

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12Q 1/68

G01N 33/569

G01N 33/535



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410072705.0

[43] 公开日 2005 年 7 月 6 日

[11] 公开号 CN 1635155A

[22] 申请日 2004.11.11

[21] 申请号 200410072705.0

[71] 申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路 94 号

[72] 发明人 黄熙泰 刘寅 蔡小宁 杨晓川

[74] 专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理事  
务所

代理人 解松凡

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称 运用分子杂交 - 酶联免疫显色技术  
检测坂崎肠杆菌的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种运用分子杂交 - 酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 的方法, 属于细菌检测技术, 特别是运用分子杂交方法检测致病细菌的技术。其技术方案是, 用 PCR 方法扩增待测细菌的 16s 和 23s rRNA 基因间区序列, 并用地高辛标记 PCR 产物, 然后与设计的一组特异性寡核苷酸探针杂交, 经酶联免疫显色后, 可以精确地判断待测样品中是否含有坂崎肠杆菌。该方法的优点是, 省去了重复的细菌培养筛选环节, 节约时间; 分子杂交鉴定方法不受培养条件和细菌生理状态的影响, 较生理生化鉴定方法更为准确。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种运用分子杂交—酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法，其特征在于，所设计的特异性寡核苷酸探针序列如下：

探针序列一：GCTGCTGCATTTCTCCGTAATAAGGAATGCGCGGTGTGT

探针序列二：CAGAGTCTCTCAAACCTCGCAGCACGAA GACTTCTTC

探针序列三：GTAAAGAAGCAGGGTTGTCTGCGAAAGCGAAGTC

探针序列四：GCGAAAGCGAAGTCCCTTTCGTCTAGAGGCCAGGACA

探针序列五：ACTCCGCAGGAGTTGAAGAGGTTAACTACG

探针序列六：TGCAAGATACAACCCCGCAGGAGTTGAAGAGG

2. 根据权利要求1所述的运用分子杂交—酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法，其特征在于，用PCR方法扩增待测样品中全部原核微生物的16s和23s rRNA基因间区的DNA片段，然后对扩增片段进行地高辛标记，PCR引物的核苷酸序列如下：

引物序列一：GCTCGTGTNGTGANATGTTGCCA

引物序列二：GCGATTCYGAATGGGGRAAGGG

其中N代表4种碱基中的任意一种；Y代表碱基C或T中的任意一个；R代表碱基A或G中的任意一个。

3. 根据权利要求1所述的运用分子杂交—酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法，其特征在于，还包括由上述6条探针序列衍生出来的、差别不大于8个碱基的寡核苷酸序列以及每个序列的反义互补序列，或它们的变体，或它们的部分序列，或由上述几条序列的全部或部分拼接的序列。

4. 根据权利要求1所述的运用分子杂交—酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：

(1) 设计特异性寡核苷酸探针，用于核酸分子杂交检测；

(2) PCR扩增待测样品中全部原核微生物的16s和23s rRNA基因间区的DNA片段，然后进行地高辛标记；

(3) 将寡核苷酸探针和地高辛标记的PCR产物进行分子杂交；

(4) 杂交结果通过酶联免疫显色技术显色；

(5) 显色结果用肉眼观察，可发现对坂崎肠杆菌进行杂交的特异性探针显色。

5. 根据权利要求4所述的运用分子杂交—酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法，其特征在于PCR反应体系中各组分构成比例如下：

成分	浓度	加样量
PCR 缓冲液	10 倍	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	20mmol/	5 $\mu$ L
Taq DNA 聚合酶	5u/ $\mu$ L	0.3 $\mu$ L
引物序列一	10 $\mu$ mol/L	2 $\mu$ L
引物序列二	10 $\mu$ mol/L	2 $\mu$ L
dNTPs	每种 10mmol/L	0.3 $\mu$ L
DIG-dUTP	1mmol/L	0.3 $\mu$ L
DNA 样品		2 $\mu$ L
双蒸水		33.1 $\mu$ L
总体积		50 $\mu$ L

6. 根据权利要求4所述的运用分子杂交—酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法，其特征在于，PCR方法中扩增程序为：

- 1) 95°C 10min
- 2) 95°C 30s
- 3) 55°C 20s
- 4) 72°C 30s
- 5) 95°C 30s, 重复 5 次
- 6) 95°C 30s
- 7) 68°C 30s
- 8) 95°C 30s, 重复 25 次
- 9) 72°C 2min

