



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105859883 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610237489.3

(22)申请日 2016.04.15

(71)申请人 汕头大学

地址 515063 广东省汕头市大学路243号

(72)发明人 胡忠 伦镜盛 刘丹 张设熙

董亚萍 袁传飞

(74)专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

44202

代理人 温旭 张泽思

(51) Int. Cl.

C07K 16/12(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

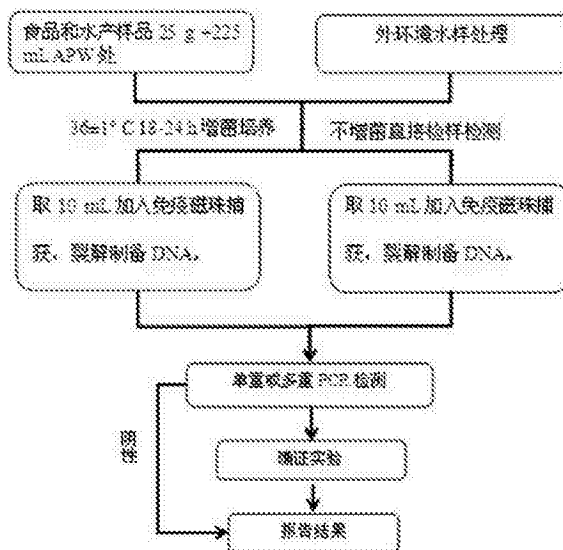
权利要求书2页 说明书12页 附图10页

(54)发明名称

一种含OmpU抗体的免疫磁珠及其制备与捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法

(57)摘要

本发明涉及一种含OmpU抗体的免疫磁珠及其制备与捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法,用弧菌的基因组作为模板PCR扩增OmpU基因,获得较纯的OmpU重组蛋白作为抗原制备抗体,经过偶联-洗涤的过程制备出含OmpU抗体的免疫磁珠;免疫磁珠能够捕获多种弧菌,然后用基于danJ基因设计的多重PCR特异性引物进行鉴定。最多同时检测副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌,可广泛应用于环境及进出口食品检验中。本发明结合了免疫分离的特异性和PCR扩增的高效性,具有分离、浓缩、富集的能力,能够对样品中低浓度的病原菌进行高效的分离和富集,降低或消除了样品对PCR的抑制、影响,提高检测的极限,具有很好的应用前景。



1. 一种含OmpU抗体的免疫磁珠的制备,其特征在于,主要包括以下步骤:
  - (1)以一种或者多种弧菌的基因组作为模板进行PCR扩增OmpU基因;
  - (2)将步骤(1)所得PCR产物连接到pET-32a构建异源表达载体,转化到大肠杆菌;
  - (3)将步骤(2)所得OmpU重组菌接种到LB培养基中,37℃振荡培养至对数生长期,加入终浓度为1mmol/L的IPTG诱导6h;
  - (4)离心收集步骤(3)所得菌体,利用亲和层析进行纯化,获得纯的OmpU重组蛋白;
  - (5)将步骤(4)所得纯的OmpU重组蛋白作为抗原制备OmpU重组蛋白抗体;
  - (6)将磁珠混匀后加入离心管中,再加入洗涤缓冲液PBST混匀,置于装有强力磁铁的磁架静置,弃液体;重复操作多次后加入重悬液重悬磁珠;
  - (7)往步骤(6)的磁珠中加入步骤(5)所得OmpU重组蛋白抗体;4℃轻缓旋转振荡孵育18~24h,制备成一种或者多种弧菌OmpU抗体的免疫磁珠;
  - (8)用洗涤缓冲液PBST清洗和重悬缓冲液重悬,4℃保存。
2. 根据权利要求1所述含OmpU抗体的免疫磁珠的制备,其特征在于,所述弧菌包括副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌。
3. 根据权利要求2所述含OmpU抗体的免疫磁珠的制备,其特征在于,步骤(5)所述OmpU重组蛋白抗体的制备主要包括:取纯的OmpU重组蛋白作为抗原,与等体积的弗氏完全佐剂混合、乳化、皮下注射,免疫大白兔;每隔两周加强免疫一次,加强免疫时,免疫剂量减半且与弗氏不完全佐剂乳化。
4. 根据权利要求2所述含OmpU抗体的免疫磁珠的制备,其特征在于,所述LB培养基中包含氨苄青霉素100μg/mL;所述亲和层析为镍琼脂糖凝胶;所述重悬液包含PBST和1%牛血清白蛋白;所述重悬缓冲液包含PBST和0.5%牛血清白蛋白;所述OmpU重组蛋白抗体的添加量为500μL/200μg磁珠。
5. 一种根据权利要求1-4任一项所述制备方法制备的含OmpU抗体的免疫磁珠。
6. 根据权利要求5所述含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法,其特征在于,主要包括以下步骤:
  - (S1)制备待测样品;
  - (S2)将一种或多种含待测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠加入待测样品中,37℃振荡反应2~3h;所述含待测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠添加量30μg/ml;
  - (S3)用磁铁将所述含待测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠与待测样品基质分开,去除待测样品基质,得到含待测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠-弧菌免疫复合体;
  - (S4)将(S3)中得到的含待测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠-弧菌免疫复合体用洗涤缓冲液PBST洗涤干净,再加入裂解液,80℃中煮15min释放DNA,然后离心,取上清作为PCR扩增模板进行PCR扩增;
  - (S5)将步骤(S4)所得PCR扩增引物采用基于dnaJ基因设计制备单重或多重PCR反应体系;
  - (S6)将单重或多重PCR反应体系置于离心机中瞬时离心,然后放到PCR仪上进行PCR反应;
  - (S7)最后进行琼脂糖凝胶电泳分析。
7. 根据权利要求6所述含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法,其

特征在于,步骤(S1)所述制备待检测的样品包括:水样直接用灭菌的离心管取样检测;泥样加入灭菌的PBS混匀后,取上清检测;鱼虾蟹取可食部位碾成糜,再加入灭菌的PBS混匀后,取上清检测。

8. 根据权利要求6所述含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法,其特征在于,所述单重PCR反应体系的制备为:将2 $\mu$ L步骤S4所得DNA作为PCR模板,加入0.5 $\mu$ L上游引物VM-F,再加入0.5 $\mu$ L待检测的弧菌的特异性引物、12.5 $\mu$ L PCRMix、加水至25 $\mu$ L;所述多重PCR反应体系的制备为将2 $\mu$ L步骤S4所得DNA作为PCR模板,加入1 $\mu$ L上游引物VM-F,加入带检测的几种弧菌的特异性引物各0.5 $\mu$ L、12.5 $\mu$ L PCRMix,加水至25 $\mu$ L。

9. 根据权利要求6所述含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法,其特征在于,所述PCR反应的条件为:step1:95 $^{\circ}$ C预变性5min;step2:94 $^{\circ}$ C变性45s;step3:62 $^{\circ}$ C变性45s;step4:72 $^{\circ}$ C变性30s~1min;step2~step4:35个循环;step5:72 $^{\circ}$ C 10min。

## 一种含OmpU抗体的免疫磁珠及其制备与捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测领域,尤其涉及一种含OmpU抗体的免疫磁珠及其制备与捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法。

### 背景技术

[0002] 弧菌病能给人和水产养殖业带来巨大危害,而且传播范围广泛。随着我国水产养殖规模不断扩大,养殖密度的增大,以及海洋养殖环境的恶化,使以弧菌为主的各类致病菌一旦在海水养殖动物中暴发,将难于控制,给水产养殖业带来巨大的经济损失,因此在养殖过程中有必要对养殖环境中弧菌病害进行监测,一旦发现细菌性病害前兆,应及时诊断,并采取相应防治措施,将病害消灭在萌芽状态,从而有效降低经济损失。同时水产品在全球范围内的消费不断增加,水产品又容易受到不同程度的污染,其中受到弧菌的污染较为严重,这些使食品安全问题不断受到威胁。养殖环境中病原菌的存在和数量的增加导致水产品污染增加,通过食用受污染的水产品可以使人类患病引发食物中毒威胁人类健康,因此对养殖环境的微生物检测改善养殖环境及对水产品安全的监测是十分必要的。可见,快速准确的诊断方法是把握最佳防御和治疗时机,也是减少食品安全事故的有效手段。

[0003] 近年,国内外报道了一些快速检测弧菌病的方法,主要分为改良的培养检测分析法、免疫学方法、分子生物学检测方法、生物传感器技术等。同时也出现了将免疫学方法与培养法结合、免疫学方法与分子生物学技术结合,分子生物学技术与传感器技术结合等开发的快速的检测方法。但是目前弧菌病检测方法的灵敏度不高,检测方法复杂,且一次只能检测一种弧菌,对于复杂的环境无法实现检测。

[0004] 免疫磁珠捕获-多重PCR技术结合了免疫分离的特异性和PCR扩增的高效性,具有分离、浓缩、富集的能力,能够对样品中低浓度的病原菌进行高效的分离和富集,再结合灵敏的检测技术能很好的达到检测病原菌或疾病的效果,降低或消除了样品对PCR的抑制、影响,提高检测的极限,具有很好的应用前景。因此研究建立对弧菌的免疫磁珠捕获-多重PCR快速检测方法具有重要的意义。

### 发明内容

[0005] 本发明实施例所要解决的技术问题在于,提供一种含OmpU抗体的免疫磁珠及其制备与捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法,解决现有技术存在的问题。

[0006] 为了实现上述的目的,采用如下的技术方案:

[0007] 一种含OmpU抗体的免疫磁珠的制备,主要包括以下步骤:

[0008] (1)以以一种或者多种弧菌的基因组作为模板PCR扩增OmpU基因;

[0009] (2)将步骤(1)所得PCR产物连接到pET-32a(原核表达载体)构建异源表达载体,转化到E.coli BL21(DE3即大肠杆菌);每个克隆至少重复测序2次;

[0010] (3)将步骤(2)所得OmpU重组菌接种到LB培养基中,37℃振荡培养至对数生长期,

加入终浓度为1mmol/L的IPTG(异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷)诱导6h;

[0011] (4)离心收集步骤(3)所得菌体,利用亲和层析进行纯化,获得纯的OmpU重组蛋白;

[0012] (5)将步骤(4)所得纯的OmpU重组蛋白作为抗原制备OmpU重组蛋白抗体;

[0013] (6)将磁珠混匀后加入离心管中,再加入洗涤缓冲液PBST(PBS+0.05%(V/V)吐温20)混匀,置于装有强力磁铁的磁架静置,弃液体;重复操作多次后加入重悬液重悬磁珠;

[0014] (7)往步骤(6)的磁珠中加入步骤(5)所得OmpU重组蛋白抗体,4℃轻缓旋转振荡孵育18~24h;制备成一种或者多种弧菌OmpU抗体的免疫磁珠;

