

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102936621 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 20

(21) 申请号 201210308753. X

(22) 申请日 2012. 08. 27

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

申请人 中华人民共和国上海出入境检验检疫局

(72) 发明人 施春雷 杨捷琳 史贤明 刘斌

潘良文 袁辰刚

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司

公司 31220

代理人 刘万磊

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12R 1/085(2006. 01)

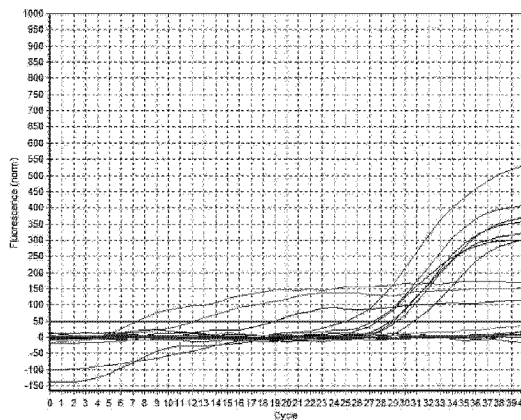
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

蜡样芽孢杆菌的检测方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明的提供一种新的蜡样芽孢杆菌的检测方法,该检测方法包括:1) 提取待检测样品中的 DNA;2) 将步骤 1) 获得的 DNA 作为模板,进行实时荧光定量 PCR 检测;其中,实时荧光定量 PCR 检测的靶标为蜡样芽孢杆菌 murB 基因。本发明还提供一种蜡样芽孢杆菌的检测试剂盒,所述试剂盒包括用于扩增蜡样芽孢杆菌 murB 基因的引物。



1. 蜡样芽孢杆菌的检测方法,其特征在于,所述方法包括:
 - 1) 提取待检测样品中的 DNA ;
 - 2) 将步骤 1) 获得的 DNA 作为模板,进行实时荧光定量 PCR 检测 ;其中,实时荧光定量 PCR 检测的靶标为蜡样芽孢杆菌 murB 基因。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,实时荧光定量 PCR 检测所用的荧光探针的核苷酸序列为 5' -TGTAAT*GG*TTGTT*CG*CAA-BHQ1-3' ,标记为星号且带下划线的核苷酸为锁核苷酸。
3. 如权利要求 2 所述的方法,其中,所述的荧光探针中的荧光素为 FAM。
4. 如权利要求 2 所述的方法,其中,实时荧光定量 PCR 检测所用的引物为引物 murB-F 和 murB-R ;其中,
murB-F 的序列为 5' -CCTTCTTCAAGTTCAAATCTCG-3' ;
murB-R 的序列为 5' -GTYGTAATGACAGGTGATGGA-3' 。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述待检测样品来自于食品。
6. 蜡样芽孢杆菌的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括用于扩增蜡样芽孢杆菌 murB 基因的引物。
7. 如权利要求 6 所述的蜡样芽孢杆菌的检测试剂盒,其中,所述引物为引物 murB-F 和 murB-R ;其中,
murB-F 的序列为 5' -CCTTCTTCAAGTTCAAATCTCG-3' ;
murB-R 的序列为 5' -GTYGTAATGACAGGTGATGGA-3' 。
8. 如权利要求 6 所述的蜡样芽孢杆菌的检测试剂盒,其中,所述试剂盒还包括锁核苷酸荧光探针,所述荧光探针的核苷酸序列为 5' -TGTAAT*GG*TTGTT*CG*CAA-BHQ1-3' ,标记为星号且带下划线的核苷酸为锁核苷酸。
9. 如权利要求 8 所述的试剂盒,其中,所述的荧光探针中的荧光素为 FAM。
10. 如权利要求 6-9 中任一所述的试剂盒在制备用于检测蜡样芽孢杆菌的产品中的应用。

蜡样芽孢杆菌的检测方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域的核酸检测。具体而言,本发明涉及蜡样芽孢杆菌快速检测的方法以及试剂盒。