7. 根据权利要求 4 所述的一种运用分子杂交-酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法, 其特征在于, 将浓度为 1mmol/L 的寡核苷酸探针溶液 0.1 $\mu$ L 点在带有正电荷的尼龙膜上, 在长波紫外灯下交联 5-10min。

8. 根据权利要求 4 所述的的一种运用分子杂交-酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法, 其特征在于, PCR 产物的地高辛标记及其与寡核苷酸探针的杂交, 方法如下:

\* 预杂交

预杂交液先预热到杂交温度 (50°C), 把点入寡核苷酸探针的尼龙膜放入塑料袋中, 加入预杂交液, 封好口, 50°C 预杂交 30min。

\* PCR 扩增产物的热变性

地高辛标记的 PCR 产物加热到 95°C, 10min, 然后插入冰浴中冷却。

\* 地高辛标记的靶 DNA 分子与尼龙膜上的探针 DNA 杂交

把预杂交好的尼龙膜装入塑料袋, 加入变性的地高辛标记的 PCR 产物 10 $\mu$ L, 再加入 1 mL 杂交液, 封好口, 50°C 杂交 1 h, 温和搅动。

9. 根据权利要求 1 所述的运用分子杂交-酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法, 其特征在于, 由本发明设计的 6 条专一性寡核苷酸探针在基因芯片检验坂崎肠杆菌中的应用。

## 运用分子杂交—酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法

### 技术领域

本发明涉及一种细菌检验技术，具体地讲是运用分子杂交—酶联免疫显色方法检测致病细菌，特别是坂崎肠杆菌的技术。

### 背景技术

坂崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 是革兰氏阴性细菌，属肠杆菌科肠杆菌属。1980 年被命名为坂崎肠杆菌前该菌被称为产黄色素阴沟肠杆菌。是临床上很少见的病原菌，其引起的脑膜炎、败血症、坏死性小肠结肠炎在全世界范围内均有报告。并有不断增多的趋势，大多数病例发生在婴幼儿，而且病程短，在一些情况下病死率达 80%。虽然坂崎肠杆菌的传染源不很清楚，但婴儿配方奶粉起到了传播媒介的作用。特别是 2002 年 11 月 26 日国家质检总局发布公告 2002 年第 120 号。主要内容是暂停办理美国惠氏公司生产的某些批号的配方奶粉的报检通关和相关的检验检疫手续，对已进口的相关产品进行监督销毁处理，原因是美国食品与药品管理局 (FDA) 在上述产品中检出坂崎肠杆菌。

### 发明内容

目前我国尚没有食品中和临床上检测坂崎肠杆菌的标准方法，美国 FDA 2002 年 8 月发布的坂崎肠杆菌分离计数方法，依然沿用了“三管”增菌法检测坂崎肠杆菌。需要经过前增菌、分离培养、生化鉴定等经典的检验方法检测目标菌。试验时间长，处理样品量小，而且灵敏度和特异性都相对较低。针对上述情况，本发明克服了现有技术中的缺点，提供了一种运用分子杂交技术检测坂崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 的方法。

本发明的技术方案如下：

1. 探针设计：根据坂崎肠杆菌 16s 和 23s rRNA 基因间区的 DNA 序列，设计 6 条特异性寡核苷酸探针，其序列如下。

探针序列一：GCTGCTGCATTTCTCCGTAATAAGGAATGCGCGGTGTGT

探针序列二：CAGAGTCTCTCAAACCTCGCAGCACGAA GACTTCTTC

探针序列三：GTAAAGAAGCAGGGTTGTCTGCGAAAGCGAAGTC

探针序列四：GCGAAAGCGAAGTCCCTTTCGTCTAGAGGCCAGGACA

探针序列五：ACTCCGCAGGAGTTGAAGAGGTTTAACTACG

探针序列六：TGCAAGATACAACCCCGCAGGAGTTGAAGAGG

2. PCR 引物设计和靶 DNA 序列的扩增：用 PCR 方法扩增待测样品中全部原核微生物的 16s 和 23s rRNA 基因间区的 DNA 片段，PCR 引物的核苷酸序列如下。

引物序列一：GCTCGTGTNGTGANATGTTGCCA

引物序列二：GCGATTTCYGAATGGGGRAAGGG

其中 N 代表 4 种碱基中的任意一种； Y 代表碱基 C 或 T 中的任意一个； R 代表碱基 A 或 G 中的任意一个。

PCR 反应体系中各组分构成比例如下：

成分	浓度	加样量
PCR 缓冲液	10 倍	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	20mmol/	5 $\mu$ L
Taq DNA 聚合酶	5u/ $\mu$ L	0.3 $\mu$ L
引物序列一	10 $\mu$ mol/L	2 $\mu$ L
引物序列二	10 $\mu$ mol/L	2 $\mu$ L

dNTPs	每种	10mmol/L	0.3 μL
DIG-dUTP		1mmol/L	0.3 μL
DNA 样品			2 μL
双蒸水			33.1 μL
总体积			50 μL

