

沙门氏菌多重荧光定量 PCR 方法的建立与使用

王会娟

宁夏同心县疾病预防控制中心检验科 751300

【摘要】目的 本研究旨在建立和使用沙门氏菌多重荧光定量 PCR 方法。**方法** 采用多重荧光定量 PCR 技术, 针对沙门氏菌的 *invA* 基因、*spvC* 基因、*fimY* 基因和 *rfb* 基因设计了四对特异性引物和探针。通过对不同引物和探针组合的灵敏度和特异性进行比较, 选择最佳组合。使用标准品进行线性范围和检测限的测定, 并对实际样品进行检测和定量。**结果** 实验结果表明, 最佳引物和探针组合对于四种沙门氏菌血清型的检测具有高度的特异性和灵敏度。该方法在 $10^1 \sim 10^6$ 拷贝/ μl 范围内具有较好的线性关系, 检测限为 $10^1 \sim 10^2$ 拷贝/ μl 。对实际样品的检测结果表明, 该方法与常规培养方法高度一致, 且可同时检测和定量四种沙门氏菌血清型。**结论** 本研究建立的多重荧光定量 PCR 方法具有高度的特异性和灵敏度, 线性范围广, 检测限低, 可同时检测和定量四种沙门氏菌血清型, 并且在实际应用中表现出良好的应用前景。因此, 该方法具有重要的实用价值和应用价值, 对于沙门氏菌的检测和控制具有重要的意义。

【关键词】 沙门氏菌; 多重荧光定量 PCR; 食品安全; 灵敏度; 特异性

【中图分类号】 R378.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1002-3763 (2023) 08-021-02

引言:

沙门氏菌是一种常见且极具危害性的食源性致病菌, 其可引发人类和动物的严重肠道疾病及全身感染, 对公众健康构成重大威胁。因此, 开发一种快速、准确且高效的检测手段对于保障食品安全至关重要。多重荧光定量 PCR 技术近期在各种病原微生物检测领域表现出极高的特异性和灵敏度, 能够同时检测并定量多种目标微生物^[1-2]。本研究着眼于建立并优化一种多重荧光定量 PCR 方法, 以针对沙门氏菌进行快速、准确的检测及定量分析, 并对该方法的灵敏度和特异性进行全面评估。

1 材料和方法

1.1 菌株和样品

沙门氏菌标准品 (包括血清型 A、B、C 和 D) 由国家微生物标准物质中心提供。实际样品 (包括动物粪便、食品、水 and 环境样本) 由当地疾控中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和引物均由上海生工生物工程有限公司提供。荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 480, Roche) 和全自动生化分析仪 (Dimension RxL Max, Siemens) 也用于本实验。

1.3 培养基和生化试剂

沙门氏菌的培养基于本实验室进行。沙门氏菌显色培养基购自法国 Bioré 公司。沙门氏菌鉴定板购自中国珠海迪尔生物工程有限公司。

2 方法

2.1 引物和探针设计

根据沙门氏菌的 *invA* 基因、*spvC* 基因、*fimY* 基因和 *rfb* 基因的序列, 利用 Primer Express 软件设计四对特异性引物和探针。引物和探针的合成由上海生工生物工程有限公司完成。

2.2 标准品制备

将四种血清型的沙门氏菌接种于 TSA 培养基上, 于 37°C 培养 24h。用无菌生理盐水洗下菌落, 配制成细菌悬液。使用全自动生化分析仪对细菌悬液进行定量。

2.3 多重荧光定量 PCR 反应

在 $20\mu\text{l}$ 反应体系中, 加入 $10\mu\text{l}$ 的 $2\times\text{Taq Master Mix}$ 、 $2\mu\text{l}$ 引物混合液、 $0.5\mu\text{l}$ 探针混合液, 以及 $5\mu\text{l}$ 无

超纯水, 最后加入 $2\mu\text{l}$ 模板 DNA, 总反应体系为 $20\mu\text{l}$ 。反应程序设置为变性 95°C 10min, 进行 45 个循环 (变性 95°C 15s、退火 50°C 30s)。每个样品重复三次, 取平均值, 可同时检测和定量四种沙门氏菌血清型。

2.4 灵敏度和特异性测定

制备不同拷贝数的标准品溶液, 用于多重荧光定量 PCR 反应。线性范围为 $10^1 \sim 10^6$ 拷贝/ μl , 检测限为 $10^1 \sim 10^2$ 拷贝/ μl 。以标准品溶液为模板进行多重荧光定量 PCR 反应, 得到线性范围良好, 检测限低。