背景技术

[0002] 蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 作为需氧芽孢杆菌群中的一种,无荚膜、能运动、革兰氏阳性杆菌,芽孢能耐受 100℃ 达 30 分钟。该菌在自然界分布极广,常见于土壤、污水和尘埃中;在 16-45℃ 能生长繁殖,最适生长温度为 35℃。常因本菌污染富含碳水化合物的淀粉制品和富含蛋白质的乳制品等食品并在其中生长繁殖而引起食物中毒。蜡样芽孢杆菌也是人和动物的各种非肠道传染病的条件致病菌,可引起人类患结膜炎、呼吸系统、心血管系统、中枢神经系统、伤口感染等疾病。蜡样芽孢杆菌主要的致病物质是两种对人致病的耐热和不耐热肠毒素、大量的活菌及代谢产物如磷脂酶、核酸酶、溶血素等。近年来在蜡样芽孢杆菌作为皮肤上的创口感染菌的病例逐渐增多。现已发现也引起烧伤创面感染症状类似气性坏疽,发展很快,出现肌肉坏死。有全身中毒症状,是由该细菌的外毒素所致。这类细菌感染,对任何抗生素无效。

[0003] 在食品企业,尤其是粮油加工企业,面临着严重的蜡样芽孢杆菌的污染治理问题,然而,摆在眼前的一个严峻问题是,蜡样芽孢杆菌的检测尤其是定量检测非常困难,使该生物危害因子的防治成为空谈。

[0004] 建立一种行之有效的食源性蜡样芽孢杆菌的定量检测方法,以提高对该菌的检测速度和准确性,使受污染的食品得到及时处理,在公共卫生、食品卫生和口岸检疫等中都有重要意义。

[0005] 然而,传统的检测方法耗时、操作繁琐,而基于免疫学原理的产品存在检测限高、特异性不强等问题。尤其是蜡样芽孢杆菌群的 6 种菌,包括蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*),炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*),苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*),蕈状芽孢杆菌 (*B. mycoides*),假真菌样芽孢杆菌 (*B. pseudomycoides*) 以及韦氏芽孢杆菌 (*B. weihenstephanensis*),表型和生化特征相似度非常高,仅在产肠毒素种类、伴胞晶体的有无等方面存在差异,尤其是一些不产肠毒素或不携带伴胞晶体的变异菌株的存在,使该群的鉴别非常困难。

[0006] 为此,本发明人经过长期研究,令人意外地研究出了一种以蜡样芽孢杆菌 *murB* 为靶标的锁核苷酸探针荧光定量快速检测的方法,不但能有效监控 PCR 扩增,而且蜡样芽孢杆菌的种特异性强,可有效区分蜡样芽孢杆菌群的其它芽孢杆菌,快速,检测灵敏度高,并可以应用于食品中蜡样芽孢杆菌的高通量筛检。

发明内容

[0007] 本发明的第一个方面是提供一种新的蜡样芽孢杆菌的检测方法。该检测方法包括:1) 提取待检测样品中的 DNA;2) 将步骤 1) 获得的 DNA 作为模板,进行实时荧光定量 PCR

检测;其中,实时荧光定量 PCR 检测的靶标为蜡样芽孢杆菌 murB 基因。

[0008] 本发明之所以将 murB 基因作为检测靶标是通过如下方法筛选得到的:

[0009] 通过公用数据库检索下载搜集,建立关于蜡样芽孢杆菌和非蜡样的芽孢杆菌的基因库。选取一蜡样芽孢杆菌基因组作为目标基因组,利用程序 genomecut.pl 对其进行分割,片段大小为 100bp。用 BLAST 对分割片段与种属内其他蜡样芽孢杆菌基因组进行相似性分析,利用程序 cofinder.pl 发掘种属内保守片段(即各蜡样芽孢杆菌基因组都含有的片段)。再用 BLAST 对保守片段与种属外其他非蜡样芽孢杆菌基因组进行相似性分析,利用程序 spfinder.pl 发掘种属特异片段(种属特异片段判断标准:种属内保守片段与其他所有已测序微生物基因组同源区域不超过 25bp),从而初步筛选到靶点序列。

[0010] 运用基因组学的方法,先建立了基因组库,再在目的蜡样芽孢杆菌基因组中,通过在线 BLAST 一共筛选出了共 100 个特异性片段,即 100 个大小为 100bp 的特异性 DNA 序列片段。将这 100 个特异片段经过合并整理成 87 个,分别设计引物进行特异性和灵敏度的普通 PCR 检测评价,最后证明 murB 基因对应的引物特异性和灵敏度均为最佳,因此选定 murB 基因为检测靶标。