PCR 扩增程序为:

- 1) 95°C 10min
- 2) 95°C 30s
- 3) 55°C 20s
- 4) 72°C 30s
- 5) 95°C 30s, 重复 5 次
- 6) 95°C 30s
- 7) 68°C 30s
- 8) 95°C 30s, 重复 25 次
- 9) 72°C 2min

3. PCR 扩增产物的地高辛标记: 按照 Roche 公司地高辛标记与检测试剂盒的使用说明, 对从待测样品中扩增出的 16s 和 23s rRNA 基因间区 DNA 片段进行地高辛标记。

(1) 设计特异性寡核苷酸探针, 用于核酸分子杂交检测;

(2) PCR 扩增待测样品中全部原核微生物的 16s 和 23s rRNA 基因间区的 DNA 片段, 然后进行地高辛标记;

4. 寡核苷酸探针与地高辛标记的 PCR 产物的分子杂交: 将浓度为 1mmol/L 的寡核苷酸探针溶液 0.1 μL 点在尼龙膜上, 在长波紫外灯下交联 5-10min, 然后与地高辛标记的 PCR 产物杂交, 方法如下。

预杂交: 预杂交液先预热到杂交温度 (50°C), 把点入寡核苷酸探针的尼龙膜放入塑料袋中, 加入预杂交液, 封好口, 50°C 预杂交 30min。

PCR 扩增产物的热变性: 地高辛标记的 PCR 产物加热到 95°C, 保持 10min, 然后插入冰浴中冷却。

DNA 杂交: 把预杂交好的尼龙膜装入塑料袋, 加入变性的地高辛标记的 PCR 产物 10 μL, 再加入 1 mL 杂交液, 封好口, 按照 Roche 公司地高辛标记与检测试剂盒的使用说明, 于 50°C 杂交 1 h。杂交结果通过酶联免疫显色技术显色, 用肉眼观察, 可发现能与坂崎肠杆菌 PCR 产物进行杂交的特异性探针显示出蓝色杂交斑点。

与现有技术相比, 本发明的有益效果是: 该方法具有检测准确、特异性强的特点, 可以快速、准确的鉴定特异的目标细菌。首先, 避免了反复培养, 节约时间; 而且 DNA-DNA 杂交鉴定方法较生理生化的鉴定方法更为准确, 不受培养条件和细菌生理状态的影响。本发明填补了使用 DNA 分子杂交方法进行坂崎肠杆菌检测的空白。

#### 附图说明

图 1 某进口品牌婴儿配方奶粉的 DNA 杂交结果

图 2 某品牌出口鱼肉粉的 DNA 杂交结果

图 3 某品牌进口狗咬胶的 DNA 杂交结果

#### 具体实施方式

##### 实施例 1

样本: 某进口品牌婴儿配方奶粉, 常规微生物培养和生化检测出坂崎肠杆菌疑似菌落。

### 1. DNA 抽提

取增菌液 1mL 在冰浴中静置 5 分钟, 然后在室温下 12000 r/min, 离心 5min, 弃去上清液, 加入 100  $\mu$ L 溶菌酶溶液, 37 $^{\circ}$ C 保温 10min, 补加 TE 缓冲液 500  $\mu$ L, 振荡混匀。加等体积 Tris 饱和酚 (pH8.0), 强烈振荡, 12000 r/min, 离心 3min, 吸取上清液, 重复酚抽提。吸取上清液, 加入 0.1 倍体积的乙酸钠 (2mol/L), 混匀, 再加等体积的冰乙醇, 混匀后低温静置 30min, 于 12000 r/min 离心 5min。弃去上清, 加 70% 冰乙醇振荡洗涤一次, 室温下 12000 r/min, 离心 5min, 弃上清。加入 50  $\mu$ L TE 溶液, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

### 2. PCR 扩增

PCR 反应混合物成分:

