

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410051081.4

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100342033C

[22] 申请日 2004.8.13

[21] 申请号 200410051081.4

[73] 专利权人 汕头大学

地址 515063 广东省汕头市大学路 243 号

[72] 发明人 刘光明 韩雅莉 章跃陵

[56] 参考文献

US6080547A 2000.6.27

US6395879B1 2002.5.28

WO2003066893A1 2003.8.14

US5494795A 1996.2.27

US6166196A 2000.12.26

空肠弯曲菌、沙门氏菌的 16S rDNA 的 PCR  
-RDB 检测方法的研究 白薇等, 中国人兽共  
患病杂志, 第 17 卷第 1 期 2001

审查员 赵晓宇

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

代理人 温 旭

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

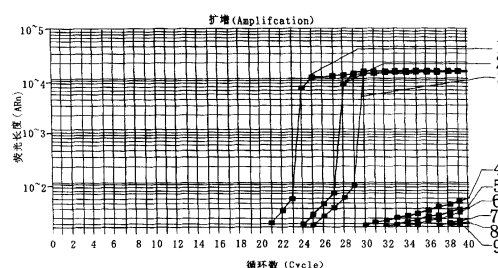
[54] 发明名称

一种检测空肠弯曲菌的方法

[57] 摘要

本发明涉及空肠弯曲菌的荧光 PCR 检测, 提供一种空肠弯曲菌的实时荧光 PCR 检测方法, 应用抗血清和磁性微珠制备空肠弯曲菌免疫磁珠, 利用免疫磁珠直接捕获检样中的空肠弯曲菌, 煮沸法提取空肠弯曲菌的 DNA, 设计合成用于扩增空肠弯曲菌鞭毛蛋白 A (flaA) 基因的引物与探针和/或空肠弯曲菌的马尿酸酶 (hipO) 基因的引物与探针, 通过荧光 PCR 技术检测得到扩增产物的荧光信号; 其中 flaA 基因的引物序列为 flaA1: 5' - ctgaatttgataccttaagtgcagc - 3' /flaA2: 5' - aggcagcctaaacctatagct - 3', 探针序列为 5' - tgtgaaagaatttctctaaagatgagcaaggaga - 3'; hipO 基因引物序列为 hipO1: 5' - tgcttcttacttgtgtggctt - 3' /hipO2: 5' - gctcctatgctta-caactgctgaatt - 3', 探针序列为 5' - caagcatag-

空肠弯曲菌的检测提供快捷方法。



1、一种检测空肠弯曲菌的方法，利用抗弯曲菌免疫磁珠直接捕获检样中的目的菌，磁珠捕获的细菌进行 DNA 抽提及荧光 PCR 检测，其特征在于：设计合成用于扩增空肠弯曲菌鞭毛蛋白 A 基因的引物与探针和马尿酸酶基因的引物与探针，通过荧光 PCR 技术检测得到相应的荧光信号或扩增产物，其中鞭毛蛋白 A 基因的引物序列为 1：5'-ctgaatttgataccttaagtcagc-3' 和 2：5'-aggcacgcctaacctatagct-3'，探针序列为 5'-tgtgaaagaatttatcctaaagatgagcaaggaga-3'；马尿酸酶基因引物序列为 1：5'-tgcttcttacttggttggtt-3' 和 2：5'-gctcctatgcttacaactgctgaatt-3'，探针序列为 5'-caaagcatagtatctcgcaatggtgatcccc-3'，所有探针的 5'端标记荧光报告基团，3'端标记荧光淬灭基团，二者可构成能量传递结构。