[0011] 为了将蜡样芽孢杆菌群的几种菌加以区分,本发明通过 murB 基因保守位点的分析,设计合成了将 murB 基因特有的保守位点加以锁核苷酸(locked nucleic acid,LNA)修饰的探针。锁核苷酸是一种人工合成的反义寡核苷酸,能够和靶核酸分子特异稳定的结合,从而增加探针的熔解温度,即 T_m 值,使 PCR 反应的特异性和稳定性得到加强。该锁核苷酸探针 LNA-probe 的序列为 5'-FAM-TGTAAT*GG*TTGTT*CG*CAA-BHQ1-3'(标记为星号且带下划线的核苷酸为锁核苷酸)。

[0012] 因此,优选地,本发明中,实时荧光定量 PCR 检测所用的荧光探针的核苷酸序列为 5'-TGTAAT*GG*TTGTT*CG*CAA-BHQ1-3',标记为星号且带下划线的核苷酸为锁核苷酸。

[0013] 在本发明中,样品是潜在含有蜡样芽孢杆菌的离体样品,如食品、血液、血液制品、唾液、医疗用品或药品等。由于蜡样芽孢杆菌是食源性致病菌,因此优选样品来自于食品,如样品是食品,或者样品是食品的细菌平板培养物等。需要指出的是,检测来自于食品的样品,属于食品安全检测领域。

[0014] 提取 DNA 以及实时荧光定量 PCR 检测中所用的试剂和仪器已经为本领域技术人员所掌握,而且目前有大量商品化的试剂和仪器可供选用。例如,在本发明的具体实施方式中,可以使用 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒来提取菌体基因组 DNA,可以使用 Taqman Universal PCR Master Mix II with UNG 试剂盒以及 ABI7500 荧光定量 PCR 仪来进行实时荧光定量 PCR 检测。但是,这些试剂不提供荧光定量 PCR 的引物和探针。优选在本发明中,实时荧光定量 PCR 的引物为 murB-F 和 murB-R, murB-F 的序列为 5'-CCTTCTTCAAGTTCAAATCTCG-3', murB-R 的序列为 5'-GTYGTAATGACAGGTGATGGA-3'。

[0015] 探针法荧光定量 PCR 的反应过程是本领域技术人员所能掌握的,一般为两步法,每个循环包括在 95° C 的变性和 60° C 的延伸过程,根据本发明人研究,最优选的实时荧光定量 PCR 的过程为 40 个循环,其中每个循环为 95° C/15sec,60° C/1min。

[0016] 探针在实时荧光定量 PCR 的反应体系中的含量对实时荧光定量 PCR 检测的结果有一定的影响。根据本发明人研究,最优选的内标在实时荧光定量 PCR 的反应体系中的含量为 0.1 μ mol/L。

[0017] 本发明的另一个方面是提供一种蜡样芽孢杆菌的检测试剂盒,包括用于扩增蜡样芽孢杆菌 murB 基因的引物。优选地,所述引物为引物 murB-F(序列为 5'-CCTTCTTCAAGTTCAAATCTCG-3') 和 murB-R(序列为 5'-GTYGTAATGACAGGTGATGGA-3')。

[0018] 另外,本发明所提供的试剂盒还可包括锁核苷酸荧光探针,所述荧光探针的核苷酸序列为 5'-TGTAAT*GG*TTGTT*CG*CAA-BHQ1-3',标记为星号且带下划线的核苷酸为锁核苷酸。

[0019] 检测试剂盒还可以包括提取 DNA 和 / 或实时荧光定量 PCR 检测中所用的试剂。这些试剂可以通过市场渠道购买,如可以将现有的提取 DNA 和 / 或实时荧光定量 PCR 检测试剂盒中的试剂进行分装。

[0020] 本发明的又一个方面是提供本发明中的试剂盒在制备用于检测蜡样芽孢杆菌的产品中的应用。所述产品包括检测试剂盒,进一步地,还可以包括记载检测蜡样芽孢杆菌的方法的说明书。

[0021] 优选地,本发明中的蜡样芽孢杆菌为 *B. cereus*。

[0022] 本发明取得的有益效果在于:有效监控荧光定量 PCR 扩增过程;蜡样芽孢杆菌检测的种特异性强,可有效区分蜡样芽孢杆菌群的其它菌种,使得检测结果更能满足实际食品安全检测的需求;检测方法快速、灵敏度高,适用于高通量筛选。

