维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0783-04

奇异变形杆菌、洛菲氏不动杆菌 16s rRNA 3'-23s rRNA 5'间序列的克隆及测序

石 磊[1,2],沈 宜[2],顾大勇[1],王 华[1],周元国[1]

(1 第三军医大学野战外科研究所分子生物学中心,重庆 400042;2 重庆医科大学病理生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:对奇异变形杆菌、洛菲氏不动杆菌 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列(16S~23S rRNA intergenic spacer region, ISR)进行克隆测序,为分子探针技术鉴定两菌奠定基础。方法:针对临床常见致病菌 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列两端的 16S 及 23S rRNA 保守序列设计 PCR 扩增的通用引物,对两菌进行扩增,利用 PMD-18 T Vector 质粒对两菌的 PCR 产物进行 T 载体克隆构建,测序后申报 Genbank。结果:两菌的通用引物扩增产物构建的 T 载体克隆,测序结果经 Blast 分析,确定为两菌的 ISR 序列,申报 Genbank 获得接收。结论:成功的对奇异变形杆菌、洛菲氏不动杆菌 ISR 序列进行了克隆测序,该序列可以用于两种菌的通用引物 PCR 扩增技术鉴定。

【关键词】奇异变形杆菌;洛菲氏不动杆菌;16s~23s rRNA 间区;T 载体

【中国图书分类法分类号】R378 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-4-27

Cloning and sequencing of the 16s rRNA intergenic spacer region of proteus mirabilis and acinetobacter iwoffii

SHI Lei, et al

(*Molecular Biology Center, Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone and sequence of 16S~23S r RNA intergenic spacer region of Proteus mirabilis and Acinetobacter lowffii for further identification of these two bacteria by means of molecular probe. *Methods:* The PCR universal clinical common pathogenic bacteria primers for 16S and 23S rRNA's conserved sequences were designed. Then the genomes of these two bacteria were amplified, T Vector clones were constructed with PMD-18 T Vector ad PCR products. The vectors were sequenced and the sequence was submitted to Genbank. *Results:* T Vector clones were constructed with products amplified by using universal primers; according to Blast analyses, the results of sequencing were determined as ISR sequences of the two kinds of bacteria. And the reports to Genbank were accepted. *Conclusion:* Genbank accepted the cloning and sequencing results of Proteus mirabilis and Acinetobacter lwoffii as new sequences. And these sequences can be used to identify the two bacteria by universal primers.

【Key words】Proteus mirabilis; Acinetobacter lwoffii; 16s~23s rRNA intergenic spacer region; T vector

目前聚合酶链反应(PCR)技术在临床致病菌诊断中的应用越来越受到人们的重视,特别针对多种/型的通用引物 PCR 扩增技术,可以一次扩增多种临床致病菌及耐药菌株的 DNA,结合凝胶电泳、寡核苷酸探针杂交、基因芯片等技术,可以快速、简便、灵敏而特异的对临床样本进行分析。而结合基因芯片技术更可以免除同位素、荧光标记的繁琐和污染等缺点,同时具有高通量、及时在线、高并行性等优点,易于标准化和产业化,是当前临床基因检测的研究开发趋势之一[1,2]。

目前细菌 PCR 通用引物的设计多选择 rRNA 基因,特别是 16s 及 23s rRNA 以及 16s~23s rRNA 区间(16s~23s ISR)序列。16srRNA、23srRNA 在细菌及其他微生物的进化过程中高度保守,被称为细菌的"分子化石",目前是最常用的细菌 PCR 通用引物设计选择的靶点位置[3,4]。但由于 16s 及 23s rRNA 序列太保守、进化太慢,无法区分某些种系非常接近的菌种及分型。而序列的进化速度是 16s rRNA 的 10 倍,具有较高的突变速率,这使得 ISR 序列既具有高保守性,又具有可变性的特点。因此可以作为

作者介绍:石 磊(1975-),男,硕士,讲师,主要研究方向:生物传感器及基因诊断。

基金项目:国家自然基金资助项目(30300326),全军重点医药卫生科研基金"十五"重点课题(项目编号:01Z073)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