[0015] (8)再用洗涤缓冲液清洗和重悬缓冲液重悬,4℃保存。

[0016] 对ompU基因的克隆和生物信息学分析显示,ompU基因在弧菌中普遍存在,且在弧菌种内(intra-species)和种间(inter-species)均具有较高的相似性。制备OmpU重组蛋白抗血清,并进一步通过Western blotting、Whole-cell ELISA技术对弧菌OmpU免疫交叉反应谱、抗原表位的细胞定位等免疫交叉反应特性进行分析,发现外膜蛋白OmpU是弧菌中一种保守的共同抗原,具有免疫交叉反应性,是一种良好的免疫捕获靶标。利用OmpU重组蛋白抗血清制备的含OmpU抗体的免疫磁珠,能有效地对副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌等多种病原弧菌进行捕获。

[0017] 进一步的,所述弧菌包括副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌。

[0018] 进一步的,步骤(5)所述OmpU重组蛋白抗体的制备主要包括:取纯的OmpU重组蛋白作为抗原(免疫剂量约为250μg蛋白/kg兔),与等体积的弗氏完全佐剂混合、乳化、皮下注射,免疫大白兔;每隔两周加强免疫一次,加强免疫时,免疫剂量减半且与弗氏不完全佐剂乳化。第二次加强免疫后第七天采血测定血清效价。待确定产生抗体后采血,收集血清。免疫前取兔血清,以作阴性对照。

[0019] 进一步的,所述LB培养基中包含氨苄青霉素(Amp)100μg/mL;所述亲和层析为镍琼脂糖凝胶;所述洗涤缓冲液为PBS和0.05%(V/V)吐温-20的混合液;所述重悬液含1%牛血清白蛋白(BSA);所述重悬缓冲液包含0.5%牛血清白蛋白;所述OmpU重组蛋白抗体的添加量为500μL/200μg磁珠。重组OmpU带有组氨酸标签(6×His-Tag),可利用镍琼脂糖凝胶进行亲和层析,再利用咪唑进行洗脱。重悬缓冲液可以起到稳定和防止非特异性吸附的作用。

[0020] 一种上述制备方法制备的含OmpU抗体的免疫磁珠。

[0021] 一种含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法,主要包括以下步骤:

[0022] (S1)制备待测样品;

[0023] (S2)将含待测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠加入待测样品中,37℃振荡反应2~3h,使含OmpU抗体的免疫磁珠上的OmpU抗体与待测样品中弧菌表面抗原充分结合;所述含OmpU抗体的免疫磁珠添加量30μg/ml;

[0024] (S3)用磁铁将所述含OmpU抗体的免疫磁珠与待测样品基质分开,去除待测样品基质,得到含OmpU抗体的免疫磁珠-弧菌免疫复合体;

[0025] (S4)将(S3)中得到的含OmpU抗体的免疫磁珠-弧菌免疫复合体用PBST洗涤干净,再加入裂解液,80℃中煮15min释放DNA,然后离心,取上清作为PCR扩增模板进行PCR扩增;

[0026] (S5)将步骤(S4)所得PCR扩增引物采用基于dnaJ基因设计制备单重或多重PCR反应体系;

[0027] (S6)将单重或多重PCR反应体系置于离心机中瞬时离心,然后放到PCR仪上进行PCR反应;

[0028] (S7)最后进行琼脂糖凝胶电泳分析。

[0029] 采用基于dnaJ基因设计的特异性引物,包括1条通用正向引物和5条反向引物。该引物能在一个PCR反应体系中,最多同时检测副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌5种致病弧菌。

[0030] 含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测技术分为含OmpU抗体的免疫磁珠捕获和多重PCR两种技术进行集成,即利用基于重组外膜蛋白OmpU抗血清制备的含OmpU抗体的免疫磁珠对样品中的弧菌进行分离、富集,再通过多重PCR对多捕获后的弧菌进行鉴定,从而构建快速检测多种病原弧菌的方法,该方法特异性高,检测迅速,操作简单,能够快速准确高效的检测病原弧菌。

[0031] 进一步的,步骤(S1)所述制备待检测的样品包括:水样直接用灭菌的离心管取样检测;泥样加入灭菌的PBS(磷酸缓冲液)混匀后,取上清检测;鱼虾蟹取可食部位碾成糜,再加入灭菌的PBS混匀后,取上清检测。

[0032] 对于固态样品,非冷冻样品采集后立即保存在4℃,并尽快处理;冷冻品应在45℃以下不超过15min,或2℃~5℃不超过18h。鱼类和头足类动物取表面组织、肠或腮。贝类取全部内容物或中心部分,带壳贝类或甲壳类应先在自来水刷洗外壳并甩干表面水分,然后以无菌操作打开外壳,取出相应部分。

[0033] 对于液态样品,液体食品或是外环境水样采集后应马上进行检测,不能马上检测的应立即保存在4℃,并尽快处理。

[0034] 进一步的,所述单重PCR反应体系的制备为:将2μL步骤S4所得DNA作为PCR模板,加入0.5μL上游引物VM-F,再加入0.5μL待检测的弧菌的特异性引物、12.5μL PCRMix和水补齐25μL;所述多重PCR反应体系的制备为将2μL步骤S4所得DNA作为PCR模板,加入1μL上游引物VM-F,加入带检测几种弧菌的特异性引物各0.5μL、12.5μL PCRMix,加水补齐25μL。其中VM-F的引物序列为CAGGTTTGYTGACGGCGAAGA;所述霍乱弧菌Vc-Rmm的引物序列为AGCAGCTTATGACCAATACGCC;所述副溶血弧菌Vp-MmR的引物序列为TGCGAAGAAAGGCTCATCAGAG;所述创伤弧菌Vv-Rmm的引物序列为GTACGAAATTCTGACCGATCAA;所述拟态弧菌Vm-Rmm的引物序列为YCTTGAAGAAGCGGTTCGTGCA;所述溶藻弧菌Va1-MmR的引物序列为GATCGAAGTRCCRACACTMGA。

[0035] 进一步的,所述PCR反应的条件为:step1:95℃预变性5min,step2:94℃变性45s,step3:62℃变性45s,step4:72℃变性30s~1min,step2~step4:35个循环,step5:72℃10min。

[0036] 与现有技术相比,本发明含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR技术结合了免疫分离的特异性和PCR扩增的高效性,可以同时捕获多种弧菌的含OmpU抗体免疫,结合多重PCR技术,不仅可以提高检测的灵敏度,而且可以在多种复杂的环境中实现检测。具有分离、浓缩、富集的能力,能够对样品中低浓度的病原菌进行高效的分离和富集,再结合灵敏的检测技术能很好的达到检测病原菌或疾病的效果,降低或消除了样品对PCR的抑制、影响,提高检测的极限,具有很好的应用前景。而且本发明检测不需要增菌培养,所需检测时间短,并且能同时检测副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌中的1~5种,检测灵敏

度高可以达到 $10^1$ CFU/mL,检测过程方便、迅速,可用于养殖业和海产品对致病弧菌的检测。

### 附图说明

- [0037] 图1为含OmpU抗体的免疫磁珠制备示意图;
- [0038] 图2为含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR快速检测弧菌的技术流程图;
- [0039] 图3为快速检测弧菌的示意图;
- [0040] 图4为重组创伤弧菌外膜蛋白ompU的交叉免疫原性分析;
- [0041] 图5为重组溶藻弧菌外膜蛋白ompU的交叉免疫原性分析;
- [0042] 图6为重组副溶血弧菌外膜蛋白ompU的交叉免疫原性分析;
- [0043] 图7为重组拟态弧菌外膜蛋白ompU的交叉免疫原性分析;
- [0044] 图8为抗重组蛋白抗体与多种弧菌的全菌ELISA交叉反应;
- [0045] 图9为磁珠抗体添加量的优化;
- [0046] 图10为待测样品中含OmpU抗体的免疫磁珠添加量的优化;
- [0047] 图11为创伤弧菌含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测的灵敏度的检测结果;
- [0048] 图12为副溶血弧菌含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测灵敏度的检测结果;
- [0049] 图13为拟态弧菌和创伤弧菌混合菌的含OmpU抗体的免疫磁珠-多重PCR灵敏度的检测结果;
- [0050] 图14为拟态弧菌和霍乱弧菌混合菌的含OmpU抗体的免疫磁珠-多重PCR灵敏度的检测结果;
- [0051] 图15为副溶血弧菌和霍乱弧菌混合菌的含OmpU抗体的免疫磁珠-多重PCR灵敏度的检测结果;
- [0052] 图16为霍乱弧菌、拟态弧菌、副溶血弧菌混合菌的含OmpU抗体的免疫磁珠-多重PCR灵敏度的检测结果;
- [0053] 图17为其他弧菌对含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-多重PCR检测效果的影响;其中+表示添加相应的菌液,-表示未添加相应的菌液;
- [0054] 图18为不同盐离子浓度对检测效率的影响;
- [0055] 其中APW指的是碱性蛋白胨水;M表示标记物,N表示阴性对照,PBS表示磷酸缓冲液对照组,Vv27562、Vv1A08743、VvATCC27562和Vv1H00047均为创伤弧菌的编号;VpATCC17802、Vp17802、VpL490、Vp1.1615和Vp1.1616均为副溶血弧菌的编号;VcVb0为霍乱弧菌的编号;VmATCC33653、Vm33653均为拟态弧菌的编号;Va1ATCC33787、Va133787、Va11.11833Va11A08081、Va11H00082均为溶藻弧菌的编号;Bsub表示的是枯草芽孢杆菌。

### 具体实施方式

[0056] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明作进一步地详细描述。

[0057] 实施例1

[0058] 以检测副溶血弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌、拟态弧菌为例。

[0059] 1、含OmpU抗体的免疫磁珠的制备,如图1所示,主要包括以下步骤:

[0060] 1)制备免疫抗原:以副溶血弧菌ATCC17802、创伤弧菌ATCC27562、霍乱弧菌Vb0和

拟态弧菌ATCC33653的基因组作为模板PCR扩增OmpU基因,PCR产物连接到pET-32a构建异源表达载体,转化到E.coli BL21;将OmpU重组菌接种到LB培养基(含Amp 100 $\mu$ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C振荡培养至对数生长期,加入终浓度为1mmol/L的IPTG诱导6h。离心收集菌体,利用亲和层析(镍琼脂糖凝胶FF)对重组蛋白进行纯化,获得较纯的OmpU重组蛋白作为抗原。

