

# 实验小鼠四种常见病原微生物多重PCR检测体系的建立

彭丽娜, 张曼, 徐汪节\*

上海交通大学实验动物中心, 上海

收稿日期: 2025年7月17日; 录用日期: 2025年9月3日; 发布日期: 2025年9月25日

## 摘要

目的: 建立实验小鼠四种常见病原微生物的多重PCR快速检测方法。方法: 对四种病原微生物引物浓度、特异性以及DNA模板的敏感性进行测试, 优化多重PCR反应条件; 对活体实验动物口腔及粪便样本进行优化处理, 简化DNA模板的提取方法。结果: 四种病原微生物的多重PCR反应在引物浓度0.15  $\mu\text{mol/L}$ 和退火温度56 $^{\circ}\text{C}$ 的反应条件下扩增, 灵敏度高(绿脓杆菌的敏感性为100 pg, 金黄色葡萄球菌的敏感性为1 pg, 肺炎克雷伯杆菌的敏感性为10 pg, 嗜肺巴斯德杆菌的敏感性为1 pg)且特异性好, 与实验动物常见的致病菌无交叉反应。活体实验动物口腔及粪便样本经培养煮沸1 min后即能快速获取检测模板。结论: 该方法灵敏特异、简便快速, 可为活体实验动物大规模筛查和检测四种病原微生物提供借鉴。

## 关键词

绿脓杆菌, 金黄色葡萄球菌, 肺炎克雷伯杆菌, 嗜肺巴斯德杆菌, 多重PCR

# Establishment of Multiple PCR Detection System for Four Common Pathogenic Microorganisms in Laboratory Mouse

Lina Peng, Man Zhang, Wangjie Xu\*

Laboratory Animal Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai

Received: Jul. 17<sup>th</sup>, 2025; accepted: Sep. 3<sup>rd</sup>, 2025; published: Sep. 25<sup>th</sup>, 2025

## Abstract

**Objective:** This study aimed to establish a rapid multiplex PCR method for the detection of four common

\*通讯作者。

文章引用: 彭丽娜, 张曼, 徐汪节. 实验小鼠四种常见病原微生物多重 PCR 检测体系的建立[J]. 微生物前沿, 2025, 14(3): 129-137. DOI: 10.12677/amb.2025.143015

**pathogenic microorganisms in laboratory mouse. Methods:** The primer concentration, specificity and the sensitivity of the DNA template for the four pathogenic microorganisms were tested to optimize the multiple PCR reaction conditions; optimized processing of oral and fecal samples from live experimental animals was performed to simplify the extraction method of the DNA template. **Result:** The multiple PCR reaction of the four pathogenic microorganisms amplified efficiently at the reaction conditions of primer concentration of 0.15  $\mu\text{mol/L}$  and annealing temperature of 56°C, demonstrating high sensitivity (sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* is 100 pg, sensitivity of *Staphylococcus aureus* is 1 pg, the sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* is 10 pg, and the sensitivity of *Pasteurella pneumophila* is 1 pg) and good specificity, there is no cross-reaction with the common pathogenic bacteria in experimental animals. Rapid template extraction was achieved from oral and fecal samples of live experimental animals after boiling for 1 min. **Conclusion:** The method was sensitive, specific, simple and fast, providing a reference for large-scale screening and detection of the four pathogenic microorganisms in live experimental animals.

## Keywords

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella pneumophila*, Multiple PCR

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae*)和嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella pneumophila*, PP)是目前啮齿类实验动物感染率较高的病原体[1][2]。这四种病原微生物主要通过接触和空气传播,以潜伏感染为主,对于免疫系统受损的宿主,常表现为感染、炎症甚至死亡[3][4],影响实验动物质量,干扰实验结果。

中国实验动物微生物检测国家标准针对上述四种病原微生物的诊断方法为分离培养和生化鉴定。传统的国标方法虽然经典,但是由于存在操作繁琐、费时费力、特异性及敏感性低等缺点,以及检测周期比较长,对检测人员专业技能要求较高,不适用于对这四种病原微生物的简便、快速检测。随着分子生物学技术的迅猛发展,PCR方法已成为国内外病原微生物检测的重要方法。但是目前报道的关于这四种病原微生物的检测方法多为单独检测一种病原微生物的普通PCR方法以及能够同时检测两种或三种病原微生物的双重、三重PCR方法,还没有相关报道能够同时检测这四种病原微生物的多重PCR检测方法[5]-[7]。