## 一种检测空肠弯曲菌的方法

### 技术领域

本发明涉及细菌的基因检测，特别涉及空肠弯曲菌的检测。

### 背景技术

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 是近十几年来被认识的世界范围广泛流行的人兽共患病原菌。鸟、禽、狗、牛、猪等动物是该菌的贮存宿主，其中猪带菌率为 30%，奶牛带菌率为 10.7%，鸡带菌率高达 60%~95%。该菌可引起牛和绵羊流产，火鸡肝炎和蓝冠病，童子鸡和雏鸡坏死性肝炎，以及雏鸡、犊牛和仔猪腹泻等多种疾病。空肠弯曲菌可以通过动物、鸟和患病者的粪便进入环境中，由于该菌对环境较敏感，所以不可能在宿主外存活时间太长，但在水中可以进入一种称为“非可培养状态” (Viable but non-culturable, VNC) 的休眠期。在条件适宜时，VNC 状态的空肠弯曲菌可增殖生长，通过环境及食物链进入人体。接触畜禽类，或食入受到污染的禽制品、水源和牛奶是该菌感染人体的主要媒介。

空肠弯曲菌可引起人体急性肠炎和食物中毒，并引发格林-巴利综合症、反应性关节炎、瑞特氏病和肝炎等严重的并发症。世界卫生组织已将该病列为最常见的食源性传染病之一，并指出必须加强监测各地区空肠弯曲菌在动物和人体中的分布，减少或切断主要传染家禽、家畜及其制品对人体的传播。

建立空肠弯曲菌快速而特异性的分离和检测方法，是有效控制和预防该类“正在发展的食源性病原菌”的关键所在。面对复杂多样的实物样品时，传统的分离鉴定方法需要耗费大量的时间和人力，而且存在敏感性低、难以检测VNC状态的空肠弯曲菌和易出现假阴性结果等问题，这将严重制约对该菌的快速准确检测，因此迫切要求新的检测技术能有效的改变这一状况。

### 发明内容

本发明旨在提供一种空肠弯曲菌的实时荧光 PCR 检测方法。该方法利用抗弯曲菌免疫磁珠直接捕获检样中的目的菌，通过荧光 PCR 技术分别检测空肠弯曲菌特定的基

因，从而达到准确、快速、灵敏检测畜禽类食品中空肠弯曲菌的目的。

实现本发明方法的技术方案是：应用抗血清和磁性微珠制备空肠弯曲菌免疫磁珠，利用免疫磁珠直接捕获检样中的空肠弯曲菌；煮沸法提取空肠弯曲菌的 DNA，设计合成用于扩增空肠弯曲菌鞭毛蛋白 A (flaA) 基因的引物与探针和/或空肠弯曲菌的马尿酸酶 (hipO) 基因的引物与探针，通过荧光 PCR 技术检测得到荧光信号或扩增产物。

其中 flaA 基因的引物序列为 flaA1: 5'-ctgaatttgatacctaagtcagc-3' 及 flaA2: 5'-aggcaccgcctaacctatagct-3'，探针为 5'-tgtgaaagaatttaccctaaagatgagcaaggaga-3'；hipO 基因的引物序列为 hipO1: 5'-tgctcttactgtgtgcttt-3' 及 hipO2: 5'-gctcctatgcttacaactgctgaatt-3'，探针为 5'-caaagcatagtatctcgcaatgttgatcccc-3'，所有探针的 5'端标记荧光报告基团，3'端标记荧光淬灭基团，二者可构成能量传递结构。

本发明的优点是：（1）利用免疫磁珠捕获技术可快速收集、浓缩检样中的目的菌，简便、特异、安全的免疫磁珠法也为分离受损伤或处于 VNC 状态的空肠弯曲菌提供了一种有效手段，这也是常规培养分离方法所不及的。（2）实时荧光 PCR 使 PCR 扩增与产物分析的全过程在单管封闭条件下进行，实现了对 PCR 扩增及产物分析的实时监控和自动化操作，无须电泳步骤，避免了交叉污染和假阳性结果。而且实时荧光 PCR 增加了荧光标记探针与目标序列的杂交步骤，因而专一性更高、结果更准确。（3）免疫磁珠捕获结合实时荧光 PCR 检测方法，更显示出优越性。免疫磁珠直接分离检样中的靶细菌，除去了 PCR 抑制物质，提高了畜禽类食品中空肠弯曲菌的检出率和灵敏度；荧光 PCR 特异性地扩增空肠弯曲菌 flaA 基因和 hipO 基因，免疫磁珠吸附的其它杂菌不会干扰 PCR 结果，解决了亲缘关系很近的空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的鉴别难题。

