



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111378717 A

(43)申请公布日 2020.07.07

(21)申请号 201911414215.7

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2019.12.31

C12R 1/01(2006.01)

(71)申请人 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心

地址 200135 上海市浦东新区民生路1208号

(72)发明人 申进玲 蒋原 赵丽娜 薛峰
苏静 郭德华 何宇平

(74)专利代理机构 上海弼升知识产权代理有限公司 31347

代理人 钟华 余化鹏

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6804(2018.01)

C12Q 1/04(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表3页 附图8页

(54)发明名称

一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条及试剂盒和方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条及试剂盒和方法。所述的试剂盒包括PCR反应体系，所述的PCR反应体系包括一引物对，所述的引物对的上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示，下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明使用用于试纸条检测空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni)的试剂盒检测空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni)特异性强、灵敏度高。

1. 一种用于试纸条检测空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 的试剂盒, 其特征在于, 其包括PCR反应体系, 所述的PCR反应体系包括一引物对, 所述的引物对的上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示, 下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 如权利要求2所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的上游引物经地高辛标记, 且所述的下游引物经异硫氰酸盐标记。

3. 如权利要求1或2所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒的扩增反应体系包括: 0.25 μ L浓度为10 μ M的所述上游引物、0.25 μ L浓度为10 μ M的所述下游引物、12.5 μ L的Premix Ex Taq以及7 μ L的双蒸水。

4. 如权利要求1~3任一项所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒还包括试纸条, 所述的试纸条包括吸水滤纸垫、结合物垫、附有FITC抗体与胶体金颗粒的交联体、侧向层析基质、检测带、质控带、衬底以及吸水垫; 所述的检测带附有地高辛抗体; 所述的质控带附有羊抗鼠二抗, 所述的二抗包括抗FITC抗体和抗地高辛抗体。

5. 如权利要求4所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的地高辛抗体的浓度为1mg/mL;

所述的FITC抗体的浓度为1mg/mL;

和/或, 所述的抗地高辛抗体的浓度为1mg/mL。

6. 如权利要求5所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的侧向层析基质硝酸纤维素膜。

7. 如权利要求1~6任一项所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒还包括阳性对照和阴性对照;

所述的阳性对照优选空肠弯曲菌DNA;

所述的阴性对照优选双蒸水。

8. 一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条, 所述的试纸条包括吸水滤纸垫、结合物垫、附有FITC抗体与胶体金颗粒的交联体、侧向层析基质、检测带、质控带、衬底以及吸水垫, 其特征在于, 所述的检测带附有地高辛抗体; 所述的质控带附有羊抗鼠二抗, 所述的二抗包括抗FITC抗体和抗地高辛抗体; 较佳地:

所述的地高辛抗体的浓度为1mg/mL;

和/或, 所述的FITC抗体的浓度为1mg/mL;

和/或, 所述的抗地高辛抗体的浓度为1mg/mL。

9. 一种用于试纸条检测空肠弯曲菌的引物对, 其特征在于, 所述的引物对的上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示, 下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

10. 一种非诊断目的的检测空肠弯曲菌的方法, 其特征在于, 其包括如下步骤:

(1) 使用DNA提取试剂提取待检样品中的总DNA;

(2) 以步骤(1)提取的总DNA为模板, 利用权利要求1~7任一项所述试剂盒中的反应体系进行反应, 得PCR产物;

(3) 将步骤(2)所得PCR产物点样于权利要求5~7任一项所述试剂盒中的试纸条上进行检测; 并分析检测结果;

较佳地, 步骤(2)中所述反应的条件为:a. 95℃预变性5min; b. 95℃变性30sec, 60℃退火30sec, 72℃延伸1min; c. 将b. 进行35个循环后进入72℃, 7min; d. 4℃保存。

一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条及试剂盒和方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种用于试纸条检测空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)的试剂盒和方法。

背景技术

[0002] 食源性疾病的发病率居各类疾病总发病率的前列，成为最突出的公共卫生问题之一。目前统的微生物检验、病原分离、处理与控制已经不能满足当前食品监测工作的需要。因此建立简单、易用且灵敏度高的病原微生物检测新技术对于有效解决上述问题和技术难点具有重要意义。

[0003] 弯曲杆菌导致人类食源性腹泻疾病的主要病因之一，也是在世界各地引起肠胃炎的最常见细菌。在一些发达和发展中国家，该菌比食源性沙门氏菌所引起的腹泻病例还要多。它主要存在于诸如家禽、牛、猪、羊、鸵鸟和贝类等食用动物中，人类感染弯曲杆菌主要是由受污染的食品、水和环境引起。引起人类疾病的弯曲杆菌主要有空肠弯曲杆菌(*C. jejuni*)、结肠弯曲杆菌(*C. coli*)、胎儿弯曲杆菌(*C. fetus*)、海鸥弯曲杆菌(*C. upsaliensis*)和红嘴鸥弯曲杆菌(*C. lari*)。空肠弯曲杆菌最为常见，通常与人的格林-巴利等并发症有关。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是为克服现有技术中用于检测空肠弯曲杆菌的方法或者试剂盒成本高、操作繁琐、灵敏度低等问题，提供一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条及试剂盒和方法。

[0005] 本发明人创造性地将PCR与免疫金标试纸条结合起来，并设计了特别适用于试纸条法的引物，大大降低了成本，简化了操作步骤，提高了检测空肠弯曲菌的灵敏度。

[0006] 本发明主要通过以下技术方案解决上述技术问题。

[0007] 本发明提供一种用于试纸条检测空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)的试剂盒，其包括PCR反应体系，所述的PCR反应体系包括一引物对，所述的引物对中上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示，下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0008] 较佳地，所述的上游引物经地高辛标记，且所述的下游引物经异硫氰酸盐标记。

[0009] 较佳地，所述试剂盒的扩增反应体系包括：0.25μL浓度为10μM的所述上游引物、0.25μL浓度为10μM的所述下游引物、12.5μL的Premix Ex Taq以及7μL的双蒸水。

[0010] 本发明中，所述试剂盒较佳地还包括试纸条，所述的试纸条包括吸水滤纸垫、结合物垫、附有FITC抗体与胶体金颗粒的交联体、侧向层析基质、检测带、质控带、衬底以及吸水垫；所述的检测带附有地高辛抗体；所述的质控带附有羊抗鼠二抗，所述的二抗包括抗FITC抗体和抗地高辛抗体。

