

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 8 月 27 日 (27.08.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/168950 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/689 (2018.01) *C12Q 1/10* (2006.01)
C12Q 1/6844 (2018.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/074822

(22) 国际申请日: 2020 年 2 月 12 日 (12.02.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910131761.3 2019年2月22日 (22.02.2019) CN

(71) 申请人: 华南理工大学 (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。

(72) 发明人: 徐振波(XU, Zhenbo); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 骆玉婷(LUO, Yuting); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 刘君彦(LIU, Junyan); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 张桂兰(ZHANG, Guilan); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 苗健(MIAO, Jian); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 袁牧(YUAN, Mu); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 陈玲(CHEN, Ling); 中国广东省

广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 苏健裕(SU, Jianyu); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 李冰(LI, Bing); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 李琳(LI, Lin); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 李晓玺(LI, Xiaoxi); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 张霞(ZHANG, Xia); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。

(74) 代理人: 广州市华学知识产权代理有限公司(GUANGZHOU HUAXUE INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西 100 号之一富力盈泰广场 A 栋 16 楼 1601-1605、1609-1611 房, Guangdong 510627 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: CPA PRIMER FOR ESCHERICHIA COLI O157:H7, KIT, AND DETECTION METHOD

(54) 发明名称: 大肠杆菌O157:H7的CPA引物及试剂盒和检测方法

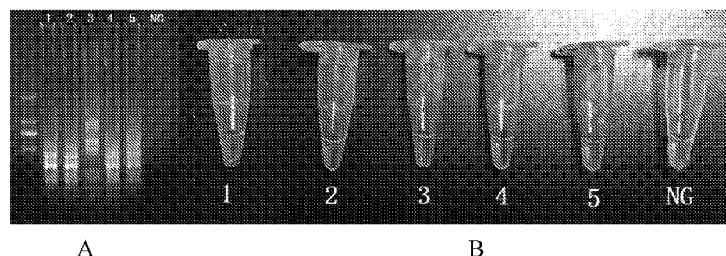


图 1

(57) Abstract: Disclosed are a CPA primer designed for specificity target sequences rfbE and stx1 of Escherichia coli O157:H7, a detection kit thereof, and a detection method therefor.

(57) 摘要: 本发明公开了一种针对大肠杆菌 O157:H7 的特异性靶序列 rfbE 及 stx1 设计的 CPA 引物及其检测试剂盒和检测方法。

[见续页]



WO 2020/168950 A1

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 引物及试剂盒和检测方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 引物及其检测试剂盒和检测方法。

背景技术

目前微生物的检测鉴定方法主要分为培养鉴定法、免疫检测法及核酸检测。培养鉴定法及免疫检测法操作繁琐、实验周期长，对实验人员专业水平要求高。

交叉引物恒温扩增（Crossing Priming Amplification, CPA）技术与其他核酸扩增技术相比，可以在等温条件下快速、高效、特异地扩增靶序列，且操作简便，不需要精准的变温设备，成本较低，在食源性微生物检测领域显示出广阔的发展前景。但该反应引物设计难度较高，需要在有限的产物长度中设计五条引物，且避免五条引物自身发生非特异性扩增而影响结果，因此引物的设计尤为重要。

Escherichia coli O157:H7 是肠出血大肠杆菌最重要的血清型，是一种人畜共患的肠道致病菌，主要通过污染的动物源性食品感染人类，如生的或绞碎的肉制品、生牛奶和受污染的蔬菜和芽菜向人类传播，感染人体后表现为相应的临床症状。轻度感染可引起腹部绞痛和腹泻，发烧和呕吐也可能出现。重度感染则表现为出血性结肠炎，溶血性尿毒综合征。

目前由 *E. coli* O157:H7 感染引起的食源性疾病已经成为世界性的卫生问题。而在 *E. coli* O157:H7 中存在部分可以产志贺毒素 I 型的大肠杆菌。若发生感染可导致人类出现腹泻、出血性结肠炎等一些胃肠道疾病。志贺毒素 I 型在肠腔产生后，可穿过上皮细胞进入血循环，引起特定靶组织的血管损伤，如脑、肾血管损伤。产志贺毒素大肠杆菌具有强烈的致病性和致死性等特点，严重威胁人类的生命健康，已成为世界性的公共卫生问题。

中国专利申请 CN 108796098A 公开了一种 PSR 等温扩增反应检测大肠杆菌

志贺毒素的引物、试剂盒及其方法，该专利针对志贺毒素特异性靶序列 *stx2* 设计了 PSR 反应的引物用于检测。

中国专利申请 CN 108796099A 公开了一种大肠杆菌 O157:H7 的 PSR 检测引物、试剂盒及其检测方法，该专利针对大肠杆菌 O157:H7 的特异性靶序列 *rfbE* 设计了 PSR 反应的引物用于检测。

以上专利中的反应灵敏度最小单位为 pg/ μ L，灵敏度不够高，限制了适用范围。

发明内容

为了克服 PSR 反应检测灵敏度低的问题，本发明的首要目的在于一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 引物，其灵敏度达到了 fg/ μ L，是 PSR 反应灵敏度的 100~1000 倍，能够解决现有技术灵敏度较低的问题。

本发明的另一目的在于提供一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测试剂盒。

本发明的再一目的在于提供一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测方法，该方法具有灵敏度高、特异性好，操作简便快速，结果准确可靠，检测成本低，适合现场检测应用的特点。

