

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 21/76

G01N 33/52 G01N 33/533



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410051081.4

[43] 公开日 2005 年 3 月 23 日

[11] 公开号 CN 1598544A

[22] 申请日 2004.8.13

[21] 申请号 200410051081.4

[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 刘光明 韩雅莉 章跃陵

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

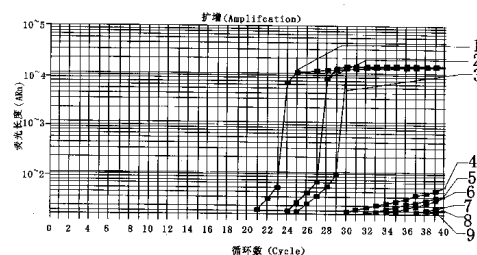
代理人 温 旭

权利要求书 1 页 说明书 7 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' - ctgaattgataccttaagtgcage - 3' /flaA2: 5' - aggcacgcctaaacctatagct - 3'，探针序列为 5' - tgtgaagaatttatcctaagatgagcaaggaga - 3' hipO 基因引物序列为 hipO 1: 5' - tgctcttactgtgtggttt - 3' /hipO2: 5' - gctcctatgctta-caactgctgaatt - 3'，探针序列为 5' - caaagcatag-tatctcgcaatgttgatcccc - 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。



1、一种检测空肠弯曲菌的方法，利用抗血清免疫磁珠直接捕获检样中的空肠弯曲菌，磁珠捕获的细菌进行DNA抽提，其特征在于：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相应的荧光信号；其中flaA基因的引物序列为flaA1：5'-ctgaattgataccttaagtgcagc-3' / flaA2：5'-aggcagcctaaacctatagct-3'，探针序列为5'-tgtgaaagaatttatcctaaagatgagcaaggaga-3'；hipO基因引物序列为hipO1:5'-tgcttctttacttggtggtgcttt-3' / hipO2:5'-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荧光 PCR 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空肠弯曲菌，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 技术检测得到扩增产物的荧光信号。

其中 flaA 基因的引物序列为 flaA1: 5'-ctgaattgataccttaagtgcagc-3' 及 flaA2 : 5'-aggcagcctaataacctatagct-3' , 探 针 为 5'-tgtgaaagaatttatcctaagatgagcaaggaga-3'; hipO 基因的引物序列为 hipO1: 5'-tgcttcttactgttggtgcttt-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。

本发明的要点在于设计合成用于扩增及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' / *flaA2*: 5'-aggcagcctaataacctatagct-3', 探针为 5'-tgtgaaagaatttatcctaaagatgagcaaggaga-3'; 第二组针对 *hipO* 基因, 其引物为 *hipO1*: 5'-tgcttcttacttggttggtt-3' / *hipO2*: 5'-gctcctatgcttacaactgctgaatt-3', 探针为 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。

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, MgCl₂, 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℃/2min, 预变性 95℃/10min; 而后 95℃/15s, 55℃/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。

免疫磁珠的制备与空肠弯曲菌 DNA 的获取

取 0.1mL 磁珠液 (Dynal 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 μ L 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。

合成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' / flaA2: 5'-aggcacgcctaaacctatagct-3', 探针为 5'-tgtgaaagaatttatcctaaagatgagcaaggaga-3'; 第二组针对 hipO 基因, 其引物为 hipO1: 5'-tgcttcttactgtgtggctt-3' / hipO2: 5'-gctcctatgcttacaactgctgaatt-3', 探针为 5'-caaagcatagtatctcgcaatgttgatcccc-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 μ L, 取合成的 flaA 引物 1/2 及探针各 0.2 μ 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 均显示阳性结果见图 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见图 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 μ L，取合成的 hipO 引物 1/2 及探针各 0.2 μ 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 均显示阳性结果见图 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见图 A2 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。