## 附图说明

图 1 为 flaA 引物及荧光探针的实时 PCR 特异性试验结果。其中各条曲线表示：  
1. 空肠弯曲菌 ATCC33560, Ct=23.248; 2. 空肠弯曲菌 ATCC8341, Ct=27.147; 3. 空肠弯曲菌 XMIQ030516, Ct=29.196; 4. 灭菌超纯水, Ct=40.00; 5. 埃希氏大肠杆菌, Ct=40.00; 6. 鼠伤寒沙门氏菌, Ct=40.00; 7. 结肠弯曲菌, Ct=40.00; 8. 单核细胞增生李斯特菌, Ct=40.00; 9. 宋氏志贺氏菌, Ct=40.00。

图 2 为 hipO 引物及荧光探针的实时 PCR 特异性试验结果。其中各条曲线表示：

1. 空肠弯曲菌 ATCC33560, Ct=21.344; 2. 空肠弯曲菌 ATCC8341, Ct=16.348; 3. 空肠弯曲菌 XMIQ030516, Ct=16.147; 4. 空肠弯曲菌 XMIQ030827, Ct=22.796; 5. 灭菌超纯水, Ct=40.00; 6. 埃希氏大肠杆菌, Ct=40.00; 7. 结肠弯曲菌, Ct=40.00。

图 3 为磁捕获-荧光 PCR 检测混合菌结果。其中各条曲线表示：1. hipO 引物及探针的 PCR 扩增, Ct=18.766; 2. flaA 引物及探针的 PCR 扩增, Ct=22.038; 3. 灭菌超纯水, Ct=40.00。

图 4 为磁捕获-荧光 PCR (hipO 引物及探针) 检测实物样品结果。其中各条曲线表示：1. 实物样品-3, Ct=17.432; 2. 实物样品-5, Ct=19.021; 3. 空肠弯曲菌 ATCC33560, Ct=19.011; 4. 结肠弯曲菌, Ct=40.000。

## 具体实施方式

下面通过具体实施例对本发明作进一步说明。

本发明首先是用抗弯曲菌免疫磁珠直接捕获检样中的空肠弯曲菌,磁捕获方法分离空肠弯曲菌特异性高且时间短。磁捕获方法分离空肠弯曲菌采用以下步骤:

1. 免疫磁珠的制备:取磁珠液于磷酸缓冲液(PBST)中,混匀,2000~5000rpm 离心 2~5min,弃液体;重复清洗 2~3 次后,加入 PBST 使磁珠重悬其中;加入弯曲菌免疫血清,4℃轻缓旋转振荡 15~25h;同上清洗 3~5 次后,加入 PBST 使磁珠重悬其中,制备的免疫磁珠悬液于 4℃保存备用。

2. 空肠弯曲菌的捕获:无菌操作取检样至蛋白胨水中,轻缓振荡 20~30 min;取检样上清液于 2000~3000rpm 离心 2~5min,上清液再次于 3000~5000rpm 离心 15~30min,弃液体,沉淀重悬于 PBST 中;取检样悬液于装有免疫磁珠悬液的小管中,室温轻缓旋转振荡 20~30min;将小管置于磁场旁 1~3min,小心移出管中液体;加入 PBST 混匀,置于磁架或磁场旁 3min,移出液体;重复清洗 3~5 次,加入灭菌超纯水使吸附弯曲菌的磁珠重悬其中。取弯曲菌磁珠悬液,100℃水浴 10min,3000~5000rpm 离心 5~10min,即可获得空肠弯曲菌。

设计用于检测空肠弯曲菌的两组引物与探针。第一组探针针对 flaA 基因,其引物为 flaA1: 5'-ctgaatttgataccttaagtgcagc-3'和 flaA2: 5'-aggcagcctaataacctatagct-3',探针为 5'-tgtgaaagaatttatcctaagatgagcaaggaga-3';第二组针对 hipO 基因,其引物为 hipO1: 5'-tgctcttactgtgtggcttt-3'和 hipO2: 5'-gctcctatgcttacaactgctgaatt-3',探针