本发明的目的通过下述技术方案实现：

一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测引物，是针对其靶点 *rfbE* 设计的，包括剥离引物 4s、5a，交叉扩增引物 2a1s，以及特异引物 2a、3a；其核苷酸序列分别如下所示：

靶点 *rfbE* 剥离引物 4s：5'-aggaccgcagaggaaaga-3' (SEQ ID NO.1)；

靶点 *rfbE* 剥离引物 5a：5'-tccacgccaaccaagatc-3' (SEQ ID NO.2)；

靶点 *rfbE* 交叉引物 2a1s：5'-agtacattggcatcgtgtcagataaaactcatcgaaaca-3' (SEQ ID NO.3)；

靶点 *rfbE* 特异引物 2a：5'-agtacattggcatcgtgt-3' (SEQ ID NO.4)；

靶点 *rfbE* 特异引物 3a：5'-ggcatcgtgtggacagggt-3' (SEQ ID NO.5)。

一种大肠杆菌志贺毒素 I 型的 CPA 检测引物，是针对其靶点 *stx1* 设计的，包括剥离引物 4s、5a，交叉扩增引物 2a1s，以及特异引物 2a、3a；其核苷酸序列分别如下所示：

靶点 *stx1* 剥离引物 4s: 5'-agttgatgtcagaggtag-3' (SEQ ID NO.6);

靶点 *stx1* 剥离引物 5a: 5'-cgctgtgtacctggaaa-3' (SEQ ID NO.7);

靶点 *stx1* 交叉引物 2als: 5'-atcagcaaagcgataaaaactacggcttattgttgaa-3' (SEQ ID NO.8);

靶点 *stx1* 特异引物 2a: 5'-atcagcaaagcgataaaa-3' (SEQ ID NO.9);

靶点 *stx1* 特异引物 3a: 5'-cctgttaacaaatcctgtcac-3' (SEQ ID NO.10)。

一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测试剂盒, 包括上述的大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测引物和/或大肠杆菌志贺毒素 I 型的 CPA 检测引物;

所述试剂盒中, 各 CPA 检测引物的浓度优选 10 μ M;

所述的试剂盒还包括如下组分:

A、2 $\times$ 反应缓冲液: 40.0 mM 的 Tris-HCl, 20.0mM 的硫酸铵, 20.0mM 的氯化钾, 16.0mM 的硫酸镁, 0.2% (v/v) 的 Tween 20, 1.4 M 的甜菜碱, 10.0 mM 的 dNTPs (each);

B、Bst DNA 聚合酶;

C、钙黄绿素和氯化锰的混合溶液;

组分 B 中所述的 Bst DNA 聚合酶优选浓度为 8U/ μ L 的 Bst DNA 聚合酶水溶液。

组分 C 中所述的钙黄绿素和氯化锰的混合溶液通过如下方法制备得到:

(i) 将钙黄绿素溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 配制 50 μ M 的钙黄绿素溶液; 将氯化锰溶于水中, 配制 1 mM 的氯化锰水溶液;

(ii) 取 25 μ L 50 μ M 的钙黄绿素溶液与 10 μ L 1 mM 的氯化锰水溶液混合均匀, 得到钙黄绿素和氯化锰的混合溶液 (钙黄绿素溶液与氯化锰溶液的浓度比为 1:8)。

一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测方法, 包括如下步骤:

(1) 提取待检样品的细菌 DNA 作为模板 DNA, 并控制模板 DNA 水溶液的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.8~2.0;

(2) 分别建立检测 *rfbE* 和/或 *stx1* 的交叉引物恒温扩增反应体系, 于 63 $^{\circ}$ C 水浴中保温至少 60 分钟进行交叉引物恒温扩增反应, 待反应完成后于 80 $^{\circ}$ C 水浴中保温 2 分钟终止反应;

其中，交叉引物恒温扩增反应体系为：2×反应缓冲液 12.5 μL，10μM 的剥离引物 4s 和 10μM 的剥离引物 5a 各 1.5μL，10 μM 的交叉引物 2a1s 2.5μL，10μM 的特异引物 2a 和 10μM 的特异引物 3a 各 1.25μL，DNA 模板 1.0 μL，8U/μL 的 *Bst* DNA 聚合酶 1.0 μL，加去核酸水补足至 25 μL；最后加入 1 μL 的钙黄绿素与氯化锰的混合溶液；

(3) 针对靶点 *rfbE* 的检测，终止反应后肉眼观察反应体系的颜色，如颜色为黄色，说明待检样品中不含有大肠杆菌 O157:H7；如颜色变为绿色，说明待检样品中含有大肠杆菌 O157:H7；

(4) 针对靶点 *stx1* 的检测，终止反应后对扩增产物做琼脂糖凝胶电泳，呈现梯形条带的含有大肠杆菌志贺毒素 I 型，无扩增条带的不含有大肠杆菌志贺毒素 I 型。

本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

(1) 本发明中所提供的针对 *E. coli*O157:H7 特异性靶序列 *rfbE* 及 *stx1* 所设计的交叉引物恒温扩增反应检测鉴定体系，解决现有技术方法所需周期长，灵敏度低，成本高，现场应用困难等缺陷。通过选择目标菌株的特异性序列 *rfbE* 及 *stx1* 的保守区域，设计一对剥离引物、交叉引物和特异引物构建交叉引物恒温扩增反应体系，并在 60 分钟左右获得检测结果以缩短传统大肠杆菌检测的周期。