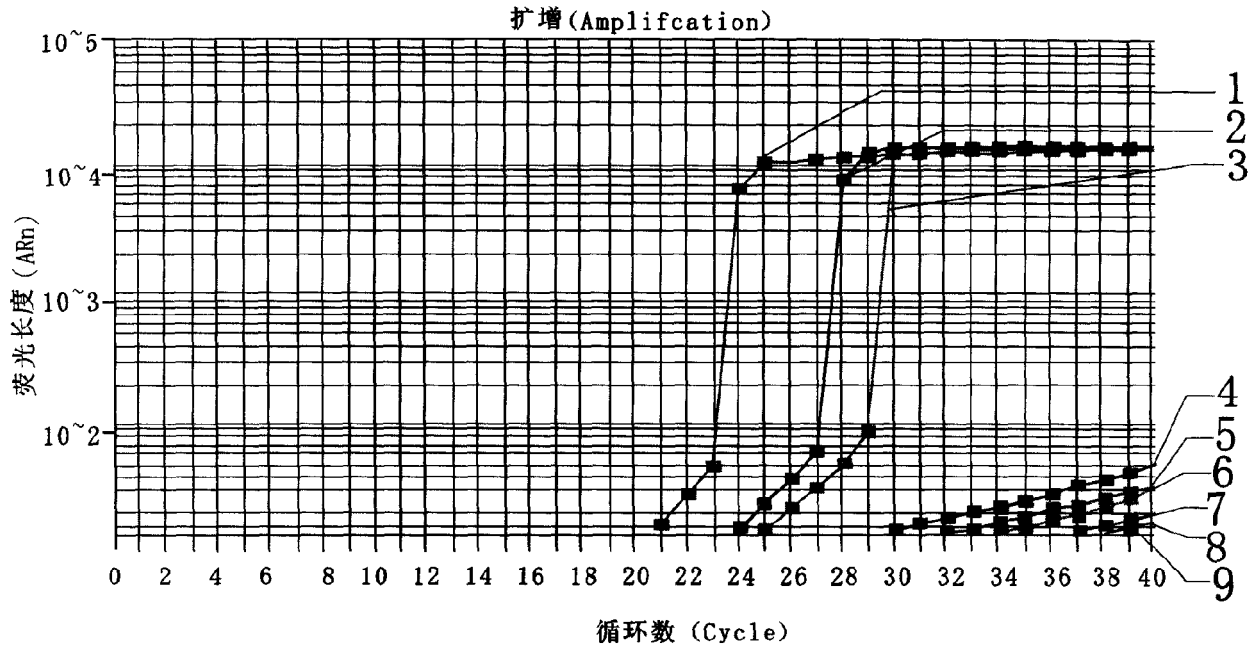


图1

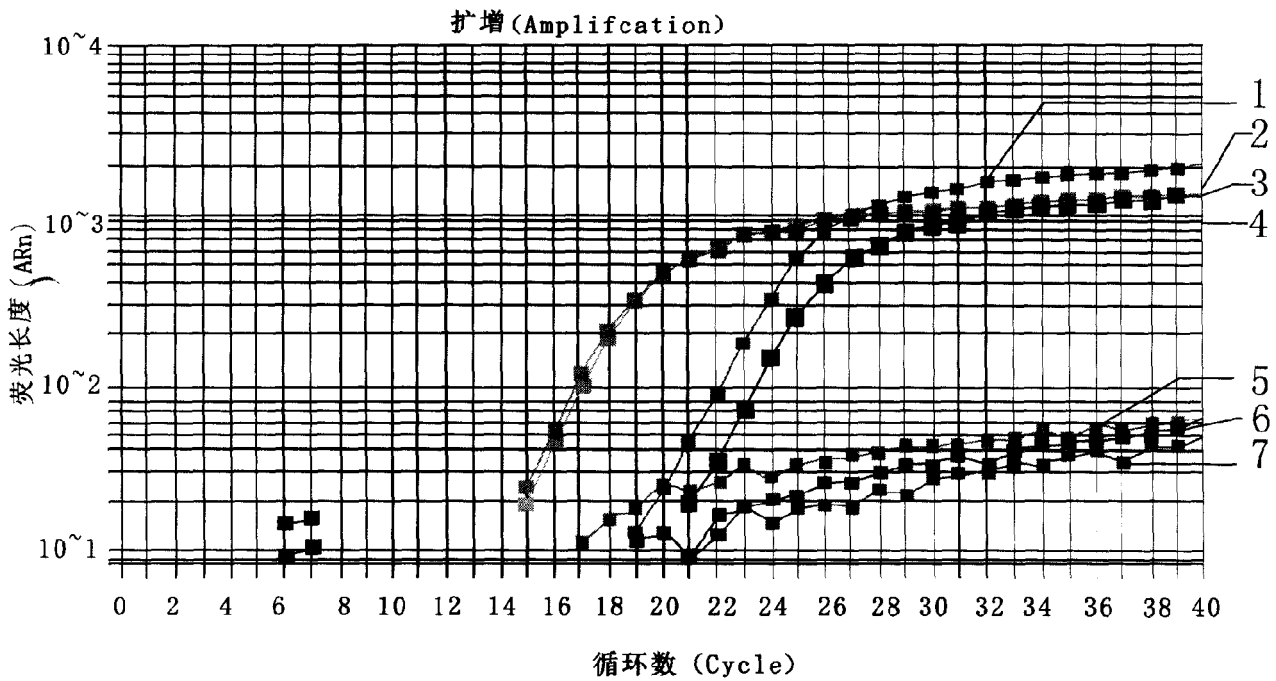


图2

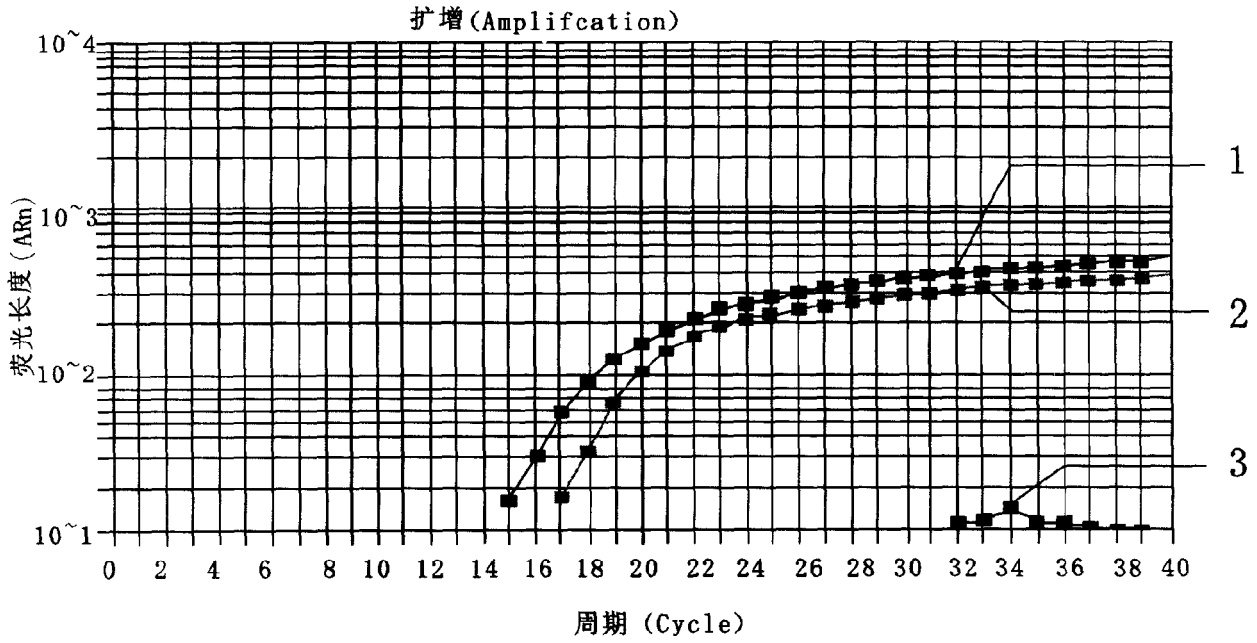


图3

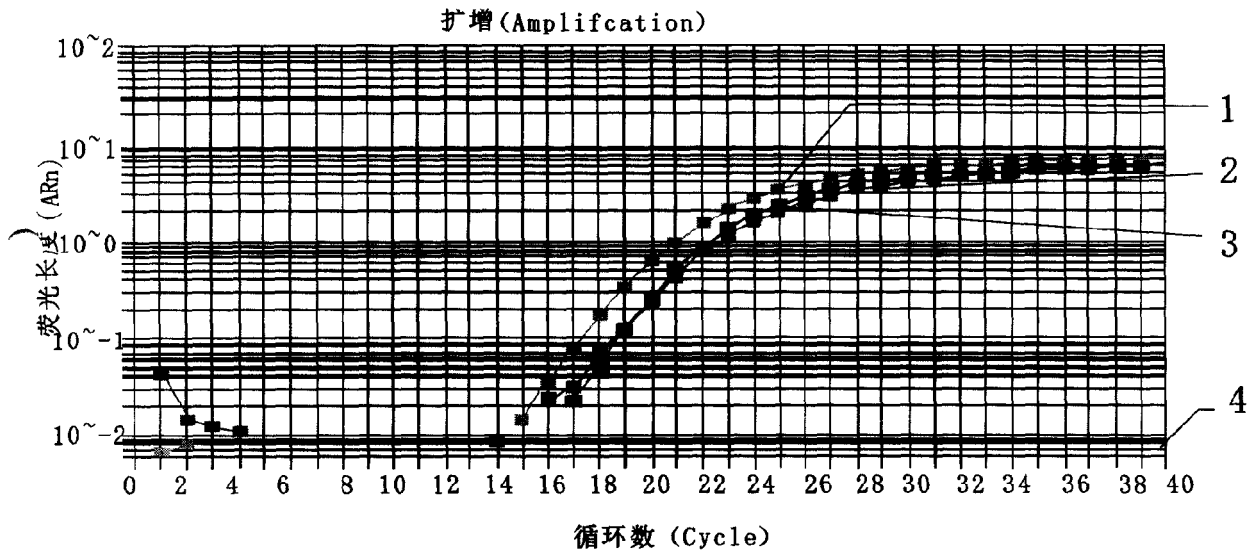


图4

专利名称(译)	一种检测空肠弯曲菌的方法		
公开(公告)号	CN1598544A	公开(公告)日	2005-03-23
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	G01N21/76 G01N33/52 G01N33/533		
代理人(译)	温旭		
其他公开文献	CN100342033C		
外部链接	Espacenet SIPO		

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(flalA)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flalA基因的引物序列为flalA1：5'-ctgaatttgataccttaagtgcagc-3'/flalA2：5'-aggcagcgctaaacctatagct-3'，探针序列为5'-tgtaaagaattatcctaagatgagcaaggaga-3'hipO基因引物序列为hipO1：5'-tgcttcttactgtgtggcttt-3'/hipO2：5'-gctcctatgctacaactgctgaatt-3'，探针序列为5'-caaagcatagtatctcgcaatgttgatcccc-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。