为 5'- caaagcatagtagtctcgcaatggtgatcccc-3'。所有探针的 5'端标记荧光报告基团，3'端标记荧光淬灭基团，二者可构成能量传递结构。

3. DNA 扩增及实时荧光 PCR 检测。荧光 PCR 扩增反应体系含有：10×PCR 缓冲液，MgCl<sub>2</sub>，dNTP（dATP，dGTP，dCTP，dUTP），flaA 基因引物和/或 hipO 基因引物，TaqMan 探针，DNA 糖基化酶（UNG 酶），DNA 聚合酶（Taq 酶），细菌 DNA 模板，灭菌超纯水。扩增或检测时可单独针对 flaA 基因，也可单独针对 hipO 基因，也可同时扩增或检测两个基因，即要扩增或检测某个基因，就加入相应的引物及探针。荧光 PCR 扩增反应条件为 50°C/2min，预变性 95°C/10min；而后 95°C/15s，55°C/60s，共 40 个循环，不同仪器应将反应参数作适当调整。检测时可设立阳性对照如：空肠弯曲菌 ATCC33560，阴性对照如：结肠弯曲菌和灭菌超纯水的空白对照。反应结束后，打开分析软件，仪器自动给出每个检样的循环阈值（Ct 值），依据所得 Ct 值对检样进行结果判定。

#### 具体实施方式

##### 免疫磁珠的制备与空肠弯曲菌 DNA 的获取

取 0.1mL 磁珠液（DynaI 公司生产的 Dynabeads M-280 Sheep anti - Rabbit IgG）于 1.0mL PBST 缓冲液中，混匀，3000rpm 离心 2min，弃液体；重复清洗 2~3 次后，加入 1.0mL PBST 缓冲液使磁珠重悬其中；加入 0.1mL 弯曲菌免疫血清，4°C 轻缓旋转振荡 18h；用 1.0mL PBST 缓冲液清洗 3~5 次后，加入 0.5mL PBST 缓冲液使磁珠重悬其中，制备的免疫磁珠悬液于 4°C 保存备用。无菌操作取检样至 50mL 蛋白胨水中，轻缓振荡 30min；取检样上清液于 3000rpm 离心 2min，上清液再次于 5000rpm 离心 20min，弃液体，沉淀重悬于 1.0mL PBST 缓冲液中；取检样悬液于装有 0.1mL 免疫磁珠悬液的小管中，室温轻缓旋转振荡 30min；将小管置于 Dynal MPC-S 磁架上 3min，小心移出管中液体；加入 1.0mL PBST 缓冲液混匀，置于磁架上 3min，移出洗液；重复清洗 3~5 次，加入 0.1mL PBST 缓冲液使吸附弯曲菌的磁珠重悬其中。取 50 μL 弯曲菌磁珠悬液于 0.5mL 离心管中，100°C 水浴 10min，5000rpm 离心 5min，上清液于 -20°C 条件下保存备用。

设计用于检测空肠弯曲菌的两组引物与探针。第一组探针针对 flaA 基因，其引物为 flaA1: 5'-ctgaatttgataccttaagtgcagc-3' 和 flaA2: 5'-aggcagcgcctaacctatagct-3'，探针为 5'-tgtgaaagaatttatcctaaagatgagcaaggaga-3'；第二组针对 hipO 基因，其引物为 hipO1: 5'-tgcttcttacttggttggtt-3'和 hipO2: 5'-gctcctatgcttacaactgctgaatt-3'，探针为 5'- caaagcatagtagtctcgcaatggtgatcccc-3'。

