



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108977555 A

(43)申请公布日 2018.12.11

(21)申请号 201810479077.X

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2018.05.18

G01N 33/569(2006.01)

(66)本国优先权数据

G01N 33/558(2006.01)

201810228298.X 2018.03.20 CN

G01N 33/532(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

(71)申请人 南京农业大学

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇
国家农业科技园南京农业大学基地

(72)发明人 戴建君 汤芳 王娟芳 姜敏

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 杜静 徐冬涛

(51)Int.Cl.

C12Q 1/689(2018.01)

C12Q 1/6804(2018.01)

C12Q 1/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种禽致病性大肠杆菌O78血清型的特异性
基因、检测方法及免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明提供一种禽致病性大肠杆菌O78血清型的特异性基因、检测方法及免疫层析试纸条,本发明所述的大肠杆菌O78血清型的特异性基因片段APEC-078-S,其序列如SEQ ID NO:1所示。本发明所述的特异性基因片段为399bp;本发明还提供基于PCR的此基因片段的免疫层析方法及试纸条及其应用,本发明所述方法和试纸条能更加快速、灵敏、简便、特异性地检测出禽致病性大肠杆菌O78血清型菌株。

1. 一种禽致病性大肠杆菌078血清型特异性基因或特异性基因片段APEC-078-S, 其中, 特异性基因序列如SEQ ID NO:4所示, 特异性基因片段APEC-078-S序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 扩增权利要求1所述特异性基因片段APEC-078-S的引物: SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:3。

3. 权利要求1所述的特异性基因或特异性基因片段APEC-078-S或权利要求2所述的引物在检测禽致病性大肠杆菌078血清型中的应用。

4. 一种基于PCR的检测禽致病性大肠杆菌078血清型的方法, 其特征在于包括如下步骤:

1) 提取待测菌株的基因组, 针对特异性基因或基因片段APEC-078-S设计引物进行PCR扩增, PCR扩增所用的上游引物和下游引物分别用FITC修饰和地高辛修饰;

2) 通过胶体金标记的FITC单克隆抗体和地高辛单克隆抗体进行免疫层析检测。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于步骤1) 中PCR扩增具体为: 用FITC和地高辛分别修饰的上游引物和下游引物扩增得到两端带有FITC和地高辛的DNA双链产物, 上游引物序列如SEQ ID NO:2所示, 下游引物序列如SEQ ID NO:3所示。

6. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于步骤1) 中提取大肠杆菌078血清型菌株基因组所用方法为磁性纳米粒子提取。

7. 一种基于PCR的检测禽致病性大肠杆菌078血清型的免疫层析试纸条, 其特征在于包括衬板和在衬板上依次衔接的样品垫、金标垫、包被膜和吸水垫, 所述金标垫上含胶体金标记的FITC单克隆抗体, 所述包被膜上设有用地高辛单克隆抗体印制的检测线T线和用二抗印制的控制线C线。

8. 根据权利要求7所述的试纸条, 其特征在于所述的衬板为不吸水的硬质塑胶条或硬纸条; 所述的样品垫为玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、或聚酯膜; 所述的包被膜为硝酸纤维素膜、纯纤维素膜、或羧化纤维素膜; 所述的吸水垫为吸水滤纸或滤油纸。

9. 根据权利要求7所述的试纸条, 其特征在于所述金标垫的制备方法为: 用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成胶体金溶液, 再将其与FITC抗体偶联制成胶体金标记的FITC抗体溶液, 再将所述胶体金标记的FITC抗体溶液加到玻璃纤维素膜上, 得到包被有胶体金标记的FITC抗体的金标垫; 所述胶体金标记的FITC抗体溶液的浓度优选为0.5-2mg/mL; 所述胶体金溶液中胶体金粒径优选为20-40nm。

10. 根据权利要求7所述的试纸条, 其特征在于所述包被膜上的检测线T和控制线C的制备方法, 将地高辛抗体溶液喷载于包被膜的T线, 将二抗溶液喷载于包被膜的C线上, 形成含有检测线T和控制线C的包被膜; 所述地高辛抗体溶液的浓度优选为0.5-2mg/mL; 所述二抗溶液的浓度优选为0.5-2mg/mL。