[0023] 为了便于理解,以下将通过具体的附图、实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是,这些描述仅仅是示例性的描述,并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述,本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都是显而易见的。另外,本发明引用了公开文献,这些文献是为了更清楚地描述本发明,它们的全文内容均纳入本文进行参考,就好像它们的全文已经在本文中重复叙述过一样。

附图说明

[0024] 图 1 显示了本发明一种具体实施方式中的实时荧光定量 PCR 体系检测阳性菌和阴性对照菌株的荧光定量 PCR 扩增曲线。

[0025] 图 2 显示了本发明一种具体实施方式中的实时荧光定量 PCR 体系检测的重现性。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图详述了本发明的一种优选的具体实施方式。

[0027] 以下本文将通过具体的实施例来描述发明。如未特别指明之处,可根据本领域技术人员所熟悉的《分子克隆实验指南》(第三版)(科学出版社,北京,中国,2005年)等实验手册以及本文所引用的参考文献中所列方法来实施。

[0028] 1.1 主要试剂和仪器

[0029] 以下描述中提到的 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒,购自美国 Qiagen 公司 (Cat. No. 51304);Taqman Universal PCR Master Mix II with UNG 荧光定量 PCR Kit 购自美国 Invitrogen 公司 (Cat. No. 4440038);ABI7500 荧光定量 PCR 仪,购自 ABI 公司。

[0030] 1.2 菌株以及 DNA 的抽提

[0031] 菌株均可以购自于中国农业微生物菌种保藏管理中心 (ACCC)、中国医学微生物菌种保藏中心 (CMCC) 以及美国典型微生物保藏中心 (ATCC),菌株编号如表 1 所示。培养方法

可以按照上述菌株提供单位推荐的方法进行,参照厂商说明,用QIAamp DNA Mini Kit试剂盒来提取细菌基因组 DNA。

[0032] 表 1 蜡样芽孢杆菌及非蜡样芽孢杆菌标准菌株以及用本发明的 PCR 方法检测的结果

[0033]

序号	菌株名称	菌株编号	PCR检测结果*
1	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ACCC 02803	+
2	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ACCC 01102	+
3	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ACCC 01664	+
4	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ACCC 10608	+
5	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ACCC 10609	+
6	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ACCC 01956	+
7	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ACCC 10117	+
8	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	+
9	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ACCC 01110	+
10	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051-U	-
11	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	-
12	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	-
13	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581	-
14	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	-
15	苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792	-
16	克劳氏芽孢杆菌 <i>Bacillus clausii</i>	ATCC 700160	-
17	耐盐芽孢杆菌 <i>Bacillus halodurans</i>	ATCC 27557	-
18	蕈状芽孢杆菌 <i>Bacillus mycooides</i>	ATCC 6462	-
19	嗜热脂肪地芽孢杆菌 <i>Geobacillus stearo- thermophilus</i>	ATCC 12980	-
20	鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	-
21	肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 13076	-
22	鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 13311	-
23	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-
24	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	-
25	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664	-
26	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 8095	-
27	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 27336	-
28	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC 46114	-
29	普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 33420	-
30	奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i> Hauser	ATCC 12453	-

[0034]

31	弗氏枸橼酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	-
32	单核细胞增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC BAA-751	-
33	大肠杆菌 O157 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43889	-
34	副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 33846	-
35	创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	-
36	福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	CMCC 51311	-
37	痢疾志贺氏菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	CMCC 51335	-
38	宋内志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i>	CMCC 51334	-
39	阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	-
40	粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	ATCC 21740	-
41	滕黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	-
42	鸟肠球菌 <i>Enterococcus avium</i>	ATCC 14025	-
43	屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 27270	-
44	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452	-
45	阪崎肠杆菌 <i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-
46	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 17485	-
47	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDC B32116	-
48	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 19218	-
49	气味沙雷氏菌 <i>Serratia odorifera</i>	ATCC 33077	-
50	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC 11864	-