[0061] 2)制备弧菌特异性抗体:取纯化的OmpU重组蛋白作为抗原(免疫剂量约为250 $\mu$ g蛋白/kg兔),与等体积的弗氏完全佐剂混合、乳化、皮下注射,免疫新西兰大白兔。每隔两周加强免疫一次,加强免疫时,免疫剂量减半且与弗氏不完全佐剂乳化。第二次加强免疫后第七天采血测定血清效价。待确定产生抗体后采血,收集血清。免疫前取兔血清,以作阴性对照。

[0062] 3)制备含OmpU抗体的免疫磁珠:将磁珠混匀,取400 $\mu$ L(400 $\mu$ g)磁珠到2mL的离心管,加入2mL洗涤缓冲液PBS+0.05%(V/V)吐温20(PBST),混匀,置于装有强力磁铁的磁架,静置3min,弃液体;重复操作3~4次后,加入适量(0.8mL左右)的重悬液重悬磁珠(含1%牛血清白蛋白BSA),分别加入1mL OmpU多克隆兔抗血清,4 $^{\circ}$ C轻缓旋转振荡孵育18~24h,制备成4种弧菌的OmpU含OmpU抗体的免疫磁珠;用2mL洗涤缓冲液缓冲液清洗3~5次,用400 $\mu$ L重悬缓冲液重悬含OmpU抗体的免疫磁珠(含0.5%BSA),4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0063] 2、快速检测弧菌的方法,如图2和图3所示,主要包括以下步骤:

[0064] 1)水样直接用灭菌的15mL的离心管取10mL样品检测,泥样取5g加入45mL灭菌的PBS混匀,取10mL上清检测;鱼虾蟹取可食部位碾成糜,取10g加入90mL灭菌的PBS混匀,取10mL上清检测。

[0065] 2)将含待检测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠加到待检测样品中,37 $^{\circ}$ C振荡反应2~3h,使含待检测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠上的抗体与弧菌表面抗原充分结合;其中加入含待检测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠各30 $\mu$ g到1mL样品中。

[0066] 3)用磁铁将含待检测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠与样品基质分开,去除样品基质,得到含待检测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠-弧菌免疫复合体。

[0067] 4)将3)中得到的含待检测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠-弧菌免疫复合体用PBST洗涤干净,加入40 $\mu$ L裂解液,80 $^{\circ}$ C煮15min释放DNA,然后3000rpm离心5min,取上清作为PCR扩增模板进行PCR扩增。

[0068] 5)制备多重PCR反应体系(25 $\mu$ L),主要包括如表1所示组分及含量:

[0069] 表1多重PCR反应体系

[0070]

组分	含量
PCR 模板 (取裂解后的上清)	2 $\mu$ L

[0071]

2 × PCR mix	12.5 μL
ddH <sub>2</sub> O	8.5 μL
通用上游引物 Vm-F	0.8 μL
副溶血弧菌检测引物 Vp-R	0.4 μL
拟态弧菌检测引物 Vm-R	0.4 μL
霍乱弧菌检测引物 Vc-R	0.4 μL
创伤弧菌检测引物 Vv-R	0.4 μL

[0072] 6)将PCR反应管置于离心机中瞬时离心,使反应液集于管底,然后将反应管放到基因扩增仪(PCR仪)上;在PCR仪上输入如表2所示参数:

[0073] 表2PCR仪上输入的参数

[0074]

Step 1	95 °C	5 min
Step 2	94 °C	45 s
Step 3	62 °C	45 s
Step 4	72 °C	1 min
<b>Goto Step 2, 30 cycles</b>		
Step 5	72 °C	10 min
Step 6	4 °C	∞
<b>END</b>		

[0075] 7)PCR反应结束后,进行琼脂糖凝胶电泳分析;电泳:3%的琼脂糖凝胶电泳,80~100V,电泳30~50min。

[0076] 实施例2

[0077] 以检测副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌五种病原弧菌为例。

[0078] 1、含OmpU抗体的免疫磁珠的制备,如图1所示,主要包括以下步骤:

[0079] 1)抗原的制备:如图4、图5、图6、图7和图8所示通过生物信息学分析对弧菌OmpU蛋白种内、种间的保守性及交叉免疫特性进行分析,结果提示OmpU蛋白是弧菌属中一种广泛存在的共同抗原,同时也是一种良好的免疫磁珠捕获靶标。利用在线的信号肽分析软件Signal 3.0,对ompU基因的氨基酸序列进行信号肽预测,并设计PCR的表达引物以去除编码信号肽的核苷酸序列,引物为如表3所示:

[0080] 表3PCR的表达引物

[0081]

引物名称	序列 (5' → 3')	退火温度 $T_m$ (°C)	产物大小 (bp)
VpCF	ATGAARAAGRCWSYAHTDRC	53.0	993
VpCR	TTAGAAGTCGTAACGTASAC	53.7	
ValCF	ATGAARAAAGRCWSYAMTB	50.4	1011
ValCR	YTAGAARYCGTAACGTASRC	55.8	
VvCF	ATGAARAAGACATTAATCGCAC	53.6	1011
VvCR	TTAGAAGTCGTAACGTAGACCTAG	58.6	
VcCF	ATGAASAAGACTCTRNTKGCTCT	51.1	1038
VcCR	TTAGAAGYCGTAACGTAGACCRA	56.8	
VmCF	ATGAAMAAGRCWSYRRTKGC	55.8	1032
VmCR	TTAGAARTCGTAACGTARAC	51.7	

[0082] 分别以副溶血弧菌ATCC17802、溶藻弧菌ATCC33787、创伤弧菌ATCC27562、霍乱弧菌Vb0和拟态弧菌ATCC33653的基因组作为模板进行PCR扩增,PCR产物连接到pET-32a构建异源表达载体,转化到E. coli BL21(DE3),每个克隆至少重复测序2次。将OmpU重组菌接种到LB培养基(含Amp 100 $\mu$ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C振荡培养至对数生长期,加入终浓度为1mmol/L的IPTG诱导6h。离心收集菌体,利用亲和层析(镍琼脂糖凝胶FF)对重组蛋白进行纯化,获得较纯的OmpU重组蛋白作为抗原。

[0083] 2)OmpU重组蛋白抗体的制备:取纯化的OmpU重组蛋白作为抗原(免疫剂量约为250 $\mu$ g蛋白/kg兔),与等体积的弗氏完全佐剂混合、乳化、皮下注射,免疫新西兰大白兔。每隔两周加强免疫一次,加强免疫时,免疫剂量减半且与弗氏不完全佐剂乳化。第二次加强免疫后第七天采血测定血清效价。待确定产生抗体后采血,收集血清。免疫前取兔血清,以作阴性对照。

[0084] 3)含OmpU抗体的免疫磁珠的制备:将磁珠混匀,取400 $\mu$ L(400 $\mu$ g)磁珠到2mL的离心管,加入2mL洗涤缓冲液PBS+0.05%(V/V)吐温20(PBST),混匀,置于装有强力磁铁的磁架,静置3min,弃液体;重复操作3~4次后,加入适量(0.8mL左右)的重悬液重悬磁珠(含1%牛血清白蛋白BSA),分别加入1mL OmpU多克隆兔抗血清,4 $^{\circ}$ C轻缓旋转振荡孵育18~24h,制备成5种弧菌的OmpU含OmpU抗体的免疫磁珠;用2mL洗涤缓冲液缓冲液清洗3~5次,用400 $\mu$ L重悬缓冲液重悬含OmpU抗体的免疫磁珠(含0.5%BSA),4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0085] 2、快速检测弧菌的方法,如图2和图3所示,主要包括以下步骤:

[0086] 1)样品的处理。

[0087] (a)固态样品:非冷冻样品采集后立即保存在4 $^{\circ}$ C,并尽快处理。冷冻品应在45 $^{\circ}$ C以下不超过15min,或2 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C不超过18h。鱼类和头足类动物取表面组织、肠或腮。贝类取全部内容物或中心部分,带壳贝类或甲壳类应先在自来水刷洗外壳并甩干表面水分,然后以无菌操作打开外壳,取出相应部分。以无菌操作取样品10g加无菌磷酸缓冲液(PBS)90mL,匀质器匀质,制成1:10的样品匀液;没有匀质器的将样品放入无菌研钵中,自90mL无菌PBS取

少许加入研钵磨碎,磨碎后放入250mL三角瓶中,再用少许无菌PBS冲洗研钵2~3次,洗液放入锥形瓶中,最后剩余的无菌PBS全部放入锥形瓶中,充分震荡制成1:10的样品匀液。泥样则称取10g放入250mL三角瓶中加入无菌PBS90mL充分震荡制成1:10的样品匀液。

[0088] (b)液态样品:液体食品或是外环境水样采集后应马上进行检测,不能马上检测的应立即保存在4℃,并尽快处理。

[0089] 2)含OmpU抗体的免疫磁珠捕获分离及DNA模板的制备(无需增菌处理):取10mL固态样品处理成的1:10的样品匀液或是10mL液体样品,加入含待检测弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠各30μg,37℃旋转捕获2~3h,对样品中待测弧菌进行捕获分离。捕获完后将离心管放到磁架上静置3min,弃液体,取1~2mL PBST将离心管壁,管盖上的磁珠轻轻的洗下,并转移到1.5或是2mL的离心管,PBST洗涤2~3次,小心吸干离心管内的水,加入40μL微生物裂解缓冲液,80℃煮15min裂解释放DNA,3000rpm离心5min,上清作为PCR扩增模板进行PCR扩增。

[0090] 3)多重PCR反应样品的制备:经过多种PCR引物的优化,最终采用基于dnaJ基因设计的多重PCR特异性引物如表4所示,检测副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌五种病原弧菌。

[0091] 表4副溶血弧菌、拟态弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌和溶藻弧菌的PCR扩增引物序列及参数

[0092]

目的菌株	引物名称	引物序列(5' → 3')	Tm值(℃)	产物大小 (bp)
	Vm-F	CAGGTTTGYTGCACGGCGAAGA	73.2	
霍乱弧菌	Vc-Rmm	AGCAGCTTATGACCAATACGCC	66.0	375
副溶血弧菌	Vp-MmR	TGCCAAGAAAGGCTCATCAGAG	67.7	96
创伤弧菌	Vv-Rmm	GTACGAAATTCTGACCGATCAA	62.7	412
拟态弧菌	Vm-Rmm	YCTTGAAGAAGCGGTTTCGTGCA	71.0	177
溶藻弧菌	Val-MmR	GATCGAAGTRCCRACACTMGGA	62.0	144

[0093] 多重PCR反应样品的制备:取出PCR管以含OmpU抗体的免疫磁珠捕获分离制备的DNA 2μL作为PCR模板,加入1μL上游引物VM-F,加入表4中要检测几种弧菌的特异性引物各0.5μL,12.5μL PCRMix,加水补齐25μL。以无菌双蒸水作为阴性对照,以与待检测弧菌对应的弧菌标准菌株DNA作为阳性对照,进行多重PCR同步检测。

