

Mat á mismunandi þreifaratækni og tækja til að auka greiningarhæfni rauntíma PCR.

E. Reynisson^a, M.H. Josefsen^b, M. Krause^b, J. Hoorfar^b

^aRannsóknastofnun fiskiðnaðarins

^bDanish Institute for Food and Veterinary Research (DFVF), 27 Bulowsvej, DK-1790, Copenhagen V, Denmark
Samþykkt til birtingar 4 Nóvember 2005 í Journal of Microbiological Methods

Áður stöðluð og gild qPCR aðferð til greiningar á *Salmonella* með mögnun á 94-bp DNA röð *ttr* gensins var notuð sem líkan til að bera sama sex mismunandi samsetningar flúrljómunarefna og slökkvara á TaqMan þreifara, auk mismunandi tækjabúnaðar með það að markmiði að auka næmni PCR prófsins. Gæði svokallaðra LNA (locked nucleic acids) og Scorpion þreifara voru einnig metin. Samsetningarnar FAM-BHQ1 og Cy5-BHQ3 gáfu bestu svörun (Cycle threshold (Ct) var 25.42 ± 0.65 og 24.47 ± 0.18 við 10^3 DNA eintaka) en slökkvararnir eru báðir afbrigði af “Black Hole Quencher”. Þegar mismunandi þreifaratækni var borin saman sýndi LNA (FAM-BHQ1) mestu næmni og sterkustu flúrljómunar svörunina (dR last 48066) og gaf 0.6 til 1.1 lægri Ct gildi en TaqMan þreifarinn og 1.9-4.0 lægra Ct en Scorpion þreifarinn (FAM-BHQ1). Rauntíma PCR tækið frá RotorGene gaf þá 0.4-1.1 lægra Ct (meiri næmni) en Mx3005p og 1.5-3.0 lægri Ct gildi en ABI7700. Með því að nota LNA þreifarann og RotorGene tækið var mögulegt að ná fram eftirfarandi greiningum á *Salmonella* DNA í 1ml forræktuðum sýnum: fiskimjöl (100 eintök), kjúklinga hálsaskinn (100 eintök), svínasaur (10 eintök). Greiningarlíkur aðferðarinnar á *Salmonella* menguð saursýni var 100% við 2×10^4 eintök á hvern mL. Með notkun LNA þreifara er því hugsanlega hægt að auka greiningarhæfni qPCR aðferða.

Vinnan að þessari vísindagrein er hluti af doktorsnámi Eyjólfis Reynissonar við líffræðiskor Háskóla Íslands, undir handleiðslu Guðmundar Ó. Hreggviðssonar.