

实验树鼩空肠弯曲菌、沙门氏菌和志贺菌 多重荧光定量 PCR 方法的建立

冯育芳, 王莎莎, 邢 进, 付 瑞, 巩 薇, 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 为实验树鼩微生物检测提供一种快速、简便、灵敏, 并且特异性强的空肠弯曲菌、沙门氏菌和志贺菌多重荧光定量 PCR 检测方法。**方法** 根据空肠弯曲菌的 *HipO* 区域、沙门氏菌的 *inV* 区域和志贺菌的 *ipaH* 区域设计特异性引物和探针, 并进行单病原定量 PCR 检测验证; 后分析多重 PCR 的灵敏度和特异性, 并使用该多重 PCR 方法检测实验树鼩样品。**结果** 本研究的 PCR 要素可用于空肠弯曲菌、沙门氏菌及志贺菌等单种菌的实时荧光定量 PCR 扩增。多重定量 PCR 扩增出了空肠弯曲菌、沙门氏菌和志贺菌标准扩增曲线; 该方法的灵敏度为 $1 \times 10^3 \text{ ng}/\mu\text{L}$; 特异性检测未从其他参考菌株中检出阳性。**结论** 该多重定量 PCR 方法在实验树鼩微生物检测中具有很好的应用和推广前景。

【关键词】 实验树鼩; 空肠弯曲菌; 沙门氏菌; 志贺菌; 多重定量 PCR;

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0056-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.06.012

Establishment of a multiplex real-time PCR method for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Shigella* in tree shrews

FENG Yu-fang, WANG Sha-sha, XING Jin, FU Ru-in, GONG Wei, YUE Bing-fei

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish a rapid, simple, sensitive, and specific multiplex real-time PCR method for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Shigella* in tree shrews. **Methods** Specific primers and probes were designed, according to the *HipO* gene of *Campylobacter jejuni*, *inV* gene of *Salmonella* and *ipaH* gene of *Shigella*. The primers were confirmed by single pathogen quantitative PCR, and the sensitivity and specificity of the multiplex PCR were analyzed. Finally, the samples of experimental tree shrews were detected by this multiplex PCR method. **Results** The PCR element of TaqMan-MGB real-time PCR assay was able to quantitatively amplify the *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* or *Shigella*. Appropriate standard amplification curves of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Shigella* in the multiplex quantitative PCR were obtained. The sensitivity of this method was $1 \times 10^3 \text{ ng}/\mu\text{L}$. There was no false positive detection from other bacterial strains. **Conclusions** This multiplex quantitative real-time PCR method has good application and development prospects in the detection of microorganisms in tree shrews.

【Key words】 Tree shrew; *Campylobacter jejuni*; *Salmonella*; *Shigella*; Multiplex Real-time PCR, Quantitative detection

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(编号:2014BAI01B01)。

【作者简介】 冯育芳(1981-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物细菌学。E-mail: fyf307@126.com。

【通讯作者】 岳秉飞(1960-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物遗传学。E-mail: y6784@126.com。

空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*), 是弯曲杆菌属的一种, 是近十年来受到国内外广泛重视的人畜共患病原菌^[1]。沙门氏菌 (*Salmonella*) 也是一种在公共卫生学上具有重要意义的, 常见的人畜共患病的病原菌, 广泛分布于自然界^[2]。志贺氏菌 (*Shigella*) 是人类细菌性痢疾的病原体, 主要引起急性直肠结肠炎和痢疾^[3]。空弯、沙门和志贺均属于肠道病原菌, 对人和动物都可以致病, 引起的症状也很类似, 三种菌都可引起急性肠炎和食物中毒症状^[4], 为实验动物需要排除的病原体。

树鼩作为新型的实验动物, 来源于自然环境, 其实验动物化首先要排除人兽共患病^[5], 如空弯、沙门和志贺等肠道病原菌。为了提高日常检测的效率, 适应送检单位的需求, 满足国际交流与合作的需要, 急需建立同时检测这三种菌的多重 PCR 方法, 为保证实验动物微生物检测质量提供技术支撑。同时, 为了提高检测方法的灵敏度和特异性, 本研究拟建立多重荧光定量 PCR 方法, 用于实验树鼩空肠弯曲杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌的检测。