[0094] 4)PCR反应程序:step1:预变性95℃5min,step2:变性94℃45s,step3:62℃45s,step4:72℃30s~1min,step2~step4:35个循环,step5:72℃10min。

[0095] 5)DNA凝胶电泳检测:用TAE或TBE制备2%~3%的琼脂糖凝胶,80~100V进行DNA琼脂糖凝胶,电泳结束后,进行溴化乙锭(EB)染色,凝胶成像仪扫描成像。

[0096] 6)结果判定和报告:

[0097] 在琼脂糖凝胶中霍乱弧菌的特异性PCR产物大小为375bp,副溶血弧菌的特异性PCR产物大小为96bp,创伤弧菌特异性PCR产物大小为412bp,拟态弧菌特异性PCR产物大小为177bp,溶藻弧菌特异性PCR产物大小为144bp。如果琼脂糖凝胶检测中有375bp的条带且

与阳性对照一致则说明检测样品中含有霍乱弧菌,没有则为阴性;如果琼脂糖凝胶中有96bp的条带且与阳性对照一致则说明检测样品中含有副溶血性弧菌,没有则为阴性;如果琼脂糖凝胶中有412bp的条带且与阳性对照一致则说明检测样品中含有创伤弧菌,没有则为阴性;如果琼脂糖凝胶中有177bp的条带且与阳性对照一致则说明检测样品中含有拟态弧菌,没有则为阴性;如果琼脂糖凝胶中有144bp的条带且与阳性对照一致则说明检测样品中含有溶藻弧菌,没有则为阴性。

[0098] 对于阳性结果,应参见规范性应用文件中的方法或相关的国际权威微生物鉴定方法做进一步的生化鉴定和报告。

[0099] 7)确证:检验筛选出的阳性样本,副溶血弧菌按照GB4789.7,霍乱弧菌按照SN/T1022进行确证。

[0100] 实施例3

[0101] 以检测副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌五种病原弧菌中任一种弧菌为例。

[0102] 1、含OmpU抗体的免疫磁珠的制备,如图1所示,主要包括以下步骤:

[0103] 1)抗原的制备:以待检测的弧菌如副溶血弧菌ATCC17802、溶藻弧菌ATCC33787、创伤弧菌ATCC27562、霍乱弧菌Vb0和拟态弧菌ATCC33653之一的基因组作为模板进行PCR扩增,PCR产物连接到pET-32a构建异源表达载体,转化到E.coli BL21(DE3),每个克隆至少重复测序2次。将OmpU重组菌接种到LB培养基(含Amp 100 $\mu$ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C振荡培养至对数生长期,加入终浓度为1mmol/L的IPTG诱导6h。离心收集菌体,利用亲和层析(镍琼脂糖凝胶FF)对重组蛋白进行纯化,获得较纯的OmpU重组蛋白作为抗原。

[0104] 2)OmpU重组蛋白抗体的制备:取纯化的OmpU重组蛋白作为抗原(免疫剂量约为250 $\mu$ g蛋白/kg兔),与等体积的弗氏完全佐剂混合、乳化、皮下注射,免疫新西兰大白兔。每隔两周加强免疫一次,加强免疫时,免疫剂量减半且与弗氏不完全佐剂乳化。第二次加强免疫后第七天采血测定血清效价。待确定产生抗体后采血,收集血清。免疫前取兔血清,以作阴性对照。

[0105] 3)含OmpU抗体的免疫磁珠的制备:将磁珠混匀,取400 $\mu$ L(400 $\mu$ g)磁珠到2mL的离心管,加入2mL洗涤缓冲液PBS+0.05%(V/V)吐温20(PBST),混匀,置于装有强力磁铁的磁架,静置3min,弃液体;重复操作3~4次后,加入适量(0.8mL左右)的重悬液重悬磁珠(含1%牛血清白蛋白BSA),分别加入1mL OmpU多克隆兔抗血清,4 $^{\circ}$ C轻缓旋转振荡孵育18~24h,制备成含待检测的弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠(如要检测副溶血弧菌就加入副溶血弧菌的OmpU抗血清制备成副溶血弧菌的含OmpU抗体的免疫磁珠);用2mL洗涤缓冲液缓冲液清洗3~5次,用400 $\mu$ L重悬缓冲液重悬含OmpU抗体的免疫磁珠(含0.5%BSA),4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0106] 2、快速检测弧菌的方法,如图2和图3所示,主要包括以下步骤:

[0107] 1)样品的处理。

[0108] (a)固态样品:非冷冻样品采集后立即保存在4 $^{\circ}$ C,并尽快处理。冷冻品应在45 $^{\circ}$ C以下不超过15min,或2 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C不超过18h。鱼类和头足类动物取表面组织、肠或腮。贝类取全部内容物或中心部分,带壳贝类或甲壳类应先在自来水刷洗外壳并甩干表面水分,然后以无菌操作打开外壳,取出相应部分。以无菌操作取样品10g加无菌磷酸缓冲液(PBS)90mL,匀质器匀质,制成1:10的样品匀液;没有匀质器的将样品放入无菌研钵中,自90mL无菌PBS取

少许加入研钵磨碎,磨碎后放入250mL三角瓶中,再用少许无菌PBS冲洗研钵2~3次,洗液放入锥形瓶中,最后剩余的无菌PBS全部放入锥形瓶中,充分震荡制成1:10的样品匀液。泥样则称取10g放入250mL三角瓶中加入无菌PBS90mL充分震荡制成1:10的样品匀液。

[0109] (b)液态样品:液体食品或是外环境水样采集后应马上进行检测,不能马上检测的应立即保存在4℃,并尽快处理。

[0110] 2)含OmpU抗体的免疫磁珠捕获分离及DNA模板的制备(增菌处理):将10mL固态样品处理成的1:10的样品匀液或是10mL液体样品接种到90mL碱性蛋白胨水37℃震荡过夜增菌。取10mL增菌液,加入对应含待测的弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠,(如对霍乱弧菌检测则加入含Vc-OmpU抗体的免疫磁珠;对几种弧菌检测则加入对应的几种含弧菌的OmpU抗体的免疫磁珠,如对霍乱弧菌和副溶血弧菌同步检测则同时加入Vc-OmpU和Vp-OmpU含OmpU抗体的免疫磁珠),37℃旋转捕获2~3h,对样品中待测弧菌进行捕获分离。捕获完后将离心管放到磁架上静置3min,弃液体,取1~2mLPBST将离心管壁,管盖上的磁珠轻轻的洗下,并转移到1.5或是2mL的离心管,PBST洗涤2~3次,小心吸干离心管内的水,加入40μL微生物裂解缓冲液,80℃煮15min裂解释放DNA,3000rpm离心5min,上清作为PCR扩增模板进行PCR扩增。

[0111] 3)单重PCR反应样品的制备:取出PCR管以含OmpU抗体的免疫磁珠捕获分离制备的DNA 2μL作为PCR模板,加入0.5μL上游引物VM-F 0.5μL,加入待检测的弧菌的特异性引物0.5μL,加入12.5μL PCRMix(DSB10),加水补齐25μL。以无菌双蒸水作为阴性对照,以与待检测弧菌对应的弧菌标准菌株DNA作为阳性对照,进行PCR检测。

[0112] 4)PCR反应程序:预变性95℃5min,变性95℃45s,62℃45s,72℃30s~1min,35个循环72℃10min。

[0113] 5)DNA凝胶电泳检测:用TAE或TBE制备2%~3%的琼脂糖凝胶,80~100V进行DNA琼脂糖凝胶,电泳结束后,进行溴化乙锭(EB)染色,凝胶成像仪扫描成像。

[0114] 实施例4

[0115] 为了获得最佳的检测效果,本实施例进一步对影像检测效果的参数做进一步优化。

[0116] 抗体添加量的优化实验:分别以100μL~1000μL/200μg的霍乱弧菌来源的兔抗重组OmpU抗体添加量制备含OmpU抗体的免疫磁珠,分别取30μg对浓度为10<sup>6</sup>CFU/mL的霍乱弧菌进行捕获、平板计数,进而确定最佳的抗体添加量。如图9可以看出当多克隆抗体添加量小于500μL/200μg时,含OmpU抗体的免疫磁珠捕获的细菌数量随着抗体添加量的增加而明显的增加;当抗体添加量达到500μL/200μg后,与抗体添加量为700μL/200μg和抗体添加量为1000μL/200μg比较,捕获的细菌数量增加不是很明显,趋于稳定。当抗体添加量为500μL/200μg是达到较佳的效果。

[0117] 含OmpU抗体的免疫磁珠添加量的优化:分别以10~50μg磁珠添加量,对浓度为10<sup>6</sup>CFU/mL的霍乱弧菌进行捕获、平板计数,进而确定最佳的磁珠添加量。如图10所示,随着含OmpU抗体的免疫磁珠加入量增加,磁珠捕获霍乱弧菌的捕获数量逐渐增大;当含OmpU抗体的免疫磁珠加入量达到30μg后,霍乱弧菌捕获数量区别不大。磁珠是通过抗原抗体特异性结合来捕获菌,当体系中的菌的表面结合了足够量的磁珠时,再加入磁珠,菌的捕获量几乎不会有太明显的提高,因此选择30μg为最佳添加量。

[0118] 实施例5

[0119] 含OmpU抗体的免疫磁珠多重PCR快速检测致病弧菌的方法作进一步的效果评估。

#### [0120] 1、灵敏度分析

[0121] 对不同编号的创伤弧菌和副溶血弧菌的菌液进行稀释,分别使其稀释后的浓度为: $10^5$ - $10^1$ CFU/mL的菌悬液,以优化后的检测方法做创伤弧菌和副溶血弧菌种内含OmpU抗体的免疫磁珠捕获-单重PCR灵敏度检测,检测灵敏度达到 $10^1$ CFU/mL如图11和图12所示。