[0011] 本发明中，所述的地高辛抗体的浓度较佳地为1mg/mL。

- [0012] 本发明中,所述的FITC抗体的浓度较佳地为1mg/mL。
- [0013] 本发明中,所述的抗地高辛抗体的浓度较佳地为1mg/mL。
- [0014] 本发明中,所述的侧向层析基质较佳地为硝酸纤维素膜。
- [0015] 本发明中,所述试剂盒较佳地还包括阳性对照和阴性对照;其中,所述的阳性对照优选空肠弯曲菌DNA;所述的阴性对照优选双蒸水。
- [0016] 本发明还提供一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条,所述的试纸条包括吸水滤纸垫、结合物垫、附有FITC抗体与胶体金颗粒的交联体、侧向层析基质、检测带、质控带、衬底以及吸水垫,其特征在于,所述的检测带附有地高辛抗体;所述的质控带附有羊抗鼠二抗,所述的二抗包括抗FITC抗体和抗地高辛抗体;较佳地:
- [0017] 所述的地高辛抗体的浓度为1mg/mL;
- [0018] 和/或,所述的FITC抗体的浓度为1mg/mL;
- [0019] 和/或,所述的抗地高辛抗体的浓度为1mg/mL。
- [0020] 本发明所述试纸条的结构见图13。其中图中各数字的含义如下:
- [0021] 1:吸水滤纸垫;2:结合物垫,附有FITC抗体与胶体金颗粒的交联体3:侧向层析基质(硝酸纤维素膜);4:检测带,附有地高辛抗体;5:质控带,附有羊抗鼠二抗;6:衬底;7:吸水垫。
- [0022] 试纸条检测原理:
- [0023] 利用裂解液破碎样本细胞,煮沸法或者磁珠法提取基因组DNA。以提取的DNA为模板,采用上游和下游引物分别经地高辛(Digoxigenin)和异硫氰酸盐(Fluorescein 5-isothiocyanate,FITC)标记的空肠弯曲菌的特异性检测引物对特异性1pxA基因片段进行PCR扩增,阳性扩增产物的两端会分别带有地高辛和FITC。检测用试纸条上在吸水垫上含有金标记的FITC单克隆抗体,可与PCR产物一条链上的FITC标记分子结合,在T检测线位置上固定有抗地高辛抗体,可与PCR产物另一条链上的地高辛标记分子结合。在展开液的作用下,PCR扩增产物首先与金标记的FITC抗体结合,通过毛细作用带动胶体金向前端移动,在经过固定有地高辛抗体的检测线位置时,因带有地高辛标记而被地高辛抗体捕获在该位置上,显示棕红色,过量的金偶联物继续向上移动至固定有羊抗鼠二抗的C质控线位置,与二抗结合,从而显示出两条色带。如模板未扩增,则无PCR产物与地高辛抗体及FITC抗体结合,从而不能在检测线(T线)位置显示颜色。未参与反应的胶体金偶联物,向上一直扩散至质控线(C线)被羊抗鼠二抗捕获而显色。
- [0024] 本发明还提供一种用于试纸条检测空肠弯曲菌的引物对,所述的引物对的上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。
- [0025] 本发明还提供一种非诊断目的的检测空肠弯曲菌的方法,其包括如下步骤:
- [0026] (1)使用DNA提取试剂提取待检样品中的总DNA;
- [0027] (2)以步骤(1)提取的总DNA为模板,利用如上所述试剂盒中的反应体系进行反应,得PCR产物;
- [0028] (3)将步骤(2)所得PCR产物点样于如上所述试剂盒中的试纸条上进行检测;并分析检测结果。
- [0029] 较佳地,步骤(2)中所述反应的条件为:a.95℃预变性5min;b.95℃变性30sec,60℃退火30sec,72℃延伸1min;c.将b.进行35个循环后进入72℃,7min;d.4℃保存。

[0030] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0031] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0032] 本发明的积极进步效果在于:

[0033] 本方法利用PCR与通用核酸检测免疫金标层析试纸条相结合的方法,通过比对空肠弯曲菌及其亲缘关系较近的结肠弯曲菌、胎儿弯曲杆菌、海鸥弯曲杆菌、红嘴鸥弯曲杆菌等其他弯曲菌的lpxA基因(编码UDP-N-乙酰葡萄糖胺酰基转移酶)序列差异,针对空肠弯曲菌特异的片段,设计上下游引物,并标记核酸扩增引物,优化反应体系,以通用核酸检测免疫金标层析试纸条为载体,通过PCR扩增产物与免疫金标层析试纸条的特异性结合,对其显色结果进行判读,实现对空肠弯曲菌的灵敏检测,最低检测限可达到 3.1×10^3 CFU/mL;且使用本发明的试剂盒和检测方法简便、快速、无毒、成本低。

附图说明

[0034] 图1为空肠弯曲菌PCR-电泳特异性检测结果;M:DL2000 marker;1:空肠弯曲菌NCTC11322;2:空肠弯曲菌NCTC11168;3:空肠弯曲菌NCTC13367;4:空肠弯曲菌ATCC49943;5:空肠弯曲菌ATCC49349;6:空肠弯曲菌ATCCBAA1153;7:空肠弯曲菌ATCC49350;8:空肠弯曲菌NCTC11351;9:红嘴鸥弯曲菌ATCC35221;10:结肠弯曲菌ATCC33559;11:胎儿弯曲菌DSM5361;12:乌普萨拉弯曲菌DSM5365;13:Campylobacter hyoilealis ATCC35217;14:幽门螺杆菌ATCC43504;15:结肠弯曲菌ATCC43478;16:无菌水。

[0035] 图2为空肠弯曲菌PCR-试纸条特异性检测结果(编号1~16同图1)。

[0036] 图3为空肠弯曲菌PCR-电泳特异性检测结果(续);M:DL2000 marker;1:空肠弯曲菌NCTC11322;2:空肠弯曲菌ATCC49349;3:福氏志贺氏菌CMCC 51573;4:鼠伤寒沙门氏菌CMCC 50013;5:大肠埃希氏菌ATCC25922;6:克罗诺杆菌21944;7:副溶血性弧菌ATCC17802;8:绿脓杆菌ZCIC0034;9:金黄色葡萄球菌CMCC26003;10:蜡样芽孢杆菌ATCC33019;11:产酸克雷伯氏菌ATCC700324;12:奇异变形杆菌ZCIC0058;13:单增李斯特菌ATCC BAA751;14:化脓链球菌;15:副溶血性弧菌ATCC17802。

[0037] 图4为空肠弯曲菌PCR-试纸条特异性检测结果(续)(编号1~15同图3)。

[0038] 图5为空肠弯曲菌PCR-电泳灵敏度检测结果;M:DL2000 marker;1~8为不同浓度的空肠弯曲菌NCTC11322,1: 3.1×10^8 cfu/mL;2: 3.1×10^7 cfu/mL;3: 3.1×10^6 cfu/mL;4: 3.1×10^5 cfu/mL;5: 3.1×10^4 cfu/mL;6: 3.1×10^3 cfu/mL;7: 3.1×10^2 cfu/mL;8: 3.1×10^1 cfu/mL。

[0039] 图6为空肠弯曲菌PCR-试纸条灵敏度检测结果(编号1~8同图5)。

[0040] 图7为人工污染鸡肉样品中空肠弯曲菌PCR-电泳检测结果;1~7为不同浓度的空肠弯曲菌NCTC11322,1: 3.1×10^7 cfu/mL;2: 3.1×10^6 cfu/mL;3: 3.1×10^5 cfu/mL;4: 3.1×10^4 cfu/mL;5: 3.1×10^3 cfu/mL;6: 3.1×10^2 cfu/mL;7: 3.1×10^1 cfu/mL。

[0041] 图8为人工污染鸡肉中空肠弯曲菌PCR-试纸条检测结果(编号1~7同图7)。

[0042] 图9为Cj323引物浓度0.2μM退火温度60℃条件下的PCR电泳图(a)和PCR纸片结果(b);1:空肠弯曲菌NCTC11351;2:结肠弯曲菌ATCC43478;3:结肠弯曲菌ATCC33559;4:红嘴鸥弯曲菌ATCC 33559;5:无菌水。

