



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103045718 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 17

(21) 申请号 201110307504. 4

C12R 1/01 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 10. 12

(71) 申请人 中华人民共和国北京出入境检验检疫局

地址 100026 北京市朝阳区甜水园街 6 号

申请人 中国科学院生物物理研究所

(72) 发明人 张捷 顾德周 张惠媛 王佩荣
乐加昌 陈广全

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12Q 1/42 (2006. 01)

C12Q 1/04 (2006. 01)

C12R 1/42 (2006. 01)

C12R 1/63 (2006. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

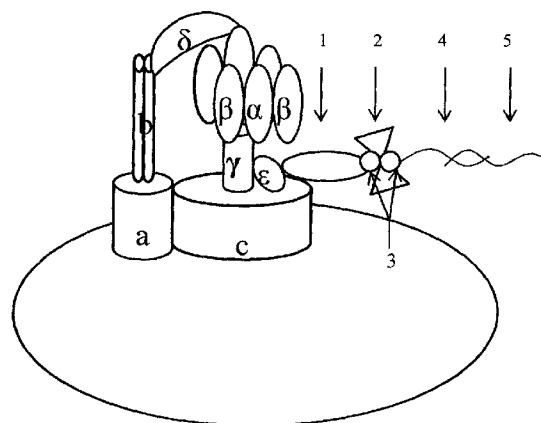
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种用于检测沙门氏菌的分子马达生物传感器试剂盒

(57) 摘要

一种用于检测沙门氏菌的分子马达生物传感器试剂盒属于食品微生物快速检测领域, 主要解决传统检测方法时间过长 (5 ~ 6 天)。本发明的核心技术是利用载色体 Chromatophore 上的 F_0F_1 -ATPase 分子马达生物传感器, F_0F_1 -ATP 合酶由于能快速地旋转, 通过旋转它建立了催化位点与质子转运之间的偶联。首先在 ATP 合酶的 ϵ 亚基上连接 *invA* 探针, 将待测样品和阴性对照分别与生物传感器结合后, 比较其催化 ATP 合成 30 分钟后的 ATP 产生量, ATP 合成的多寡可以通过环境中 H^+ 的量进行测量, 而 H^+ 的多寡通过 H-DHPE 所体现的荧光强度大小来获得。本试剂盒可对待测样本中的沙门氏菌进行快速、灵敏、高通量的检测。



本发明要求保护的内容有：

1. 特异性核酸探针与 F_0F_1 -ATP 合酶连接的方式：在 F_0F_1 -ATP 合酶的 ϵ 亚基上依次连接 ϵ 亚基抗体、生物素、链霉亲和素、生物素标记的 invA 探针。
2. 试剂盒检测体系的反应条件：37℃ 恒温摇床中温育 30min。
3. 合成 buffer、启动 buffer、PBS 的配方。合成 buffer：甘油 20%，氯化镁 5mM, Tricine 50mM, 磷酸氢二钾 5mM；启动 buffer：ADP (1.6mM)：上述合成 buffer = 1：3(v/v)；PBS：137mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾, 10mM 磷酸氢二钠, 2mM 磷酸二氢钾。

一种用于检测沙门氏菌的分子马达生物传感器试剂盒

技术领域

[0001] 本发明是关于食品微生物快速检测技术的一种。

背景技术

[0002] 传统的病原菌检测方法要求对每个检验项目进行非选择性增菌、选择性增菌、分离、筛选和鉴定等步骤,一般需要 5 天才能出具检测报告,严重影响货物的品质和货架寿命。一些新的技术如 PCR 技术、免疫学检测技术、生物芯片技术等检测方法仍依赖于传统的检测步骤,即需要进行增菌,耗时耗力,完成一次检测通常需要几天的时间。这样不仅增加了实验室的工作量,而且也不利于食品工业中生产流程的监测、终产品的质量控制在以及政府部门对食品安全的管理和控制。由于进出口食品的大量增加,因此急需可靠有效的快速检测方法,缩短检测时间,促进我国食品的进出口贸易。

发明内容

[0003] 以受控分子马达技术为核心,集成核酸探针识别、荧光探针标记与检测等技术,建立了一个全新概念的快速检测技术体系。利用 ATP 酶作为载体对目标物进行检测具有灵敏度高、特异性强、快速的特点。在 F_0F_1 -ATPase 分子马达连接上特异的核酸探针,可以实现对特定食品微生物的快速、特异性、高通量的检测。本发明可将检测时间缩短至 2 天,且检测灵敏度能达到 10^2 CFU/ml,满足现有的食品微生物检测范围。

附图说明

[0004] 附图 1 为分子马达生物传感器模式图(其中 a、b、c、 α 、 β 、 δ 、 γ 、 ϵ 均为 ATP 合酶亚基),1 为 ϵ 亚基抗体,2 为链霉亲和素(Streptavidin),3 为 N-biotin,4 为 invA 探针,5 为沙门氏菌单链 DNA。