[0122] 将副溶血弧菌、拟态弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌4种病原弧菌任意2或3种进行组合,调整菌悬液浓度使其浓度为 $10^5$ - $10^1$ CFU/mL的稀释梯度,分别添加对应的抗体制备的磁珠进行细胞分离后进行DNA模板制备,根据混合DNA模板,添加对应的两对或是三对引物,进行二重PCR扩增以及三重PCR扩增,电泳检测扩增产物,实现同时检测两种或是三种弧菌。如图13所示,将结合有兔抗Vv-OmpU外膜蛋白血清、兔抗Vm-OmpU外膜蛋白的含OmpU抗体的免疫磁珠等量混合后对Vv、Vm的混合菌悬液样本进行同时捕获-PCR检测,检测灵敏度都能达到 $10^1$ ,如图13所示,拟态弧菌Vm的检测灵敏度能到 $10^1$ ( $2.72 \times 10^1$ CFU/mL),创伤弧菌Vv的检测灵敏度为 $10^1$ ( $4.35 \times 10^1$ CFU/mL)。同样的,将结合有兔抗Vc-OmpU外膜蛋白血清、兔抗Vm-OmpU外膜蛋白的含OmpU抗体的免疫磁珠对Vc、Vm的混合菌悬液样本进行捕获-PCR同步检测中,检测灵敏度都能达到 $10^1$ ,如图14所示,拟态弧菌Vm的检测灵敏度为 $2.15 \times 10^1$ CFU/mL,霍乱弧菌Vc的检测灵敏度为 $3.08 \times 10^1$ CFU/mL。以结合有兔抗Vc-OmpU外膜蛋白血清、兔抗Vp-OmpU外膜蛋白血清的含OmpU抗体的免疫磁珠等量混合后对Vp、Vc的混合菌悬液样本进行捕获-PCR同步检测中,检测灵敏度也都能达到 $10^1$ CFU/mL,副溶血弧菌Vp的检测灵敏度为 $2.15 \times 10^1$ CFU/mL,霍乱弧菌Vc的检测灵敏度为 $3.1 \times 10^1$ CFU/mL,如图15所示。对霍乱弧菌、拟态弧菌、副溶血弧菌3种弧菌同时进行的同步检测,检测极限都能达到 $10^1$ CFU/mL,如图16所示。

#### [0123] 2、抗干扰性分析

[0124] 以霍乱弧菌的OmpU抗血清制备含OmpU抗体的免疫磁珠,在浓度梯度为 $10^5$ - $10^1$ CFU/mL的霍乱弧菌Vc的菌悬液中加入的创伤弧菌Vv、拟态弧菌Vm、溶藻弧菌Va1、副溶血弧菌Vp四种弧菌的混合菌悬液,制备成使霍乱弧菌Vc的菌悬液梯度中 $10^5$ - $10^1$ CFU/mL含有浓度分别为 $10^5$ CFU/mL的4种混合弧菌,进一步研究在有混合菌的存在下对霍乱弧菌的检测灵敏度。如图17所示,在加有混合菌的反应体系的检测条带从 $10^3$ ~ $10^1$ 与不加混合菌的 $10^3$ ~ $10^1$ 的条带相比电泳条带减弱,说明在有较高浓度的其他弧菌存在的时候,还是会有一点影响的,虽然这样,但是对霍乱弧菌Vc的检测极限还是能达到 $10^1$ CFU/mL。

#### [0125] 3、不同的盐离子浓度对含OmpU抗体的免疫磁珠-PCR检测效率的影响

[0126] 采用霍乱弧菌液浓度为 $10^5$ CFU/mL,盐离子浓度分为PBS、3%NaCl、4%NaCl、5%NaCl、6%NaCl,研究离子浓度对检测效率的影响,如图18所示,不同盐离子浓度对含OmpU抗体的免疫磁珠-PCR检测效率没有明显的影响,可以直接对海水样品、海产品样品进行检测。

#### [0127] 4、与其他弧菌检测方法的比较

[0128] 与其他弧菌检测方法,如国标法:检测过程繁琐,随机性大,检测时间所需时间长;多重PCR法对坎氏弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌的检出限为10-100cell/pcr管;荧光检测法经过6-8h的增菌培养后,对海产品的最低检测限为10cell/s/g;含OmpU抗体的免疫磁珠-环介导恒温扩增技术对牡蛎中的副溶血弧菌未增菌检测检出限为 $1.9 \times 10^3$ CFU/g等相比较,本发明方法具有更好的检测性能。本发明检测不需要增菌培养,所需检测时间短,并且能同时检测副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌中的1~5种,检测灵敏度

可以达到 $10^1$ CFU/mL。

[0129] 综上所述,本发明的含OmpU抗体的免疫磁珠-多重PCR检测方法具有较高的灵敏度,对主要的致病弧菌的检测限为 $10^1$ CFU/mL,检测过程方便、迅速,可用于养殖业和海产品对致病弧菌的检测。