成分	浓度	加样量
PCR 缓冲液	10 倍	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	20mmol/L	5 $\mu$ L
Taq DNA 聚合酶	5u/ $\mu$ L	0.3 $\mu$ L
引物序列一	10 $\mu$ mol/L	2 $\mu$ L
引物序列二	10 $\mu$ mol/L	2 $\mu$ L
dNTPs	每种 10mmol/L	0.3 $\mu$ L
DIG-dUTP	1mmol/L	0.3 $\mu$ L
DNA 样品		2 $\mu$ L
双蒸水		33.1 $\mu$ L
总体积		50 $\mu$ L

PCR 扩增条件:

- 1) 95 $^{\circ}$ C 10min
- 2) 95 $^{\circ}$ C 30s
- 3) 55 $^{\circ}$ C 20s
- 4) 72 $^{\circ}$ C 30s
- 5) 95 $^{\circ}$ C 30s, 重复 5 次
- 6) 95 $^{\circ}$ C 30s
- 7) 68 $^{\circ}$ C 30s
- 8) 95 $^{\circ}$ C 30s, 重复 25 次
- 9) 72 $^{\circ}$ C 2min

### 3. 靶 DNA 扩增产物与尼龙膜上探针的杂交

预杂交: 预杂交液先预热到杂交温度 (50 $^{\circ}$ C), 把分别点入寡核苷酸探针序列一、二、三、四的尼龙膜放入塑料袋中, 加入预杂交液, 封好口, 50 $^{\circ}$ C 预杂交 30min。

PCR 扩增产物的热变性: 地高辛标记的 PCR 产物加热到 95 $^{\circ}$ C, 保持 10min, 然后插入冰浴中冷却。

DNA 杂交: 把预杂交好的尼龙膜装入塑料袋, 加入变性的地高辛标记的 PCR 产物 10  $\mu$ L, 再加入 1 mL 杂交液, 封好口, 按照 Roche 公司地高辛标记与检测试剂盒的使用说明, 于 50 $^{\circ}$ C 杂交 1 h。杂交结果通过酶联免疫方法显色。结果表明, 尼龙膜上的 sak1、sak2、sak3 和 sak4 处均深为蓝色斑点, 此为阳性杂交结果, 表明样品中含有坂崎肠杆菌, 而阴性对照样品未出现蓝色斑点 (图 1)。

图 1 中的各个点分别是:

- (1) 阳性对照
- (2) 探针序列一
- (3) 探针序列二

(4) 探针序列三

(5) 探针序列四

(6) 阴性对照

待测样品经常规微生物培养，使用生化检测仪进行检测，结果表明被测样品 98% 为坂崎肠杆菌，其中一个菌株命名为 *fps6*。这说明用探针序列一、二、三、四对样品中坂崎肠杆菌的检测结果是可信的。

#### 实施例 2

样本：某品牌出口鱼肉粉，常规生化法检测出坂崎肠杆菌疑似菌落。

##### 1. DNA 抽提

同实施例 1。

##### 2. PCR 扩增

PCR 反应混合物的成分同实施例 1。

PCR 扩增条件：

- 1) 95°C 10min
- 2) 95°C 30s
- 3) 55°C 20s
- 4) 72°C 30s
- 5) 95°C 30s, 重复 5 次
- 6) 95°C 30s
- 7) 72°C 30s
- 8) 95°C 30s, 重复 25 次
- 9) 72°C 2min

##### 3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交

方法同实施例 1。所用寡核苷酸探针为序列三、四、五、六。杂交结果表明，尼龙膜上的 *sak3*、*sak4*、*sak5* 和 *sak6* 均出现深蓝色斑点，此为阳性杂交结果，表明样品中含有坂崎肠杆菌，而阴性对照样品未出现蓝色斑点（图 2）。

图 2 中的各个点分别是：

- (1) 阳性对照
- (2) 探针序列三
- (3) 探针序列四
- (4) 探针序列五
- (5) 探针序列六
- (6) 阴性对照

待测样品经常规微生物培养，使用生化检测仪进行检测，结果表明被测样品 100% 为坂崎肠杆菌，其中一个菌株命名为 *fis5*。这说明用探针序列三、四、五、六对样品中坂崎肠杆菌的检测结果是可信的。