[0005] 附图 2 为 chro invA 对不同种菌株的检测结果,纵坐标表示荧光值,横坐标表示检测的样本,其中 1 为水,2 为沙门氏菌,3 为副溶血性弧菌,4 为霍乱弧菌,5 为单增李斯特氏菌,6 为大肠杆菌。

[0006] 附图 3 为 chro invA 对 30 株沙门氏菌样本的检测结果,纵坐标表示荧光值,横坐标表示检测的样本,1 ~ 30 为食品检测样本编号。

具体实施方式

[0007] 根据沙门氏菌 invA 基因设计特异性核酸探针 5' gtgaaattatcgccacgttcgggcaa,其中探针的 5' 用生物素进行标记。将该探针通过生物素抗体连接在分子马达上面,利用分子马达生物传感器即可对待测样本的 DNA 进行检测,当样品为沙门氏菌 DNA 时,检测体系的荧光值会发生明显的变化,通过这一变化即可判断样本为阳性。为此,我们设计了一个试剂盒,可以方便、快速对食品中的沙门氏菌进行检测。

[0008] 试剂盒组成:

[0009]

编号	组分名称	数量	保存条件
1	Chro invA	20 μ l	-20 $^{\circ}$ C
2	合成 buffer	10ml	室温
3	ADP(1.6mol/l)	1ml	-20 $^{\circ}$ C
4	1 \times PBS	25ml	室温
5	荧光素酶 / 荧光素	100 个单位	-20 $^{\circ}$ C
6	荧光素酶 / 荧光素重组缓冲液	12ml	-20 $^{\circ}$ C
7	无菌水	5ml	室温

[0010] 操作步骤如下：

[0011] 1. 取 1.5ml EP 管，加入待测样本 10 μ l。

[0012] 2. 将上述 EP 管放入沸水中 3min，然后立即转移到冰上至完全冷却。

[0013] 3. 取 2 μ l chro invA，用合成 buffer 稀释到一定的倍数。取稀释后的 chro 10 μ l 加入上述 EP 管。[0014] 4. 另取 1 个 EP 管加入 10 μ l 无菌水，沸水中 3min，然后立即转移到冰上至完全冷却，再加入 10 μ l 合成 buffer 作为本底对照，短暂振荡使反应体系混匀。[0015] 5. 再向 2 个 EP 管中分别加入 30 μ l 启动 buffer（启动 buffer 由 ADP(1.6mol/l) 和合成 buffer 按体积比 1 : 3 配制，每次实验按需要取一定的量配制，现用现配），振荡使反应体系混匀，然后立即短暂离心以除去管盖内壁上的水珠。[0016] 6. 将上述反应体系放入 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中温育 30min。[0017] 7. 将 EP 管从摇床中取出，分别加入 450 μ l PBS 缓冲液，振荡使体系混匀。[0018] 8. 取一块干净的 96 孔板，将 2 管中的最终反应体系加入其中，每个体系加 3 孔，每孔加样 50 μ l，然后对每个加样孔分别加入 30 μ l 已配置好的荧光素酶溶液（将荧光素酶 / 荧光素重组缓冲液加入装有荧光素酶 / 荧光素的棕色玻璃瓶中，盖上瓶塞，反复颠倒几次混匀，不可振荡。使用前应将混合液在室温放置 1h），用枪反复吹打几次使体系混匀。

[0019] 9. 将 96 孔板上机检测，处理数据，对各组数据取平均值，然后用样本数值减去本底数值即为样本的实际荧光值。

[0020] 通过实验，分子马达生物传感器 chro invA 具有良好的特异性，用 chro invA 对水、沙门氏菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、单增李斯特氏菌、大肠杆菌进行检测，沙门氏菌的荧光值明显低于水和其他对照菌的荧光值，具体数据见下表，结果见附图 2。

[0021]

样品 (60ng/mL)	荧光值
水	186833
沙门氏菌	151545
副溶血性弧菌	191182
霍乱弧菌	213759
单增李斯特氏菌	217528
大肠杆菌	221041

[0022] 用 *chro invA* 对 30 株食品样本进行检测, 均能检出, 具体数据见下表, 结果见附图 3。

[0023]

样本编号	荧光值	样本编号	荧光值
水	109189	16	83584
1	79808	17	81985
2	82552	18	86921
3	80465	19	91123
4	79272	20	87213
5	75704	21	85731
6	78311	22	83990
7	73562	23	82643
8	81879	24	86794
9	83382	25	86762
10	87573	26	84188
11	84986	27	85778
12	84826	28	88563
13	84337	29	80783

14	81762	30	83503
15	76086	——	——

[0024] 实验结果表明,该试剂盒对沙门氏菌 DNA 的检测时间为 1h,检出限为 10ng/ml。对 30 株食品检测样本菌株的检出结果与 PCR 检测的结果一致。通过大量的实验验证该分子马达生物传感器具有良好的特异性和较高的灵敏度,并可通过 96 孔化学发光板高通量的对样本进行检测。