一种禽致病性大肠杆菌078血清型的特异性基因、检测方法及免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,具体涉及一种禽致病性大肠杆菌078血清型的特异性基因、检测方法及免疫层析试纸条。

背景技术

[0002] 禽致病性大肠杆菌(Avian pathogenic Escherichia coli,APEC)可以引起鸡、火鸡及其他禽类的多系统混合感染,如心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎等,甚至引起败血症而急性死亡。禽致病性大肠杆菌通过呼吸道感染禽,并可引起哺乳动物的脑膜炎,表明禽致病性大肠杆菌亦是人兽共患病的潜在病原体,对人类公共健康造成了潜在威胁。

[0003] 禽致病性大肠杆菌的血清型众多,国际上报道的致病力较强的血清型主要有01、02和078,其余血清型还有08、0145、088、020、0141等。临床上最常见的血清型为078,目前对禽致病性大肠杆菌078血清型菌株的检测报道较少,且耗时长,仪器设备较繁琐,灵敏度低。因此实现对禽致病性大肠杆菌078血清型的快速检测,对禽致病性大肠杆菌临床鉴定具有重要的意义。

[0004] 目前对大肠杆菌的检测技术主要包括DNA探针技术、荧光定量PCR、基因芯片技术、酶联免疫吸附分析法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay,ELISA)和荧光免疫测定(Fluorescent Immunoassay,FIA)等。由于这些技术需要特殊的仪器设备和专业的操作人员,对操作技术要求较高,费时费力,不能广泛应用到普通实验室及基层的临床诊断中。聚合酶链式反应(PCR)的基因检测一直深受人们喜爱,PCR是指对特定的模板DNA基因片段设计的一小段互补寡核苷酸,来模拟DNA的天然复制过程,其特异性取决于靶序列两端互补的寡核苷酸引物。通过PCR技术,可以在很短的时间内确定待检样品中是否含目的产物。但是PCR产物的普遍验证都是琼脂糖凝胶电泳,需要大型仪器,成本较高。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有检测禽致病性大肠杆菌078血清型技术的不足和缺陷,提供一种基于PCR的禽致病性大肠杆菌078血清型的共有的特异性基因、免疫层析方法及试纸条及其应用,本发明所述方法和试纸条能更加快速、灵敏、简便、特异性地检测出禽致病性大肠杆菌078血清型菌株。本发明能够快速检测出禽致病性大肠杆菌078血清型的菌株,具有灵敏度高、反应时间短、仪器设备便宜、方便易用等特点。

[0006] 本发明所述方法针对禽致病性大肠杆菌078血清型菌株共有的特异性基因片段设计引物,进行PCR扩增,并对扩增产物采用胶体金免疫层析试纸条方法进行快速检测。

[0007] 本发明的技术方案:

[0008] 本发明提供一种禽致病性大肠杆菌078血清型特异性基因,序列如SEQ ID NO:4所示。所述基因可用于大肠杆菌078血清型的特异性检测。

[0009] 本发明还提供一种大肠杆菌078血清型特异性基因片段APEC-078-S,其序列如SEQ

ID NO:1所示。本发明所述的特异性基因片段为399bp。所述基因片段可用于大肠杆菌078血清型的特异性检测。

[0010] 本发明还提供扩增特异性基因片段APEC-078-S的引物:SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:3。

[0011] 本发明还提供特异性基因或特异性基因片段APEC-078-S或引物在检测禽致病性大肠杆菌078血清型中的应用。

[0012] 本发明还提供一种基于PCR的检测禽致病性大肠杆菌078血清型的方法,包括如下步骤:

[0013] 1) 提取待测菌株的基因组,针对特异性基因或基因片段APEC-078-S设计引物进行PCR扩增,PCR扩增所用的上游引物和下游引物分别用FITC修饰和地高辛修饰;

[0014] 2) 通过胶体金标记的FITC单克隆抗体和地高辛单克隆抗体进行免疫层析检测。

[0015] 本发明步骤1)中PCR扩增具体为:用FITC和地高辛分别修饰的上游引物和下游引物扩增得到两端带有FITC和地高辛的DNA双链产物,上游引物和下游引物的序列如下:

[0016] 上游引物序列为5'-CGGAAGATAATGAGTGGGT-3'(SEQ ID NO:2);

[0017] 下游引物序列为5'-GCAACATGGAGCTAATAAAA-3'(SEQ ID NO:3)。

[0018] 本发明所述的用FITC和地高辛分别修饰的上游引物和下游引物可以为用FITC修饰上游引物、地高辛修饰下游引物的情况,还可以为用FITC修饰下游引物、地高辛修饰上游引物的情况。

[0019] 进一步的,所述PCR扩增程序为:

[0020]

95°C	5min	
95°C	30sec	} 30 个循环
47°C	40sec	
72°C	35sec	
[0021]	72°C	10min

[0022] 进一步的,所述PCR体系:MgCl₂ 2.5μL,PCR Buffer 2.5μL,2.5mM dNTPs 2μL,(购自上海生工),0.5个单位的Taq DNA聚合酶(购自上海生工),DNA模板2μL,分别取上游引物1μL和下游引物1μL,加灭菌水至总体积为25μL。

[0023] 进一步的,本发明步骤1)中提取大肠杆菌078血清型菌株基因组所用方法为磁性纳米粒子(MNPs)提取,采用这种方法提取的DNA浓度高,可以进一步提高检测的灵敏度。

[0024] 本发明还提供一种更为具体的基于PCR的检测禽致病性大肠杆菌078血清型的方法,将从禽致病性大肠杆菌078血清型菌株CVCC1553中所提取的基因组DNA进行PCR扩增,所得的PCR产物进行试纸条检测。具体包括以下步骤:(1)基因组DNA的提取;(2)用修饰FITC的上游引物和修饰地高辛的下游引物进行PCR;(4)胶体金的制备及金标抗体的制备;(5)胶体金试纸条的制备;(6)目的基因的试纸条检测。

[0025] 本发明还提供一种基于PCR的检测禽致病性大肠杆菌078血清型的免疫层析试纸条,所述试纸条包括衬板和在衬板上依次衔接的样品垫、金标垫、包被膜和吸水垫,所述金标垫上含胶体金标记的FITC单克隆抗体,所述包被膜上设用地高辛单克隆抗体印制的检测线T线和用二抗印制的控制线C线。

[0026] 进一步的,本发明所述的衬板可以为不吸水的硬质塑胶条或硬纸条。

[0027] 进一步的,本发明所述的样品垫为玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、或聚酯膜。

[0028] 进一步的,本发明所述的包被膜为硝酸纤维素膜(NC膜)、纯纤维素膜、或羧化纤维素膜。

[0029] 进一步的,本发明所述的吸水垫为吸水滤纸或滤油纸。

[0030] 进一步的,本发明所述包被膜上有用地高辛单克隆抗体印制的直线式隐形检测线T线,用二抗印制的直线式隐形控制线C线,两条线平行排列。印制C线所用的二抗可以为羊抗鼠二抗等常用抗体。

[0031] 进一步的,本发明还公开一种金标垫的制备方法,用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成胶体金(AuNPs)溶液,再将其与FITC抗体偶联制成胶体金标记的FITC抗体溶液,再将所述胶体金标记的FITC抗体溶液加到玻璃纤维素膜上,得到包被有胶体金标记的FITC抗体的金标垫。

[0032] 进一步的,本发明所述胶体金标记的FITC抗体溶液的浓度优选为0.5-2mg/mL。低于此浓度,会导致胶体金试纸条稳定性降低;高于此浓度,会导致胶体金试纸条的灵敏度降低。

[0033] 进一步的,所述胶体金溶液中胶体金粒径为20-40nm,在此粒径范围内,胶体金溶液的稳定性较好。

[0034] 进一步的,所述包被膜上的检测线T和控制线C的制备方法,将地高辛抗体溶液喷载于包被膜的T线,将二抗溶液喷载于包被膜的C线上,形成含有检测线T和控制线C的包被膜。

