

# 空肠弯曲菌的磁捕获-荧光 PCR 检测方法的建立 Establishment of Immunomagnetic Capture-Fluorescent PCR Detection Method for *Campylobacter jejuni*

刘光明<sup>1,2\*</sup>, 苏文金<sup>3</sup>, 蔡慧农<sup>3</sup>, 谢明星<sup>1</sup>, 刘 棠<sup>1</sup>, 彭小莉<sup>1</sup>  
LIU Guang-Ming<sup>1, 2\*</sup>, SU Wen-Jin<sup>3</sup>, CAI Hui-Nong<sup>3</sup>, XIE Ming-Xing<sup>1</sup>, LIU Tang<sup>1</sup> and  
PENG Xiao-Li<sup>1</sup>

1. 厦门出入境检验检疫局, 厦门 361012

2. 汕头大学生物学系, 汕头 515063

3. 集美大学生物工程学院, 厦门 361021

1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012, China

2. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China

3. School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China

**摘 要** 为提高畜禽类食品中空肠弯曲菌的检出率和灵敏度,应用抗血清和磁性微珠首次制备弯曲菌免疫磁珠,利用弯曲菌免疫磁珠直接捕获检样中目的菌,不需要增菌培养;通过荧光 PCR 检测鞭毛蛋白 A(flA)基因和/或马尿酸酶(hipO)基因,首次建立空肠弯曲菌的磁捕获-荧光聚合酶链反应(IMC-FPCR)方法。IMC-FPCR 法检测空肠弯曲菌方法简便易行,可在 24h 内完成,特异性好,检测下限达到 10cfu/mL,抗干扰性强。IMC-FPCR 方法可望解决非可培养状态的空肠弯曲菌检测难题,是一种适用于检验检疫、卫生防疫和农产品安全检验等领域的快速方法。

**关键词** 空肠弯曲菌, 免疫磁珠捕获, 荧光 PCR, 检测

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0336-05

**Abstract** In order to develop a rapid method which can check *Campylobacter jejuni* in animal and poultry foods nicely, an immunomagnetic capture-fluorescent PCR (IMC-FPCR) method was established in this paper. The reported method involves isolation of the target pathogen by immunocapture prior to the fluorescent PCR step, therefore the immunomagnetic-beads for *Campylobacter* were developed, and two groups of primer/probe, which targeted for the species special sequence of flA gene and hipO gene for *Campylobacter jejuni* were designed. The immunomagnetic capture-fluorescent PCR assay amplification of the hipO gene and flA gene for detection of *Campylobacter jejuni* was firstly reported in this paper. Result indicated that IMC-FPCR method permits direct detection of the pathogen without an enrichment step and can be performed in approximately 24 h. The assay results are positive for all of the isolates of *Campylobacter jejuni* (3 isolates, including type strain ATCC 33560 and ATCC8341) with a detection limit of approximately 10 cfu/mL, are negative for *Campylobacter coli* and several other bacteria. IMC-FPCR assay provide not only a rapid, sensitive method for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*, but also an important method for detecting of *Campylobacter jejuni* of viable but non-culturable (VNC) state.

**Key words** *Campylobacter jejuni*, immunomagnetic capture, fluorescent PCR, detection

Received: October 8, 2004; Accepted: December 15, 2004.

This work was supported by Grant from General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China (No.2002IK002-06).

\* Corresponding author. Tel: 86-592-6013201; E-mail: lgm@xmciq.gov.cn

国家质量监督检验检疫总局重大科技项目(No.2002IK002-06)。

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 是近十几年来被认识的在世界范围广泛流行的人兽共患病原菌,可引起人体急性肠炎和食物中毒,并引发格林-巴利综合症、反应性关节炎和肝炎等严重的并发症。该菌通过动物带菌者或患病者的粪便进入环境中,并在水环境中可以进入一种称为“活的非可培养状态”(viable but non-culturable, VNC)的休眠期。接触禽畜类,或食入受到污染的禽制品、水源和牛奶是该菌感染人体的主要媒介<sup>[1]</sup>。国外流行病学调查表明,该菌作为肠炎的病因仅次于沙门氏菌和志贺氏菌,在很多地区甚至有超过沙门氏菌而居首位的趋势<sup>[2]</sup>。我国在上海、北京、福建等地多次报道经食物感染该菌并引发疾病<sup>[3]</sup>。世界卫生组织已将该病列为最常见的食源性传染病之一。