因此,本研究旨在建立一种能够同时检测这四种病原微生物的多重PCR方法,从而实现对实验动物活体实时快速、准确简便的健康监测。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 菌株

本实验所用金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、肺炎克雷伯杆菌(CMCC46117)、表皮葡萄球菌(ATCC12228)购自广东省微生物菌种保藏中心,绿脓杆菌(ATCC27853)和嗜肺巴斯德杆菌(NCTC8141)由本实验室分离

保存。大肠杆菌(CMCC44102)、肺炎链球菌(ATCC6503)、多杀巴斯德杆菌(ATCC12945)和鼠伤寒沙门氏菌(SL1344)由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠。

## 2.2. 实验动物

本研究所用实验动物为饲养在上海交通大学实验动物中心 SPF 级屏障设施(使用许可证号: SYXK(沪)2023-0042)内设置的哨兵鼠(ICR, 2♀, 13W, 共 19 笼)。以及饲养在隔离检疫区隔离包内, 经第三方检测机构(苏州西山生物技术有限公司)检测确认感染绿脓阳性(清洁级, C57, 2♀, 17W, 40~50 g, 共 2 笼)和嗜肺巴斯德杆菌阳性(清洁级, C57, 5♀, 12W, 35~40 g, 共 1 笼)的待生物净化的实验小鼠。

## 2.3. 主要试剂与仪器

营养肉汤、DHL 培养基等购自杭州滨河微生物试剂有限公司; BHI 培养基购自纽蓝科学仪器(上海)有限公司; 羊血琼脂平皿购自上海伊华医学科技有限公司; 马血清购自 BBI 生命科学有限公司; 粪便基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒和 100 bp DNA Ladder 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 2xES Tag Master Mix(Dye)购自北京康为世纪生物科技有限公司; 琼脂糖和 Sybr safe 核酸染料购自英潍捷基(上海)贸易有限公司。

新加坡 ESCO Class II BSC 生物安全柜; 德国 Eppendorf Innova 40 恒温摇床; 上海一恒医疗器械有限公司 LRH-150 生化培养箱; 德国 Eppendorf 高速冷冻离心机; 上海申力生物科技有限公司 DK-8A 三孔恒温水浴锅; 基因公司 NanoDrop 2000 分光光度计; 美国 ABI Pro Flex PCR 仪; 美国 Bio-Rad Gel Doc XR+ 核酸电泳及凝胶成像系统。

## 2.4. 实验方法

### 2.4.1. 引物设计与合成

根据绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯杆菌和嗜肺巴斯德杆菌的特异性保守区域, 参照文献 [7]-[9] 设计引物(表 1)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

Table 1. Primer sequences

表 1. 引物序列

细菌	基因	引物名称	引物序列(5'-3')	片段/bp
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>toxR</i>	PA1	GCACCCGCAACGCATCAA	278 bp
		PA2	CCTGGAAAGGCTCCGAATAGTG	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	nuc-1	CACCTGAAACAAAGCATCCTAA	153 bp
		nuc-2	TATACGCTAAGCCACGTCCAT	
肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>khe</i>	khe-F	GGCGAGGTTTACGTCTCAA	353 bp
		khe-R	GAAGAACTGCGCGGATG	
嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumophila</i>	<i>16sRNA</i>	PP-F	GTTTGGTTAATAGCCAAG	428 bp
		PP-R	CCAGACGGTTCGATTTATCA	

### 2.4.2. 细菌基因组 DNA 的提取

各菌株分别接种至普通营养肉汤培养基, 置于恒温摇床中, 37℃, 180 r/min, 培养 16 h~18 h, 用细

菌基因组 DNA 提取试剂盒, 按照说明书要求提取细菌基因组 DNA。经 NanoDrop 2000 分光光度计测定各菌株 DNA 的浓度, 并于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