1 材料和方法

1.1 材料

- 1.1.1 菌种: 本实验所用菌种、编号及来源见表 1。
- 1.1.2 样本: 随机抽取了 56 份树鼩肠道样本, 全部进行了沙门、志贺和空弯菌的检测。
- 1.1.3 引物: 根据沙门氏菌的 *inV* 区域、志贺菌的 *ipaH* 区域和空肠弯曲菌的 *HipO* 区域, 分别设计了探针和引物, 序列见表 2
- 1.1.4 标准品: 根据 3 种菌的特异基因序列, 由 Takara 公司进行质粒制备, 将制备的质粒作为本实验的标准品。
- 1.1.5 所用试剂: Qiagen DNA 提取试剂盒 (51304,

54161) 购自凯杰企业管理 (上海) 有限公司。OXIOD 哥伦比亚血琼脂 (CM0031B)、OXIOD 胰蛋白胨大豆琼脂 (CM00131B)、胰蛋白胨大豆肉汤 (CM0129B)、BD 公司 SS 琼脂 (212118)、OXIOD XLD 培养基 (CM0469B) 以及添加剂 (SR0109E) 均购自北京兰伯瑞生物技术有限公司。Takara Probe qPCR Mix (RR391A) 购自北京六合通经贸有限公司。

1.1.6 仪器设备: 所用 PCR 仪为美国 ABI 7500 fast Real-Time PCR 仪; 微量分光光度计为美国 Thermo Nanodrop 2000; 自动核酸提取仪为德国 Qiagen QIAcube; 德国 Hettich 22R 冷冻离心机。

1.2 方法

1.2.1 空弯、沙门和志贺菌的培养: 参照国标 GB/T 14926.1 - 2001、GB/T 14926.47 - 2001 和 GB/T 14926.49 - 2001 中的方法进行培养。

表 1 实验用菌株

Tab. 1 Experimental bacterial strains		
参考菌株	菌株编号	来源
肺炎克雷伯杆菌	46108	CMCC
绿脓杆菌	27853	ATCC
金黄色葡萄球菌	26001	CMCC
大肠杆菌	44110	CMCC
啮齿类柠檬酸杆菌	BAA-352	ATCC
奇异变形杆菌	13 - 1870	分离株
普通变形杆菌	S3 - 56	分离株
宋内志贺菌	51082	CMCC
痢疾志贺菌	51252	CMCC
假结核耶尔森氏菌	53518	CMCC
小肠结肠炎耶尔森氏菌	52301	ATCC
空肠弯曲菌	700819	ATCC
鸡白痢沙门氏菌	525	CVCC
雏沙门氏菌	50047	CMCC
鼠伤寒沙门氏菌	50115	CMCC
肠炎沙门氏菌	533	分离株
副伤寒沙门氏菌	50071	CMCC
乙型副伤寒沙门氏菌	50094	CMCC
亚利桑那沙门氏菌	47001	CMCC
甲型副伤寒沙门氏菌	50093	CMCC
肠炎沙门氏菌	50041	CMCC

表 2 多重定量 PCR 实验所用引物序列

Tab. 2 Primers used in the multiplex real-time PCR assay			
检测病原	引物名称	序列 (5' - 3')	扩增片段大小
Pathogens	Primers	Sequences	Length of amplified fragments
沙门 Salmonella	AIT97IE_F	GCCAAGCCTAAAACCAGTAAAGG	96 bp
	AIT97IE_R	GTCCTAGCGACGTTCTCTCTTTT	
	AIT97IE_M	FAM-CAGCCGCTCACTATTG-MGBNFQ	
空弯 Campylobacter	AICXII_F	CACATTAATCTTTATTTTCAACCCGCTGAA	73 bp
	AICXII_R	ACAATCCATCTTCTATCATTGCCTTAGC	
	AICXII_M	VIC- ACCACCCAAACCTTC-MGBNFQ	
志贺 Shigella	AIBZH_F	CCCTGGGCAGGGAAATGTT	62 bp
	AIBZH_R	AAATGGAGAGTTCTGACTTTATCCCG	
	AIBZH_M	TAMRA-CGCCTCGAAATTCTGGAGGACATTG-BHQ	