[0035] 进一步的,所述地高辛抗体溶液的浓度优选为0.5-2mg/mL。浓度低于此范围,会导致胶体金试纸条稳定性降低;浓度高于此范围,会降低胶体金试纸条的灵敏度。

[0036] 进一步的,所述二抗溶液的浓度为优选0.5-2mg/mL。浓度低于此范围,会导致胶体金试纸条稳定性降低;浓度高于此范围,会降低胶体金试纸条的灵敏度。

[0037] 本发明所述方法具体基于PCR免疫层析试纸条检测反应原理:

[0038] 本发明先采用PCR技术,根据禽致病性大肠杆菌O78血清型特异性基因设计一对特异性引物,上下游引物分别用FITC和地高辛标记。经PCR扩增得到两端带有FITC和地高辛的DNA双链产物。

[0039] 当在试纸条的样品垫上滴加PCR产物后,样品溶液沿着试纸条通过层析作用泳动,溶解金标垫上干燥的金标抗体,若待测样品中存在目的基因,则金标抗体首先会和样品溶液中检测物上的FITC发生反应,再直接泳动到检测线和包被膜上的地高辛抗体发生反应,从而胶体金颗粒发生聚集,形成红色的线条,然后其他未结合的金标抗体继续通过层析作用向前泳动,与控制线上的羊抗鼠二抗发生第二次免疫反应,同样形成红色线条,这样包被膜上就会有两条红色线条,表示样品为阳性。若待测样品中不存在目的基因,则待测液会先溶解金标抗体,然后再一起沿着试纸条通过层析作用直接泳动到控制线上与羊抗鼠二抗发生免疫反应,形成红色线条。控制线是为检验金标免疫层析方法本身是否有效而设定的,所以无论样品中是否存在待测目的基因,控制线都应该显色。如果控制线不显色,则说明试纸条失效。

[0040] 本发明还提供上述试纸条的具体检测方法,将待测样品,如本发明中的PCR产物滴于样品垫上,10~20min后,观察试纸条显线情况来判定检测结果;如果在包被膜上仅有C线一条红线显现,表示检测结果为阴性;如果在包被膜上C线和T线两条红线都显现,表示检测结果为阳性;如果在包被膜上C线红线不显现,则表明试纸条已失效。

[0041] 更具体的,本发明所述的PCR产物的试纸条检测:取PCR产物用磷酸盐缓冲液(PB)稀释不同倍数上样,待测液将通过层析作用从试纸条上流过,室温反应10~20min后,即可观察结果。

[0042] 本发明的有益效果主要是:

[0043] (1)灵敏度高:一方面采用了PCR技术,将数量很少的目标基因以指数级增长,得到大量的目的产物,极大的提高了灵敏度,同时特异性也达到了100%;另一方面将用FITC和地高辛修饰的引物所得的PCR产物与试纸条结合检测,又提高了灵敏度,本发明的检测灵敏度能达到 1×10^4 CFU/mL。

[0044] (2)特异性好:PCR扩增过程中引物的特异性决定了目标产物的特异性;同时PCR产物与试纸条结合是抗原抗体的特异性识别,具有较高的特异性。

[0045] (3)价格低廉:使用PCR仪和简单的试纸条制备工具即可完成实验,操作简便,结果易于观察同时提高了检测效率。

[0046] (4)适于现场检测:临床上最常见的禽致病性大肠杆菌血清型为O78,目前对其检测的报道很少,而用于现场快速检测的报道更少,所以对此禽致病性大肠杆菌的检测具有重要的意义。

附图说明

[0047] 图1为胶体金试纸条的原理图;

[0048] 图2为不同浓度菌液的PCR产物的试纸条结果图;

[0049] 图3为胶体金试纸条的特异性结果图。

具体实施方式

[0050] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0051] 实施例1禽致病性大肠杆菌O78血清型特异性基因片段APEC-078-S的确认