#### 2.4.3. 口腔及粪便样本 DNA 的快速提取

用无菌棉拭子采集动物口腔样本将其浸泡在含 1 mL 无菌水的离心管中, 同时无菌操作采集实验动物 2~3 粒新鲜粪便样本放在同一离心管内, 将两种样本混匀后取 100  $\mu\text{L}$  接种至 5 mL 普通营养肉汤培养基,  $37^{\circ}\text{C}$ , 180 r/min 培养 16~18 h。取 1 mL 菌液经  $4^{\circ}\text{C}$ 、8000 r/min 离心 3 min 后弃上清, 加入 100  $\mu\text{L}$  TE 后混匀,  $100^{\circ}\text{C}$ 煮沸 1 min 后放冰上 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ 、12,000 r/min 离心 5 min 后取上清并于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

#### 2.4.4. 单重 PCR 条件优化

采用单重 PCR 方法, 用四种病原微生物的基因组 DNA 分别测试四对引物的特异性和灵敏度。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 包括: 2xES Tag Master Mix(Dye) 10  $\mu\text{L}$ , 引物浓度为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3  $\mu\text{mol/L}$ , DNA 模板为 10 ng。反应条件为  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s; 退火温度 30 s;  $72^{\circ}\text{C}$  30 s; 共 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min; 退火温度变化范围设置为  $55^{\circ}\text{C}$ ~ $60^{\circ}\text{C}$ 。

PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳, 120 V 50 min, 选取扩增的阳性产物切胶回收后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

#### 2.4.5. 多重 PCR 条件优化

用四种病原微生物的基因组 DNA 及引物进行多重 PCR 扩增, 并对反应体系中的退火温度进行优化。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 包括: 2xES Tag Master Mix(Dye) 10  $\mu\text{L}$ , 四种病原微生物的引物浓度均为 0.15  $\mu\text{mol/L}$ , 四种混合 DNA 模板均按照 1:1 比例添加, 每种模板均为 10 ng。反应条件为  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s; 退火温度为 30 s;  $72^{\circ}\text{C}$  30 s; 共 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。退火温度变化范围设置为  $50^{\circ}\text{C}$ ~ $60^{\circ}\text{C}$ 。

#### 2.4.6. 多重 PCR 特异性测试

将四种病原微生物 DNA 的模板浓度调整至 10 ng/ $\mu\text{L}$ , 分别将四种菌、三种菌、两种菌混合的模板和单一菌模板进行 PCR 扩增。每种模板按照 1:1 比例添加, 模板量均为 10 ng, 引物浓度为 0.15  $\mu\text{mol/L}$ , 退火温度为  $56^{\circ}\text{C}$ 。同时用上述方法扩增大肠杆菌、表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、多杀巴斯德杆菌和鼠伤寒沙门氏菌基因组 DNA, 每种菌的模板添加量为 10 ng, 来验证所建立的多重 PCR 检测体系的特异性。

#### 2.4.7. 多重 PCR 敏感性测试

分别测定四种病原微生物 DNA 的模板浓度, 调整至 10 ng/ $\mu\text{L}$ , 以此为基础进行倍比稀释, 终浓度分别为 10、 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  ng/ $\mu\text{L}$ , 共设 10 个浓度梯度, 每个浓度梯度各取 1  $\mu\text{L}$  作模板进行多重 PCR 反应敏感性测试。