(2) 目前，有文献报道采用交叉引物恒温扩增反应技术检测大肠杆菌 O157:H7,但是检测灵敏度不高，相较于普通 PCR 没有体现交叉引物恒温扩增技术灵敏度方面显著的优越性。而本发明可以降低出现假阳性结果的概率，同时确保检测的可靠性、特异性和高灵敏度。这对于提高重大群体疾病诊断率，早期的疾病诊断具有非常重要的意义。

(3) 本发明在恒温条件下扩增，不会因温度的改变而造成时间损失，耗时短，此外，该技术不需要特殊、昂贵的仪器和试剂，扩增产物不需要凝胶电泳，直接用荧光染料显色可凭肉眼判断结果，操作简便快捷，检测成本较低。本发明的试剂盒及方法特别适用中小型单位及现场检测。

附图说明

图1为交叉引物恒温扩增反应技术检测*E. coli*O157:H7的凝胶电泳结果及显色结果图；其中，图A为交叉引物恒温扩增检测*E. coli*O157:H7的凝胶电泳结果（泳道1为大肠杆菌O157:H7 ATCC43895，泳道2为大肠杆菌O157:H7 ATCC43894，泳道3为大肠杆菌O157:H7 E019，泳道4为大肠杆菌O157:H7 E043，泳道5为大肠杆菌O157:H7 E044，NG为空白对照）；图B为交叉引物恒温扩增反应技术检测*E. coli*O157:H7的显色结果（1为大肠杆菌O157:H7 ATCC43895，2为大肠杆菌O157:H7 ATCC43894，3为大肠杆菌O157:H7 E019，4为大肠杆菌O157:H7 E043，5为大肠杆菌O157:H7 E044，NG为空白对照）。

图2为交叉恒温扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的最适扩增时间试验的凝胶电泳结果图；其中，泳道1为扩增时间10分钟，泳道2为扩增时间20分钟，泳道3为扩增时间30分钟，泳道4为扩增时间40分钟，泳道5为扩增时间50分钟，泳道6为扩增时间60分钟，泳道7为扩增时间70分钟，泳道8为扩增时间80分钟，NG为空白对照。

图3为检测靶点*rfbE*特异性的实验结果图；其中，1：大肠杆菌O157:H7 ATCC43895，2：大肠杆菌O157:H7 ATCC43894，3：大肠杆菌O157:H7 E019，4：大肠杆菌O157:H7 E043；5：大肠杆菌O157:H7 E044；6：沙门氏菌ATCC29629；7：沙门氏菌ATCC19585；8：沙门氏菌ATCC14028；9：沙门氏菌ATCC13076；10：单增李斯特菌ATCC19116；11：单增李斯特菌ATCC19114，12：单增李斯特菌ATCC19115；13：单增李斯特菌ATCC15313；14：单增李斯特菌ATCC19113；15：铜绿假单胞菌ATCC27853；16：金黄色葡萄球菌ATCC27664；17：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌NCTC10442；18：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌N315；19：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌85/2082；20：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌CA05；21：副溶血性弧菌ATCC17802；22：副溶血性弧菌 ATCC27969；23：干酪乳杆菌 BM-LC14617；24：阴性对照。

图4为检测靶点*rfbE*灵敏度实验结果图，图A为交叉恒温扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度试验的结果图，图B为PCR扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度试验；其中，1为3.28ng/ μ L；2为328 pg/ μ L；3为32.8 pg/ μ L；4为3.28 pg/ μ L；5为328fg/ μ L；6为32.8fg/ μ L；7为3.28 fg/ μ L；8为328ag/ μ L；NG为阴性对照。

图5为交叉引物恒温扩增反应技术检测大肠杆菌志贺毒素I型的凝胶电泳结果；其中，图A为根据靶点 *stx1* 所设计的第一套引物的电泳结果，图B为根据靶点 *stx1* 所设计的第二套引物的电泳结果（泳道1为大肠杆菌 O157:H7 ATCC43895，泳道2为大肠杆菌 O157:H7 ATCC43894，泳道3为大肠杆菌 O157:H7 E019，泳道4为大肠杆菌 O157:H7 E043，泳道5为大肠杆菌 O157:H7 E044，NG为空白对照）。

具体实施方式

下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

实施例1

基于交叉引物恒温扩增反应技术检测大肠杆菌O157:H7的方法，包括以下步骤：

1、基于交叉引物恒温扩增反应技术检测病原微生物的方法，本实施例以大肠杆菌O157:H7为例，其使用试剂如下：

a. 浓度各为10 μ M的剥离引物4s、5a，交叉扩增引物2a1s，以及特异引物2a、3a，引物序列如前文SEQ ID NO.1- SEQ ID NO.5所示；

b. 2 $\times$ 反应储液：由浓度为40.0 mM的Tris-HCl，20.0 mM的硫酸铵，20.0 mM的氯化钾，16.0 mM的硫酸镁，0.2% (v/v) 的Tween 20，1.4 M的甜菜碱，10.0 mM的 dNTPs (each) 组成；

c. 浓度为8U/ μ L的Bst DNA 聚合酶（大片段，NEB公司）水溶液；

d. 钙黄绿素和氯化锰的混合溶液：先配制浓度为50 μ M的钙黄绿素溶液（二甲基亚砷溶解）；然后取25 μ L 50 μ M的钙黄绿素溶液，与10 μ L 1 mM的氯化锰水溶液混合均匀（钙黄绿素溶液与氯化锰溶液的浓度比为1:8）。