[0035] *注 :+ 表示 PCR 扩增结果为阳性 ; - 表示 PCR 扩增结果为阴性

[0036] 1.3 实时荧光定量 PCR 反应

[0037] PCR 反应体系 (本文中 PCR 体系均参照此) :Taqman Universal PCR Master Mix II with UNG, 10.0 μ L, 引物 murB-F (5' -CCTTCTCAAGTTCAAATCTCG-3') (10 μ mol/L), 1 μ L, 引物 murB-R (5' -GTYGTAATGACAGGTGATGGA-3') (10 μ mol/L), 1 μ L, 锁核苷酸探针 LNA-probe (5' -FAM-TGTAAT*GG*TTGTT*CG*CAA-BHQ1-3') (2 μ mol/L), 1 μ L, ROX 荧光校正试剂 (50 \times), 0.5 μ L, 超纯水, 4.5 μ L; 加入 2.0 μ L 模板 (即, 上述各自抽提的菌株 DNA)。在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增和荧光检测, 扩增条件为 :40 个循环 : 95 $^{\circ}$ C/15sec, 68 $^{\circ}$ C/1min。实时荧光定量 PCR 体系检测阳性菌和阴性对照菌株的荧光定量 PCR 扩增曲线如图 1 所示。实时荧光定量 PCR 体系检测的重现性如图 2 所示。

[0038] 1.4 方法特异性

[0039] 将表 1 所列菌株培养后提取总 DNA, 进行 1.3 节所述的实时荧光定量 PCR 法。结果如表 1 所示, 所有蜡样芽孢杆菌菌株均能得出阳性的检测结果, 而所有非蜡样芽孢杆菌菌株检测结果均为阴性。

[0040] 1.5 方法灵敏度

[0041] 蜡样芽孢杆菌 ATCC14579 在 LB 平板上划线后, 挑取单克隆接种于 1mL LB 液体培

培养基培养 18~24 小时,培养物 10 倍梯度稀释,每个稀释梯度取 1mL 抽提总 DNA,按 1.3 节所述的实时荧光定量 PCR 法。另各取 1mL 进行平板计数。

[0042] 当蜡样芽孢杆菌纯培养物稀释后得到的平板计数浓度为 10^2 CFU/mL 时,PCR 检测的 Ct 值为 38.5;而浓度为 10CFU/mL 时,Ct 值大于 40,超越仪器分辨极限,即检测限为 10^2 CFU/mL。

[0043] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术人员无需创造性劳动就可以根据本发明的构思做出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域的技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