[0130] 以上所揭露的仅为本发明的较佳实施例而已,当然不能以此来限定本发明之权利范围,因此依本发明权利要求所作的等同变化,仍属本发明所涵盖的范围。

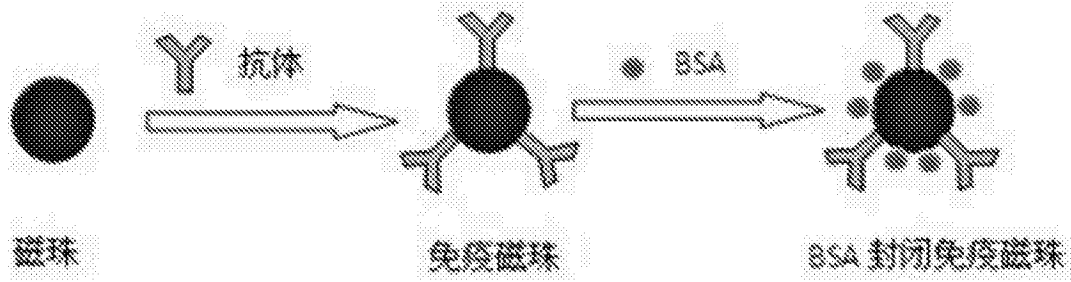


图1

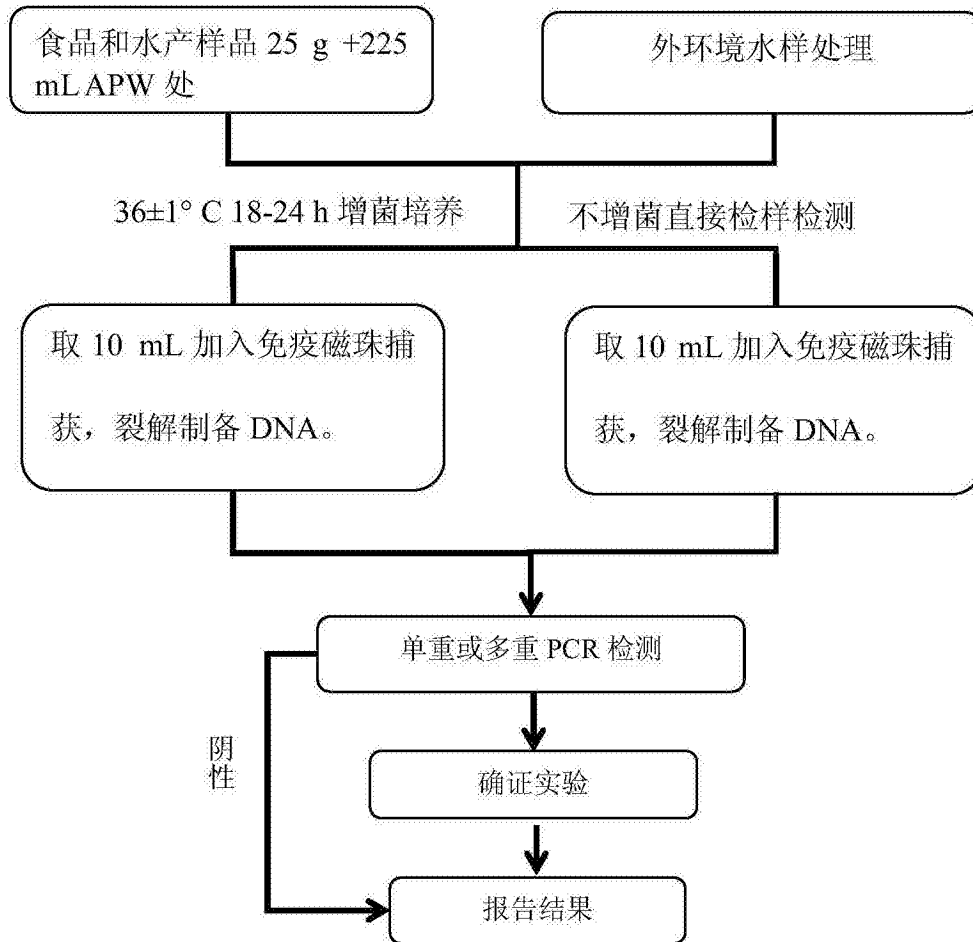


图2

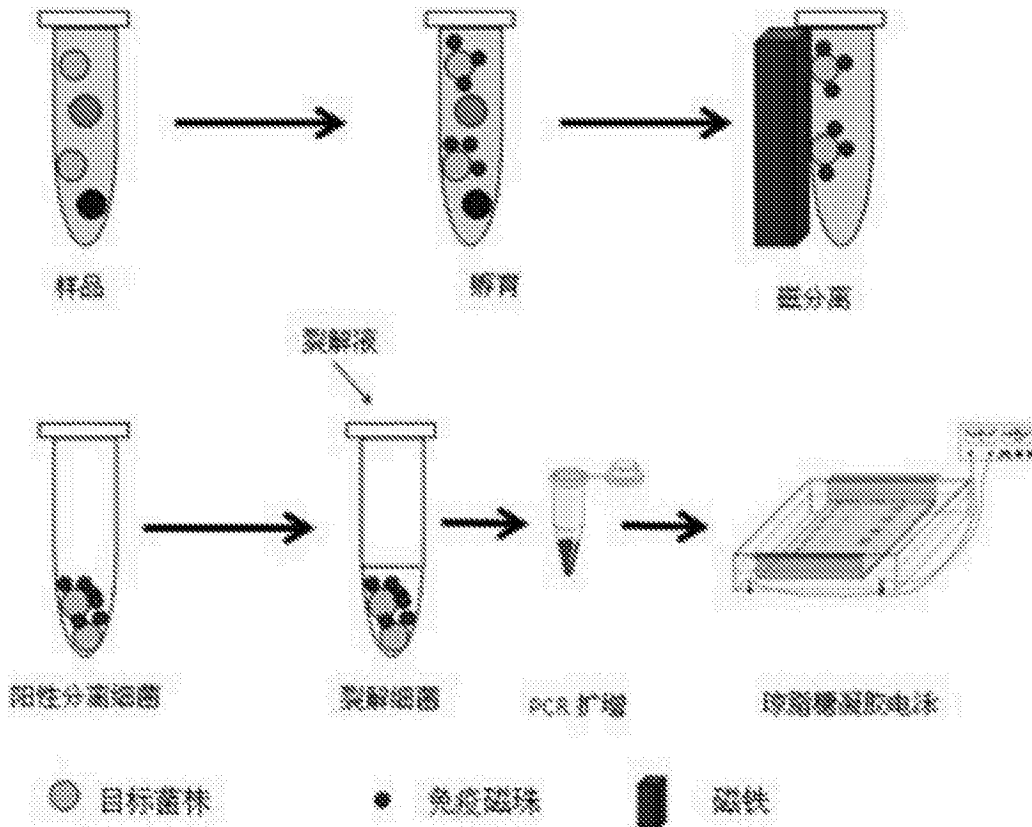


图3

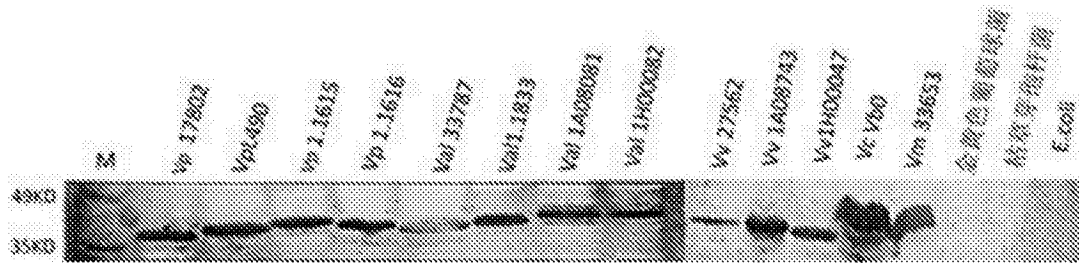


图4

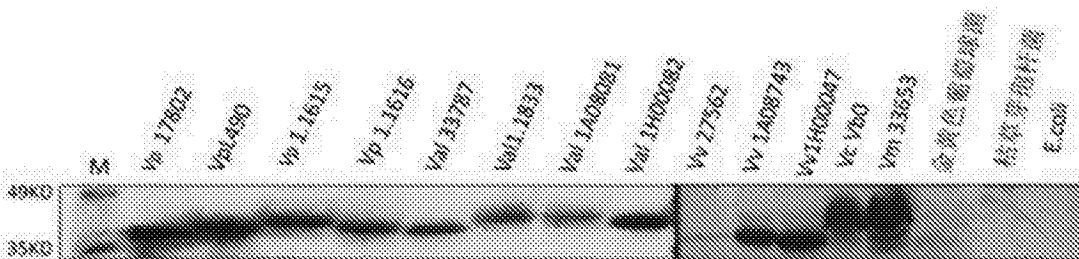


图5

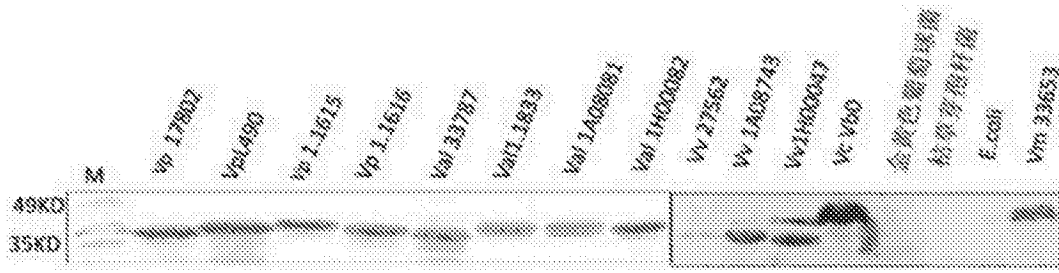


图6

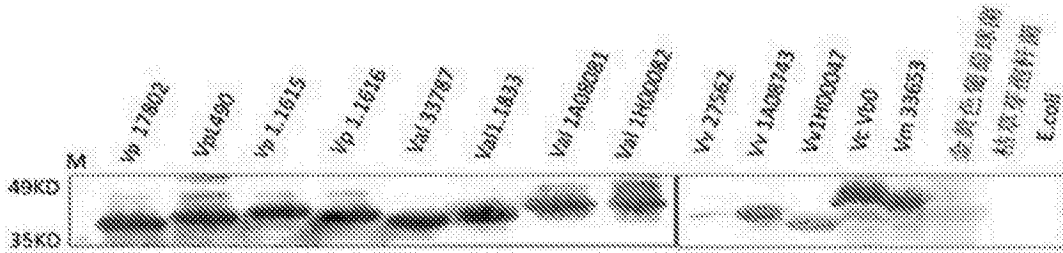


图7



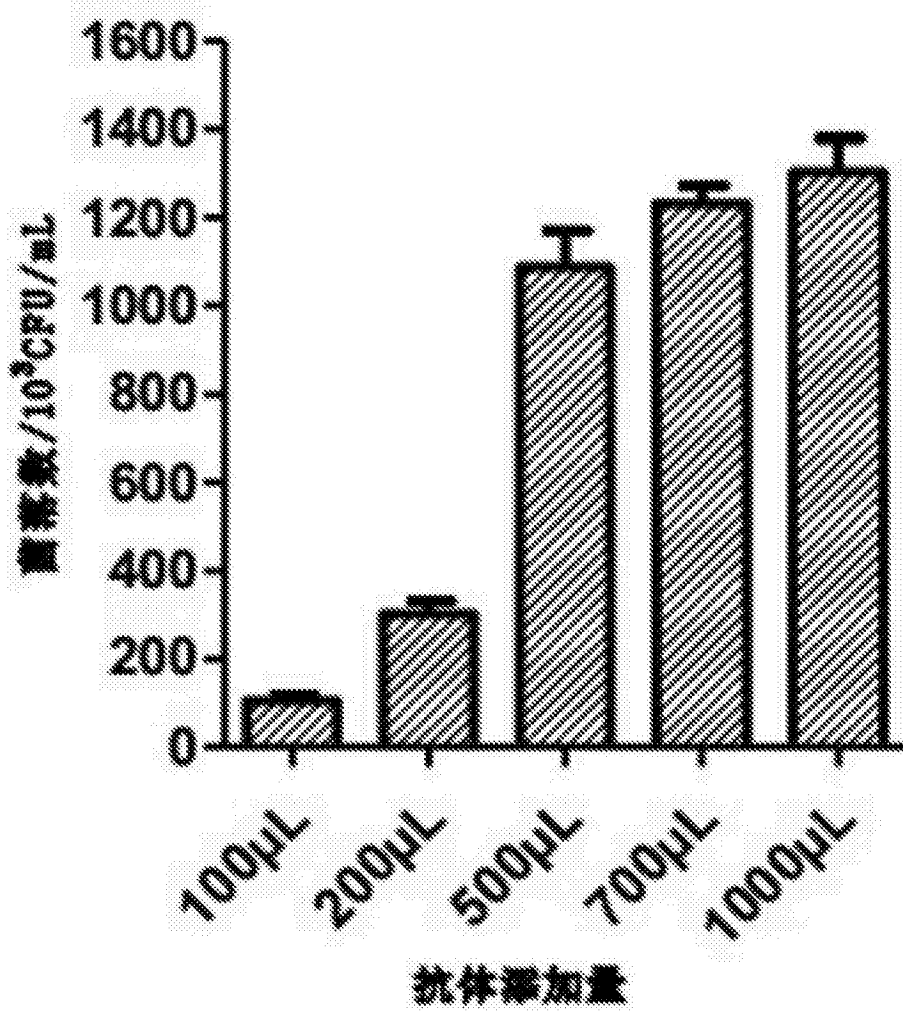


图9

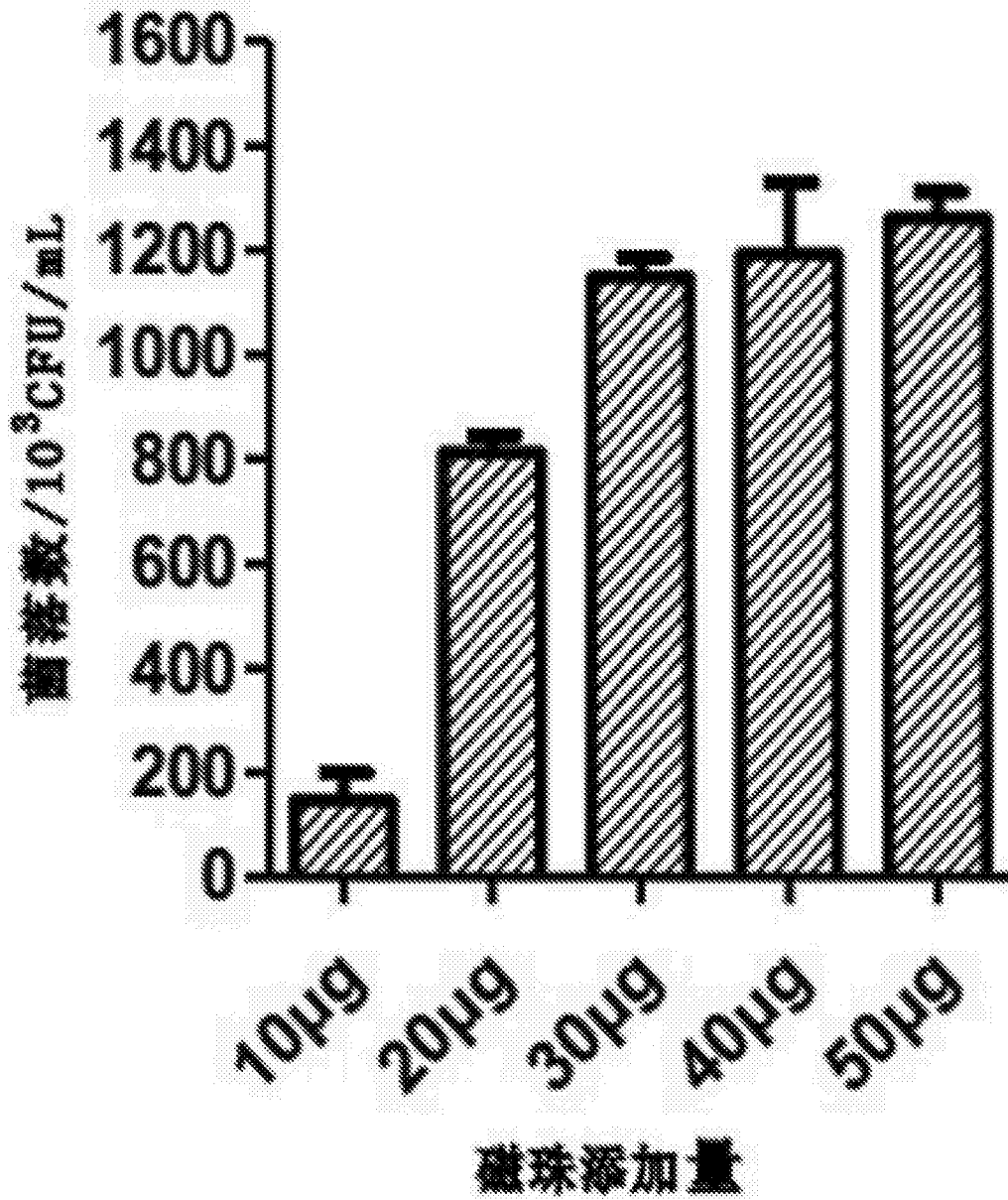


图10

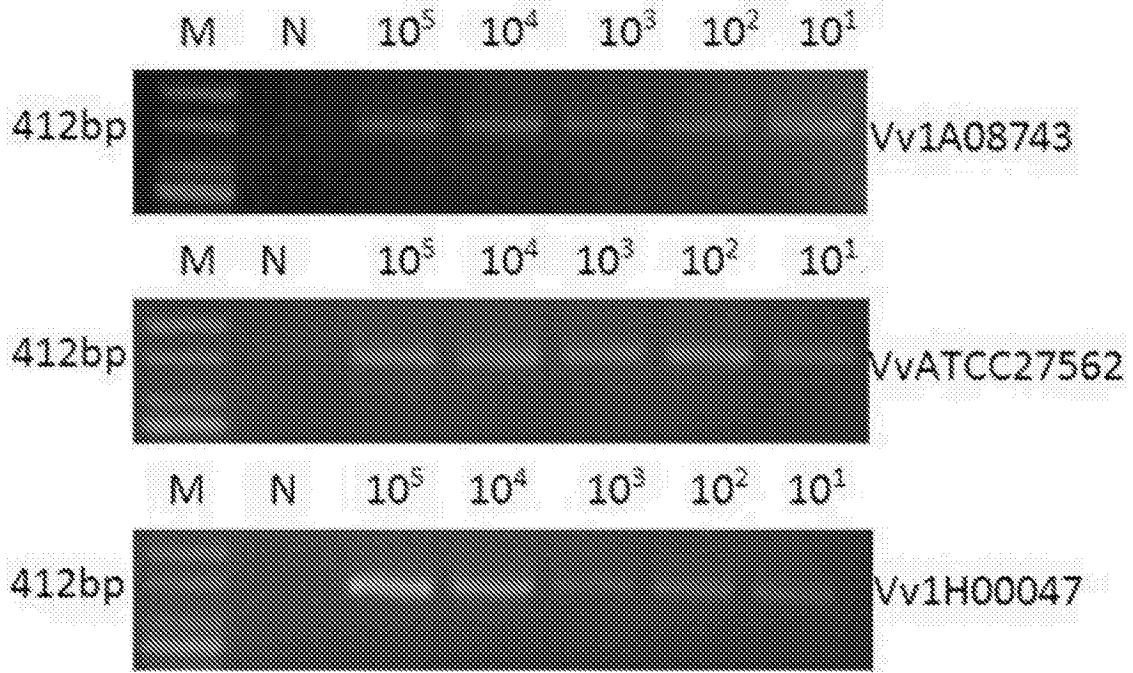


图11

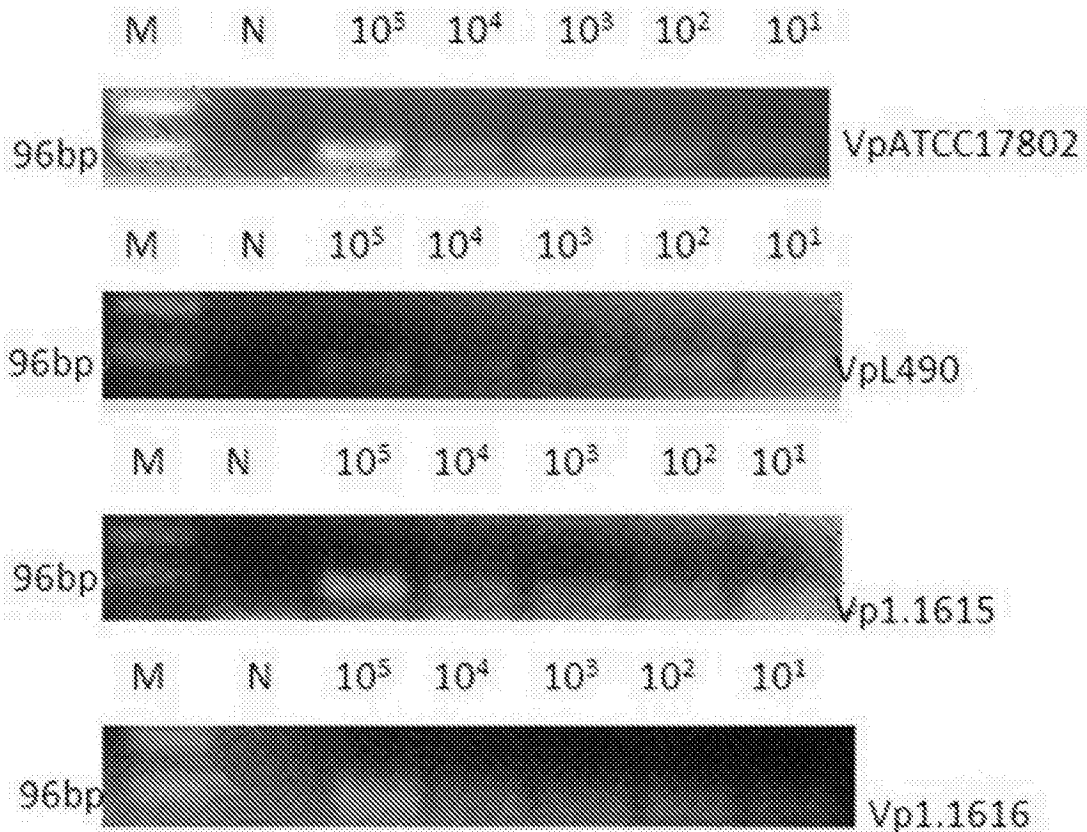