[0052] 将禽致病性大肠杆菌O78血清型菌株CVCC1553进行全基因组测序,并将CVCC1553和NCBI已公布的另一株禽致病性大肠杆菌O78血清型菌株*Escherichia coli* APEC 078 (GenBank:CP004009.1)的全基因组序列与NCBI已公布的其他200多株大肠杆菌全基因组序列比较,筛选出一个禽致病性大肠杆菌O78血清型特异性基因,序列为:
ATGTGTTTTTTTATTTTGTTCGATGGTAAGGGGTATAAAGTTGATTCTATCGGTGAGCTTGTGAAATACTTTAGACAGGCCACTAGGATTGATCAAATAAATTTTACTATTGAAACTTATCAAAGTCGACAGTCTAACAGGATGAATGGATCTTGGATGGAGCTACGAATTGATGAGAGGAATTCAAATAGCAGCACAAATGATTGTAGCATCGGAAGATAATGAGTGGGTTGACTCGTTATGGATTACGATTCAGGATTTACTTAACAAGTGCAAAAATAAATTTAGATTTTTTAGAACAGCTTGGACTATGTTAAGTATCCAGATTTTCAGGTGTGACAGTTGGCTTTTGTCTTAGCTTATGGACAGCCTCAAACTGGCGCCAA

AACTATCAATCGATGGTGCATTTGCTTTATCATTTATTTGTATCTTTATTTTGTTCGAACTTATGGAGCTTTGCT
ATTCCATTAATAATTAAGCTTATCGACTTTTTGTTTCCTAGTGTTAAGTTTGTATTAAATGGTAAAAATTACTTTCA
CTGGAGTGTCCAGGCTATAATTGGAGCGATTGCCAGTGCAGTTATATTGTATTTTATTAGCTCCATGTTGCTTTTGTG
CATTAGAAATGTTAAATAGCATCATTAAGAAATAG (SEQ ID NO:4)。根据这段基因设计引物(上游引
物序列为5'-CGGAAGATAATGAGTGGGT-3' (SEQ ID NO:2);下游引物序列为5'-
GCAACATGGAGCTAATAAAA-3' (SEQ ID NO:3),特异性扩增的基因片段APEC-078-S大小为
399bp。

[0053] PCR模板包括以下菌株(菌株均购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心):

[0054] 禽致病性大肠杆菌078血清型菌株:CVCC1553、CVCC1418、CVCC1556、CVCC1490、
CVCC1564、CVCC1569;

[0055] 禽致病性大肠杆菌01血清型菌株:CVCC249;

[0056] 禽致病性大肠杆菌02血清型菌株:CVCC244、CVCC251;

[0057] 禽致病性大肠杆菌08血清型菌株:CVCC1551;

[0058] 禽致病性大肠杆菌0157血清型菌株:CVCC248;

[0059] 大肠杆菌0149血清型菌株:CVCC1500;

[0060] 大肠杆菌0141血清型菌株:CVCC1498;

[0061] 沙门氏菌:CVCC79201、CVCC79207、CVCC79500;

[0062] 金黄色葡萄球菌:CVCC2253、CVCC546;

[0063] 对上述菌株提取DNA,进行PCR检测,PCR反应体系为:MgCl₂ 2.5μL,PCR Buffer
2.5μL,2.5mM dNTPs 2μL,0.5个单位的Taq DNA聚合酶,DNA模板2μL,上游引物1μL,下游引
物1μL,加灭菌水至总体积为25μL。

[0064] PCR扩增程序为:

	95°C	5min	
	95°C	30sec	} 30 个循环
[0065]	47°C	40sec	
	72°C	35sec	
	72°C	10min	

[0066] 琼脂糖凝胶电泳结果显示,在禽致病性大肠杆菌078血清型菌株(CVCC1553、
CVCC1418、CVCC1556、CVCC1490、CVCC1564、CVCC1569)上出现阳性条带,其他菌株扩增结果
均为阴性。故确定APEC-078-S为禽致病性大肠杆菌078血清型的特异性基因片段。

[0067] 实施例2、待检PCR产物的制备

[0068] 1、磁性纳米粒子(MNPs)提取基因组DNA

[0069] 取1mL禽致病性大肠杆菌078血清型标准菌株CVCC1553的菌液于EP管中,8500×g、
5min离心,去上清,加入1mL裂解液,70°C孵育10min裂解细胞,再加入20mg/mL,20μLMNPs和
吸附缓冲液NaCl/PEG,使NaCl的终浓度为2mol/L,混匀10min,磁性分离去上清;再加入洗脱
液70%的乙醇清洗,最后将沉淀溶于TE缓冲液,65°C孵育10min,上清即为DNA溶液,于-20°C
保存备用。