1.2.2 模板 DNA 的提取:沙门菌、志贺菌和空弯菌等 21 株参考菌株用 Qiagen DNA 提取试剂盒,按照使用说明提取基因组 DNA。经微量分光光度计检测,所提取的细菌 DNA 浓度均不低于 50 ng/ μ L。

1.2.3 PCR 体系和反应条件:PCR 反应体系为 20.4 μ L,包括:Mix 10 μ L, Rox II 0.4 μ L,沙门探针 + 引物 1 μ L,空弯、志贺引物及探针各 1 μ L,模板 DNA 3 μ L,见表 3。94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 sec,58 $^{\circ}$ C 30 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min。

表 3 PCR 反应体系
Tab.3 The PCR reaction system

试剂名称	浓度	20 μ L 内体积(1 $\times$)
Mix	2 $\times$	10 μ L
Rox II	/	0.4 μ L
沙门探针 + 引物	10 μ mol/L	1 μ L
空弯引物 F	10 μ mol/L	1 μ L
空弯引物 R	10 μ mol/L	1 μ L
空弯探针 M	10 μ mol/L	1 μ L
志贺引物 F	10 μ mol/L	1 μ L
志贺引物 R	10 μ mol/L	1 μ L
志贺探针 M	10 μ mol/L	1 μ L
模板 DNA	>1 pg/ μ L	3 μ L

根据上述体系对待检样本 DNA 进行 Real-Time PCR 检测,同时设置标准品阳性对照和阴性对照。

反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;然后 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,共 40 个循环,在每个循环延伸结束时进行荧光信号检测。

1.2.4 特异性检测:用所建立的 Real-time PCR 体系分别扩增肺炎克雷伯菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、啮齿类柠檬酸杆菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、假结核耶尔森氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌等来检测所建方法的特异性。

1.2.5 敏感性检测:将合成的标准品质粒浓度进行换算,得出质粒的拷贝数均为 1×10^{11} copies/ μ L 数量级,将 10^{10} copies/ μ L 浓度的质粒按 1:1:1 合并,并做 10 倍系列稀释至 10^1 copies/ μ L,分别为 10^{10} copies/ μ L、 10^9 copies/ μ L、 10^8 copies/ μ L、 10^7 copies/ μ L、 10^6 copies/ μ L、 10^5 copies/ μ L、 10^4 copies/ μ L、 10^3 copies/ μ L、 10^2 copies/ μ L、 10^1 copies/ μ L,同时设置阴性对照,检测所建方法的敏感性。

1.2.6 应用:用所建立的 real-time PCR 检测方法对树鼩的 56 份粪便样本进行检测。

2 结果

为建立实验树鼩空肠弯曲菌、沙门氏菌和志贺菌多重定量 PCR 方法,首先需要分别设计针对 3 种

细菌的 PCR 引物和探针,以及合适的 PCR 体系和扩增条件,为此,本研究首先分别设计了针对 3 种细菌的 PCR 引物和探针,并进行单细菌实时荧光定量 PCR 检测,以检测所有的定量 PCR 的实验要素,包括引物对、探针、实验体系及扩增条件等。

2.1 空肠弯曲菌 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 方法建立

本研究测试了针对空肠弯曲菌的 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 方法,结果显示,该 real-time PCR 能有效地扩增空肠弯曲菌标准品,其检测灵敏度下限为 1×10^2 copies/ μ L(图 1A)。该扩增标准曲线的斜率为 -3.391,相关系数为 0.999,扩增效率为 97.196%(图 1B)。用所建立的 real-time PCR 方法扩增表 1 中除空弯之外的 12 株菌,结果见图 1C,所测样品均未见扩增,说明该体系特异性良好。此外,使用该方法对空肠弯曲菌进行了扩增,可得到特异性扩增,结果见图 1D。上述结果说明,本研究的实验要素可用于空肠弯曲菌的 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 扩增。