精细的分子指标，用于一些亲缘关系十分密切的细菌的分类、鉴定和系统学研究[5,6]。

奇异变形杆菌、洛菲氏不动杆菌这两种菌是临床感染的常见致病菌，临床鉴定多采用血琼脂培养后生化检测等方法，繁琐而且耗时长，难以快速直接的得到结果。由于其 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列目前未有报道，不能用于基因芯片等基因鉴定方法。为了解决该问题，简化诊断程序，节省检测时间，为今后建立高通量、高速度的临床微生物检测芯片及其广泛应用提供基础，我们对两种菌的 16s rRNA 3'~23s rRNA 5' 间序列片段进行了克隆测序和鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

1.1.1 奇异变形杆菌、洛菲氏不动杆菌 由大坪医院检验科细菌室提供，鉴定参照《全国临床检验操作规程》进行；

1.1.2 PCR 扩增引物、测序引物 由上海生工生物有限公司合成；

1.1.3 PMD-18TVector 大连宝生物(TAKARA)生物有限公司；

1.1.4 PCR 仪 PTC100PCR 仪，美国 MJ.；

1.1.5 凝胶成像系统 GDS8000，美国 UVP Inc.

1.1.6 基因测序仪 CEQTM8000，美国 Beckman 公司。

1.2 计算机软件

1.2.1 Primer Primer 5.0 PREMIER Biosoft International；

1.2.2 Array Designer 2.0 PREMIER Biosoft International；

1.2.3 Chromas 1.45 Technelysium Pty Ltd.

1.3 主要实验方法[7]

1.3.1 根据临床常见致病菌 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列两端的 16s 及 23srRNA 保守序列设计 PCR 扩增的通用引物（上游：TTG TAC ACA CCG CCC GTC；下游：CCT TTC CCT CAC GGT ACT）、对从两种菌中提取的基因组进行 PCR 扩增，扩增条件如表 1，图 1。

1.32 利用上海生工生物有限公司 PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 产物；

表 1 通用引物 PCR 扩增体系

试剂	用量（μl）
10 × ExTaq Buffer	5
dNTPs（2.5mmol/L each）	4
$MgCl_2$（25μm）	4
Primer F（25μm）	0.5
Primer R（25μm）	0.5
DNA polymerase（5U/μl）	0.25
Template	2
Rnase Free H_2O	33.75

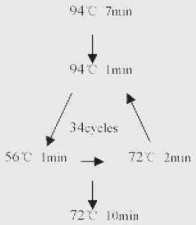


图 1 通用引物 PCR 扩增反应条件

1.3.3 PMD-18 T Vector 质粒对两菌的 PCR 产物进行 T 载体克隆构建；

1.3.4 氯化钙法制备 E.coliDH5α 大肠杆菌感受态细胞，转化 T 载体克隆，培养、振荡增菌后抽提质粒；

1.3.5 通用引物 PCR 扩增鉴定质粒，并对质粒进行正反向测序，测序引物为通用测序引物：M13F（5'-GGT AAC GCC AGG GTT TTC C-3'），M13R （5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'）；

1.3.6 根据正反向测序结果设计测通引物（CAG TTT ACT ACG CAC CGA CG），测通、拼接序列；

1.3.7 对测序获得的序列在 NCBI 网站行 Blast 分析，申报 Genbank。

2 结 果

2.1 通用引物 PCR 扩增细菌 DNA，PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

结果如图 2 所示：两菌通用引物扩增均有产物条带，条带清晰，均齐，与 2000 DNA marker 比较大约在 1000 ~ 1500bp 之间。

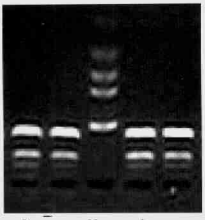
2.2 质粒转染感受态细胞，增菌培养后抽提质粒，质粒琼脂糖凝胶电泳



图 2 两菌通用引物 PCR 扩增产物电泳结果

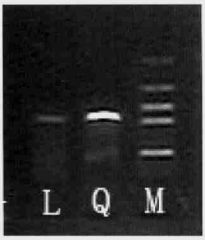
结果如图 3 所示：可见到清晰均齐的质粒条带。

维普资讯 http://www.cqvip.com



L:洛菲氏不动杆菌质粒
Q:奇异变形杆菌质粒
M:2000DNAmarker

图 3 抽提质粒电泳结果



L:洛菲氏不动杆菌质粒通用引物 PCR 产物
Q: 奇异变形杆菌质粒通用引物 PCR 产物
M:2000DNAmarker

图 4 质粒通用引物 PCR 扩增产物电泳

2.3 抽提质粒通用引物 PCR 扩增,PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

结果如图 4 所示:两菌 PCR 产物条带清晰,与 2000 DNA marker 比较大约在 1000 ~ 1500bp 之间,初步证明重组质粒中含有待测基因片段。