[0070] 2、用修饰FITC的上游引物和修饰地高辛的下游引物进行PCR

[0071] 使用修饰过的引物进行PCR扩增,再将PCR扩增产物用于免疫层析试纸条的检测;
[0072] PCR扩增用FITC修饰的上游引物和地高辛修饰的下游引物扩增得到两端带有FITC和地高辛的DNA双链产物,上游引物和下游引物的序列如下:

[0073] 上游引物序列为5'-CGGAAGATAATGAGTGGGT-3' (SEQ ID NO:2);

[0074] 下游引物序列为5'-GCAACATGGAGCTAATAAAA-3' (SEQ ID NO:3)。

[0075] PCR方法扩增其特异性目标条带,大小为399bp。

[0076] PCR扩增程序为:

	95°C	5min	
	95°C	30sec	} 30 个循环
[0077]	47°C	40sec	
	72°C	35sec	
	72°C	10min	

[0078] PCR体系:MgCl₂ 2.5μL,PCR Buffer 2.5μL,2.5mM dNTPs 2μL,(购自上海生工),0.5个单位的Taq DNA聚合酶(购自上海生工),DNA模板2μL,分别取上游引物1μL和下游引物1μL,加灭菌水至总体积为25μL。

[0079] 实施例3、检测禽致病性大肠杆菌078血清型菌株的胶体金试纸条的制备

[0080] 1、胶体金的制备及金标抗体的制备

[0081] 用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成20nm-40nm的胶体金(AuNPs)溶液,再将其与FITC抗体偶联制成金标抗体。偶联过程为:取1mL AuNPs,加入0.1mol/L碳酸钾调节pH至碱性,再加入1mg/mL 2-10μL FITC抗体孵育1h,加入BSA或明胶等封闭30min,离心去上清,沉淀复溶于100μL重悬液中,再以每个4-6μL滴于金标垫上37°C烘干备用。

[0082] 2、胶体金免疫层析试纸条的制备

[0083] 制备羊抗鼠二抗和地高辛抗体的NC膜:用喷膜仪将1mg/mL的地高辛抗体喷载于NC膜的T线,以及1mg/mL的二抗喷载于NC膜的C线上,37°C烘箱干燥10min备用。待干燥后将样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫由一端依次粘附在衬板上,如图1所示,即得到用于免疫检测的禽致病性大肠杆菌078血清型基因的胶体金层析检测试纸条。

[0084] 3、CVCC1553基因的胶体金试纸条检测方法

[0085] 取PCR产物用PB缓冲液稀释100倍后滴于样品垫上,约10~20min后,观察试纸条显线情况来判定检测结果。如果在NC膜上仅有C线一条红线显现,表示检测结果为阴性,说明在待测样品中不含有禽致病性大肠杆菌078血清型CVCC1553目的基因;如果在NC膜上C线和T线两条红线都显现,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有禽致病性大肠杆菌078血清型CVCC1553目的基因;如果在NC膜上C线红线不显现,则表明试纸条已失效。当在样品垫上滴加不同浓度菌液经PCR扩增后的产物时,在T线上显现出不同程度的红色线条,且呈现出一定的趋势。结果见图2,最低能检测到10⁴CFU/mL菌液。

[0086] 实施例4、胶体金试纸条的特异性试验

[0087] 将待测菌液进行DNA提取,PCR后将PCR产物100倍稀释后滴加于上述实施例3制备好的胶体金试纸条的样品垫上,10~20分钟内判定结果。

[0088] 上述待测菌液分别为禽致病性大肠杆菌078血清型菌株CVCC1553、禽致病性大肠

杆菌01血清型菌株CVCC249、禽致病性大肠杆菌02血清型菌株CVCC251、禽致病性大肠杆菌08血清型菌株CVCC1551、禽致病性大肠杆菌0157血清型菌株CVCC248、0141血清型大肠杆菌CVCC1498、0149血清型大肠杆菌CVCC1500、沙门氏菌CVCC79201、金黄色葡萄球菌CVCC2253。