2.2 沙门氏菌 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 方法建立

本研究测试了针对沙门氏菌的 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 方法,结果显示,该 real-time PCR 能有效地扩增沙门氏菌标准品,其检测灵敏度下限为 1×10^2 copies/ μ L(图 2A)。该扩增标准曲线的斜率为 -3.39,相关系数为 1,扩增效率为 97.247%(图 2B)。用所建立的 real-time PCR 方法扩增表 1 中除沙门氏菌之外的 12 株菌,结果见图 2C,所测样品均未见扩增,说明该体系特异性良好。此外,使用该方法对本实验室的 9 株空肠弯曲菌进行了扩增,均可得到特异性扩增,只是菌株间载量存在差异,结果见图 2D。上述结果说明,本研究的实验要素可用于沙门氏菌的 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 扩增。

2 志贺菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法建立 3

首先,本研究测试了针对志贺菌的 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 方法,结果显示,该 real-timePCR 能有效地扩增志贺菌标准品,其检测灵敏度下限为 1×10^2 copies/ μ L(图 3A)。该扩增标准曲线的斜率为 -3.316,相关系数为 0.999,扩增效率为 100.244%(图 3B)。用所建立的 real-time PCR 方法扩增表 1 中除沙门氏菌之外的 11 株菌,结果见

图 3C,所测样品均未见扩增,说明该体系特异性良好。此外,使用该方法对本实验室的痢疾志贺菌和宋内志贺菌进行了扩增,均可得到特异性扩增,只是菌株间载量存在差异,结果见图 3D。上述结果说明,本研究的实验要素可用于志贺菌的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 扩增。

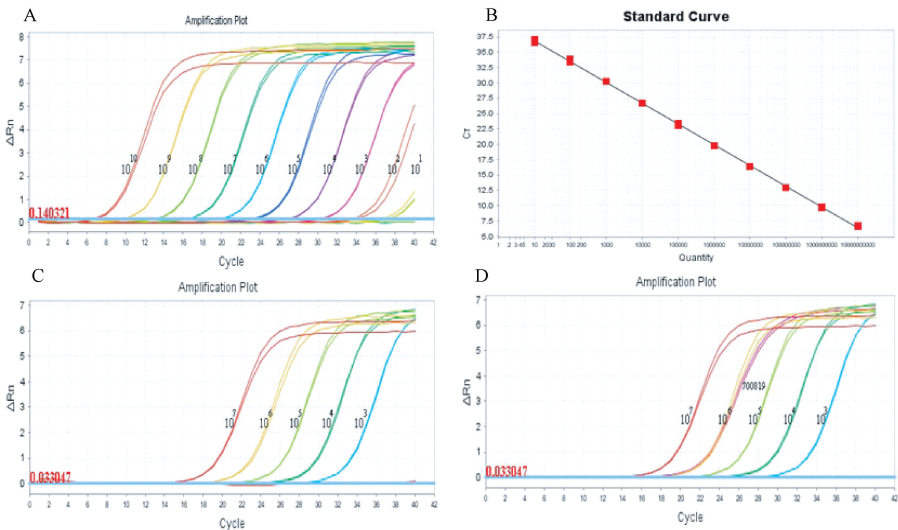
4 三重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法建立

在建立空弯、沙门及志贺菌单菌实时荧光定量 PCR 方法后,本研究把 3 种细菌引物和探针混合尝试建立三重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法。结果显示,该 real-time PCR 能有效地扩增空弯、沙门及志贺菌标准品,其检测灵敏度下限为 1×10^3 copies/ μ L(图 4A)。该扩增中空弯标准曲线的斜率为 -3.387,相关系数为 1,扩增效率为 97.354%;沙门标准曲线的斜率为 -3.263,相关系数为 1,扩增效率为 102.528%;志贺标准曲线的斜率为 -3.294,相关系数为 1,扩增效率为 101.175%(图 4B)。用所建立的 real-time PCR 方法扩增表 1 中除空弯、沙门及志贺菌之外的 9 株菌,结果见图 4C,所测样品均未见扩增,说明该体系特异性良好。上述结果说明,本研究成功建立三重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法。

之后,用本实验所建立的 real-time PCR 方法对 56 份树鼩肠道样本进行检测,结果显示,空弯有 5 份样本阳性(空弯单重有 7 份阳性,培养有 5 份阳性),志贺有 4 份样本阳性(志贺单重有 5 份阳性,培养有 4 份阳性),沙门检测无阳性,结果见图 4D。本研究建立的三重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法与经典的细菌培养检测法结果一致,说明本方法具有较好的灵敏性和特异性。