2.4 测序结果

2.4.1 奇异变形杆菌 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列测序拼接结果 1196bp:

ATTTT GTACA CACCG CCCGT CACAC CATGG GAGTG GGTTG CAAAA GAAGT AGGTA GCTTA ACCTT CGGGA GGGCG CTTAC CACTT TGTGA TTCAT GACTG GGGTG AAGTC GTAAC AAGGT AACCG TAGGG GAACC TGCGG TTGGA TCACC TCCTT ACCTA AGAGA TACGT GTTAT GTGAA GTGCT CACAC AGATT GTCTG ATGAA GAACG AGCAG AGATA CCGGT ATAGG CTTGT AGCTC AGGTG GTTAG AGCGC ACCCC TGATA AGGGT GAGGT CGGTG GTTCA AGTCC ACTCA GGCCT ACCAC TTTTC CTTTA TGCTG TGTTG TGAAG CAACT CGTTT ACATT AAGTA AACTT CGTTA CTCCA CGCCT TGCCT AAAGA AAAAG CTTCT TATTA TAAGA AGAAA AAGGA GTGGT TATAC GGGTA TTAAA ACATT ATGGG GCTAT AGCTC AGCTG GGAGA GCGCC TGCCT TGCAC GCAGG AGGTC AGCGG TTCGA TCCCG CTTAG CTCCA CCATA ATCTC TTGAA TATAA AACAA TGATT CAGAG TATAT TAGGA ATAGT ATACT GCGAA TTATT ATGCT CTTTA ACAAT CTGGA ACAAG CTGAA AAATT GAAAA CAAAT CAATA TATCA ACGAG GTATA TTGGT GAGTC TCTCA AAATC TCAAA CCTTA AAGTT TGTCA CGCAA AGTTT ATCTT TGAAA GAGAC ACTTT CGGGT TGTGA GGTTA AGCGA ATAAG CGTAC ACGGT GGATG CCTAG GCAAT CAGAG GCGAT GAAGG ACGTG CTAAT CTGCG AAAAG CGTCG GTAAG GTGAT ATGAA CCGTT ATACC CGACG ATATC CGAAT GGGGA AACCC AGTAT CCAAT GGATA CTATC ATTAA CTGAA TCCAT AGGTT AATGA GGCGA ACCGG GAGAA CTGAA ACATC TCAGT ACCCC GAGGA AAAGA AATCA ACCGA GATTC CCCTA GTAGC GGCGA GCGAA CGGGG AGCAG CCCAG AGTCT TAATC AATAG CAGTG TCAGG AGAAC GGTCT GGAAA GTCCG GCAGT AAAGG GTGAT AGCCC CGTAT CTGAA GATGC TGTTA TTGTG AACTC GACGA GTAGG GCGGC ACACG TGTTA TCCTG TCTGA ATATG GCGGG ACCAT CCTCC AAGGC TAAAT ACTCC TGATT GACCG ATAGT GAACC AGTAC CGTGA GGGAA AGGAA T

2.4.2 洛菲氏不动杆菌 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列测序拼接结果 1331bp:

ATTTT GTACA CACCG CCCGT CACAC CATGG GAGTT TGTTG CACCA GAAGT AGGTA GTCTA ACCGC AAGGA GGACG CTTAC CACGG TGTGG CCGAT GACTG GGGTG AAGTC GTAAC AAGGT AGCCG TAGGG GAACC TGCGG CTGGA CCACC TCCTT AACGA AAGAT TGGTG ACCGG TAAGA ATCCA CAAGA AGTTG TTCTT CGAAG ATGTA TCTGA GGGTC TGTAG CTCAG TTGGT TAGAG CACAC GCTTG ATAAG CGTGG GGTCA CAAGT TCAAG TCTTG TCAGA CCCAC CACTA CTGGC GAAGT GATGA ATAAT CACAA GCTGC TAGAT AAAAA GATAT GTCGT TCATT ATGAT TAAAG CTGGG GACTT AGCTT AGTTG GTAGA GCGCC TGCTT TGCAC GCAGG AGGTC AGGAG TTCGA CTCTC CTAGT CTCCA CCAAA TTCGA GGGTA AACAA AGCAA CGCTT TGTCC GAGAA TTTAA GCAAA CAGCT ATGCT GTGCG CAGGC ACACA TAGAA CGAAG CTTAG AGCTA AAGAT TACAG AACTT AGTAA GCAAA CAGCT TCTTA ACTTC TGTGA TTTAT CACAG TTTAC TACGC ACCGA CGAGG TGGTA GTTAA TCATT AACAG ATTAG AAAAT TGAGT CTGAA ATAAA CTGTT CAAAC TCGAT TAAAT AGGAA GATAA CAAGT AATTG TTAAA TTAAT ATTTA ATCTG AGAAC TAGCA AAAAC ACTGA ATCAA GCGTT TTGGT ATATG AATTT AGATT GAAGC TGTAT GGTGA TTAAA TTCAC AGACA ACAAA CCAGT AGCAA TTAAG TTTGC AACGA TAACA CTCAC TTGTA TGTGT TAACG ACTGT TTGGG GTTGT ATAGT CAAGT AATTA AGTGC ATGTG GTGGA TGCCT TGGCA GTCAG AGGCG ATGAA AGACG TGATA GCCTG CGAAA

维普资讯 http://www.cqvip.com

AGCTC CGGGG AGGCG GCAAA TATCC TTTGA TCCGG AGATT TCTGA ATGGG GGAAC CCACC CGCTA TAAGG CGGGT ATCAT AAACT GAATA CATAG GTTTA TGAAG CGAAC GAGGG GAAGT GAAAC ATCTC AGTAC CCTTA GGAAA AGAAA TCAAT TGAGA TTCCC TTAGT AGCGG CGAGC GAACG GGGAG CAGCC CATTA AGTTA TGTGT GTTTT AGTGG AACGC TCTGG GAAGT GCGAA CGTAG AGGGT GATAT TCCCG TACAC GAAAG GGCAC ACATA ATGAT GACGA GTAGG GCGTG GCACG TGAAA CCTTG TCTGA ATATG GGGGG ACCAT CCTCC AAGGC TAAAT ACTCC TGACT GACCG ATAGT GAACC AGTAC CGTGA GGGAA AGGAA T

2.5 申报 GenBank

奇异变形杆菌 16s rRNA 3'~23s rRNA 5' 间序列:1196bp。

ACCESSION NUMBER:AY993943。

洛菲氏不动杆菌 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列:1331bp。

ACCESSION NUMBER:DQ188904。

3 讨 论

本实验中,我们针对包括奇异变形杆菌及洛菲氏不动杆菌在内的多种菌的 ISR 序列两端 16s 及 23s rRNA 保守区设计通用引物,用该通用引物作为通用引物 PCR 扩增检测的扩增引物,并对两种菌进行了扩增。对扩增产物采用了高效 T 载体进行克隆构建、测序。经过反复的测序及测序结果的拼接分析,结果真实可靠。经过将结果提交 NCBI 网站行 Blast 分析,没有与之重复的序列结果,申报 Genbank 并被接受,公开了两个菌的 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列。

我们将两个序列与 Genbank 中 Blast 结果中各序列进行比对:

奇异变形杆菌序列:我们所提交的序列 AY9939433' 端第 4 个碱基到第 304 个碱基共约 300 个碱基与 Genbank 上已经公开的奇异变形杆菌的 16s rRNA 部分序列吻合,末端从第 721 个碱基始到第 1193 个碱基与 Genbank 上已经公开的奇异变形杆菌的 23s rRNA 部分序列吻合,证明测序结果可靠,准确性高。另外两端的序列与多种细菌的 16s 及 23s rRNA 有至少 200 碱基以上的吻合,说明 ISR 序列两端 16s 及 23s rRNA 序列保守,在此区域设计通用扩增引物可以对多种细菌进行有效的 PCR 扩增获得产物。在 16s 及 23s rRNA 之间大约有 400 多碱基区域在 Genbank 奇异变形杆菌基因组中没有相匹配序列,证明我们所提交的 ISR 序列是未有人申报的新序列。该 ISR 序列与基因库中序列没有超过 80bp 的序列吻合,而且在第 304 碱基~第 436 碱基、第 513 碱基~第 558 碱基、第 607 碱基~第 709 碱基三段区域与现有 Genbank 中的序列没有吻合,这三个区域可认为是奇异变形杆菌 ISR 序列的特异区域,在此区域设计特异性诊断探针,可以对奇异变形杆菌进行特异性基因诊断。

洛菲氏不动杆菌序列:我们所提交的序列 DQ188904 与 Blast 结果比对,序列 3'端第 4 个碱基到第 209 个碱基共约 200 个碱基与 Genbank 上已经公开的洛菲氏不动杆菌或不动杆菌属的 16s rRNA 部分序列吻合,末端从第 824 个碱基始到第 994 个碱基及第 1040 碱基到第 1290 碱基与 Genbank 上已经公开的洛菲氏不动杆菌或不动杆菌属的 23s rRNA 部分序列吻合,证明测序结果可靠,准确性高,且说明不动杆菌属 ISR 序列两端 16s 及 23s rRNA 序列保守,在此区域设计通用扩增引物可以对多种细菌进行有效的 PCR 扩增获得产物。在 16s 及 23s rRNA 之间第 358 碱基~第 589 碱基;第 616 碱基~第 787 碱基与不动杆菌属部分序列吻合,而没有完全匹配的基因序列,证明我们所提交的 ISR 序列是未有人申报的新序列。该 ISR 序列与基因库中非不动杆菌属序列没有超过 80bp 的序列吻合,虽然在上述两段序列与不动杆菌属部分序列吻合,但中间仍有部分区域特异性比较高(如:约第 210 碱基~约第 290 碱基,约第 330 碱基~约第 710 碱基区域),在此区域设计特异性诊断探针,可以对洛菲氏不动杆菌进行特异性基因诊断。

奇异变形杆菌及洛菲氏不动杆菌 16s rRNA 3'~23s rRNA 5'间序列的公开为科研及临床对这两个菌的新的检测方法提供了可能。ISR 序列在种系进化发展过程中变异度较高,其在不同种的细菌中拷贝数、长度、碱基排列顺序以及含有的 tRNA 基因的数量和种类不同,这些不同可用于临床对细菌种系甚至分型的鉴定。我们在该序列区域分别设计针对此两菌的特异性检测探针,结合 16s 及 23s rRNA 保守区设计的通用引物 PCR 扩增、基因探针杂交、基因芯片等技术对于此两菌的临床鉴定及分型提供了新的方法和思路。另外,这两个 ISR 序列是以 16s

(下转第 835 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

可使胎盘血管收缩，胎儿—胎盘循环阻力增大，缺氧、缺血及应激均可导致脑、胎盘等组织 NPY 的合成及释放再增加[13]。过度升高的 NPY 可导致胎儿重要器官缺血、缺氧损伤，加重循环不良，使胎儿各系统功能产生抑制，从而导致胎儿缺氧更加严重，NPY 含量也更加上升，这种恶性循环，最后导致胎儿死亡。这一作用途径可能是 ICP 胎儿窘迫或死亡发生发展的重要原因之一。

本研究认为 NPY 与 ICP 及其并发症密切相关，监测 NPY 的变化可作为诊断 ICP 和预测 ICP 胎儿宫内情况指标之一；推测 NPY 受体拮抗剂的应用可能是改善胎儿不良结局的一条新途径。

参 考 文 献

[1] 陈建国，钱德英，刘建中，等. 妊娠高血压综合征患者血浆降钙素基因相关肽和神经肽 Y 含量的变化及其意义[J].中国现代医学杂志，2003；13(8)：56-58.