图12

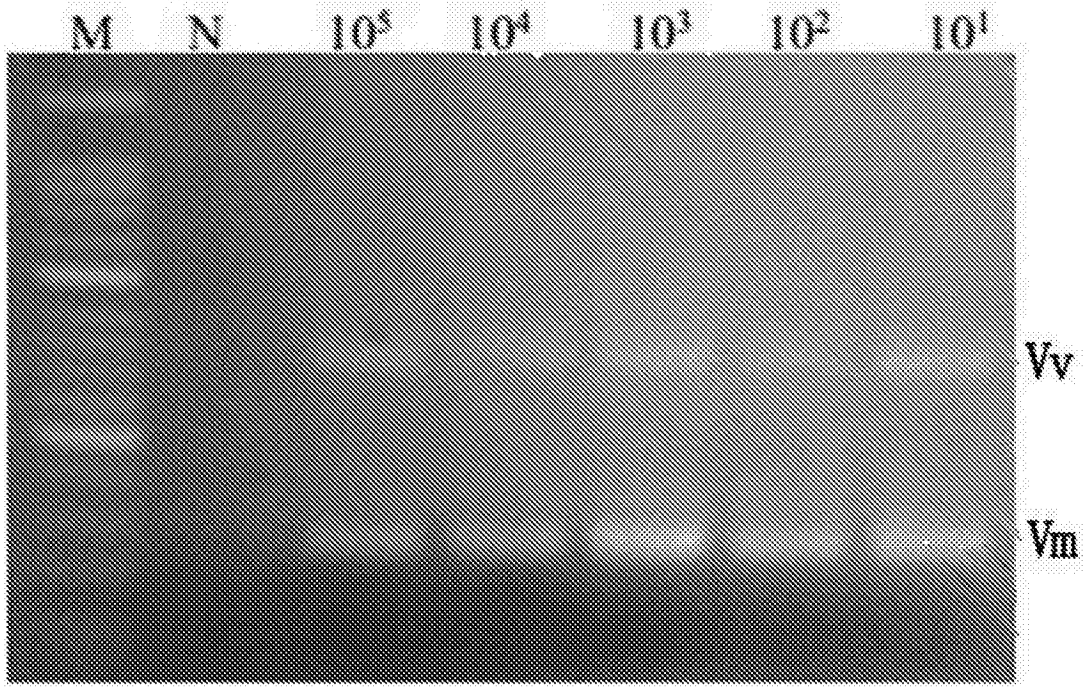


图13

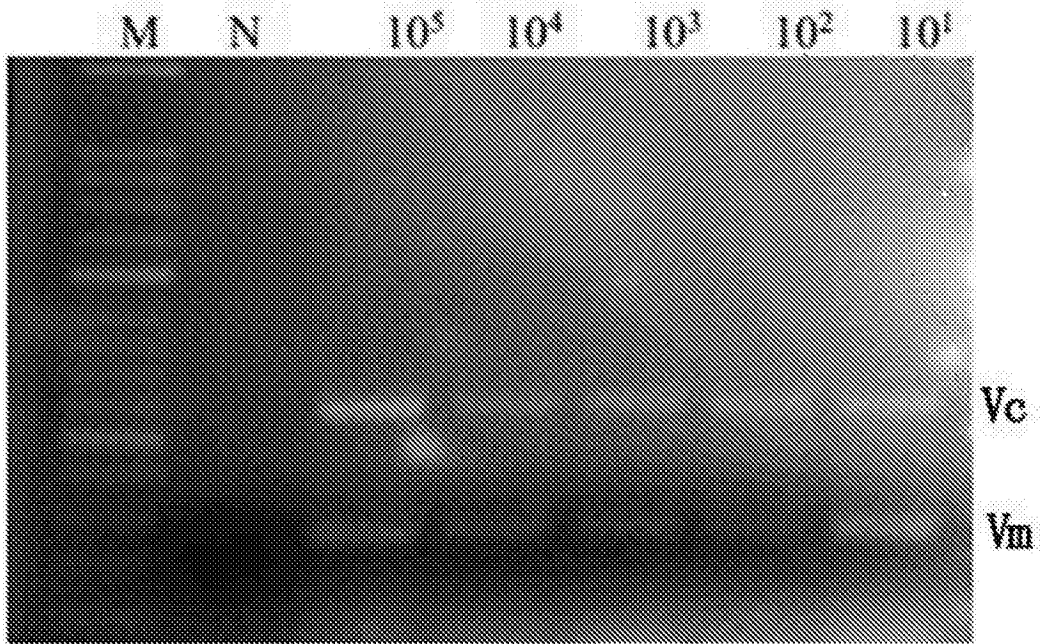


图14

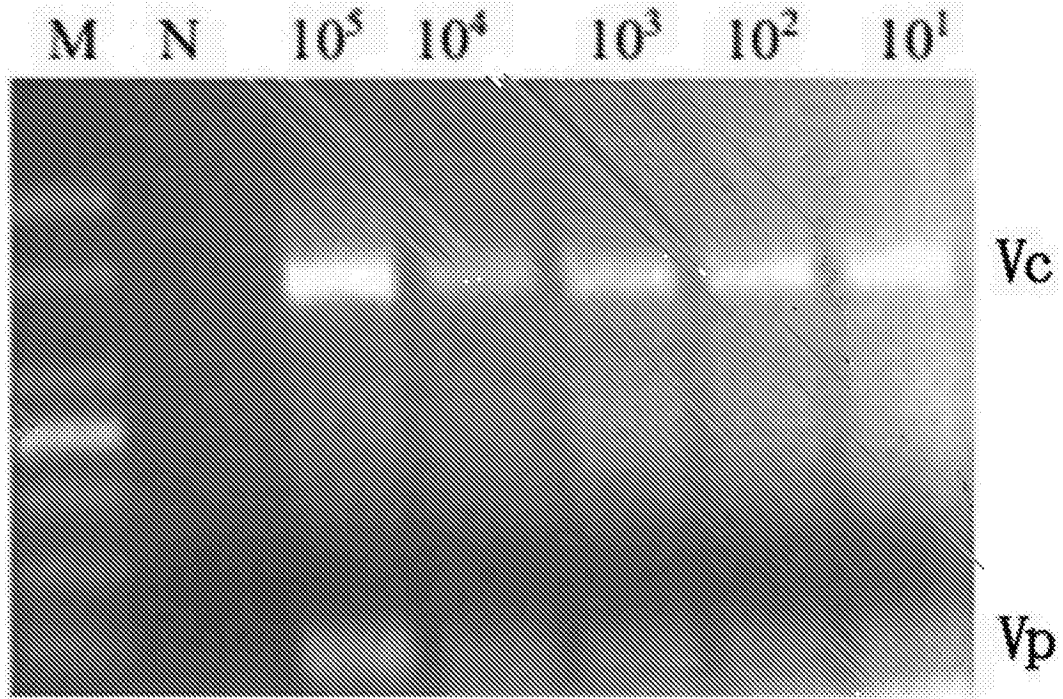


图15

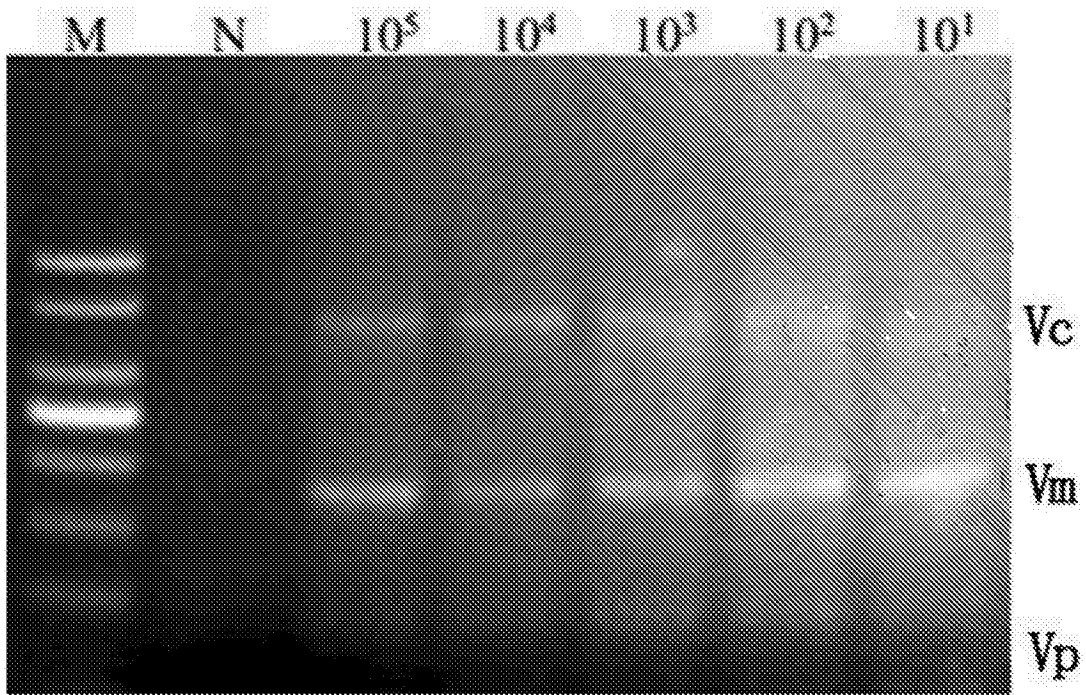


图16

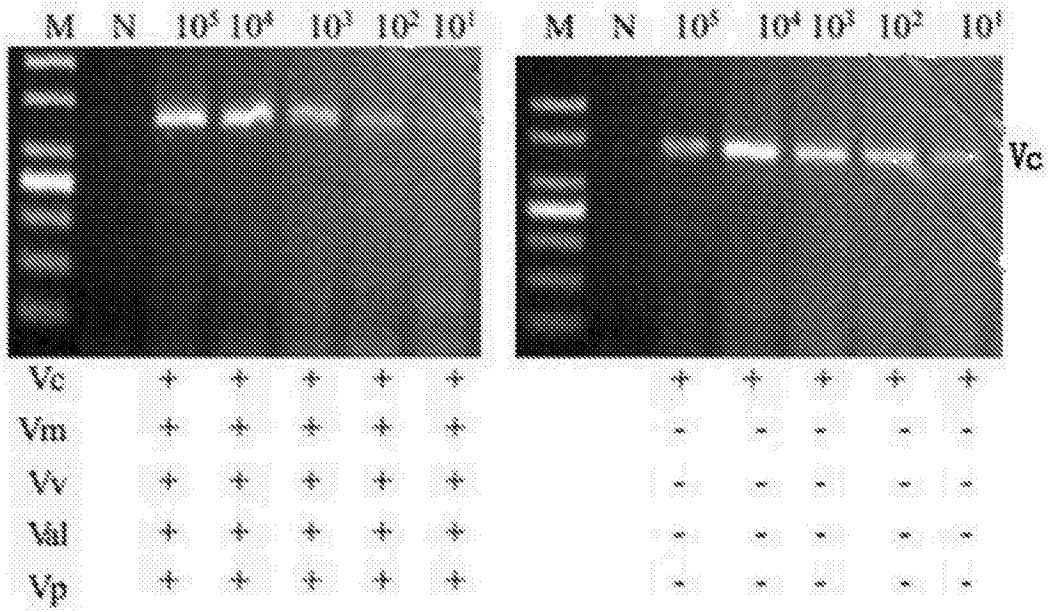


图17

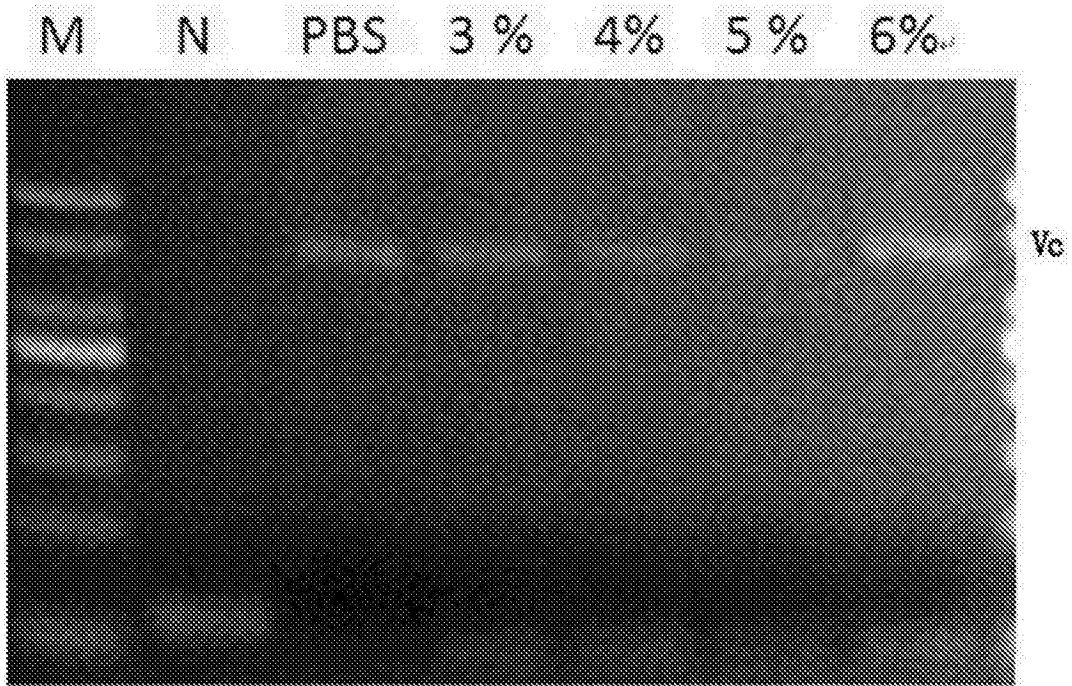


图18

专利名称(译)	一种含OmpU抗体的免疫磁珠及其制备与捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105859883A</a>	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201610237489.3	申请日	2016-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	汕头大学		
申请(专利权)人(译)	汕头大学		
当前申请(专利权)人(译)	汕头大学		