5 结论

空肠弯曲杆菌主要可引起人体急性肠炎和食物中毒,并伴发反应性关节炎、肝炎、瑞特氏病和格林-巴利综合症等免疫性损伤性疾病。也可引起动物流产不孕、乳房炎及幼畜禽腹泻和家禽肝炎。沙门氏菌不仅能导致鸡白痢、鸡伤寒、副伤寒、仔猪副伤寒、鼠伤寒、动物流产、死亡等,还能使人类发生伤寒、副伤寒、败血症、胃肠炎、感染性腹泻和食物中毒。在世界各地的食物中毒中,沙门菌引起的中毒病例占首位或第二位。志贺氏菌是人类细菌性痢疾的病原体之一,主要引起急性直肠结肠炎和痢疾。空弯、沙门和志贺均属于肠道病原菌,对人和动物都可以致病,引起的症状也很类似,三种菌都可引起急性肠炎和食物中毒症状^[6]。

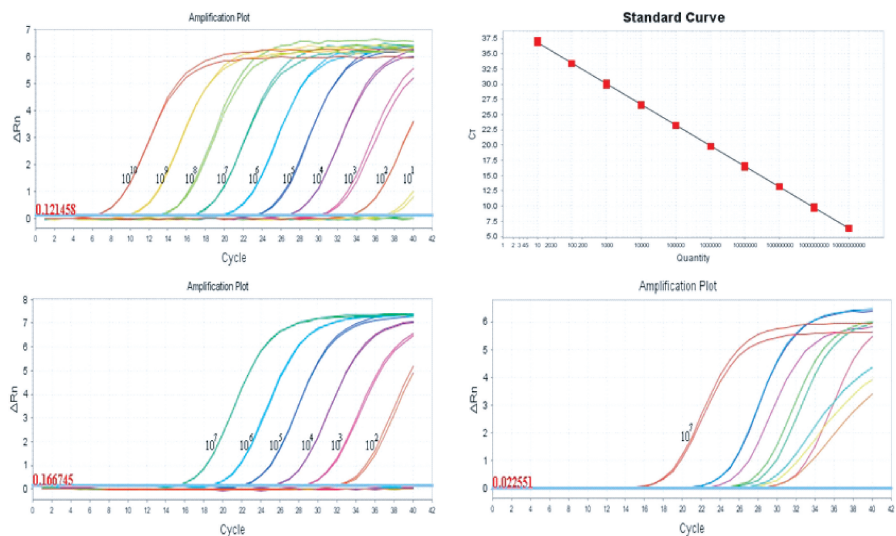


A: 空肠弯曲菌 Real-time PCR 方法敏感性结果(图中曲线上所标数字的单位为 copies/ μ L);B: 空肠弯曲菌 real-time PCR 方法标准曲线;C: 空肠弯曲菌 real-time PCR 方法特异性结果;D: 对空弯菌种扩增的结果

图 1 空肠弯曲菌 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 方法建立

A: Sensitivity of the real-time PCR for *Campylobacter jejuni* (copies/ μ L);
B: Standard curve of the real-time PCR for *Campylobacter jejuni*; C: Specificity of the real-time PCR for *Campylobacter jejuni*; D: Results of amplification of the *Campylobacter jejuni* strain

Fig. 1 Establishment of the TaqMan-MGB real-time PCR for *Campylobacter jejuni*.