[0089] 根据T线和C线的显色情况进行判断：T线和C线均显色，判定为禽致病性大肠杆菌078血清型阳性；C线显色T线不显色，判定为禽致病性大肠杆菌078血清型阴性；C线不显色，无论T线是否显色，判定为检测失败。

[0090] 结果如图3所示，上方为C线，下方为T线，从左至右依次滴加的待检测样品菌株为CVCC1553、CVCC249、CVCC251、CVCC1551、CVCC248、CVCC1498、CVCC1500、CVCC79201、CVCC2253。结果表明除了禽致病性大肠杆菌078血清型菌株CVCC1553为阳性外，其他菌株均为阴性，表明本发明的方法特异性好。

序列表

<110>	南京农业大学	
<120>	一种禽致病性大肠杆菌078血清型的特异性基因、检测方法及其免疫层析试纸条	
<160>	4	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	399	
<212>	DNA	
<213>	大肠杆菌078血清型 (Avian Pathogenic Escherichia coli Serotype 078)	
<400>	1	
	cggaagataa tgagtgggtt gactcggtat ggattacgat tcaggattta cttacaagt	60
	gcaaaaataa atttagattt tttagaacag cttggactat gtttaagtatc cagatttcag	120
	gtgtgacagt tggctttttg cttagcttat ggacagcctc aaaactggcg ccaaaactat	180
	caatcgatgg tgcatttgct ttatcattta tttgtatctt tttttgttt tcgaacttat	240
	ggagctttgc tattccatta ataattaagc ttatcgactt tttgtttcct agtggttaagt	300
	ttgttattaa tggtaaaaat tactttcact ggagtgtcca ggctataatt ggagcgattg	360
	ccagtgcggt tatattgtat tttattagct ccatgttgc	399
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	2	
	cggaagataa tgagtgggt	19
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	3	
	gcaacatgga gctaataaaa	20
<210>	4	
<211>	651	
<212>	DNA	
<213>	大肠杆菌078血清型 (Avian Pathogenic Escherichia coli Serotype 078)	
<400>	4	
	atgtgttttt ttattttgtt cgatggtaag gggtataaag ttgattctat cggtgagctt	60
	gtgaaataact ttagacaggc cactaggatt gatcaataa attttactat tgaacttat	120
	caaagtcgac agtctaacag gatgaatgga tcttgatgg agctacgaat tgatgagagg	180
	aattcaaata gcagcacaat gattgtagca tcggaagata atgagtgggt tgactcggtta	240

tggattacga ttcaggattt acttaacaag tgcaaaaata aatttagatt ttttagaaca	300
gcttggacta tgftaagtat ccagatttca ggtgtgacag ttggcttttt gcttagctta	360
tggacagcct caaaactggc gccaaaacta tcaatcgatg gtgcatttgc tttatcattt	420
atttgtatct ttattttggt ttcgaactta tggagctttg ctattccatt aataattaag	480
cttatcgact ttttgtttcc tagtgtaag tttgttatta atggtaaaaa ttactttcac	540
tggagtgtcc aggctataat tggagcgatt gccagtgcgg ttatattgta ttttattagc	600
tccatgttgc tttttgcatt agaaatgta aatagcatca ttaagaaata g	651