建立空肠弯曲菌快速而特异性的分离和检测方法,是有效控制和预防该类“正在发展的食源性病原菌”的关键所在。面对复杂多样的样品时,传统的分离鉴定方法需要耗费大量的时间和人力,而且存在敏感性低、难以检测 VNC 状态的空肠弯曲菌和易出现假阴性结果等问题<sup>[4]</sup>,这将严重制约对该菌的快速准确检测,因此迫切要求新的检测技术来改变这一状况。

本研究应用抗血清和磁性微珠制备弯曲菌免疫磁珠,利用免疫磁珠直接捕获检样中目的菌;通过荧光 PCR 检测鞭毛蛋白 A(flA)基因和/或马尿酸酶(hipO)基因,建立磁捕获-荧光 PCR(immunomagnetic capture-fluorescent PCR, IMC-FPCR)检测方法,以期提高禽畜类食品中空肠弯曲菌的检出率和灵敏度,并达到 1 个工作日内完成检测的要求。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验菌株:本研究使用的空肠弯曲菌标准菌株(ATCC33560)来自福建省疾病预防控制中心,空肠弯曲菌标准菌株(ATCC 8341)及结肠弯曲菌标准菌株(ATCC7709)来自上海市疾病预防控制中心,空肠弯曲菌阳性菌株(XMIQ030516)系本实验室从实物样品中分离得到,12种其它细菌菌株由本实验室保存或分离(表1)。

1.1.2 主要试剂:弯曲菌免疫血清(カソピロバクター免疫血清, Lot No. 104041)为デソカ生研株式会社产品;磁珠液 Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG 及其试剂(PBST 缓冲液、10×洗液、重悬液和 NaOH 等)为 DYNAL 公司产品;AmpliQ™ Gold DNA 聚合酶和 AmpErase® UNG 酶为 Applied Biosystems 公司产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 引物及探针设计:目前空肠弯曲菌检测的目的 DNA 序列有 23S rRNA、16S rRNA、hipO 和 flA 等基因<sup>[5]</sup>。本研究选择了常用的 16S rRNA、hipO 和 flA 基因作为扩增目标序列,使用 Primer Express® 软件(Applied Biosystems)自行设计多组引物及 Taqman 探针。对设计的引物及探针进行比较选择后,从中确定了五组引物及探针,分别是 74-UC、RDB、JSCIQ、11168 和 400-1134,由上海生工生物工程技术有限公司

表 1 本研究使用的菌株

Table 1 List of bacterial reference strains used in this study

Bacteria	Serial Number	Purpose
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC33560	Positive control
	ATCC8341	Positive control
	XMIQ030516	Positive control
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC7709	Negative control
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19115	Negative control
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC25931	Negative control
<i>Vibrio cholera</i>	XMIQ020419	Negative control
<i>Staphylococcus aureus</i>	XMIQ010317	Negative control
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC27736	Negative control
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC50308	Negative control
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	XMIQ030225	Negative control
<i>Vibrio alginolicus</i>	XMIQ990518	Negative control
<i>Aeromonas caviae</i>	XMIQ010624	Negative control
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC28576	Negative control
<i>Aeromonas hydrophila</i>	XMIQ020630	Negative control
<i>Escherichia coli</i>	ATCC43888	Negative control

\* ATCC: American Type Culture Collection; XMIQ: Xiamen Inspection and Quarantine.

合成。

1.2.2 血清特异性试验:将弯曲菌免疫血清与 16 个已知细菌(3 株空肠弯曲菌、1 株结肠弯曲菌和 12 种其它细菌,表 1)进行玻片凝集试验<sup>[6,7]</sup>,以确定其特异性和交叉反应性。

1.2.3 免疫磁捕获方法的建立<sup>[7,8]</sup>:①免疫磁珠的制备:取 0.1mL 磁珠液于 1.0mL PBST 缓冲液中,混匀,3000r/min 离心 2min,弃液体;重复清洗 3 次后,加入 1.0mL PBST 缓冲液使磁珠重悬其中;加入 0.1mL 弯曲菌免疫血清,室温轻缓旋转振荡 3h;用 1.0mL 洗液清洗 5 次后,加入 0.5mL 重悬液,于 4℃ 保存备用。