### 实施例 1

#### 扩增及检测空肠弯曲菌 *flaA* 基因的实时荧光 PCR

取空肠弯曲菌 ATCC33560、空肠弯曲菌 ATCC8341、空肠弯曲菌 XMIQ030516、埃希氏大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、结肠弯曲菌、单核细胞增生李斯特菌、宋氏志贺氏菌的 DNA 及灭菌超纯水各 2 $\mu$ L，取合成的 *flaA* 引物 1/2 及探针各 0.2 $\mu$ L，按照前述的步骤 3 “DNA 扩增及实时荧光 PCR 检测” 中的反应体系及条件进行扩增及检测试验，结果如图 1 所示，多份空肠弯曲菌 DNA 均显示阳性结果（图 1 中曲线 1~3）；而其它菌株 DNA 均显示阴性结果，其中包括属内同源程度极高的结肠弯曲菌（图 1 中曲线 7）。结果表明，*flaA* 引物及荧光探针对空肠弯曲菌检测特异性高，能有效地鉴别空肠弯曲菌和结肠弯曲菌。

### 实施例 2

#### 用于检测空肠弯曲菌 *hipO* 基因的实时荧光 PCR

取空肠弯曲菌 ATCC33560、空肠弯曲菌 ATCC8341、空肠弯曲菌 XMIQ030516、空肠弯曲菌 XMIQ030827、埃希氏大肠杆菌、结肠弯曲菌 DNA 及灭菌超纯水各 2 $\mu$ L，取合成的 *hipO* 引物 1/2 及探针各 0.2 $\mu$ L，按照前述的步骤 3 “DNA 扩增及实时荧光 PCR 检测” 中的反应体系及条件进行扩增及检测试验，结果如图 2 所示，多份空肠弯曲菌 DNA 均显示阳性结果（图 2 中曲线 1~4）；而其它菌株 DNA 均显示阴性结果，其中包括属内同源程度极高的结肠弯曲菌（图 2 中曲线 6）。结果表明，*hipO* 基因引物及荧光探针对空肠弯曲菌检测特异性高，能有效地鉴别空肠弯曲菌和结肠弯曲菌。

### 实施例 3

#### 磁捕获-荧光 PCR 检测混合菌

由于实际检样中可能同时带有多种细菌，本实施例对多种混合菌进行实验，针对含有单核细胞增生李斯特菌、绵羊李斯特菌、英诺克李斯特菌、宋氏志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、腊样芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌、豚鼠气单胞菌、溶藻弧菌、绿脓杆菌、嗜水气单胞菌、埃希氏大肠杆菌、结肠弯曲菌和空肠弯曲菌 ATCC33560 等 16 种细菌的混合样品，细菌磁捕获及 DNA 提取方法按照实施例 1 进行，采用实施例 2 和 3 的步骤检测空肠弯曲菌的 *flaA* 及 *hipO* 基因，结果如图 3 所示，

磁捕获-荧光 PCR 检测方法能抵抗其它细菌干扰,从含有混合菌的样品中检出空肠弯曲菌,排除了包括结肠弯曲菌在内的多种细菌干扰,显示出良好的特异性和抗干扰性,具有实际的应用价值。

#### 实施例 4

##### 磁捕获-荧光 PCR 方法检测实物样品

采集畜禽类实物样品,弯曲菌的磁捕获及 DNA 提取方法按照前述的步骤进行,本实施例只检测空肠弯曲菌的 *hipO* 基因,*hipO* 引物和探针的设计合成及 *hipO* 基因的荧光 PCR 检测与实施例 3 相同,从 27 份实物样品中检出 2 份样品含有空肠弯曲菌,结果显示见图 4。

本方法利用抗弯曲菌免疫磁珠直接捕获检样中的目的菌,磁珠捕获的细菌进行 DNA 抽提;通过荧光 PCR 技术分别检测空肠弯曲菌的鞭毛蛋白 A (*flaA*) 基因和马尿酸酶 (*hipO*) 基因。本方法采用的磁捕获结合荧光 PCR 技术,提高了畜禽类食品中空肠弯曲菌的检出率和灵敏度,解决了亲缘关系很近的空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的鉴别难题,达到了准确、快速、灵敏的要求。