[0043] 图10为Cj323引物浓度0.1μM退火温度62℃条件下的PCR电泳图(a)和PCR纸片结果(b);1:空肠弯曲菌NCTC11351;2:空肠弯曲菌ATCC49349;3:结肠弯曲菌ATCC43478;4:红嘴鸥弯曲菌ATCC 35221;5:无菌水。

[0044] 图11为Cj323引物浓度0.1μM退火温度60℃条件下的PCR电泳图(a)和PCR纸片结果(b);1:空肠弯曲菌NCTC11351;2:空肠弯曲菌ATCC49349;3:红嘴鸥弯曲菌ATCC 35221;4:结肠弯曲菌ATCC43478;5:无菌水。

[0045] 图12A、图12B为4对引物对空肠弯曲菌的PCR-电泳检测结果(M:50bp DNA ladder marker;1:空肠弯曲菌ATCC49943;2:空肠弯曲菌ATCC49349;3:结肠弯曲菌ATCC43478;4:无菌水;P1:引物Cj161;P2:引物hip0344;P3:引物mapA;P4:Cj1pxA(本发明))。

[0046] 图13试纸条结构。

具体实施方式

[0047] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0048] 实施例1样品制备

[0049] 按照GB4789.9-2014进行样品制备。

[0050] 实施例2预增菌与增菌

[0051] 在微需氧条件下,36℃±1℃培养4h,如条件允许配以100r/min的速度进行振荡。必要时测定增菌液的pH值并调整至7.4±0.2,42℃±1℃继续培养24h~48h。

[0052] 实施例3DNA模板提取

[0053] 移液器吸取1mL增菌液于1.5mL离心管中,12,000g离心2min,尽量弃去上清,加入1mL PBS缓冲液洗涤一次,再加入500μL无菌水,充分混匀,100℃煮沸15分钟(水浴、金属浴都可),12,000g离心3min,取上清到一个新的离心管。提取的核酸如短期保存,4℃即可,如长期保存必须冻存于-20℃。

[0054] 实施例4PCR引物及反应条件

[0055] 空肠弯曲菌检测特异性引物如下:

[0056] 表1空肠弯曲菌特异性引物

物种名称	引物序列(5'→3')	5' 端标记物	靶基因	片段长度
[0057] 空肠弯曲 菌	F: 5'- TGCACAACTTGGTGACGATGTTGTA -3' (SEQ ID NO. 1)	地高辛	lpxA	335 bp
	R: 5'- CAATCATGAGCAATATGACAATAAGCCATA - 3' (SEQ ID NO. 2)	异硫氰酸 盐		

[0058] 表2 PCR扩增体系

	PCR	Total (25μL)
[0059]	Premix Ex Taq	12.5 μL
	Primer-F (10μM)	0.25 μL
	Primer-R (10μM)	0.25 μL
	Template	5 μL
	ddH ₂ O	7 μL

[0060] 反应条件:95℃预变性5min;95℃变性30sec,60℃退火30sec,72℃延伸1min,35个循环后进入72℃,7min;4℃保存。

[0061] 结果观察:取6μL PCR产物与54μL展开液混匀后,点于试纸条样品垫上进行检测,3分钟左右观察结果。

[0062] 实施例5空肠弯曲菌PCR试纸条法特异性检测

[0063] 以上述PCR-试纸条反应体系及程序进行特异性检测,分别以取自空肠弯曲菌NCTC11322等空肠弯曲菌标准菌株基因组DNA为阳性对照品,选择其他弯曲菌和其他食源性致病菌的基因组DNA为阴性对照,以无菌水为空白对照,试纸条检测结果显示特异性达100%,与电泳结果一致,电泳及试纸条结果见图1至图4。

[0064] 实施例6空肠弯曲菌PCR试纸条法灵敏度检测

[0065] 为了验证该方法对空肠弯曲菌的灵敏度,接空肠弯曲菌NCTC11322划线于哥伦比亚血琼脂42℃微需氧环境培养24-48h,采用0.85%NaCl配制成浓度 3.1×10^8 CFU/mL的菌悬液作为母液,然后对母液进行10倍梯度稀释,取每个浓度的菌悬液1mL提取DNA进行PCR,并分别进行电泳和试纸条检测。同时将每个梯度稀释液接种于哥伦比亚血琼脂平板,42℃微需氧环境培养24h,对不同梯度菌液进行计数。

[0066] PCR-试纸条检测结果表明,当样品菌液浓度为 3.1×10^3 CFU/mL时,试纸条质控线和检测线均能显示红色条带;且试纸条结果与电泳结果保持一致,说明本试纸条的最低检测限可达到 3.1×10^3 CFU/mL。

[0067] 实施例7空肠弯曲菌人工污染样品PCR试纸条法检测

[0068] 为了验证该方法对污染空肠弯曲菌实际样品的检测灵敏度,自农贸市场随机采样冻鸡肉,以无菌操作取7份样品,每份重量1g置于无菌袋中,每份加入9mL bolton肉汤,编号1-7。

[0069] 稀释空肠弯曲菌NCTC11322菌液制成7个梯度:① 3.1×10^2 CFU/mL,② 3.1×10^3 CFU/mL,③ 3.1×10^4 CFU/mL,④ 3.1×10^5 CFU/mL,⑤ 3.1×10^6 CFU/mL,⑥ 3.1×10^7 CFU/mL,⑦ 3.1×10^8 CFU/mL,分别对应样品的1-7号,各取1mL菌液加入无菌袋中,此时1-7号的梯度为:① 3.1×10^1 CFU/mL,② 3.1×10^2 CFU/mL,③ 3.1×10^3 CFU/mL,④ 3.1×10^4 CFU/mL,⑤ 3.1×10^5 CFU/mL,⑥ 3.1×10^6 CFU/mL,⑦ 3.1×10^7 CFU/mL。

[0070] PCR-试纸条检测结果表明,当混合样品的菌液浓度为 3.1×10^3 CFU/mL时,试纸条对空肠弯曲菌lpxA基因扩增的质控线和检测线均能显示红色条带;且试纸条结果与电泳结果保持一致,说明本试纸条混合样品的最低检测限可达到 3.1×10^3 CFU/mL,此结果也与实施例6空肠弯曲菌PCR试纸条法灵敏度检测结果一致。

[0071] 实施例8食品中空肠弯曲菌的实际检测

[0072] 对来自进出口检验样品、国内农贸市场、超市的食品样品进行前增菌,提取基因组DNA,用建立的PCR-试纸条方法和现有国标GB4789.9-2014采用的方法对实际样品进行检测,检测结果表明PCR-试纸条方法的检测结果与现有国标的检测结果一致。

[0073] 表3实际样品检测结果

样品	数量(份数)	PCR-试纸条法 (阳性)	国标方法 (阳性)
鸡肉	60	1	1
三文鱼	20	0	0
冻猪肉	10	0	0
火腿	10	0	0
进口巴氏杀菌乳	10	0	0

[0074] [0075] 所建立的方法特异性强、灵敏度高、操作简便、快速、环保,最低检出限(LOD)为 3.1×10^3 CFU/mL,试纸条检测时间为3分钟左右,适用于对食品中空肠弯曲菌的快速检测。