②目的菌的磁捕获:无菌操作取检样至 50mL 蛋白胨水中,轻缓振荡 30min;取检样上清液于 3000r/min 离心 2min,上清液再次于 5000r/min 离心 20min,弃液体,沉淀重悬于 1.0mL PBST 缓冲液中;取检样悬液于装有 0.1mL 免疫磁珠悬液的小管中,室温轻缓旋转振荡 30min;将小管置于 Dynal MPC-S 磁架上 3min,小心移出管中液体;加入 1.0mL 洗液混匀,置于磁架上 3min,移出洗液;重复清洗 5 次,加入 0.1mL 重悬液使吸附弯曲菌的磁珠重悬其中。带有弯曲菌的磁珠悬液可转接在肉汤或平板中进行培养,也可直接用于提取细菌 DNA。

③细菌 DNA 的提取(煮沸法):取 50 μL 弯曲菌磁珠悬液于 0.5mL 管中,100℃ 水浴 10min,5000r/min 离心 5min,上清液于 -20℃ 条件下保存备用。

1.2.4 荧光 PCR 检测方法的建立:荧光 PCR 扩增反应体系含有:10×PCR 缓冲液, MgCl<sub>2</sub>, dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dUTP), 引物 1 和 2, TaqMan 探针, UNG 酶, DNA 聚合酶, 细菌 DNA 模板, 灭菌超纯水。荧光 PCR 扩增反应条件为 50℃/2min, 预变性 95℃/10min; 而后 95℃/15s, 55℃/60s, 共 40 个循环。PCR 扩增反应条件则以 50℃ 作用 2min 开始, 此阶段为

UNG 酶作用时间,UNG 酶在 50℃ 可选择性地将含有 dUTP 的产物降解而对正常胸腺嘧啶的模板 DNA 无破坏作用。由于 UNG 酶不耐热,可通过热变性失活,不影响新扩增的 PCR 产物。这样既防止了含有 dUTP 的 PCR 产物污染,又不妨碍目的基因的扩增,提高了 PCR 的准确性和特异性<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.5 磁捕获-荧光 PCR 检测方法的特异性和敏感性试验:

① 抗干扰性试验:将培养 24h 的 ATCC33560 菌液与结肠弯曲菌及 12 种其它细菌菌液等量混合,以弯曲菌免疫磁珠从混合菌液中捕获并提取细菌 DNA,荧光 PCR 检测空肠弯曲菌 *flaA* 和 *hipO* 基因。

② 敏感性试验:用改良布氏肉汤对 ATCC33560 菌液依次进行  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  和  $10^{-9}$  倍梯度稀释。每份稀释菌液取 1mL 以磁捕获法获取 DNA,进行荧光 PCR 检测;同时取 0.1mL 稀释菌液涂布哥伦比亚马血平板,于 37℃ 培养 24h,进行菌落计数。

## 2 结果

### 2.1 引物及探针设计

选择合适的引物与探针是成功进行 DNA 分析检测的关键。查阅了国内外相关文献及 GenBank、EMBL 和美国专利网等数据库后中获得了空肠弯曲菌的基因序列,对目前传统 PCR 方法检测弯曲菌时所选定的目标 DNA 序列进行归纳总结,并经过比较和筛选,针对 16S rRNA 基因设计了 74-UC、RDB、JSCIQ 三对引物及探针,针对 *hipO* 基因设计了 400-1134 引物及探针,针对 *flaA* 基因设计了 11168 引物及探针。设计的引物及探针序列已申请专利。

### 2.2 血清特异性试验

弯曲菌免疫血清与 12 种其它细菌菌株的凝集试验显示,尽管弯曲菌免疫血清与鼠伤寒沙门氏菌、埃希氏大肠杆菌和宋氏志贺氏菌等有交叉反应,但与 3 株空肠弯曲菌及 1 株结肠弯曲菌的玻片凝集反应均呈阳性。因而初步认为,本研究采用カソピロバクター免疫血清对 Dynabeads M-280 磁性微珠制备的弯曲菌免疫磁珠可用于弯曲菌的分离。