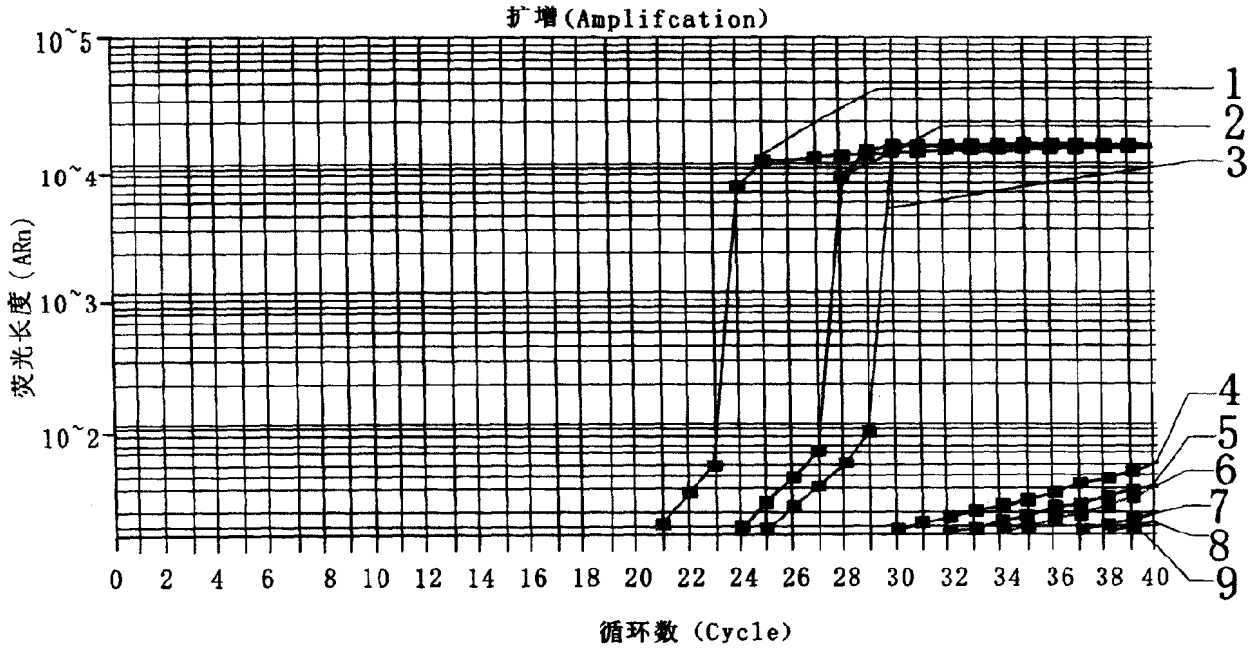


图1

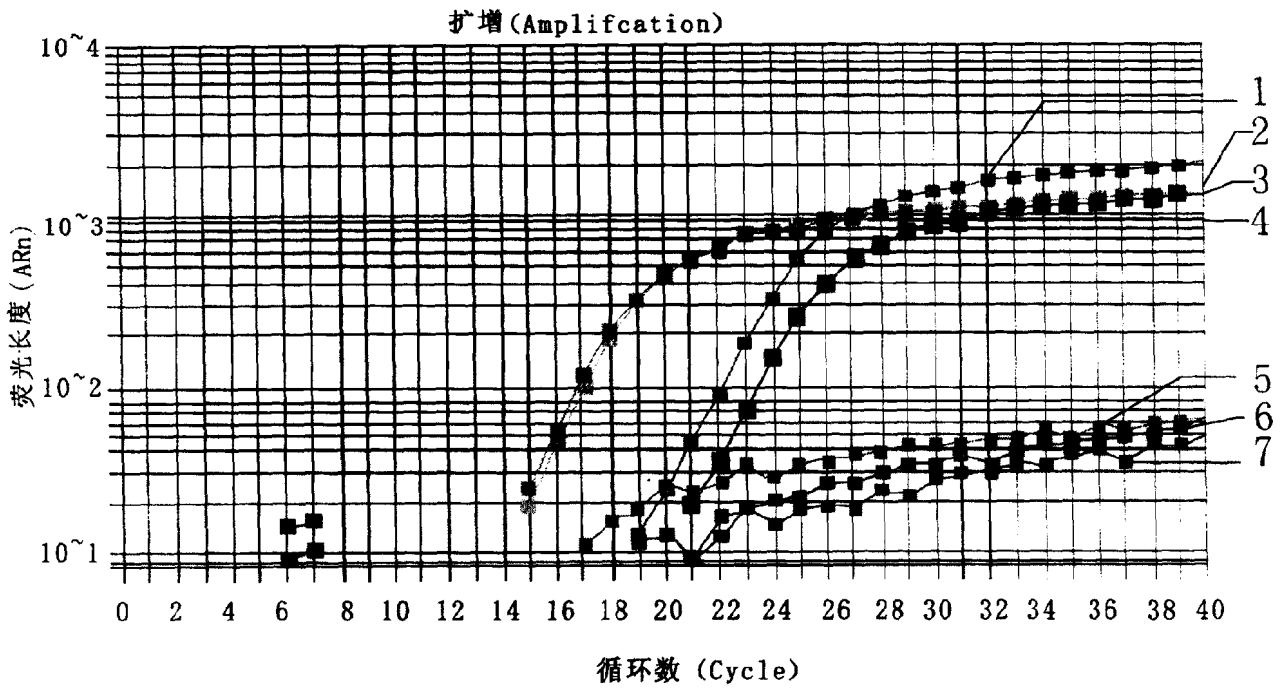


图2

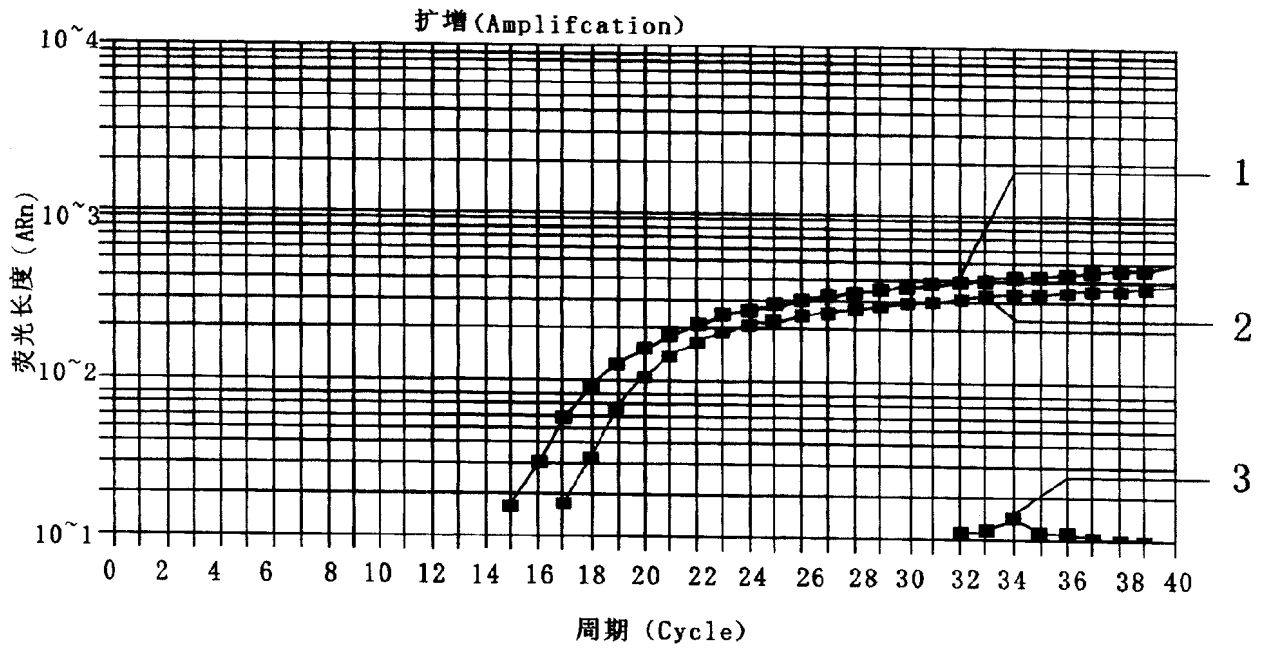


图3

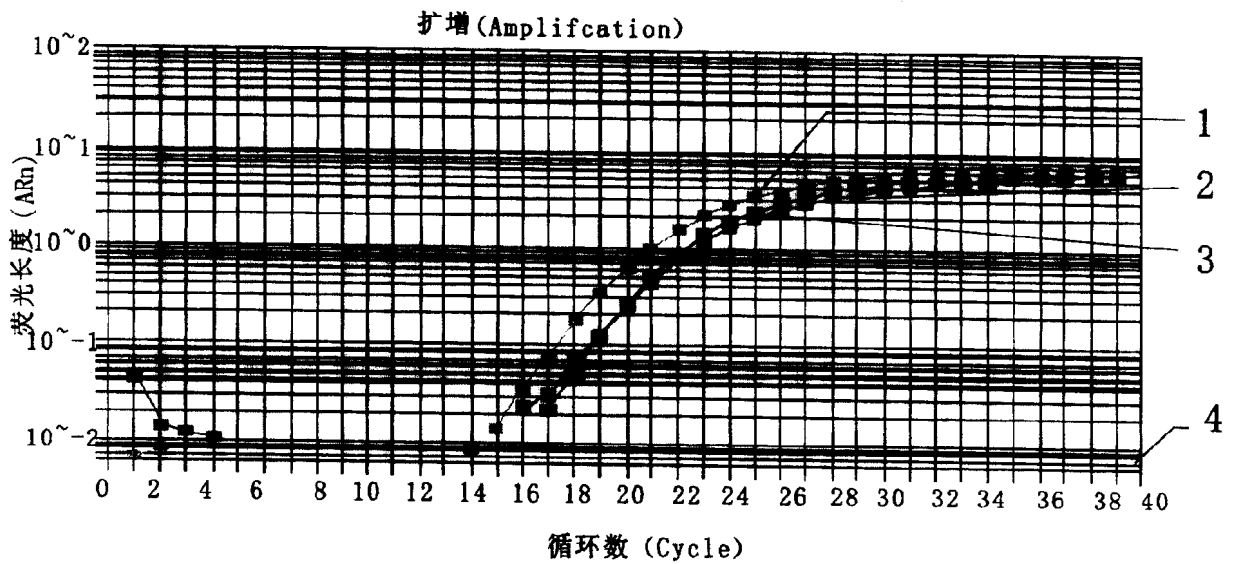


图4

专利名称(译)	一种检测空肠弯曲菌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN100342033C</a>	公开(公告)日	2007-10-10
申请号	CN200410051081.4	申请日	2004-08-13