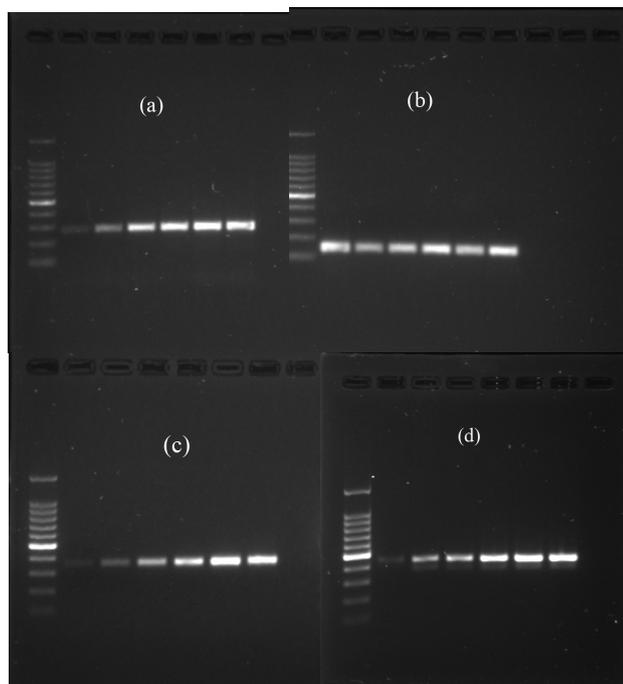
#### 2.4.8. 在实验动物临床检测样本中的应用

采集本中心 SPF 屏障内设置的 19 笼哨兵鼠以及隔离饲养的 3 笼实验小鼠的口腔和粪便混合样本, 快速提取样本 DNA 后用多重 PCR 方法进行检测。

### 3. 结果与分析

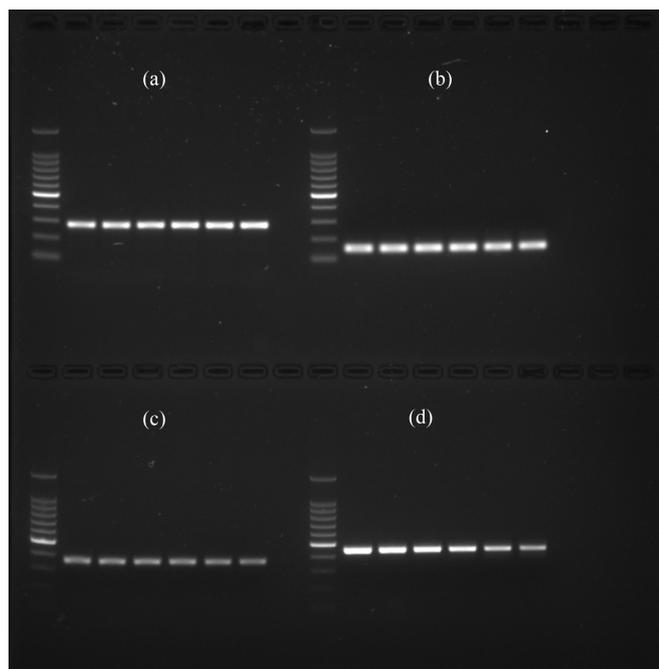
#### 3.1. 单重 PCR 优化结果

将四种病原微生物 PCR 的引物及基因组 DNA, 先用单重 PCR 方法进行扩增, 并对引物浓度和退火温度进行条件优化。PCR 结果显示, 四种病原微生物在引物浓度为 0.15~0.3  $\mu\text{mol/L}$  (图 1(a)~(d)), 退火温度为  $55^{\circ}\text{C}$ ~ $60^{\circ}\text{C}$  时的扩增效果均较好(图 2(a)~(d))。



**Figure 1.** Optimization of single PCR in primer concentrations. Note: (M): 100 bp DNA Ladder; 1~6: Primer concentrations were 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, and 0.3  $\mu\text{mol/L}$ . (a)~(d) *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pasteurella pneumophila*

**图 1.** 单重 PCR 引物浓度的优化。注：(M)：100 bp DNA Ladder；1~6：引物浓度分别为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3  $\mu\text{mol/L}$ 。(a)~(d) 绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德杆菌

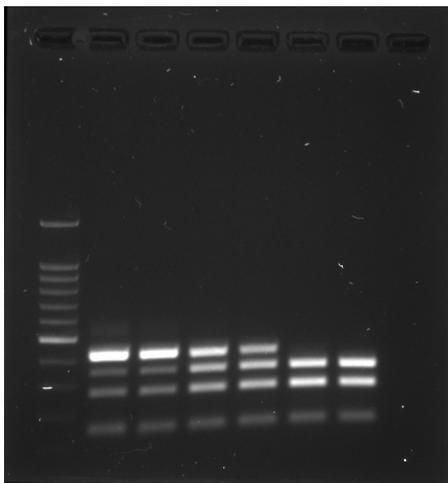


**Figure 2.** Optimization of single PCR in annealing temperature. Note: (M): 100 bp DNA Ladder; 1~6: Annealing temperatures were 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C and 60°C. (a)~(d) *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pasteurella pneumophila*

**图 2.** 单重 PCR 退火温度的优化。注：(M)：100 bp DNA Ladder；1~6：退火温度为 55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C。(a)~(d) 绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德杆菌