### 2.3 免疫磁珠捕获目的细菌

以 16 个已知细菌作为测试菌,应用制备的弯曲菌免疫磁珠捕获目的菌,采取煮沸法获取细菌 DNA。琼脂糖凝胶电泳结果显示,磁捕获结合煮沸法提取的所有弯曲菌 DNA 均条带清晰明亮、具有较好的完整性;提取的鼠伤寒沙门氏菌、埃希氏大肠杆菌和宋氏志贺氏菌 DNA 条带较模糊且有拖尾现象;而其它 9 种细菌均无明显的 DNA 条带。由电泳图谱分析,本研究制备的弯曲菌免疫磁珠能获取少许鼠伤寒沙门氏菌、埃希氏大肠杆菌和宋氏志贺氏菌 DNA,可能是抗血清的非特异性反应及磁珠的非特异性吸附引起的。但考虑到免疫磁珠可以捕获浓缩检样中的弯曲菌,而且获取的弯曲菌 DNA 条带清晰、无拖尾现象、具有较好的完整性,适于用作荧光 PCR 反应模板。因此,确定了磁捕获结合煮沸法作为细菌分离及 DNA 提取方法,同时以 Wizard Genomic DNA Purification kit 法作为细菌 DNA 提取的对照试验。

### 2.4 引物及探针的特异性试验

对自行设计的五对引物及探针进行检测特异性的比较选择试验,以便从中确定对空肠弯曲菌检测敏感度高、特异性强的引物及探针组合。

分别以不同引物及探针的荧光 PCR 对 16 个已知细菌进行检测。结果发现(荧光 PCR 检测图未显示),JSCIQ 引物及探针的检测敏感度高,无论是空肠弯曲菌菌株还是结肠弯曲菌和其它细菌菌株的检测 Ct 值均为 40.0;RDB 引物及探针既能正确扩增出空肠弯曲菌目的片段,但也能对霍乱弧菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋氏志贺氏菌、埃希氏大肠杆菌和结肠弯曲菌发生阳性扩增信号;74-UC 引物及探针在扩增出空肠弯曲菌目的片段的同时,对豚鼠气单胞菌、溶藻弧菌、埃希氏大肠杆菌、宋氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和结肠弯曲菌也能检出阳性信号。

以上结果表明,由于 JSCIQ 引物及探针不能正确扩增出空肠弯曲菌目的片段,而 RDB、74-UC 引物及探针则对多种非空肠弯曲菌发生假阳性结果,所以排除了上述 3 种引物及探针在荧光 PCR 检测空肠弯曲菌中的使用。

400-1134、11168 引物及探针对于 16 个已知细菌的荧光 PCR 检测结果如图 1~2 所示,两组引物及探针对于 3 株空肠弯曲菌均显示阳性结果,同时对其它 13 个细菌菌株则始终显示阴性结果,其中包括属内同源程度极高的结肠弯曲菌。

以上结果表明,400-1134、11168 引物及探针检测特异性高,不仅能特异性扩增出空肠弯曲菌目的片段,而且对包括结肠弯曲菌在内的多种非空肠弯曲菌不产生假阳性结果。由此确定了 400-1134、11168 引物及探针在荧光 PCR 检测空肠弯曲菌中的使用。

### 2.5 IMC-FPCR 方法的抗干扰性和敏感性试验

2.5.1 抗干扰性试验:在实际情况下,由于空肠弯曲菌所处的环境可能含有大量其它种属细菌,建立的检测方法必须能抵抗其它细菌干扰,从混合菌液中正确检出空肠弯曲菌。

在确立了磁捕获结合煮沸法作为弯曲菌分离及 DNA 提取方法,以及使用 400-1134 和/或 11168 引物及探针来进行荧光 PCR 检测的基础上,将空肠弯曲菌 ATCC33560 菌液与结肠弯曲菌及 12 种其它细菌菌液等量混合后,以弯曲菌免疫磁珠从混合菌液中捕获并提取细菌 DNA,然后荧光 PCR 检测空肠弯曲菌的 *flaA* 基因和/或 *hipO* 基因。结果如图 3 所示,IMC-FPCR 方法能成功地从混合菌液中检出空肠弯曲菌,排除了其它细菌的干扰,尤其是解决了空肠弯曲菌与结肠弯曲菌的区别鉴定难题,显示出良好的特异性和抗干扰性。

2.5.2 敏感性试验:建立的 IMC-FPCR 检测空肠弯曲菌方法应当具有较高的敏感性,以便检样中空肠弯曲菌含量较低时仍能准确检出。本研究取空肠弯曲菌 ATCC33560 菌液,经空白增菌液稀释得到  $10^{-1}$  ~  $10^{-9}$  倍梯度稀释菌液,从中分别取 0.1mL 用于菌落计数;取 1mL 用于 IMC-FPCR 检测。

血平板菌落计数结果显示,浓度为  $10^{-6}$  的细菌数为 100cfu,浓度为  $10^{-7}$  的细菌数为 10cfu,浓度为  $10^{-8}$  的细菌数为 1cfu。荧光 PCR 检测结果显示,400-1134 引物及探针对于