[标]发明人	胡忠 伦镜盛 刘丹 张设熙 董亚萍 袁传飞		
发明人	胡忠 伦镜盛 刘丹 张设熙 董亚萍 袁传飞		
IPC分类号	C07K16/12 G01N33/569 G01N33/531 C12Q1/68		
CPC分类号	Y02A50/451 Y02A50/52 C07K16/1239 C12Q1/686 C12Q1/689 G01N33/531 G01N33/56911		
代理人(译)	温旭		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种含OmpU抗体的免疫磁珠及其制备与捕获-多重PCR检测病原弧菌的方法，用弧菌的基因组作为模板PCR扩增OmpU基因，获得较纯的OmpU重组蛋白作为抗原制备抗体，经过偶联-洗涤的过程制备出含OmpU抗体的免疫磁珠；免疫磁珠能够捕获多种弧菌，然后用基于danJ基因设计的多重PCR特异性引物进行鉴定。最多同时检测副溶血弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌，可广泛应用于环境及进出口食品检验中。本发明结合了免疫分离的特异性和PCR扩增的高效性，具有分离、浓缩、富集的能力，能够对样品中低浓度的病原菌进行高效的分离和富集，降低或消除了样品对PCR的抑制、影响，提高检测的极限，具有很好的应用前景。