### 3.2. 多重 PCR 优化结果

根据单重 PCR 摸索好的反应条件, 将四种病原微生物 PCR 的引物及基因组 DNA 进行多重 PCR 扩增, 并对退火温度进行条件优化。多重 PCR 结果显示, 四种病原微生物在引物浓度  $0.15 \mu\text{mol/L}$ , 退火温度为  $50^\circ\text{C}\sim 56^\circ\text{C}$  时均能成功扩增出四条特异性目的条带, 其中  $54^\circ\text{C}$  和  $56^\circ\text{C}$  扩增效果较好(图 3), 后续实验选用  $56^\circ\text{C}$  作为退火温度。



**Figure 3.** Optimization of multiple PCR in annealing temperature. Note: (M): 100 bp DNA Ladder; 1~6: Annealing temperatures were  $50^\circ\text{C}$ ,  $52^\circ\text{C}$ ,  $54^\circ\text{C}$ ,  $56^\circ\text{C}$ ,  $58^\circ\text{C}$  and  $60^\circ\text{C}$

**图 3.** 多重 PCR 退火温度的优化。注: (M): 100 bp DNA Ladder; 1~6: 退火温度为  $50^\circ\text{C}$ 、 $52^\circ\text{C}$ 、 $54^\circ\text{C}$ 、 $56^\circ\text{C}$ 、 $58^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$

### 3.3. 多重 PCR 特异性验证

将四种病原微生物分别进行单重、双重、三重和四重 PCR 扩增, 并用四重 PCR 方法同时扩增大肠杆菌、表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、多杀巴斯德杆菌和鼠伤寒沙门氏菌等 5 种细菌的基因组 DNA 来验证所建立的多重 PCR 检测体系的特异性。多重 PCR 结果显示, 每一种病原菌的扩增条带都很单一, 且无非特异性条带产生(图 4(a))。用该方法扩增 5 种阴性对照菌均未扩增出阳性条带(图 4(b))。

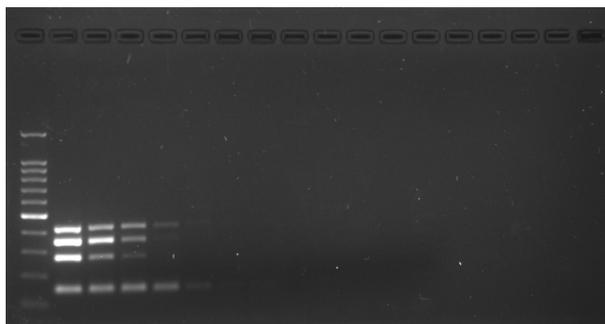


**Figure 4.** Specificity results of multiple PCR. Note: (M): 100 bp DNA Ladder; (a) 1~4: Single PCR; 5~10: Dual PCR; 11~14: Triple PCR; 15: Quad PCR; (b) (+): Positive control; (-): Negative control; 1: *Escherichia coli*; 2: *Staphylococcus epidermidis*; 3: *Streptococcus pneumoniae*; 4: *Pasteurella multocida*; 5: *Salmonella typhimurium*

**图 4.** 多重 PCR 特异性。注: (M): 100 bp DNA Ladder; (a) 1~4: 单重 PCR; 5~10: 双重 PCR; 11~14: 三重 PCR; 15: 四重 PCR; (b) (+): 阳性对照; (-): 阴性对照; 1: 大肠杆菌; 2: 表皮葡萄球菌; 3: 肺炎链球菌; 4: 多杀巴斯德杆菌; 5: 沙门氏菌

### 3.4. 多重 PCR 敏感性验证

将不同浓度梯度的四种病原微生物的基因组 DNA 作为模板, 进行多重 PCR 扩增来测试该体系的灵敏度。多重 PCR 结果显示, 绿脓杆菌最低检出量为  $10^{-1}$  ng, 金黄色葡萄球菌最低检出量为  $10^{-3}$  ng, 肺炎克雷伯杆菌最低检出量为  $10^{-2}$  ng, 嗜肺巴斯德杆菌最低检出量为  $10^{-3}$  ng (图 5)。