2、使用上述试剂利用交叉引物恒温扩增反应技术检测大肠杆菌O157:H7，包括如下步骤：

（1）提取待检样品的细菌DNA作为模板DNA：

本实施例同时设置实验组和空白对照组，其中实验组为五株 *E. coli* O157:H7，分别是大肠杆菌O157:H7 ATCC43895，大肠杆菌O157:H7 ATCC43894，

大肠杆菌O157:H7 E019,大肠杆菌O157:H7 E043,大肠杆菌O157:H7 E044;所有菌株均可由公开途径获得;

采用DNA提取试剂盒(广东东盛生物科技有限公司)提取各组细菌DNA,按照试剂盒说明书操作,实验组所得细菌DNA水溶液的OD₂₆₀/OD₂₈₀的值(260nm和280nm下吸光光度比值)为1.8。

(2) 建立检测*rfbE*的交叉引物恒温扩增反应:

在反应管中配制总体积为26 μ L的交叉引物恒温扩增反应体系:加入2 $\times$ 反应储液12.5 μ L, 4s与5a等体积混合引物混合液3.0 μ L, 交叉引物2a1s 2.5 μ L, 特异引物2a与3a等体积混合液2.5 μ L, Bst DNA 聚合酶1 μ L, DNA模板1.0 μ L, 用去核酸水补充体积至25 μ L,最后加入上述浓度的钙黄绿素及氯化锰混合液水溶液1 μ L,混匀即可。此时各物质浓度为: Tris-HCl 20.0 mM, 硫酸铵 10.0 mM, 氯化钾10.0 mM, 硫酸镁 8.0 mM, Tween 20 0.1% (v/v), 甜菜碱0.7 M, dNTPs (each) 1.4 mM, Bst DNA聚合酶8U, 剥离引物4s、5a各0.6 μ M, 交叉引物2a1s 1.0 μ M, 特异引物2a及3a各0.5 μ M。将反应管置于63 $^{\circ}$ C水浴中保温反应60分钟,再于80 $^{\circ}$ C水浴中保温2分钟终止反应。

(3) 显色检测:

待反应结束后,用肉眼观察颜色变化。

结果如图1所示,结果显示:空白对照组的颜色为黄色,说明不含有*E. coli* O157:H7菌;实验组的颜色变为绿色,说明含有*E. coli* O157:H7菌,随后对扩增产物进行2%的琼脂糖凝胶电泳,阳性组呈现梯形条带,阴性组无扩增条带,与预期结果一致。

实施例2

交叉恒温扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的最适扩增时间试验,包括以下步骤:

按照实施例1反应体系构建交叉恒温扩增方法,分别进行10分钟,20分钟,30分钟,40分钟,50分钟,60分钟,70分钟,80分钟,90分钟的不同扩增时间试验,以确定最适的扩增时间。

按照实施例1构建反应体系,无菌水作空白对照,并对扩增产物进行2%的琼

脂糖凝胶电泳。

结果如图2所示，反应时间为40分钟至90分钟时均出现了梯状条带，而60分钟至90分钟的梯状条带无显著差别，所以可将交叉引物恒温扩增反应时间减少为60分钟，能够实现最短的扩增时间和最佳的扩增效果。

实施例3

交叉恒温扩增反应检测大肠杆菌O157:H7特异性试验，包括以下步骤：

将大肠杆菌O157:H7 ATCC43895与非大肠杆菌的基因组DNA按照实施例1中的反应体系和条件建立交叉恒温扩增反应检测方法，进行特异性试验；

其中，非大肠杆菌为：沙门氏菌ATCC29629；沙门氏菌ATCC19585；沙门氏菌ATCC14028；沙门氏菌ATCC13076；单增李斯特菌ATCC19116；单增李斯特菌ATCC19114；单增李斯特菌ATCC19115；单增李斯特菌ATCC15313；单增李斯特菌 ATCC19113；铜绿假单胞菌ATCC27853；金黄色葡萄球菌ATCC27664；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌NCTC10442；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌N315；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌85/2082；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌CA05；副溶血性弧菌ATCC17802；副溶血性弧菌ATCC27969；干酪乳杆菌BM-LC14617。

设置大肠杆菌O157:H7基因组为阳性对照，去核酸水为阴性对照。对扩增产物进行2%的琼脂糖凝胶电泳，结果如图3所示，加入大肠杆菌基因组的反应体系呈现梯形条带，阴性组无扩增条带，与预期结果一致。

如此表明，基于交叉引物恒温扩增反应检测*E. coli*O157:H7的引物具有较高的特异性。

实施例4

交叉恒温扩增反应和PCR扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度对比试验，包括以下步骤：

1. 交叉恒温扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度试验

将大肠杆菌O157:H7的基因组进行10倍浓度梯度稀释，分别为3.28ng/μL；328 pg/μL； 32.8 pg/μL； 3.28 pg/μL； 328 fg/μL； 32.8 fg/μL； 3.28 fg/μL； 328 ag/μL，同时设置阴性对照（去核酸水），按照实施例1中的反应体系构建交叉恒温扩增