#### 实施例 3

样品：某品牌进口狗咬胶，常规生化检测出坂崎肠杆菌疑似菌落。

##### 1. DNA 抽提

同实施例 1。

##### 2. PCR 扩增

PCR 反应混合物的成分同实施例 1。

PCR 扩增条件同实施例 2。

##### 3. 靶 DNA 扩增产物与尼龙膜上探针的杂交

方法同实施例 1。所用寡核苷酸探针为序列一、二、三、四。杂交结果表明，尼龙膜上的 sak1、sak2、sak3、sak4 均无蓝色斑点产生，此为阴性杂交结果，表明样品中不含有坂崎肠杆菌（图 3）。

图 3 中的各个点分别是：

- (1) 阳性对照
- (2) 探针序列一
- (3) 探针序列二
- (4) 探针序列三
- (5) 探针序列四
- (6) 阴性对照

待测样品经常规微生物培养，使用生化检测仪进行检测，结果表明被测样品 100% 为团聚肠杆菌，其中一个菌株命名为 dot3。这进一步说明，用探针序列一、二、三、四对样品中坂崎肠杆菌的检测结果是可信的。

此外，还进行了肠杆菌属和肠杆菌科道的其他细菌的对照平行实验，发现阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、团聚肠杆菌、大肠杆菌、蜂房哈夫尼亚氏菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、宋内氏志贺氏菌、肠炎沙门氏菌、肺炎克雷伯氏菌等均不产生杂交斑点。

#### 序列列表

#### SEQUENCE LISTING

<110> 南开大学

<120> 运用分子杂交—酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法

<130> 041106

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

gctgctgcat ttctccgtaa taaggaatgc gcggtgtgt 39

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(36)

<223>

<400> 2

cagagtctct caaactcgca gcacgaagac ttcttc 36

<210> 3  
 <211> 34  
  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(34)  
 <223>  
 <400> 3  
 gtaaagaagc agggttgtct gcgaaagcga agtc 34

<210> 4  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(38)  
 <223>  
 <400> 4  
 gcgaaagcga agtcaccttc gtctagagc ccaggaca 38

<210> 5  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(31)  
 <223>  
 <400> 5  
 actccgcagg agttgaagag gtttaactac g 31

<210> 6  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(32)  
 <223>  
 <400> 6  
 tgcaagatac aacccgcag gagttgaaga gg 32

<210> 7  
<211> 23

<212> DNA  
<213> 人工合成  
<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(23)  
<223>  
<400> 7

**gctcgtgtag tgacatgtg cca**

**23**

<210> 8  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工合成  
<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(23)  
<223>  
<400> 8

**gcgatttctg aatggggcaa ggg**

**23**

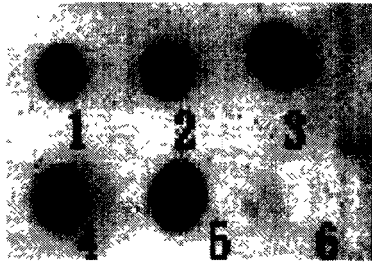


图 1

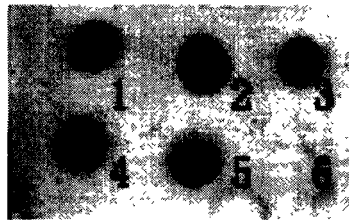


图 2

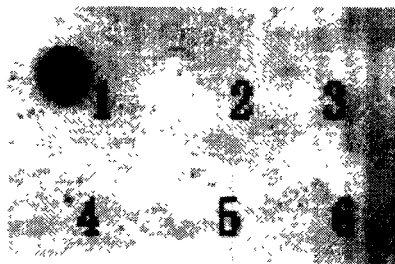


图 3

专利名称(译)	运用分子杂交 - 酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1635155A</a>	公开(公告)日	2005-07-06
申请号	CN200410072705.0	申请日	2004-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	黄熙泰 刘寅 蔡小宁 杨晓川		
发明人	黄熙泰 刘寅 蔡小宁 杨晓川		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/535 G01N33/569		
CPC分类号	Y02A50/451		
其他公开文献	CN1280429C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种运用分子杂交 - 酶联免疫显色技术检测坂崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 的方法, 属于细菌检测技术, 特别是运用分子杂交方法检测致病细菌的技术。其技术方案是, 用PCR方法扩增待测细菌的16s和23s rRNA基因间区序列, 并用地高辛标记PCR产物, 然后与设计的一组特异性寡核苷酸探针杂交, 经酶联免疫显色后, 可以精确地判断待测样品中是否含有坂崎肠杆菌。该方法的优点是, 省去了重复的细菌培养筛选环节, 节约时间; 分子杂交鉴定方法不受培养条件和细菌生理状态的影响, 较生理生化鉴定方法更为准确。