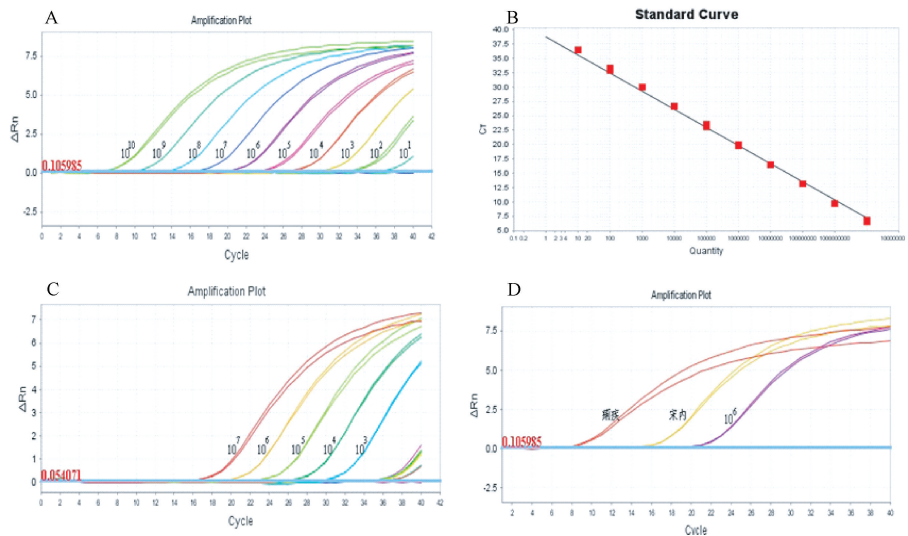


A: 沙门氏菌 Real-time PCR 方法敏感性结果(图中曲线上所标数字的单位为 copies/ μ L);
B: 沙门氏菌 Real-time PCR 方法标准曲线;C: 沙门氏菌 Real-time PCR 方法特异性结果;D: 对沙门氏菌种扩增的结果

图 2 沙门氏菌 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 方法建立

A: Sensitivity of the real-time PCR for *Salmonella* (copies/ μ L); B: Standard curve of the real-time PCR for *Salmonella*;
C: Specificity of the real-time PCR for *Salmonella*; D: Results of amplification of the *Salmonella* species

Fig. 2 Established of TaqMan-MGB real-time PCR for *Salmonella*.



A: 志贺菌 real-time PCR 方法敏感性结果(图中曲线上所标数字的单位为 copies/ μ L);
B: 志贺菌 real-time PCR 方法标准曲线;C: 志贺菌 real-time PCR 方法特异性结果;D: 对志贺菌种扩增的结果

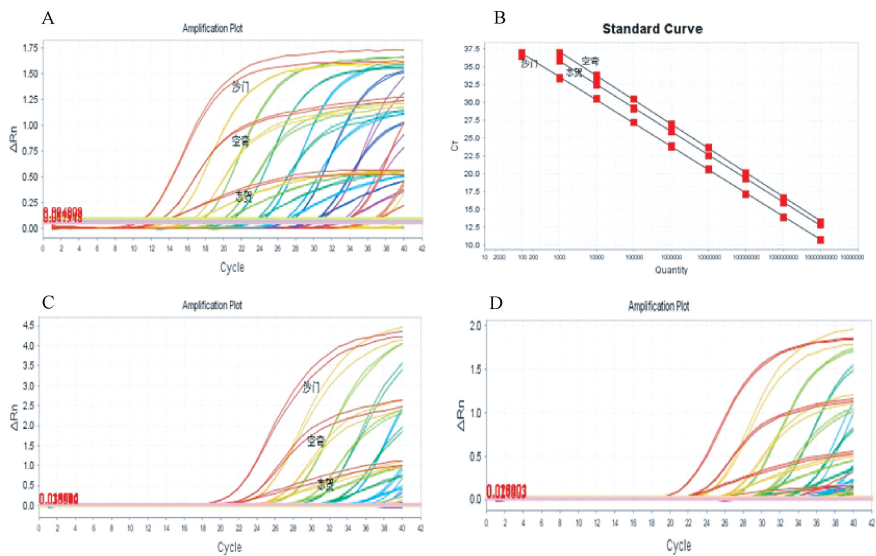
图 3 志贺菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法建立

A: Sensitivity of the real-time PCR for *Shigella* (copies/ μ L); B: Standard curve of the real-time PCR for *Shigella*;
C: Specificity of the real-time PCR for *Shigella*; D: Results of amplification of the *Shigella* species

Fig. 3 Established of the TaqMan-MGB real-time PCR for *Shigella*.