方法并对扩增产物进行2%的琼脂糖凝胶电泳，以确定检测方法的灵敏度。

2. PCR扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度试验

(1) 基于PCR扩增反应技术检测病原微生物的方法，本实施例以大肠杆菌O157:H7为例，其使用试剂如下：

a. 浓度各为10 μ M的剥离引物4s、5a，引物序列如前文SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2所示；

b. 2 $\times$ Taq PCR MasterMix；

(2) 建立检测 *rfbE* 的 PCR 扩增反应：

在反应管中配制总体积为 25 μ L 的交叉引物恒温扩增反应体系：加入 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 12.5 μ L，4s 与 5a 等体积混合引物混合液 3.0 μ L，DNA 模板 2.0 μ L，用去核酸水补充体积至 25 μ L。将反应管置于 PCR 仪中进行扩增。

(3) 将大肠杆菌O157:H7的基因组进行10倍浓度梯度稀释，分别为3.28ng/ μ L；328 pg/ μ L；32.8 pg/ μ L；3.28 pg/ μ L；328 fg/ μ L；32.8 fg/ μ L；3.28 fg/ μ L；328 ag/ μ L，同时设置阴性对照（去核酸水）。按照实施例4中的PCR扩增反应体系构建PCR扩增方法并对扩增产物进行2%的琼脂糖凝胶电泳，以确定检测方法的灵敏度。阳性组呈现单一条带，阴性组无扩增条带，与预期结果一致。

结果如图4所示，图A为交叉恒温扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度试验的结果图，图B为PCR扩增反应检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度试验。从图A中可以看出，样品中大肠杆菌DNA的浓度高于3.28fg/ μ L的均出现了梯形条带，呈现阳性结果。而图B中，当样品中大肠杆菌DNA的浓度高于32.8 pg/ μ L时才出现了单一条带。

结果表明：建立的 *E. coli* O157:H7交叉恒温扩增反应方法可检测样品中3.28fg/ μ L反应的大肠杆菌DNA，其灵敏度是PCR扩增反应检测的10000倍。

实施例5

交叉恒温扩增反应检测大肠杆菌志贺毒素I型的引物筛选，包括以下步骤：

1. 根据CPA扩增反应原理，使用PrimerPremier软件针对 *stxI* 靶点分别设计的两组引物，引物序列如下（5'-3'）：

靶点 *stxI-I* 剥离引物4s：5'- agttgatgtcagagggatag -3'（SEQ ID NO.6）；

靶点*stx1-1*剥离引物5a: 5'-cgctgtgtacactgaaa-3' (SEQ ID NO.7);

靶点*stx1-1*交叉引物2a1s: 5'-atcagcaaagcgataaaa ctacggcttattgttgaa-3' (SEQ ID NO.8);

靶点*stx1-1*特异引物2a: 5'-atcagcaaagcgataaaa-3' (SEQ ID NO.9)。

靶点*stx1-1*特异引物3a: 5'-cctgttaacaaatcctgtcac-3' (SEQ ID NO.10)

靶点*stx1-2*剥离引物4s: 5'-gagcgatgttacggttg-3' (SEQ ID NO.11);

靶点*stx1-2*剥离引物5a: 5'-caggcaggacactactcaa-3' (SEQ ID NO.12);

靶点*stx1-2*交叉引物2a1s: 5'-caacatcttcagcagtcattgggatttcgtacaacac-3' (SEQ ID NO.13);

靶点*stx1-2*特异引物2a: 5'-caacatcttcagcagtcac-3' (SEQ ID NO.14)。

靶点*stx1-2*特异引物3a: 5'-gaacgcccactgagatcatcc-3' (SEQ ID NO.15)。

2、将大肠杆菌O157:H7 ATCC43895, 大肠杆菌O157:H7 E019, 大肠杆菌O157:H7 E020, 大肠杆菌O157:H7 E043, 大肠杆菌O157:H7 E044的基因组按照实施例1中的反应体系和条件建立交叉恒温扩增反应检测方法, 进行大肠杆菌志贺毒素I型的检测, 去核酸水为阴性对照。对扩增产物进行2%的琼脂糖凝胶电泳。

结果如图5所示, 图A为根据靶点*stx1*所设计的第一套引物的电泳结果, 图B为根据靶点*stx1*所设计的第二套引物的电泳结果。靶点*stx1*所设计的第一套引物中的空白对照组无明显梯状条带, 而第二套引物的空白对照组出现了明显的梯状条带, 说明第一套引物的质量更高, 能够有效减少交叉引物恒温扩增反应中假阳性的产生。

结论: 从上述实验结果可以看出, 交叉恒温扩增反应扩增方法与常规PCR和荧光PCR具有如下优点:

操作和鉴定简便快捷: 常规PCR整个过程在2~4个小时才能出结果, 荧光定量PCR需要2~3小时, 本发明所提供的检测方法在60分钟就可出现阳性结果。其次对仪器要求低, 仅需要一个普通水浴锅, 并可以通过荧光染料直接观测检测结果, 省去了传统的电泳检测步骤。在快速检测及现场检测的实践中有广泛的应用前景。