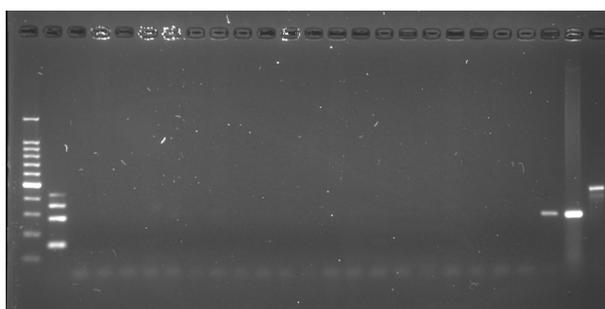


**Figure 5.** Sensitivity results of multiple PCR. Note: (M): 100 bp DNA Ladder; 1~10: PCR template final concentration is 10,  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , and  $10^{-8}$  ng/ $\mu$ L

**图 5.** 多重 PCR 敏感性。注: (M): 100 bp DNA Ladder; 1~10: PCR 模板终浓度分别为 10、 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  ng/ $\mu$ L

### 3.5. 临床检测应用

将优化好的多重 PCR 体系, 进行实验动物临床检测应用。多重 PCR 结果显示, 19 笼哨兵鼠均未扩出四种病原微生物的阳性条带, 绿脓杆菌和嗜肺巴斯德杆菌感染的阳性小鼠能够扩出目的条带(图 6)。该结果验证了临床检测结果和第三方专业检测机构检测结果一致。



**Figure 6.** Clinical application of multiple PCR detection system. Note: (M): 100 bp DNA Ladder; (+): Positive control; (-): Negative control; 1~19: Sentinel animals; 20~21: *Pseudomonas aeruginosa* positive mouse; 22: *Pasteurella pneumophila* positive mouse

**图 6.** 多重 PCR 检测体系临床检测应用。注: (M): 100 bp DNA Ladder; (+): 阳性对照; (-): 阴性对照; 1~19: 哨兵鼠; 20~21: 绿脓杆菌阳性小鼠; 22: 嗜肺巴斯德杆菌阳性小鼠

## 4. 分析与讨论

实验动物是生命科学研究的基础和条件, 实验动物的质量直接影响众多科学领域实验结果的准确性, 也关系到实验动物从业人员和动物实验操作者的健康[10]。近年来, 随着实验动物在高校等科研机构的广

泛应用, 研究者对实验动物健康状况要求也越来越高, 尤其是一些实验动物极其珍贵, 如一些转基因动物模型, 其质量严重影响生物医药研究结果的准确性和可重复性[11], 对其进行健康监测时需要进行活体检测以保护珍贵的转基因实验动物资源, 因此急需建立快速、敏感、易于标准化操作的活体动物快速检测方法。

多重 PCR 技术在传统 PCR 技术的基础上发展而来, 可在单一反应体系中针对多个位点扩增以实现多种靶标病原的检测, 具有通量高、快速、成本低的优点[12], 对临床上混合感染的快速检测具有重要意义[13]。由于多重 PCR 是在同一反应中利用多对引物进行靶标扩增, 随着引物的增加, 引物间的相互作用会降低检测灵敏度, 增加检出难度[14]。因此, 多重 PCR 引物设计较单一 PCR 要复杂得多, 技术难度大, 要同时设计多对引物, 既要考虑产物的大小从而能够准确判断出所扩增的不同产物; 又要考虑各对引物的特异性, 选择待检靶标的特异性保守区域来设计引物, 防止菌株变异; 还要考虑引物二聚体、防止各引物间相互交叉影响从而出现非特异性扩增, 造成假阳性或者假阴性的问题。因此, 在构建多重 PCR 体系时, 要求引物之间的退火温度尽可能相近, 引物对应的扩增产物能够区分, 且在反应过程中引物间不能交叉[15]。另外, 还需对影响其扩增效果的主要因素, 比如引物的浓度、退火温度、灵敏度等进行反复摸索和优化, 从而达到最佳的扩增效果。