[2] Huizinga，-C-T；Oudejans，-C-B；Delemarre-van-de-Waal，-H-A Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation[J]. J-Endocrinol，2001；168(2)：273-281.

[3] 王利权，董旻岳，周坚红. 妊高症增加妊娠期肝内胆汁淤积症的发病危险性[J].浙江预防医学，2003；15(6)：8-9.

[4] Hajime Takikawa，Ryo Yamazaki，Naoyo Sano，et al.Biliary excretion of estradiol-17 β -glucunonide in the rat[J].Hepatology，1996；23：607-613.

[5] Lesle KK，Reznikov L，Simon FR.Estrogen in intrahepatic cholestasis of pregnancy [J].Obstetrics Gynecology，2000；95：372-375.

[6] 徐先明，庄依亮，杨幼明，等.乙炔雌二醇诱发孕鼠肝内胆汁淤积症[J].中华围产医学杂志，2000；3(2)：112-115.

[7] Bacq Y，Sapey T，Brechot MC，et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy：a French prospective study[J]. Hepatology，1997；26：358-364.

[8] Shi QY，Kong BH，Ma KD，et al. Effects of ursodeoxycholic acid on the liver plasma membrane fluidity，hepatic glutathione concentration，hepatic estrogen receptors and progesterone receptors in pregnant rats with ethinylestradiol and progesterone induced intrahepatic cholestasis [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi，2003；38(11)：680-682.

[9] 李泽桂、蔡文琴. 血管活性肽在人胚胎脐血管内皮细胞中的发育 [J].解剖学报，1997；28(1)：81-84.

[10] 王竹晨，刘淑芸，王靖华 .妊娠肝内胆汁淤积症患者血硒及胎盘硒水平变化与胎盘组织学改变的关系 [J].中华妇产科杂志，2000；35(8)：476-478.

[11] 董旻岳，王亚平，贺 晶 .抗心磷脂抗体与妊娠期肝内胆汁淤积症的关系[J].中华妇产科杂志，1999；34(8)：491.

[12] 戴华康，金杭美，贺 晶.妊娠期胆汁淤积症患者脂质代谢及血液流变学变化 [J].中华妇产科杂志，1997；32(12)：728-731.

[13] Fletchert AJ，Edwards CM，Gardner DS，et al.Neuropeptide Y in the sheep fetus effects of acute hypoxemia and dexamethasone during late gestation[J].Endocrinology，2000；141：3976-3982.

(上接第 786 页)

及 23s rRNA 保守区设计的通用引物扩增获得的片段序列。因此，这两个片段的测序及 Genbank 的收录发表丰富了细菌通用 PCR 扩增及基因芯片检测的靶样本范围，对于扩大一次 PCR 扩增及基因芯片对临床标本的检测范围做出了贡献。并且可以大大促进临床细菌通用 PCR 扩增检测试剂盒及检测基因芯片的开发和临床应用。

(通讯作者：周元国，第三军医大学野战外科研究所分子生物学中心，ygzhou@cta.cq.cn)

参 考 文 献

[1] Li L, Ma W, Zheng W, et al.Progress in DNA chip technology [J]. Chin Med Sci J，2001；16(1)：59-62.

[2] Bier FF, Kleinjung F.Feature-size limitations of microarray technology--a critical review[J]. Fresenius J Anal Chem，2001；371(2)：151-156.

[3] 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 [J].Appl Environ Microbiol，2002；68(12)：6077-6086.

[4] Chandler DP，Newton GJ，Small JA，et al.Sequence versus structure for the direct detection of 16S rRNA on planar oligonucleotide microarrays[J]. Appl Environ Microbiol，2003；69(5)：2950-2958.

[5] Gonzalez N, Romero J, Espejo RT. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region [J]. J Microbiol Methods，2003；55(1)：91-97.

[6] 傅君芬，徐美春，尚世强，等.应用 16S-23S rRNA 基因区间对败血症常见菌的鉴定[J].中华传染病杂志，2002；20(5)：261-264.

[7] 分子克隆实验指南(上、下册)/(美)萨姆布鲁克(Sambrook,J.)等著；黄培堂等译[M]. 第 3 版，北京：科学出版社，2002. 8.