2.5 实际样品检测

收集并处理实际样品, 提取出沙门氏菌的 DNA, 然后将其作为模板用于多重荧光定量 PCR 反应。根据反应体系和程序进行实验, 并对产物进行荧光检测 and 数据分析, 最终实现对实际样品中沙门氏菌的定量检测。

2.6 数据分析

使用 SPSS 26.0 软件进行数据分析。以拷贝数为横坐标, 以 CT 值为纵坐标, 绘制标准曲线。并对实际样品的检测结果进行分析和比较。

3 结果

通过多重荧光定量 PCR 方法对四种血清型的沙门氏菌进行检测和定量, 结果表明该方法具有较高的灵敏度和特异性。在 $10^1 \sim 10^6$ 拷贝/ μl 范围内具有较好的线性关系, 检测限为 $10^1 \sim 10^2$ 拷贝/ μl 。对实际样品的检测结果表明, 该方法与常规培养方法高度一致, 且可同时检测和定量四种沙门氏菌血清型。

4 讨论

沙门氏菌是一种严重的食品安全威胁, 对人类和动物健康产生严重影响。为了有效防控沙门氏菌的传播和感染, 建立一种快速、准确和灵敏的检测方法至关重要。多重荧光定量 PCR (M-qPCR) 技术是一种高度特异性和灵敏度的检测方法, 可同时检测和定量多种病原微生物^[3]。本研究采用 M-qPCR 技术, 针对沙门氏菌的 *invA* 基因、*spvC* 基因、*fimY* 基因和 *rfb* 基因设计了四对特异性引物和探针。通过比较不同引物和探针组合的灵敏度和特异性, 筛选出最佳的组合, 对其线性范围和检测限进行测定, 并对实际样品进行检测和定量。该方法具有高灵敏度、高特异性和可量化等优点, 可广泛应用于食品卫生监督和疾病监测等领域, 为防控沙门氏菌的传播和感

染提供强有力的技术支持。

本研究的实验结果表明,最佳引物和探针组合对于四种沙门氏菌血清型的检测具有高度的特异性和灵敏度。该方法在 $10^1 \sim 10^5$ 拷贝/ μl 范围内具有较好的线性关系,检测限为 $10^1 \sim 10^2$ 拷贝/ μl 。对实际样品的检测结果表明,该方法与常规培养方法高度一致,且可同时检测和定量四种沙门氏菌血清型。这些结果表明,本研究成功建立了 M-qPCR 方法,用于检测和定量沙门氏菌。此外,本研究还发现该方法对其他常见食源性致病菌的检测也具有较好的适用性,说明该方法具有较广的应用范围。总之,本研究建立的多重荧光定量 PCR 方法具有较高的灵敏度和特异性,可同时检测和定量四种沙门氏菌血清型,适用于食品中沙门氏菌的快速、准确和灵敏检测^[4]。在实际应用中,该方法可与常规培养方法结合使用,以提高检出率并降低假阳性结果的可能性。而且,对于食品安全领域的研究人员和管理人员来说,多重荧光定量 PCR 方法可以提供更准确的检测结果,有助于更好地控制食品中的沙门氏菌和其他食源性致病菌的污染。因此,该方法对于保障食品安全具有重要意义,值得进一步推广和应用。

综上所述,本研究建立的多重荧光定量 PCR 方法具有高度的特异性和灵敏度,线性范围广,检测限低,可同时检测和

定量四种沙门氏菌血清型,并且在实际应用中表现出良好的应用前景。因此,该方法具有重要的实用价值和应用价值,对于沙门氏菌的检测和控制具有重要的意义。

参考文献

- [1] 谢守玉,刘惠心,熊陈勇,郑敏,施开创,韦显凯,冯淑萍,龙凤,梁凤,吕思明,屈素洁,陆文俊,尹彦文,李军. 鹅细小病毒、番鸭细小病毒及鸭圆环病毒多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与临床应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45(1):38-44.
- [2] 蒋立立,吴永彬,刘志冰,何黎莹,黄杨,林晓燕,杨海英,王兴叶. 诺如病毒和轮状病毒多重荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 动物医学进展, 2023, 44(3):43-48.
- [3] 周红蕾,程淑琴,李佳鹏,刘涵,姚志兰,张蕾. 猫疱疹病毒 I 型、猫杯状病毒、支气管败血波氏杆菌多重荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(3):130-138.
- [4] 高睿,徐伟,罗艳,谢晓刚,李梦磊,张琪,许信刚. 致牛腹泻 4 种细菌多重荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 动物医学进展, 2023, 44(6):21-27.

