.
- [6] 葛文平,张旭,高翔,等.我国商业化SPF级小鼠病原体污染分析[J].中国比较医学杂志,2012,22(3):65-68.
- [7] 王月玲,黄晓尤,刘云波,等.增菌PCR法检测小鼠沙门氏菌[J].上海实验动物科学,2000,20(3):144-147.
- [8] 冯洁,谢建云,冯丽萍,等.培养法和PCR法用于实验大、小鼠细菌检测的比较分析[J].中国比较医学杂志,2015,25(8):23-26.
- [9] 冯洁,谢建云,胡建华,等.3种条件性致病菌三重PCR检测方法的建立及初步应用[J].中国畜牧兽医,2015,42(6):1389-1395.
- [10] Rhan K, De Grandis S A, Clarke R C. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* [J]. Mol Cell Probe, 1992, 6(4): 271-279.
- [11] 王贵升,尹斐斐,田夫林,等.水貂中大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌和不动杆菌三重荧光PCR方法的建立[J].中国动物检疫,2017,2(34):96-10.
- [12] Cattoir V, Gilibert A, Glaunec J, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* from positive blood cultures by quantitative PCR [J]. Ann Clin Microb Anti, 2010, 9: 21-21.
- [13] Dole V S, Banu L A, Fister R D, et al. Assessment of *rpoB* and 16S *rRNA* Genes as Targets for PCR-Based Identification of *Pasteurella pneumotropica* [J]. Comparative Med, 2000, 60(6): 427-435.

Construction and Application of Multiple PCR Detection for Four Pathogenic Bacteria in SPF Mice

ZHANG Yuehua , ZHENG Xiuqing
(Laboratory animal center , Xiamen university Xiamen 361100 china)

Abstract: Objective To establish a protocol for simultaneous detection of four common pathogens in SPF environment. **Method** A multiplex PCR assay was established with primers designed according to *invA* gene of *Salmonella typhimurium* , *khe* gene of *Klebsiella pneumoniae* , 16S *rRNA* gene of *pasteurella pneumotropica* and *ecfX* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. The specificity and sensitivity of the new multiplex PCR system were also evaluated after optimization. **Result** The multiplex PCR method could simultaneously amplify the four bacteria in the same sample without cross reaction , and the minimum detection concentration was 10^{-3} ng/ μ L. The multiplex PCR method could also specifically detect the target pathogens from co-infection disease material. **Conclusion** The multiplex PCR method , which was rapid , convenient and sensitivity , could provide effective technical for the rapid diagnosis and monitoring of these four pathogens.

Key words: multiplex PCR; *Salmonella typhimurium*; *Klebsiella pneumoniae*; *pasteurella pneumotropica*; *Pseudomonas aeruginosa*

(上接第 48 页)

Effect of Anshen Umbilical Paste on Autonomic Activity and Serum Levels of GABA and NE in Experimental Insomnia Rats

GAN Yu , MA Jin , QIAO Min , ZHANG Hong , BAO Yulong , WU Xiaolin , LIU Xiaohu , JIAO Fuying
(Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicine , Shenyang 110034 , China)

Abstract: Objective To explore the effect of Anshen umbilical paste on autonomic activity and serum levels of gamma aminobutyric acid (GABA) and noradrenaline (NE) in experimental insomnia rats , in order to reveal its mechanism. **Method** The model of insomnia rats were established by 4-Chloro-DL-phenylalanine (PCPA) injected intraperitoneally. Forty rats were randomly divided into blank control group , model control group , Anshen umbilicus plaster (2.70 g/kg) group and diazepam (0.90×10^{-3} g/kg) group. The general condition and autonomic activity of the rats were observed , and the contents of serum GABA and NE were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) . **Result** Compared with the model control group , the body weight of the rats in Anshen umbilicus plaster group and diazepam group were significantly increased ($P < 0.05$) , and the distance and speed of the movement were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) , and the frequency and residence time in the central area also declined. After the treatment with Anshen umbilical paste and diazepam , the content of GABA in serum of rats were increased significantly ($P < 0.01$) , and the content of NE were decreased significantly ($P < 0.01$) . **Conclusion** Anshen umbilical paste could improve the general condition of insomnia rats and reduce the autonomic activity. The mechanism of promoting sleep may be related to the increase of GABA secretion and the decrease of NE release.

Key words: insomnia; Anshen umbilical paste; autonomic activity; GABA; NE