[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	刘光明 韩雅莉 章跃陵		
发明人	刘光明 韩雅莉 章跃陵		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N21/76 G01N33/52 G01N33/533		
代理人(译)	温旭		
审查员(译)	赵晓宇		
其他公开文献	CN1598544A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及空肠弯曲菌的荧光PCR检测，提供一种空肠弯曲菌的实时荧光PCR检测方法，应用抗血清和磁性微珠制备空肠弯曲菌免疫磁珠，利用免疫磁珠直接捕获检样中的空肠弯曲菌，煮沸法提取空肠弯曲菌的DNA，设计合成用于扩增空肠弯曲菌鞭毛蛋白A(flA)基因的引物与探针和/或空肠弯曲菌的马尿酸酶(hipO)基因的引物与探针，通过荧光PCR技术检测得到扩增产物的荧光信号；其中flA基因的引物序列为flaA1：5'-ctgaattgatacctaagtgcagc-3'/flaA2：5'-aggcagcctaaccctatagct-3'，探针序列为5'-tgtgaagaattatcctaagatgagcaaggaga-3'；hipO基因引物序列为hipO1：5'-tgctcttactgtgtggcttt-3'/hipO2：5'-gctcctatgcttacaactgctgaatt-3'，探针序列为5'-caaagcatagtatctcgcaatgtgatcccc-3'，本发明为畜禽等食品中的空肠弯曲菌的检测提供快捷方法。