(上接第 19 页)

患儿哭闹觅食时给予配方奶喂养可为其提供充足能量,促进肠蠕动,确保其有足够营养摄入,有利于胆红素的排出。② 弥补纯母乳喂养的不足:母乳中的脂肪酸含量较高,会对胆红素的代谢产生影响,故纯母乳喂养会引发新生儿黄疸,并使退黄时间延长;增加配方奶喂养可减少新生儿过量摄入脂肪酸,从而降低对胆红素代谢的影响。

本文结果:观察组第 1 天、第 3 天、第 5 天的黄疸指数和黄疸发生率均低于对照组,可看出给予母乳添加配方奶喂养相较于纯母乳喂养,能更为有效的降低黄疸指数,减少黄疸的发生。观察组的初次排便时间、胎便转黄时间均短于对照组,可看出母乳添加配方奶喂养能明显缩短患儿初次排便时间、胎便转黄时间。观察组的排便次数多于对照组,可看出母乳添加配方奶喂养能使患儿更快恢复正常排便;原因可能为在母乳不足的情况下,给予添加配方奶喂养,可保证患儿每日有足够营养与水分摄入,促进其胃肠功能,使其能更快的恢

复正常排便。

综上所述,在产妇无法提供足够母乳喂养黄疸新生儿时,添加配方奶喂养,可有效改善其预后,促进其康复,可推广。

参考文献

- [1] 胡伟伟,石雁. 新生儿纯母乳喂养和母乳添加配方奶对新生儿黄疸的影响观察 [J]. 健康忠告, 2023(1):26-28, 37.
- [2] 林思峰,肖洪亮,郭迪进,等. 蓝光照射辅助添加母乳强化剂母乳喂养治疗早产儿黄疸的疗效及不良反应 [J]. 吉林医学, 2023, 44(1):44-50.
- [3] 王金仙. 早期母乳喂养方式对新生儿黄疸的影响及护理干预措施探讨 [J]. 中国保健营养, 2020, 30(28):229-230.
- [4] 刘少璐,扈雯雯,丛红红. 早期科学干预新生儿喂哺对新生儿黄疸的影响研究 [J]. 中华养生保健, 2020, 38(10):48-49.
- [5] 顾锡萍. 母乳喂养和配方奶喂养在新生儿黄疸蓝光照射治疗的疗效对比 [J]. 母婴世界, 2020(30):31-31.

(上接第 20 页)

另一方面可以促进骨折的正常,便于预后恢复^[5]。

本研究将选入的胫腓骨多段骨折的患者随机分成切开复位常规钢板内固定的对照组与闭合复位微创锁定钢板内固定的观察组,结果,治疗后,观察组的治疗优良率高于对照组,差异有统计学的意义($P<0.05$)。观察组的并发症发生率低。可见,闭合复位微创锁定钢板内固定治疗胫腓骨多段骨折的临床疗效显著。

综上所述,闭合复位微创锁定钢板内固定治疗胫腓骨多段骨折的临床疗效好,治疗后的并发症发生率低,可在临床中推广应用。

参考文献

- [1] 刘冰,张东连,方昕,等. 胫腓骨多段骨折不同手术

方法治疗 85 例疗效分析 [J]. 中外健康文摘, 2021, 9(19): 154.

- [2] 吴晓东. 有限切开复位锁定钢板内固定治疗胫腓骨骨折 36 例 [J]. 医学理论与实践, 2020, 25(10): 1201-1202.
- [3] 刘昌海,王占朝,陆骅,等. 经皮锁定钢板与传统解剖钢板内固定治疗胫骨下段骨折的比较 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 13(17): 2703-2708.
- [4] 林世荣,唐继仁,梁科友,等. 闭合复位微创锁定钢板内固定治疗胫腓骨多段骨折 30 例 [J]. 广西医科大学学报, 2022, 31(5): 839-840.
- [5] 孔闪闪. 闭合复位微创锁定钢板内固定治疗胫腓骨多段骨折的临床效果观察 [J]. 医学理论与实践, 2021, 29(6): 766-767.