特异性强: 仅通过是否扩增就可判断目的基因的存在与否, 从而完成了细

菌的定性检测。

灵敏度高:针对大肠杆菌 O157:H7 *rfbE* 的检测限为 3.28fg/ μ L, 是常规 PCR 反应 10000 倍左右, 具有较高的灵敏度。

上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 华南理工大学

<120> 大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 引物及试剂盒和检测方法

<160> 15

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 rfbE 剥离引物 4s

<400> 1

aggaccgcag aggaaaga 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 rfbE 剥离引物 5a

<400> 2

tccacgcaa ccaagatc 18

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 rfbE 交叉引物 2a1s

<400> 3

agtacattgg catcgtgtca gataaactca tcgaaaca 38

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 rfbE 特异引物 2a

<400> 4

agtacattgg catcgtgt 18

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 rfbE 特异引物 3a

<400> 5

ggcatcgtgt ggacagggt 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1 剥离引物 4s

<400> 6

agttgatgtc agagggatag 20

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1 剥离引物 5a

<400> 7

cgctgttgta cctggaaa 18

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1 交叉引物 2a1s

<400> 8

atcagcaaag cgataaaact acggcttatt gttgaa 36

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1 特异引物 2a

<400> 9

atcagcaaag cgataaaa 18

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1 特异引物 3a

<400> 10

cctgttaaca aatcctgtca c 21

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1-2 剥离引物 4s

<400> 11

gagcgatggt acggtttg 18

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1-2 剥离引物 5a

<400> 12

caggcaggac actactcaa 19

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1-2 交叉引物 2a1s

<400> 13

caacatcttc agcagtcattg gggatttcgt acaacac 37

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1-2 特异引物 2a

<400> 14

caacatcttc agcagtcac 19

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 靶点 stx1-2 特异引物 3a

<400> 15

gaacgcccac tgagatcatc c 21

权 利 要 求 书

1、一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测引物，其特征在于：是针对靶点 *rfbE* 设计的，包括剥离引物 4s、5a，交叉扩增引物 2a1s，以及特异引物 2a、3a；其核苷酸序列分别如下所示：

靶点 *rfbE* 剥离引物 4s: 5'-aggaccgcagaggaaaga-3' (SEQ ID NO.1);

靶点 *rfbE* 剥离引物 5a: 5'-tccacgccaccaagatc-3' (SEQ ID NO.2);

靶点 *rfbE* 交叉引物 2a1s: 5'-agtacattggcatcgtgtcagataaactcatcgaaaca-3' (SEQ ID NO.3);

靶点 *rfbE* 特异引物 2a: 5'-agtacattggcatcgtgt-3' (SEQ ID NO.4);

靶点 *rfbE* 特异引物 3a: 5'-ggcatcgtgtggacagggt-3' (SEQ ID NO.5)。

2、一种大肠杆菌志贺毒素 I 型的 CPA 检测引物，其特征在于：是针对靶点 *stx1* 设计的，包括剥离引物 4s、5a，交叉扩增引物 2a1s，以及特异引物 2a、3a；其核苷酸序列分别如下所示：

靶点 *stx1* 剥离引物 4s: 5'-agttgatgtcagaggtag-3' (SEQ ID NO.6);

靶点 *stx1* 剥离引物 5a: 5'-cgctgtgtacctggaaa-3' (SEQ ID NO.7);

靶点 *stx1* 交叉引物 2a1s: 5'-atcagcaaagcgataaaactacggcttattgttgaa-3' (SEQ ID NO.8);

靶点 *stx1* 特异引物 2a: 5'-atcagcaaagcgataaaa-3' (SEQ ID NO.9);

靶点 *stx1* 特异引物 3a: 5'-cctgttaacaaatcctgtcac-3' (SEQ ID NO.10)。

3、一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测试剂盒，其特征在于包括权利要求 1 所述的 CPA 检测引物和/或权利要求 2 所述的 CPA 检测引物。

4、根据权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于：各 CPA 检测引物的浓度为 10 μ M。

5、根据权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于还包括如下组分：

A、2×反应缓冲液：40.0 mM 的 Tris-HCl，20.0mM 的硫酸铵，20.0mM 的氯化钾，16.0mM 的硫酸镁，0.2% (v/v) 的 Tween 20，1.4 M 的甜菜碱，10.0 mM 的 dNTPs；

B、Bst DNA 聚合酶；

C、钙黄绿素和氯化锰的混合溶液。

6、根据权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于：组分 B 中所述的 Bst DNA 聚合酶是浓度为 8U/ μ L 的 Bst DNA 聚合酶水溶液。

7、根据权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于：组分 C 中所述的钙黄绿素和氯化锰的混合溶液通过如下方法制备得到：

(i) 将钙黄绿素溶于二甲基亚砷中，配制 50 μ M 的钙黄绿素溶液；将氯化锰溶于水中，配制 1 mM 的氯化锰水溶液；

(ii) 取 25 μ L 50 μ M 的钙黄绿素溶液与 10 μ L 1 mM 的氯化锰水溶液混合均匀，得到钙黄绿素和氯化锰的混合溶液。

8、一种大肠杆菌 O157:H7 的 CPA 检测方法，其特征在于包括如下步骤：

(1) 提取待检样品的细菌 DNA 作为模板 DNA，并控制模板 DNA 水溶液的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.8~2.0；

(2) 分别建立检测 *rfbE* 和/或 *stx1* 的交叉引物恒温扩增反应体系，于 63℃ 水浴中保温至少 60 分钟进行交叉引物恒温扩增反应，待反应完成后于 80℃ 水浴中保温 2 分钟终止反应；