本研究建立的四种实验动物常见病原微生物多重 PCR 扩增体系, 设计的 PCR 扩增的核酸片段大小间隔都控制在 70 bp 以上, 这样通过成像能够准确、快速地判断出是哪一种病原菌。和冯杰等[7]以及丁滢高等[5]建立的双重和三重 PCR 检测方法相比, 通量更高, 能够同时实现四种微生物的检测。虽然多重 PCR 技术的优势在于它的高效性, 但是也存在许多影响扩增与检测效果的因素, 其中扩增效率的一致性是最大的难题, 检测重数越多, 效率一致性往往越低[16]。此外, 本研究和其他文献报道的多重 PCR 方法相比, 简化了 DNA 提取方法, 比用试剂盒方法提取小鼠粪便中的 DNA, 操作更简单且成本低。即使小鼠粪便中有死细菌, 只存在少量活菌, 也能通过培养法先大量扩增活菌, 通过煮沸法提取细菌基因组 DNA, 能够灵敏特异地完成目的靶标的检测。该方法应用于实验动物大通量的临床样本检测时, 优势更明显。

本研究建立了一整套活体实验动物常见病原菌多重 PCR 检测体系, 从采样方法的选择、样本 DNA 的快速提取到多重 PCR 方法的建立和优化, 最后通过临床检测样本对该体系进行了应用和评估。该体系不仅操作简便、快速, 缩短样本 DNA 的提取时间, 并能够同时检出四种致病菌, 还能大大节省检测成本, 对动物不会造成伤害, 可以为高校等研究机构实验动物使用单位的大规模啮齿类实验动物日常监测、感染早期诊断、隔离检疫等快速检测四种病原微生物提供有利借鉴。

## 致 谢

感谢上海交通大学实验动物中心检测平台给予本项目的仪器设备使用支持。感谢给予转载和引用权的资料、文献、研究思想的所有作者。

## 基金项目

上海交通大学校级决策咨询课题(编号: JCZXSJB2018-024)。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] 冯丽萍, 陶凌云, 周洁, 等. 上海地区实验动物病原体感染指数分析[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 309-312.
- [3] Bleich, A., Kirsch, P., Sahly, H., Fahey, J., Smoczek, A., Hedrich, H., et al. (2008) *Klebsiella oxytoca*: Opportunistic Infections in Laboratory Rodents. *Laboratory Animals*, 42, 369-375. <https://doi.org/10.1258/la.2007.06026e>

- [4] 田克恭, 贺争鸣, 刘群, 顾小雪. 实验动物疫病学[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 2015.
- [5] 丁洽高, 蔡丽媛, 杨浩. 隔离设施中小鼠金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的检测[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(9): 13-15.
- [6] Benga, L., Benten, W.P.M., Engelhardt, E., Bleich, A., Gougoula, C. and Sager, M. (2013) Development of a Multiplex PCR Assay Based on the 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer for the Detection and Identification of Rodent *Pasteurellaceae*. *Journal of Microbiological Methods*, **95**, 256-261. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.005>
- [7] 冯杰, 谢建云, 胡建华, 高诚. 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.
- [8] 谭燕玲, 朱瑞良, 王慧, 等. 鸡胚胎性病原菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(5): 374-377.
- [9] 胡瑜. 金黄色葡萄球菌耐热核酸酶的功能鉴定及表达调控[D]: [博士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2013.
- [10] 张飞燕, 赵玲, 金洁, 等. 多重 PCR 技术在实验动物病原检测中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 111-116.
- [11] 李娜, 杨秋龙, 李思璧, 等. 模型动物生物净化方法的探讨[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2014, 32(5): 85-88.
- [12] Sint, D., Raso, L. and Traugott, M. (2012) Advances in Multiplex PCR: Balancing Primer Efficiencies and Improving Detection Success. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 898-905. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00215.x>
- [13] Zhang, Y., Sun, L., Zhu, R., Zhang, S., Liu, S., Wang, Y., *et al.* (2022) Porcine Gut Microbiota in Mediating Host Metabolic Adaptation to Cold Stress. *npj Biofilms and Microbiomes*, **8**, Article No. 18. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00283-2>
- [14] Sánchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., Herranz, M.C., Minafra, A., Myrta, A. and Pallás, V. (2005) Simultaneous Detection and Identification of Eight Stone Fruit Viruses by One-Step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **111**, 77-84. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-1422-y>
- [15] 曹子健, 邱艳红, 秦文韬, 等. 多重 PCR 技术在植物病原物检测中的应用[J]. 中国农业科技导报, 2023, 25(8): 216-224.
- [16] 钟泽澄, 王进, 张师音, 等. 多重 PCR 技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(2): 171-179.