

《疾病监测》审稿意见与作者答复

题目：基于单基因的实时荧光定量反转录-聚合酶链反应定性检测猪霍乱沙门菌
作者：高瑞红，曹阳，闫梅英

审稿专家意见与答复

审稿专家 1 意见：

本研究建立了基于荧光的猪霍乱沙门菌的鉴定方法。本研究设计合理、方法得当、叙述清晰，分析透彻。从实验数据看，所建立的方法具有良好的特异性和灵敏度，有潜在的应用价值。

有几处意见供作者参考：

- 1、本文所建立的方法主要用于定性检测，因此建议修改题目；
- 2、rRT-PCR 的缩写根据哪些单词确定的？
- 3、英文摘要需要修改；
- 4、文中存在几处笔误，例如 QIAamp UCP PurePathogen Blood fieldtest Kit (QIAGEN 公司)，field 与 test 之间需要空格；“keyi”应为“可以”。
- 5、讨论中，PFGE 是一种分型方法，与本实验相关性不足，建议删除 PFGE 部分的讨论。

建议修改后发表。

审稿专家 2 意见：

本研究建立了基于猪霍乱沙门菌特异基因 SC1242 的 rRT-PCR 检测方法，对猪霍乱沙门菌的早期诊断具有一定的应用价值。

建议修改后再审。

- 1、本研究选择检测细菌 rRNA，除能反应细菌处于活的增殖状态外，论文中还提及直接水煮核酸为模板检测敏感性较以 DNA 为模板的荧光 PCR 高，猪霍乱沙门菌不同条件下 SC1242 的转录水平如何？什么状态下转录水平更高？相同条件下，rRT-PCR 检测方法与基于探针的 DNA 荧光定量 PCR 方法相比，哪个灵敏度更高？
-

2、根据本研究中设计的检测引物，经 Blast 比对，发现除引物 SC1242F 仅一个碱基不匹配外，与 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport str. CVM 21554 (GenBank No. CP009565) 和 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strain OLF-SE9-10012 (GenBank No. CP009091) 存在引物结合位点。请核对。如何保证在一个碱基不匹配的情况下不出现扩增产物？

3、“通过生物信息学比对” 的描述过于笼统，说明具体使用的方法。

4、前言中“目前，猪霍乱沙门菌的诊断主要依靠病原学培养和血清学检测。”目前是否存在基于核酸的检测方法，如有，应简要介绍其优缺点。同时简要介绍猪霍乱沙门菌的疾病负担，以明确 该检测方法的潜在应用价值。

5、2.1 中过多方法性的描述，改在材料和方法部分描述。

6、图 1A 中，“h: 0.25 pg/test”，是否正确，是否应为 0.025 pg/test？在材料和方法中，说明了进行了 12 个稀释度的检测，图中为什么只显示 8 个稀释度的结果？

7、2.4 中，“该实验结果说明 SC1242 基因 *keyi* 在体内进行转录表达。”模拟血液标本不代表真实的体内情况。

8、2.5 中，如果仅仅是对纯培养采用粗提 RNA 进行检测有效，则实际价值有限，如直接对血液等混合标本的检测有效则更有实际意义。同时，简单比较灵敏度（“说明以直接水煮核酸为模板，可以进行有效的 rRT-PCR 扩增检测，且检测敏感性较以 DNA 为模板的荧光 PCR 提高 16 倍左右”）容易误导读者，应结合“基于探针的荧光定量 PCR 方法的敏感性高于终点法荧光定量 PCR”在讨论中做相应的说明。

9、多数参考文献过于陈旧。

编辑部意见汇总及作者说明：

本研究建立了基于猪霍乱沙门菌特异基因 SC1242 的 rRT-PCR 检测方法，对猪霍乱沙门菌的早期诊断具有一定的应用价值。

1、本文所建立的方法主要用于定性检测，因此建议修改题目；

答：已修改。

2、rRT-PCR 的缩写根据哪些单词确定的？

答：rRT-PCR 是 real time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction 中划线部分单词的缩写，与以前发表的文章相同（利用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应方法检测血液中伤寒沙门菌. 疾病监测. 2012 , 27 (6): 471-474）。

3、英文摘要需要修改。

答：已修改。

4、本研究选择检测细菌 rRNA，除能反应细菌处于活的增殖状态外，论文中还提及直接水煮核酸为模板检测敏感性较以 DNA 为模板的荧光 PCR 高，猪霍乱沙门菌不同条件下 SC1242 的转录水平如何？什么状态下转录水平更高？相同条件下，rRT-PCR 检测方法与基于探针的 DNA 荧光定量 PCR 方法相比，哪个灵敏度更高？