图1

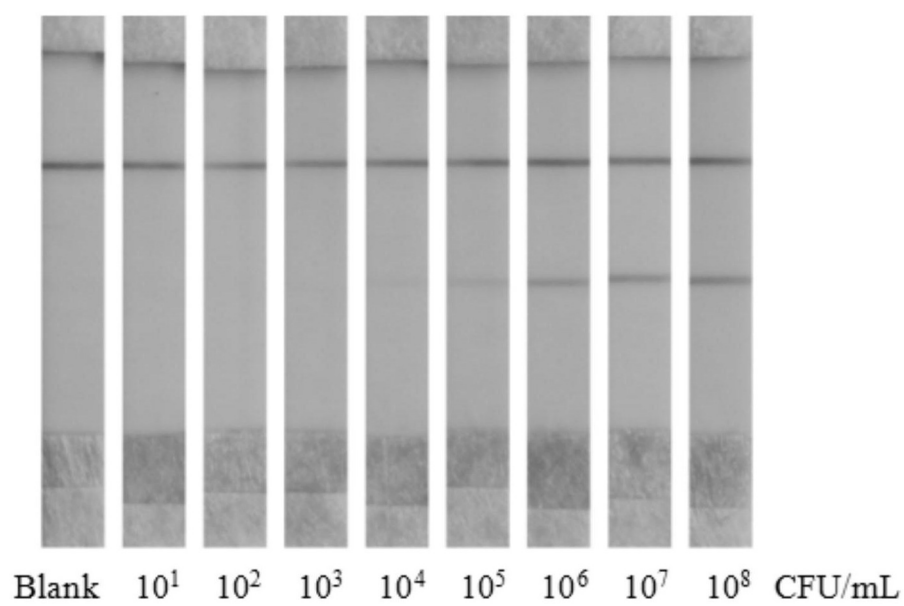


图2

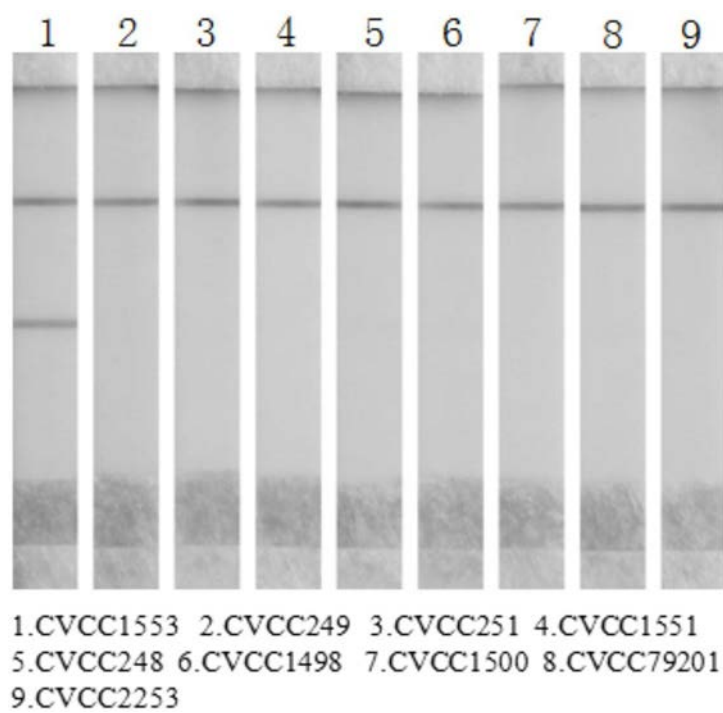


图3

专利名称(译)	一种禽致病性大肠杆菌O78血清型的特异性基因、检测方法及免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN108977555A	公开(公告)日	2018-12-11
申请号	CN201810479077.X	申请日	2018-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	戴建君 汤芳 王娟芳 姜敏		
发明人	戴建君 汤芳 王娟芳 姜敏		
IPC分类号	C12Q1/689 C12Q1/6804 C12Q1/10 C12N15/11 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532 C12R1/19		
CPC分类号	C12Q1/10 C12Q1/6804 C12Q1/689 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56916 C12Q2531/113 C12Q2563/131 C12Q2565/625		
代理人(译)	杜静		
优先权	201810228298.X 2018-03-20 CN		
其他公开文献	CN108977555B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种禽致病性大肠杆菌O78血清型的特异性基因、检测方法
及免疫层析试纸条，本发明所述的大肠杆菌O78血清型的特异性基因片
段APEC-O78-S，其序列如SEQ ID NO：1所示。本发明所述的特异性基
因片段为399bp；本发明还提供基于PCR的此基因片段的免疫层析方法
及试纸条及其应用，本发明所述方法和试纸条能更加快速、灵敏、简
便、特异性地检测出禽致病性大肠杆菌O78血清型菌株。

95°C	5min	} 30 个循环
95°C	30sec	
47°C	40sec	
72°C	35sec	