[0076] 本技术充分利用PCR检测的高灵敏度,又结合了PCR引物与金标抗体的双重特异性,使得特异性大大增强,同时免疫金标试纸条具有操作简便、快捷、成本低的优势。与常规检测相比,本技术避免了PCR结果电泳检测耗时、易污染、程序复杂以及操作人员需要培训等不利条件,使检测结果可视化,直观简便,易于操作,缩短了检测时间,为一线检测实验室,基层及偏远经济不发达地区实验室,开展分子生物学现场检测提供了一种新的安全、便捷的手段。

[0077] 对比例

[0078] 1.PCR引物筛选及条件优化

[0079] 本方法设计的引物与文献中其他4套普通PCR引物相比较(表4),分别在退火温度为56℃、58℃、60℃和62℃时,进行PCR反应。

[0080] 表4空肠弯曲菌PCR候选引物

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增长度	扩增基因	文献
Cj323-F	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC (SEQ ID NO. 3)	323 bp	hipO	(Wang,2002)
Cj323-R	GCCACAACAAGTAAAGAAGC (SEQ ID NO. 4)			
Cj161-F	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT (SEQ ID NO. 5)		cj0414	(Matsune 2007)

	Cj161-R	CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT (SEQ ID NO. 6)				
	hipO344-F	GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT (SEQ ID NO. 7)	344 bp	hipO	(Persson,2005)	
	hipO344-R	GCTATAACTATCCGAAGAACCATCA (SEQ ID NO. 8)				
[0082]	mapA-F	CTATTTATTTTGAGTGCTTGTG (SEQ ID NO. 9)	589 bp	mapA	(Denis,2001)	
	mapA-R	GCTTTATTGCCATTGTTTATTA (SEQ ID NO. 10)				
	CjlpxA-F	TGCACAACTTGGTGACGATGTTGTA (SEQ ID NO. 11)	335 bp	lpxA	本发明	
	CjlpxA-R	CAATCATGAGCAATATGACAATAAGCCATA (SEQ ID NO. 12)				

[0083] 2. 引物Cj323

[0084] 首先对Cj323进行测试,引物浓度分别为0.10μM和0.2μM,退火温度为60℃和62℃。测试结果见图9至图12。

[0085] 由图9可知,在引物浓度0.2μM退火温度60℃条件下,Cj323引物对空肠弯曲菌的PCR电泳方法和纸片方法均呈阳性,虽然对其它非空肠弯曲菌未出现电泳目的条带,但由于具有二聚体,因此在纸片检测线上也呈现弱阳性。因此,考虑降低引物浓度至0.1μM,提高退火温度至62℃,结果见图10。

[0086] 由图10可知,降低引物浓度至0.1μM,提高退火温度至62℃时,引物二聚体在电泳和纸片上均有所减少,但对空肠弯曲菌的扩增条带也大大减弱,因此PCR纸片检测线不能有效区分空肠弯曲菌和非空肠弯曲菌。因此降低退火温度至60℃,引物浓度保持不变,结果见图11。

[0087] 由图11和图9可知,在退火温度60℃条件下,无论引物浓度是0.1μM还是0.2μM,Cj323引物对空肠弯曲菌的扩增电泳方法和纸片方法均呈阳性,虽然对其它非空肠弯曲菌未出现电泳目的条带,但由于该对引物容易形成二聚体,因此对于非空肠弯曲菌在纸片检测线上也呈现弱阳性。因此,该引物不可用。

[0088] 3. 本发明设计引物与其他引物比较情况

[0089] 由于非特异性扩增和引物二聚体均会在试纸条上显示阳性,因此对本研究设计的引物和另外3对引物预先进行PCR电泳,测试引物的特异性和二聚体产生情况(二聚体对PCR纸片法结果影响较大)。结果见图12。

[0090] 由此可见,引物P1(Cj161)在56~62℃对空肠弯曲菌扩增条带均较弱,对退火温度适应性差;引物P2(hip0344)在退火温度为56~62℃时对结肠弯曲菌ATCC43478均有非特异性扩增;引物P3(mapA)在56~62℃退火温度下对结肠弯曲菌ATCC43478均有扩增,不能区分空肠弯曲菌和结肠弯曲菌;引物P4(CjlpxA)在退火温度为56~62℃时均能特异地扩增空肠弯曲菌,且结肠弯曲菌和无菌水的二聚体较少,不会在试纸条上显示假阳性,因此经反复检测验证,最终选择扩增片段为335bp的引物P4(CjlpxA)基因。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心

<120> 一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条及试剂盒和方法

<130> BSP19014523C

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 上游引物

<400> 1

tgcacaacctt ggtgacgatg ttgtta 25

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 下游引物

<400> 2

caatcatgag caatatgaca ataaggcata 30

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cj323-F

<400> 3

acttctttat tgcttgctgc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cj323-R

<400> 4

gccacaacaa gtaaaagaagc 20

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Cj161-F
<400> 5
caaataaaagt tagaggtaga atgt 24
<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Cj161-R
<400> 6
ccataaaggcac tagcttagctg at 22
<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> hip0344-F
<400> 7
gacttcgtgc agatatggat gctt 24
<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> hip0344-R
<400> 8
gctataacta tccgaagaag ccatca 26
<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mapA-F
<400> 9

ctattttattt tttgagtgct tgtg 24
<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mapA-R
<400> 10
gctttatttg ccatttgtt tatta 25
<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CjlpxA-F
<400> 11
tgcacaacctt ggtgacgatg ttgta 25
<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CjlpxA-R
<400> 12
caatcatgag caatatgaca ataaggcata 30