(3) 针对靶点 *rfbE* 的检测，终止反应后肉眼观察反应体系的颜色，如颜色为黄色，说明待检样品中不含有大肠杆菌 O157:H7；如颜色变为绿色，说明待检样品中含有大肠杆菌 O157:H7；

(4) 针对靶点 *stx1* 的检测，终止反应后对扩增产物做琼脂糖凝胶电泳，呈现梯形条带的含有大肠杆菌志贺毒素 I 型，无扩增条带的不含有大肠杆菌志贺毒素 I 型。

9、根据权利要求 8 所述的检测方法，其特征在于：步骤 (2) 所述的交叉引物恒温扩增反应体系为：2×反应缓冲液 12.5 μ L，10 μ M 的剥离引物 4s 和 10 μ M 的剥离引物 5a 各 1.5 μ L，10 μ M 的交叉引物 2a1s 2.5 μ L，10 μ M 的特异引物 2a 和 10 μ M 的特异引物 3a 各 1.25 μ L，DNA 模板 1.0 μ L，8U/ μ L 的 Bst DNA 聚合酶 1.0 μ L，加去核酸水补足至 25 μ L；最后加入 1 μ L 的钙黄绿素与氯化锰的混合溶液。

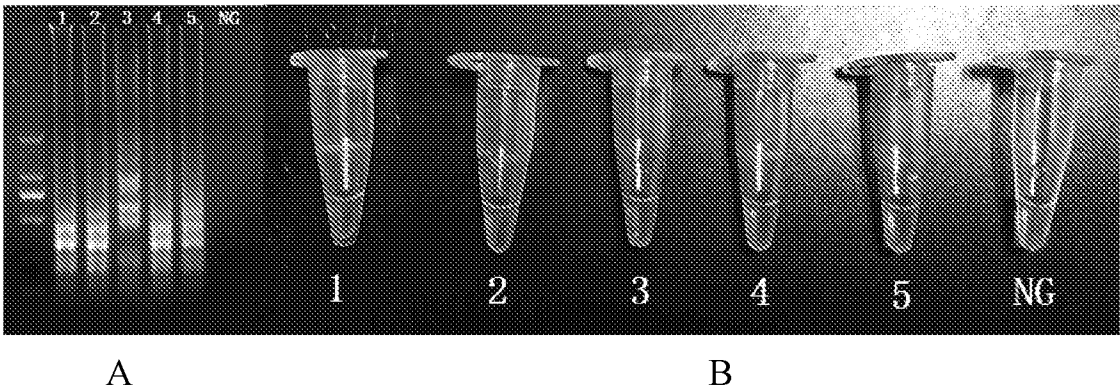


图 1



图 2



图 3

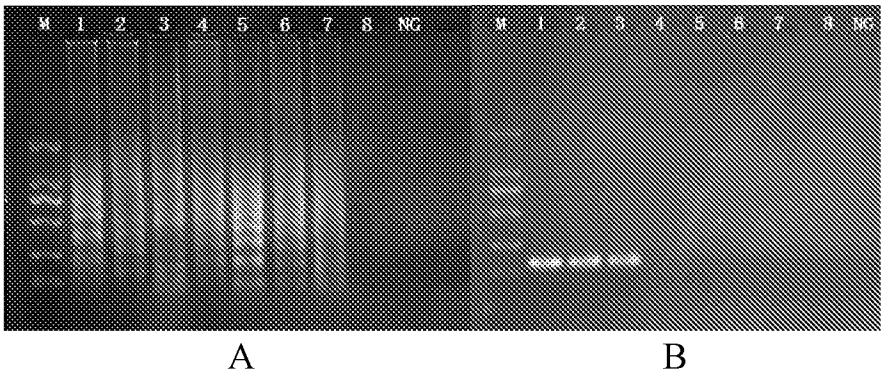


图 4

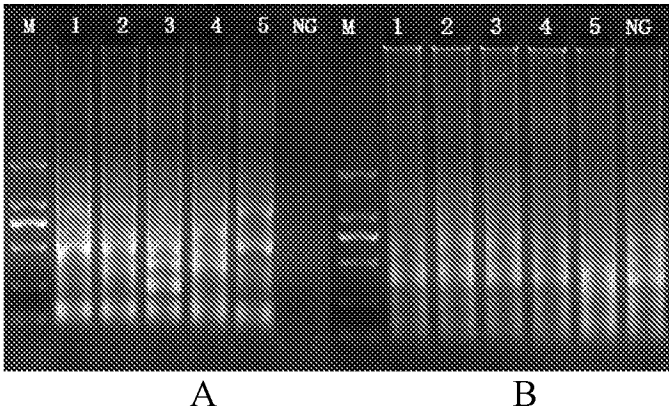


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/074822

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/689(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/10(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; SIPOABS; DWPI; CPRSABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; 万方; 百度学术; Science Direct; ISI web of Science; 引物, 大肠杆菌, rfbe, stx1, 交叉引物恒温扩增, O157: H7, primer, CPA, Ecoli, EHEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109652574 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 19 April 2019 (2019-04-19) claims 1-9	1-9
X	祁军等 (QI, Jun et al.). "交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌O157:H7快速检测中的应用 (Rapid detection of enterohemorrhagic E. coli O157: H7 by using cross priming amplification technology)" <i>口岸卫生控制 (Port Health Control)</i> , Vol. 21, No. 1., 29 February 2016 (2016-02-29), abstract, Methods	2-4
Y	祁军等 (QI, Jun et al.). "交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌O157:H7快速检测中的应用 (Rapid detection of enterohemorrhagic E. coli O157: H7 by using cross priming amplification technology)" <i>口岸卫生控制 (Port Health Control)</i> , Vol. 21, No. 1., 29 February 2016 (2016-02-29), abstract, Methods	1, 5-9
Y	CN 108796099 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 13 November 2018 (2018-11-13) abstract, claims 1-8, description, paragraph 35	1, 5-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 April 2020