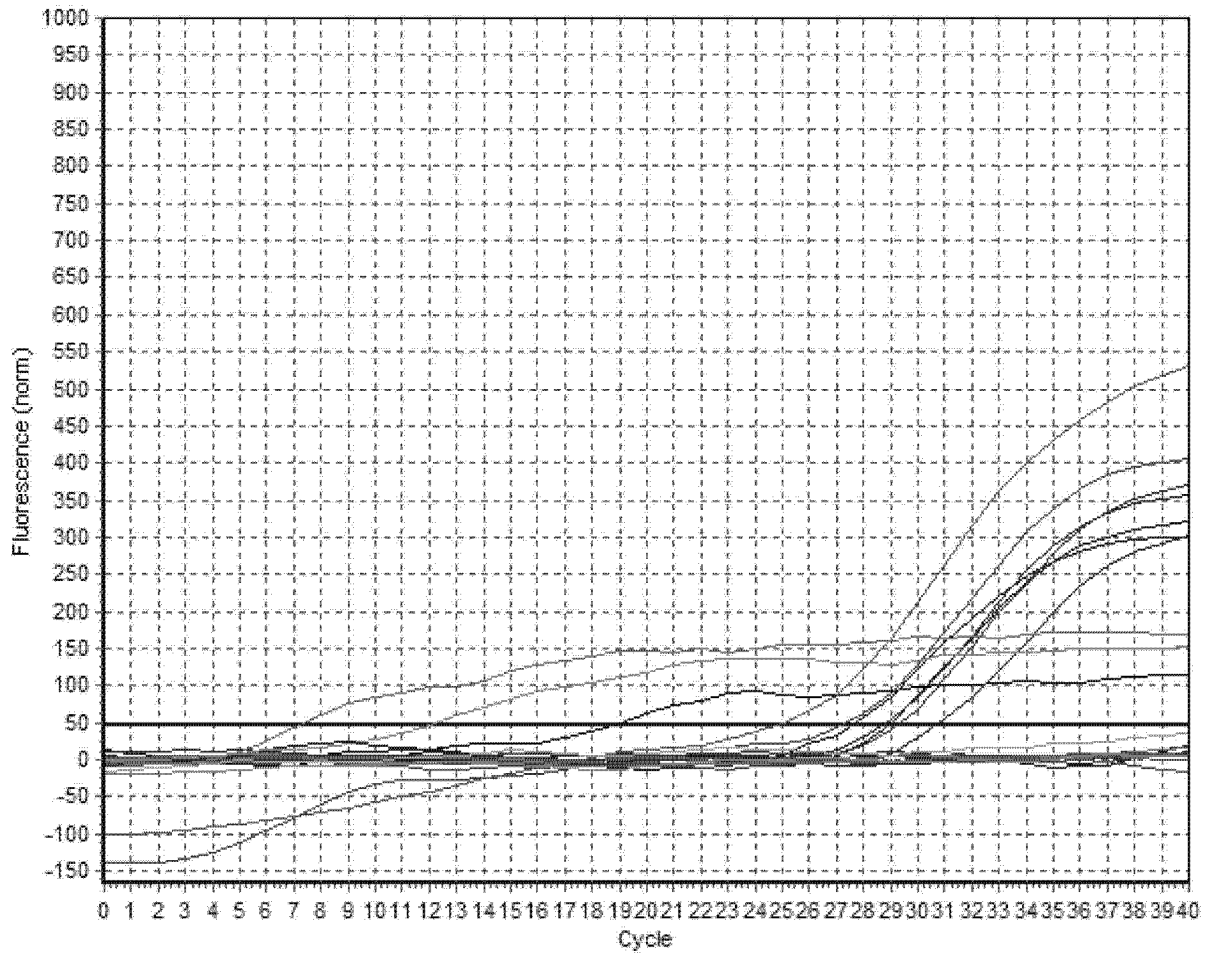


图 1

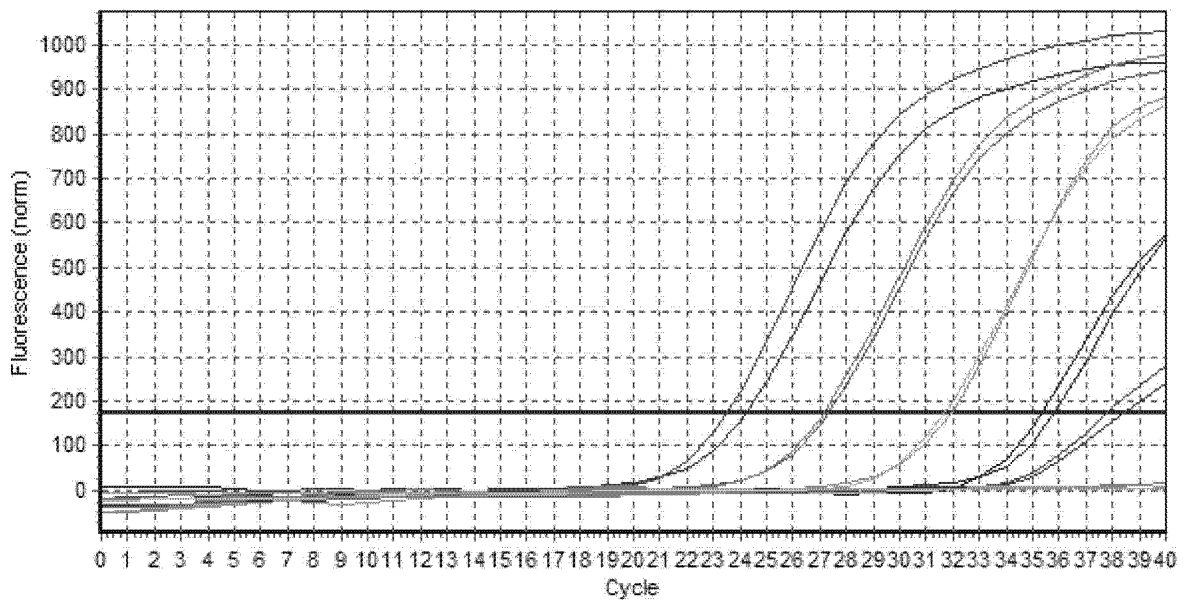


图 2