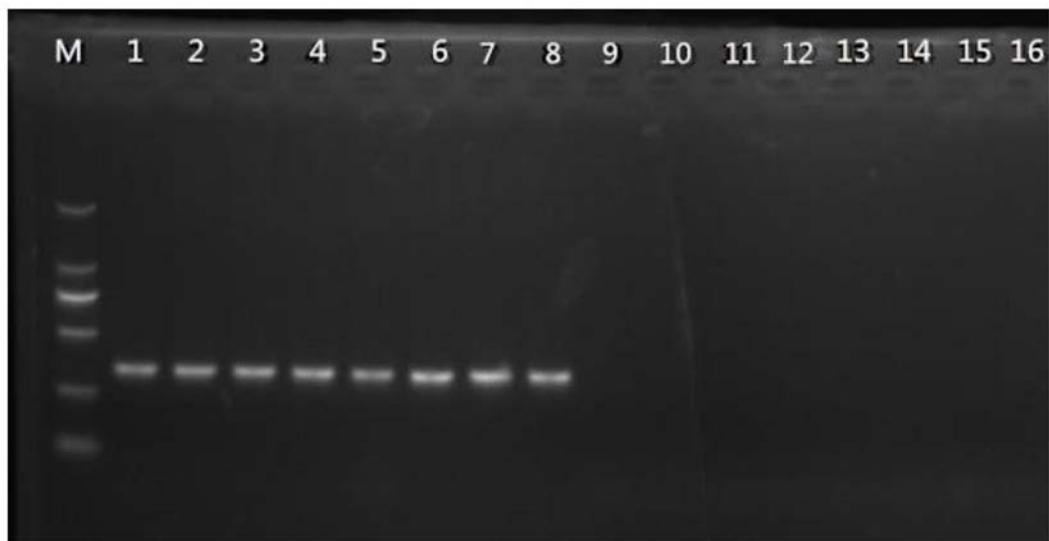


图1

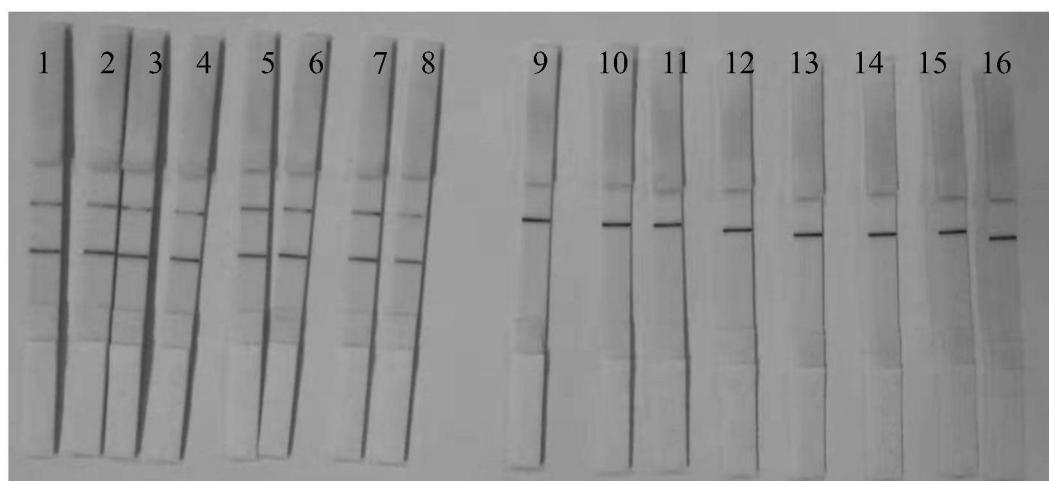


图2

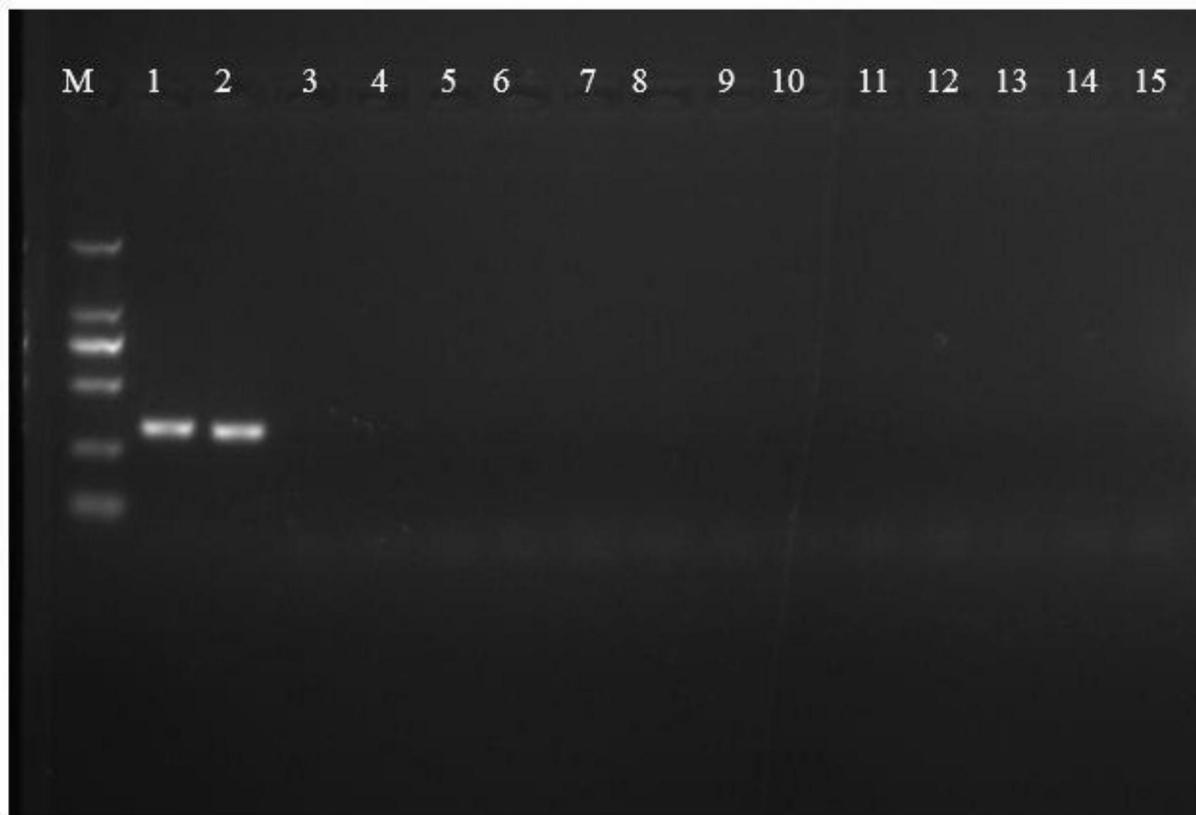


图3

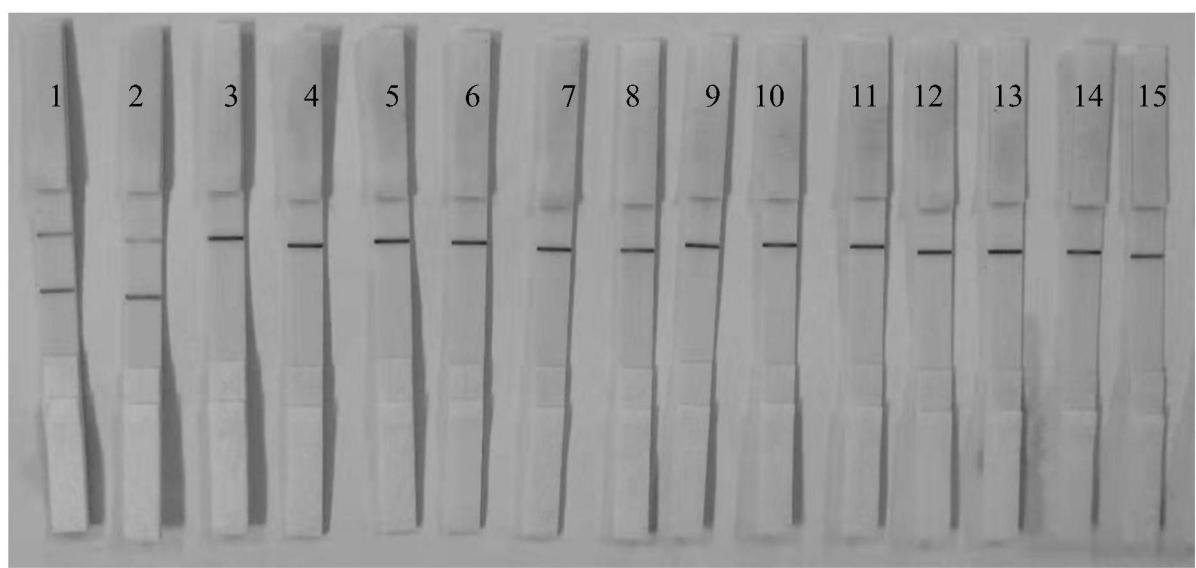


图4

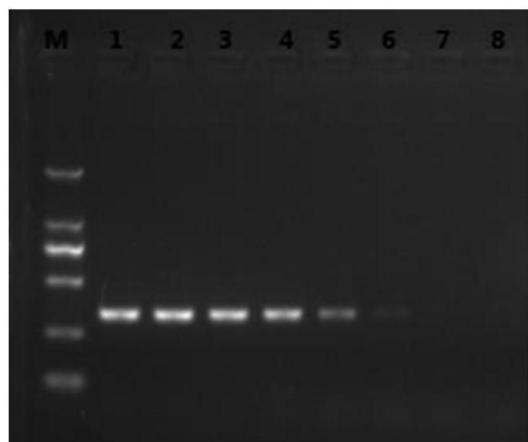


图5

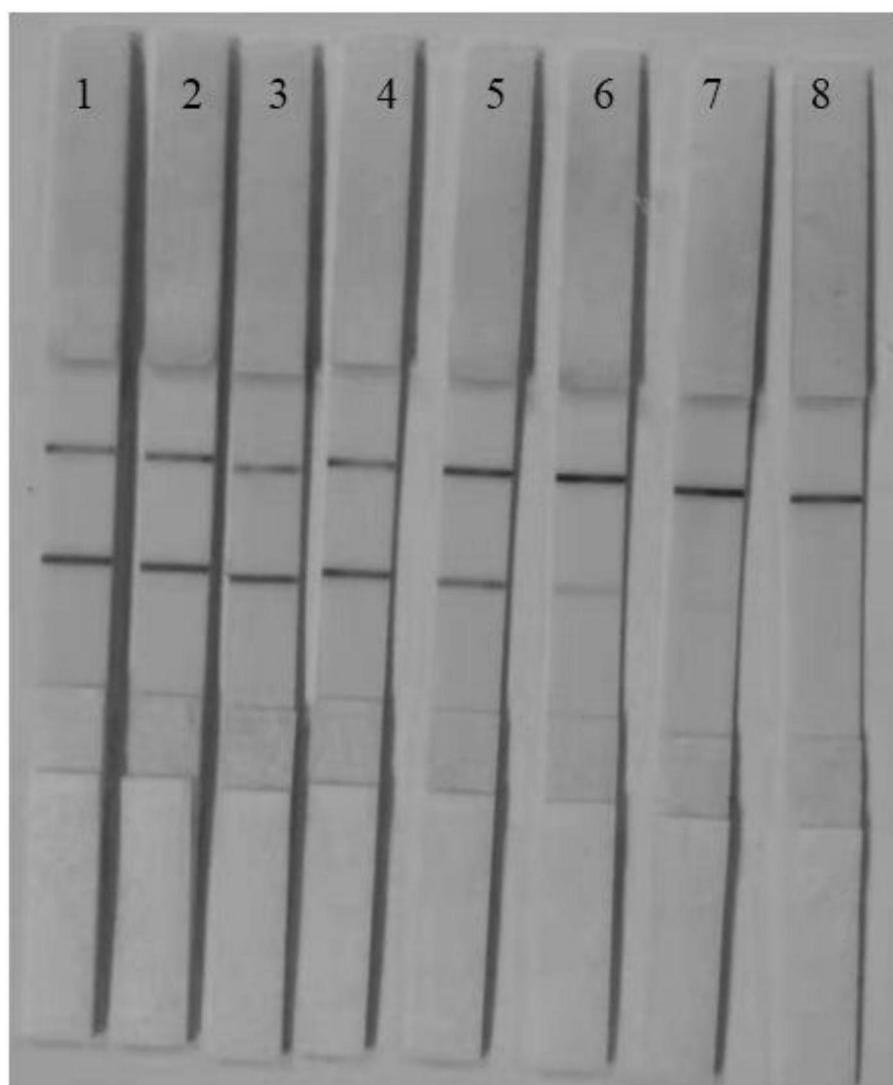


图6

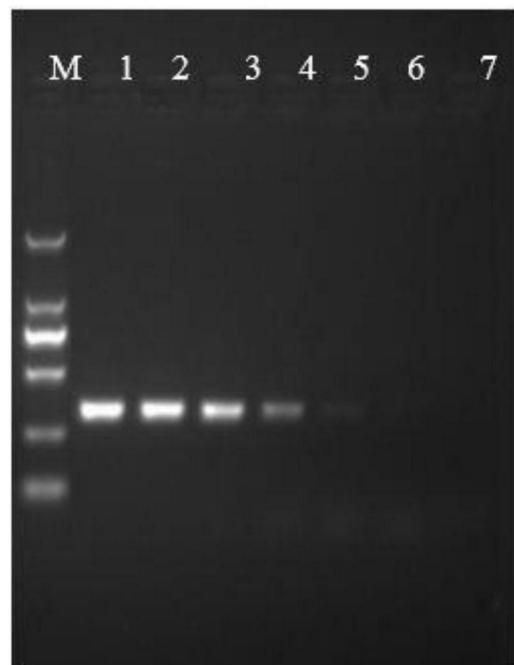


图7

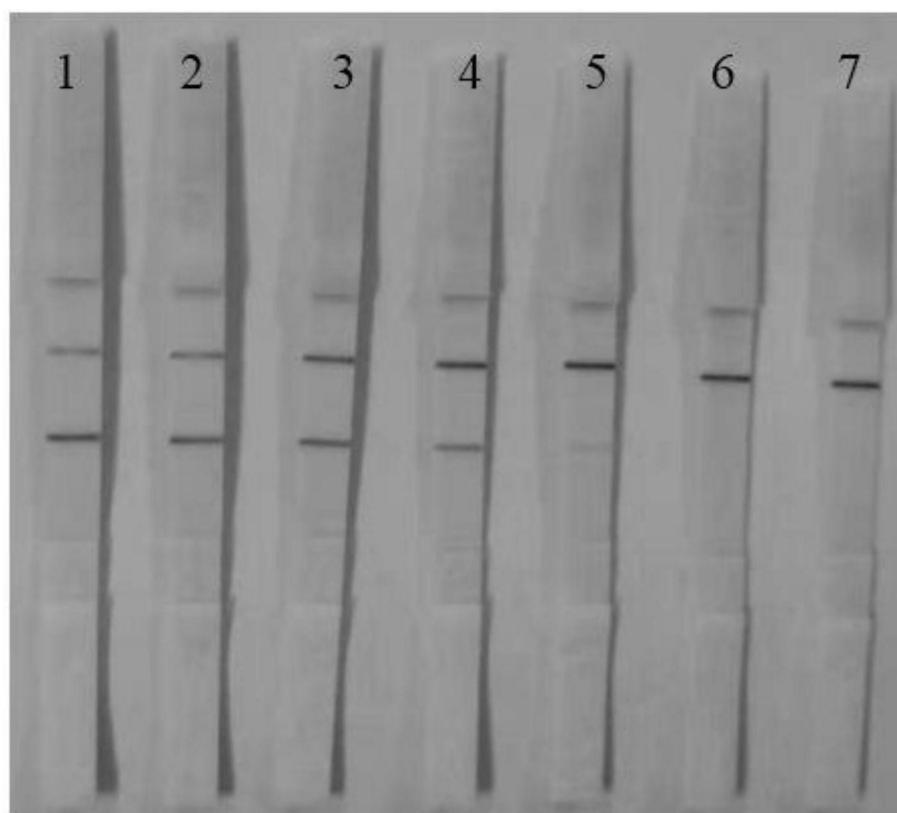