唐梦君等人建立空肠弯曲杆菌 PCR-ELISA 检测方法,用于家禽泄殖腔样本的检测^[7]。阳成波等人先后建立基于 SYBR Green I 或 TaqMan 探针的 real-time PCR 定量检测空肠弯曲杆菌^[8, 9]。刘俊华等^[10]人建立实时荧光 PCR 快速检测食品中的空肠

弯曲菌。孔繁德等^[11]人进行了沙门菌 PCR 快速检测试剂盒的研制,并进行了初步应用。郑友限等人建立实时荧光定量 PCR 法用于沙门菌的检验,用鼠伤寒标准菌和 60 份食品样本进行检测方法的特异性、敏感性和重复性试验,并与常规法和科玛嘉平



A: 空弯沙门志贺菌 *real-time PCR* 方法敏感性结果 (图中曲线上所标数字的单位为 *copies/μL*) ;B: 空弯沙门志贺菌 *real-time PCR* 方法标准曲线;C: 空弯沙门志贺菌 *real-time PCR* 方法特异性结果;D: 对树鼩样品扩增的结果

图 4 空弯沙门志贺菌多重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法建立

- A: Sensitivity of the real-time PCR for *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Shigella* (*copies/μL*) ;
- B: Standard curve of the real-time PCR for *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Shigella*;
- C: Specificity of the real-time PCR for *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Shigella*;
- D: Results of detection in tree shrew samples by this multiplex real-time PCR method

Fig. 4 Established of the multiplex TaqMan-MGB real-time PCR for detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Shigella*

板分离法做比较^[12]。赵雪涛等人也建立了鉴定沙门菌的荧光定量 PCR 方法^[12]。陈峰等人利用二聚体蝎型荧光探针法,建立检测志贺菌的荧光定量 PCR 技术,可应用于食品卫生监管以及传染病诊断等^[13]。高春燕等人建立一种检测志贺菌属快速敏感的荧光定量 PCR 方法。

为方便快速检测,也有部分联合检测方法的建立,如王晨等人建立了沙门菌和志贺菌二联实时荧光 PCR 检测方法,实验结果与权威检验机构的结果符合率达 100%,适用于 CDC 体检等同时对沙门菌和志贺菌的快速临床检测^[14]。陈萍等人基于 SYBR Green I 染料建立沙门菌、志贺菌和金黄色葡萄球菌的多重荧光定量 PCR 检测方法,该方法能快速、灵敏、特异检出沙门菌、志贺菌和金黄色葡萄球菌。石晓路等^[15]人建立改良分子信标-多重实时 PCR 同时检测沙门菌和志贺菌的快速方法,应用于食源性致病菌的快速诊断。于新芬等^[16]人建立多重实时荧光 PCR 检测沙门菌侵袭蛋白 A 基因(*invA*)、肠产毒性大肠埃希菌(ETEC)不耐热肠毒素基因(*elt*)、志贺菌和肠侵袭性大肠埃希菌侵袭力基因(*ipaH*)的方法,可用于临床腹泻粪便标本的快速筛

检。但未见空弯、沙门和志贺三种肠道病原菌的荧光定量 PCR 检测方法的建立,而且上述检测都是针对临床样品或食品检测,与本研究针对的实验树鼩存在一定的差异。

本研究通过引物、探针的设计,及实验体系、扩增条件的优化,成功建立了沙门志贺空弯菌多重 qPCR 检测方法,所建方法特异性良好,敏感性可以检测到 1×10^3 *copies/μL* (与单重比低一个数量级),而且特异性好,对非目标菌株未见阳性扩增。并对该方法进行了初步的应用,其中 56 份树鼩样本中空弯有 5 个阳性,志贺有 4 个阳性,沙门无阳性,与分离培养相比检测结果完全一致,与单重荧光定量比略低,但是多重可以节省检测试剂,节约检测时间。因此,该多重 PCR 方法在实验动物微生物检测具有很好的应用和推广前景。

参考文献:

[1] 吴蜀豫, 张立实, 冉陆. 弯曲菌及弯曲菌病的流行现状 [J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 58 - 61.
[2] 贺奇义. 沙门氏菌的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(11): 91 - 95.
[3] 丁建强. 志贺氏菌属感染若干方面的研究进展 [J]. 国际流

行病学传染病学杂志,1997, 24(2): 56-60.

[4] 刘新铭. 弯曲菌属(Campylobacter)耶森氏菌属、沙门氏菌属和志贺氏菌属引起的肠道传染病[J]. 微生物学免疫学进展,1981, 9(1): 61-65

[5] 沈培清, 郑红, 刘汝文, 等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望[J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 109-114.