答：目前尚无文献研究猪霍乱沙门菌不同条件下 SC1242 的转录水平，这些也是我们下一步的研究内容。相同条件下，rRT-PCR 检测方法与基于探针的 DNA 荧光定量 PCR 方法相比，rRT-PCR 检测方法灵敏度更高一些，因为文章我们已经做了 rRT-PCR 与终点法的定量 PCR 的比较（高 16 倍），由于基于探针的与染料法的荧光定量 PCR 的灵敏度无显著差异（在条件完全相同的情况下，两者的差异不超过 10 倍），故在使用相同上下游引物及相同扩增靶标的情况下，由于 RNA 数量高于 DNA 数量，故 rRT-PCR 的灵敏度以 DNA 为模板的荧光定量 PCR。

5、根据本研究中设计的检测引物，经 Blast 比对，发现除引物 SC1242F 仅一个碱基不匹配外，与 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport str. CVM 2155 4 (GenBank No. CP009565) 和 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strain OL F-SE9-10012 (GenBank No. CP009091) 存在引物结合位点。请核对。如何保证在一个碱基不匹配的情况下不出现扩增产物？

答：对 2 个引物重新进行 blast 比对，发现上游引物 SC1242F 在上述 2 株菌中均无匹配位点，仅下游引物 SC1242R 与这 2 株菌有匹配，故理论上不会出现 PCR 扩增产物，而且我们在实际菌株中也利用普通引物进行了 SC1242 基因的检测，未出现扩增条带。blast 比对也发现，2 条引物均仅在猪霍乱中完全匹配，其他微生物无 2 条引物同时匹配者。另外，我们将 Newport 菌株的检测结果补充到了表 1 中。

6、“通过生物信息学比对” 的描述过于笼统，说明具体使用的方法。

答：已在方法中补充。

7、前言中“目前，猪霍乱沙门菌的诊断主要依靠病原学培养和血清学检测。”目前是否存在基于核酸的检测方法，如有，应简要介绍其优缺点。同时简要介绍猪霍乱沙门菌的疾病负担，以明确该检测方法的潜在应用价值。

答：目前没有基于核酸检测的猪霍乱沙门菌诊断方法，有文献报道的猪霍乱沙门菌核酸检测技术（见讨论第1、2段），但均无商品化试剂盒，其优缺点简介加入了前言中。猪霍乱沙门菌感染的发病情况也加入了前言中。

8、2.1 中过多方法性的描述，改在材料和方法部分描述。

答：已将设计方法的内容改在材料和方法部分描述。

9、图 1A 中，“h: 0.25 pg/test”，是否正确，是否应为 0.025 pg/test？在材料和方法中，说明了进行了 12 个稀释度的检测，图中为什么只显示 8 个稀释度的结果？

答：已将 0.25 pg/test 改为 0.025 pg/test；由于模板量 ≤ 0.025 pg/test 的扩增均为阴性，对文章结果及结论无影响，所以在绘图时没有展示更多阴性结果。

10、2.4 中，“该实验结果说明 SC1242 基因 keyi 在体内进行转录表达。”模拟血液标本不代表真实的体内情况。

答：改为“该实验结果提示 SC1242 基因有可能在体内进行转录表达”。

11、2.5 中，如果仅仅是对纯培养采用粗提 RNA 进行检测有效，则实际价值有限，如直接对血液等混合标本的检测有效则更有实际意义。同时，简单比较灵敏度（“说明以直接水煮核酸为模板，可以进行有效的 rRT-PCR 扩增检测，且检测敏感性较以 DNA 为模板的荧光 PCR 提高 16 倍左右”）容易误导读者，应结合“基于探针的荧光定量 PCR 方法的敏感性高于终点法荧光定量 PCR”在讨论中做相应的说明。

答：1. 正如审稿专家所言，如果直接对血标本进行检测意义更大，这也是我们做血液模拟样本的意义。直接对纯培养物进行粗提 RNA 的检测，主要是为了解决猪霍乱与丙型副伤寒菌株采用血清凝集不能有效区分的问题，而且直接做 PCR 检测替代血清凝集试验，可以大大节省时间（血清凝集需要 2-7 天才能得到血清型）。

2. 在文章提及“rRT-PCR 扩增检测敏感性较以 DNA 为模板的荧光 PCR 提高 16 倍左右”的目的主要是强调针对同一基因的检测，检测其转录产物-多拷贝 RNA（在有转录的情况下）比仅检测单拷贝的 DNA 分子，更能提高检测反应的灵敏度。为避免误导读者，我们在正文中进行了补充修改。

12、文中存在几处笔误，例如 QIAamp UCP PurePathogen Blood fieldtest Kit (QIAGEN 公司)，field 与 test 之间需要空格；“keyi”应为“可以”。

答：已在文中修改。

13、讨论中，PFGE 是一种分型方法，与本实验相关性不足，建议删除 PFGE 部分的讨论。

答：已删除 PFGE 部分。

14、多数参考文献过于陈旧。

答：已补充新文献。

第一次复审意见：

建议修改后再审。见审稿意见附件。

作者说明：

已按照专家意见进行了修改。

第二次复审意见：

已按审稿意见进行了修改说明，建议采用。

第七次专家定稿会意见与答复

定稿会专家意见：

同意发表。