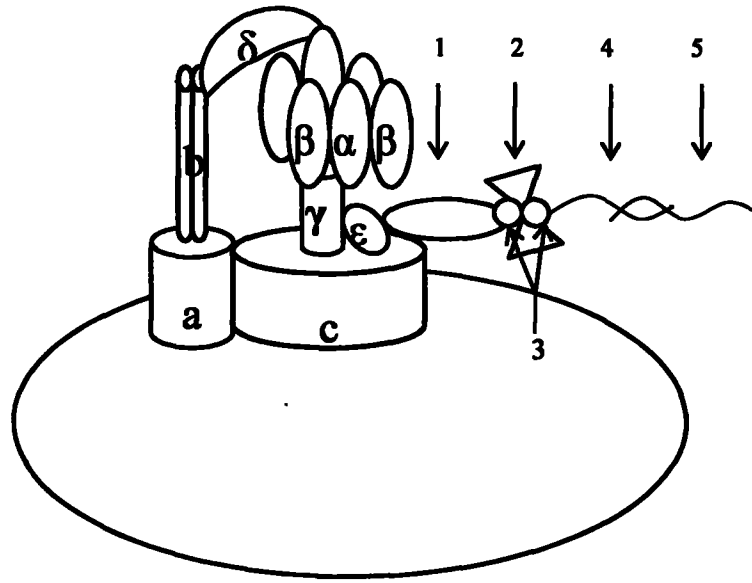


图 1

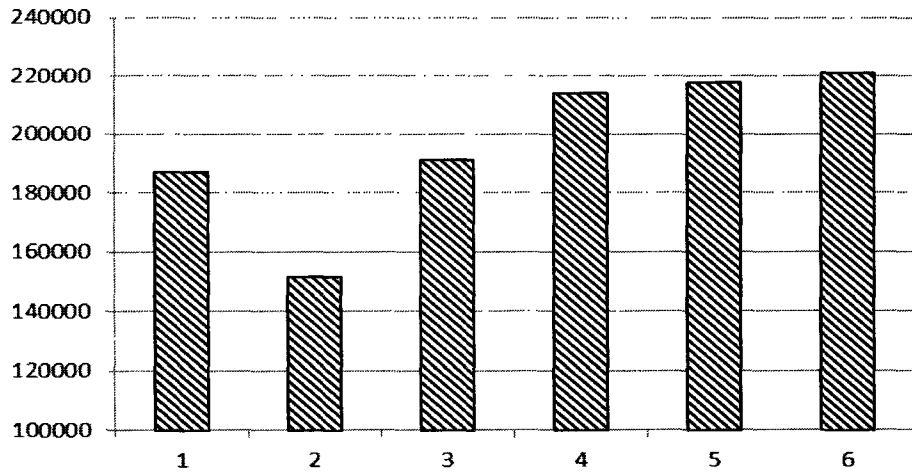


图 2

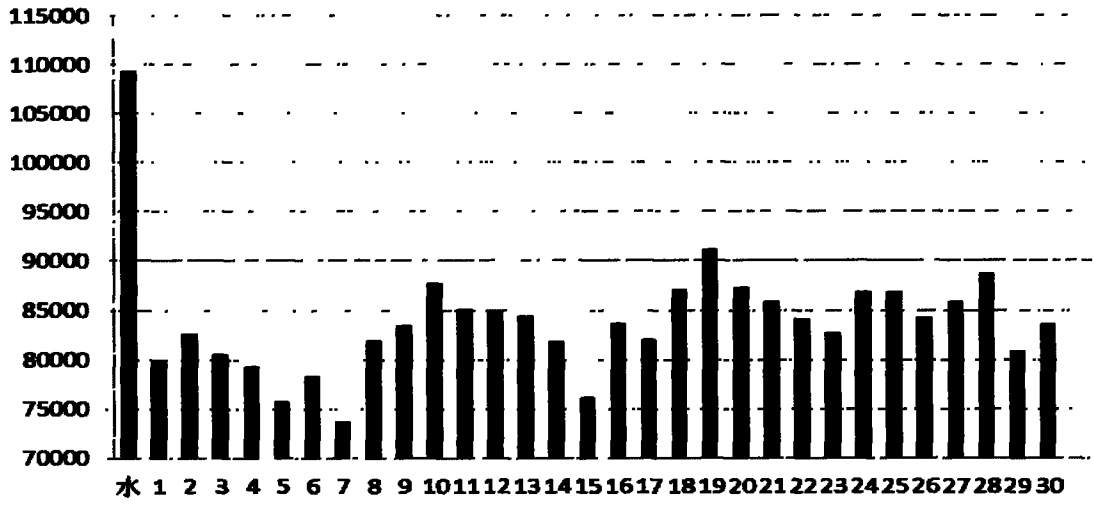


图 3