[6] 王传清, 何磊燕, 王爱敏 等. 上海地区急性细菌性肠炎儿童中沙门菌弯曲菌及志贺菌感染临床及分子流行病学研究[D]. 中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛, 2012.

[7] 唐梦君, 周生, 张小燕, 等. 空肠弯曲杆菌 PCR-ELISA 检测方法的建立[J]. 吉林农业大学学报,2013, 35(3): 340-345.

[8] 阳成波, 蒋原, 黄克和, 等. 基于 TaqMan 探针的 Real-time PCR 定量检测空肠弯曲杆菌[J]. 中国预防兽医学报,2003, 25(3): 183-187.

[9] 阳成波, 蒋原, 黄克和, 等. 应用 SYBR Green I 的 Real-time PCR 方法定量检测空肠弯曲杆菌[J]. 动物医学进展, 2003, 24(1): 74-78.

[10] 刘俊华, 张欣强, 陈守义, 等. 实时荧光 PCR 方法快速检测空肠弯曲菌方法的建立[J]. 热带医学杂志,2009, 9(7): 729-731.

[11] 孔繁德, 徐淑菲, 陈琼, 等. 沙门菌 PCR 快速检测试剂盒的研制与应用[J]. 中国兽医科学,2007, 37(2): 103-107.

[12] 郑友联, 杨育红, 陈培蓉, 等. TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 快速检测沙门菌的探讨[J]. 中国食品卫生杂志,2006, 18(4): 311-313.

[13] 陈峰, 吴尔翔, 丁锁顺, 等. 二聚体蝎型探针荧光定量 PCR 快速检测志贺菌方法的建立及初步应用[J]. 中国人兽共患病学报,2013, 29(9): 886-890.

[14] 王晨, 吴晖, 肖性龙, 等. 沙门菌和志贺菌二联实时荧光定量 PCR 的临床检测应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(7): 1397-1399.

[15] 石晓路, 扈庆华, 张佳峰, 等. 多重实时 PCR 快速同时检测沙门菌和志贺菌[J]. 中华流行病学杂志,2006, 27(12): 1053-1056.

[16] 于新芬, 潘劲草, 孟冬梅, 等. 多重实时 PCR 检测沙门菌、志贺菌和致泻性大肠埃希菌[J]. 中华预防医学杂志, 2007, 41(6): 461-465.

[修回日期]2016-11-29

(上接第 55 页)

进行脑部 MRI 扫描。如呼吸功能恢复不足则可能导致实验动物缺氧,甚至死亡;(4)完成脑部 MRI 后需再次回到介入中心行溶栓术,此阶段需 1~2 h,要维持一定的麻醉深度,并根据其生命体征进行补液;因全身麻醉后实验猴的体温调节功能降低,受外界温度影响较大,需采取保温措施。

速眠新加氯胺酮诱导麻醉丙泊酚静脉持续泵入可维持适宜的麻醉深度并可随时调整麻醉深度,为恒河猴大脑中动脉 M1 段栓塞模型建立提供了一种安全、简便、易行的麻醉方法。

参考文献:

[1] 马诺山, 姚咏明, 于勇. 速眠新与盐酸氯胺酮对猕猴麻醉效果的初步观察[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(03): 191-192.

[2] 田肇隆,王小华,许亚超,等. 恒河猴脊髓半断模型行脑和脊髓 fMRI 检查麻醉方案的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(03): 39-41.

[3] 刘雪萍, 谢莉萍, 韦祝梅. 四种麻醉药物对食蟹猴麻醉效果分析和选择应用[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(02): 45-47.

[4] 和占龙, 鲁帅尧, 陈丽雄, 等. 速眠新在实验猕猴麻醉中的应用[J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(04): 236-237.

[5] 陶静茹, 任荣荣, 赵璇, 等. 猕猴视觉光学成像的麻醉方法[J]. 上海医学, 2012, 35(10): 871-873.

[6] 肖建华, 王洪斌, 亢飞飞, 等. 猴专用复方麻醉剂安全性试验[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(01): 70-71.

[7] 刘辉梅, 庾俊雄, 丁可, 等. 食蟹猴肝纤维化不同阶段对丙泊酚代谢的影响[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(22): 3700-3702.

[修回日期]2016-10-26