图8

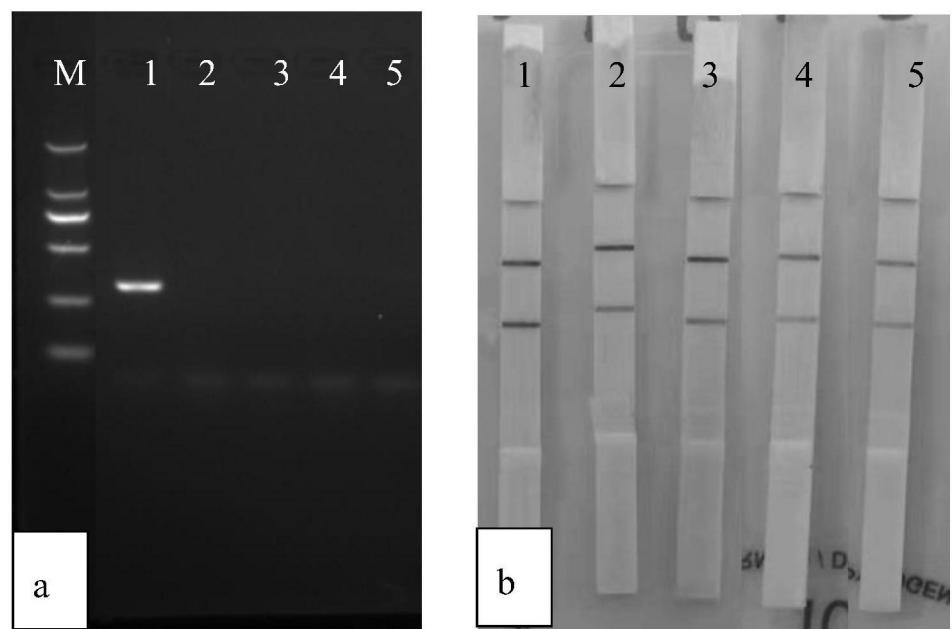


图9

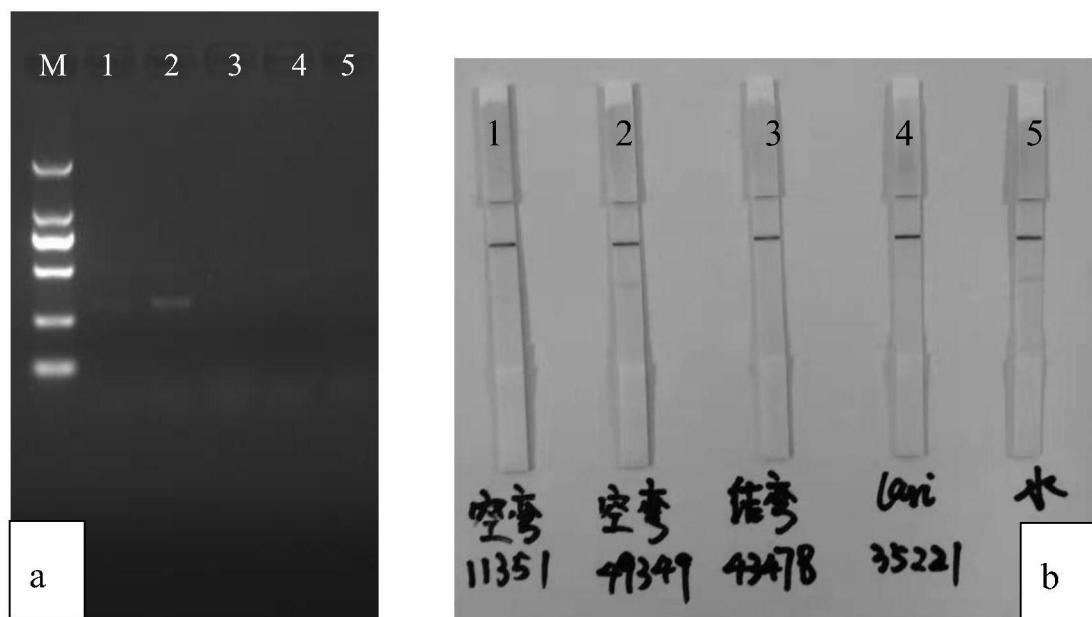


图10

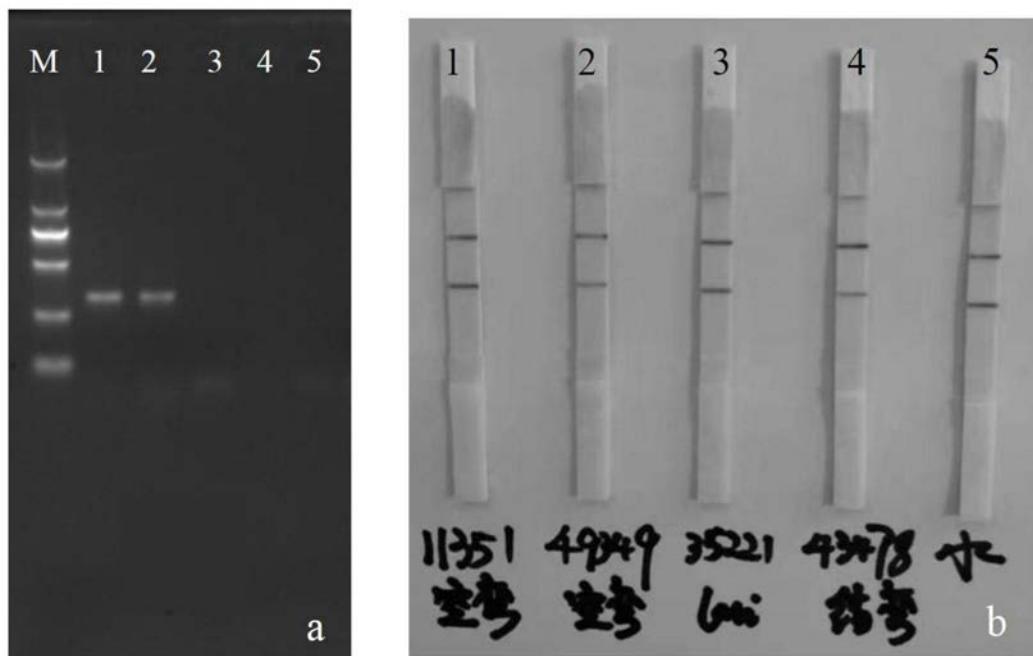


图11

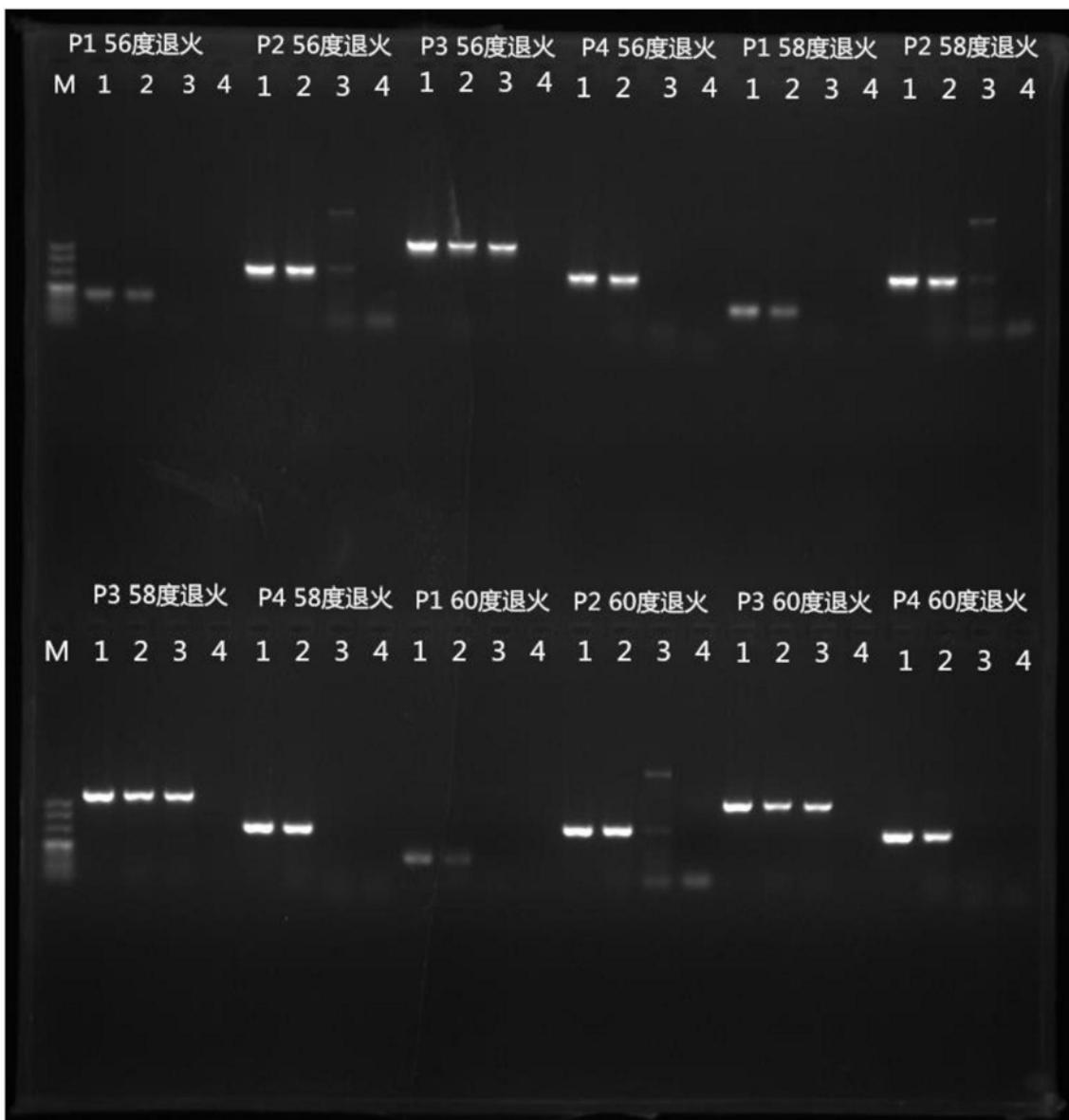


图12A

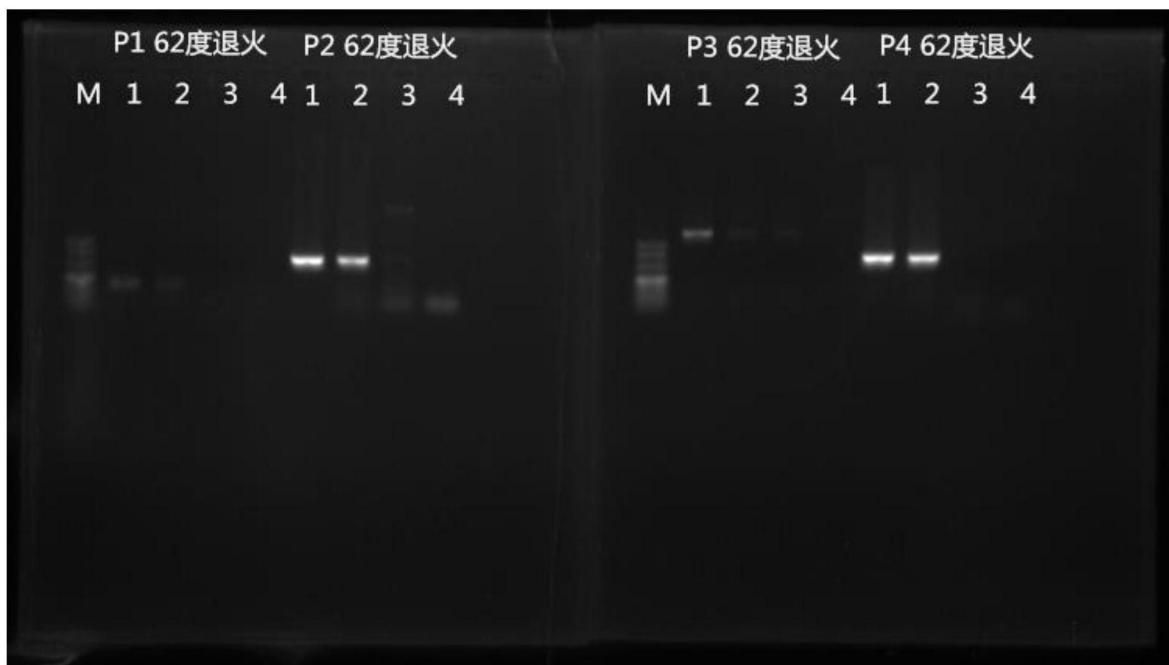


图12B

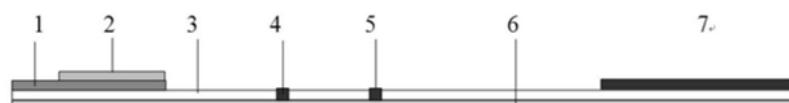


图13

专利名称(译)	一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条及试剂盒和方法		
公开(公告)号	CN111378717A	公开(公告)日	2020-07-07
申请号	CN201911414215.7	申请日	2019-12-31
[标]发明人	申进玲 蒋原 赵丽娜 薛峰 苏静 郭德华 何宇平		
发明人	申进玲 蒋原 赵丽娜 薛峰 苏静 郭德华 何宇平		
IPC分类号	C12Q1/6804 C12Q1/04 G01N33/569 G01N33/53 C12R1/01		
代理人(译)	钟华 余化鹏		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测空肠弯曲菌的核酸免疫金标试纸条及试剂盒和方法。所述的试剂盒包括PCR反应体系，所述的PCR反应体系包括一引物对，所述的引物对的上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示，下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明使用用于试纸条检测空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni)的试剂盒检测空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni)特异性强、灵敏度高。

物种名称	引物序列(5'→3')	5'端标记物	靶基团	片段长度
空肠弯曲菌	F: 5'-TGCACAACTGGTGACCATGTTGTA-3' (SEQ ID NO.1)	地高辛	-	-
	R: 5'-CAATCATGAGCAATATGACAATAAGCCATA-3' (SEQ ID NO.2)	异硫氰酸盐	pxA	335 bp