Date of mailing of the international search report

06 May 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/074822**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108950029 A (QILU UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 07 December 2018 (2018-12-07) Abstract, claims 1-3	1-9
A	CN 101613743 A (XUZHOU ENTRY-EXIT INSPECTION AND QUARANTINE BUREAU OF P.R.C.) 30 December 2009 (2009-12-30) entire document	1-9
A	CN 102154488 A (GUANGXI VETERINARY RESEARCH INSTITUTE) 17 August 2011 (2011-08-17) entire document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/074822

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/074822

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	109652574	A	19 April 2019	None	
CN	108796099	A	13 November 2018	None	
CN	108950029	A	07 December 2018	None	
CN	101613743	A	30 December 2009	None	
CN	102154488	A	17 August 2011	CN 102154488 B	05 June 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/074822

A. 主题的分类 C12Q 1/689(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/10(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																							
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q; C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; SIPOABS; DWPI; CPRSABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; 万方; 百度学术; Science Direct; ISI web of Science; 引物, 大肠杆菌, rfbe, stx1, 交叉引物恒温扩增, 0157:H7, primer, CPA, Ecoli, EHEC																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109652574 A (华南理工大学) 2019年 4月 19日 (2019 - 04 - 19) 权利要求1-9</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>祁军等. "交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌0157:H7快速检测中的应用" 口岸卫生控制, 第21卷, 第1期, 2016年 2月 29日 (2016 - 02 - 29), 摘要, 方法部分</td> <td>2-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>祁军等. "交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌0157:H7快速检测中的应用" 口岸卫生控制, 第21卷, 第1期, 2016年 2月 29日 (2016 - 02 - 29), 摘要, 方法部分</td> <td>1, 5-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108796099 A (华南理工大学) 2018年 11月 13日 (2018 - 11 - 13) 摘要, 权利要求1-8, 说明书第35段</td> <td>1, 5-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108950029 A (齐鲁工业大学) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 摘要, 权利要求1-3</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101613743 A (中华人民共和国徐州出入境检验检疫局) 2009年 12月 30日 (2009 - 12 - 30) 全文</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 109652574 A (华南理工大学) 2019年 4月 19日 (2019 - 04 - 19) 权利要求1-9	1-9	X	祁军等. "交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌0157:H7快速检测中的应用" 口岸卫生控制, 第21卷, 第1期, 2016年 2月 29日 (2016 - 02 - 29), 摘要, 方法部分	2-4	Y	祁军等. "交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌0157:H7快速检测中的应用" 口岸卫生控制, 第21卷, 第1期, 2016年 2月 29日 (2016 - 02 - 29), 摘要, 方法部分	1, 5-9	Y	CN 108796099 A (华南理工大学) 2018年 11月 13日 (2018 - 11 - 13) 摘要, 权利要求1-8, 说明书第35段	1, 5-9	A	CN 108950029 A (齐鲁工业大学) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 摘要, 权利要求1-3	1-9	A	CN 101613743 A (中华人民共和国徐州出入境检验检疫局) 2009年 12月 30日 (2009 - 12 - 30) 全文	1-9
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 109652574 A (华南理工大学) 2019年 4月 19日 (2019 - 04 - 19) 权利要求1-9	1-9																					
X	祁军等. "交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌0157:H7快速检测中的应用" 口岸卫生控制, 第21卷, 第1期, 2016年 2月 29日 (2016 - 02 - 29), 摘要, 方法部分	2-4																					
Y	祁军等. "交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌0157:H7快速检测中的应用" 口岸卫生控制, 第21卷, 第1期, 2016年 2月 29日 (2016 - 02 - 29), 摘要, 方法部分	1, 5-9																					
Y	CN 108796099 A (华南理工大学) 2018年 11月 13日 (2018 - 11 - 13) 摘要, 权利要求1-8, 说明书第35段	1, 5-9																					
A	CN 108950029 A (齐鲁工业大学) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 摘要, 权利要求1-3	1-9																					
A	CN 101613743 A (中华人民共和国徐州出入境检验检疫局) 2009年 12月 30日 (2009 - 12 - 30) 全文	1-9																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																							
国际检索实际完成的日期 2020年 4月 9日		国际检索报告邮寄日期 2020年 5月 6日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 吴立 电话号码 62411046																					

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102154488 A (广西壮族自治区兽医研究所) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 全文	1-9

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/074822

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	109652574	A	2019年 4月 19日	无	
CN	108796099	A	2018年 11月 13日	无	
CN	108950029	A	2018年 12月 7日	无	
CN	101613743	A	2009年 12月 30日	无	
CN	102154488	A	2011年 8月 17日	CN 102154488	B 2013年 6月 5日