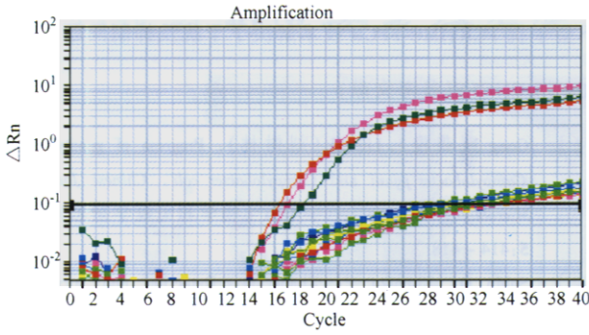


图1 400-1134 引物及探针的荧光 PCR 特异性试验

Fig.1 The result of 400-1134 primer/probe applied to detect *C. jejuni*

1: *C. jejuni* ATCC33560, Ct = 17.344; 2: *C. jejuni* ATCC8341, Ct = 17.848; 3: *C. jejuni* XMIQ030516, Ct = 18.147; 4: ddH<sub>2</sub>O, Ct = 40.0; 5 ~ 17: other 13 bacteria (inclusion of *C. coli*), Ct = 40.0.

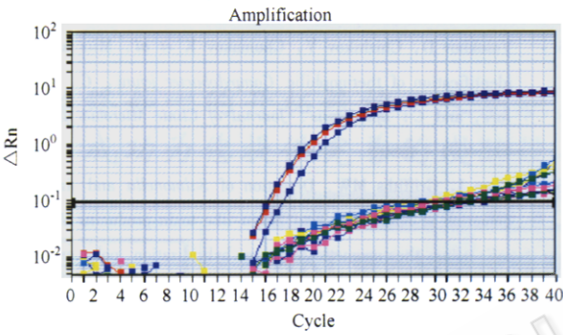


图2 11168 引物及探针的荧光 PCR 特异性试验

Fig.2 The result of 11168 primer/probe applied to detect *C. jejuni*

1: *C. jejuni* ATCC33560, Ct = 16.248; 2: *C. jejuni* ATCC8341, Ct = 16.547; 3: *C. jejuni* XMIQ030516, Ct = 17.196; 4: ddH<sub>2</sub>O, Ct = 40.0; 5 ~ 17: other 13 bacteria (inclusion of *C. coli*), Ct = 40.0.

10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>-8</sup> 倍稀释菌液均检出阳性信号,对 10<sup>-9</sup> 倍稀释菌液的检测结果为阴性(图4)。11168 引物及探针的 IMC-FPCR 检测灵敏度与此是相一致的(图略)。因此,IMC-FPCR 方法对空肠弯曲菌的最低检测值为 10cfu/mL。

### 3 讨论

#### 3.1 免疫磁珠法捕获细菌

免疫磁珠分离法是基于抗原抗体反应和磁分离技术,本研究采用カソピロバクター免疫血清对 Dynabeads M-280 磁性微珠进行包被,制备了弯曲菌免疫磁珠。尽管使用的弯曲菌免疫血清与鼠伤寒沙门氏菌、埃希氏大肠杆菌和宋氏志贺氏菌等革兰氏阴性菌有交叉反应,但与所有弯曲菌菌株(包括 3 株空肠弯曲菌及 1 株结肠弯曲菌)的玻片凝集反应均呈阳性。将制备的弯曲菌免疫磁珠直接加至检样中,室温轻轻摇转,弯曲菌有机体将被吸附在磁珠的抗体上,在磁场作用下与其它微生物和样品残渣分离开来,从而直接捕获获得检样中的弯曲菌,不需要增菌培养。经琼脂糖凝胶电泳分析及荧

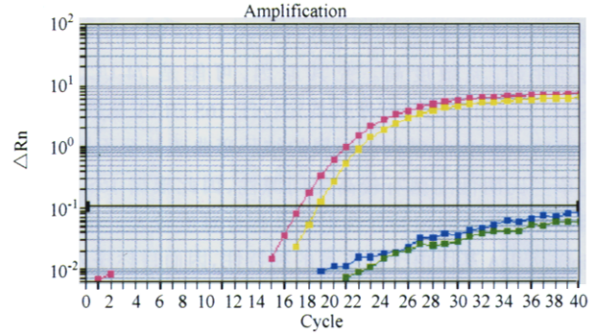


图3 IMC-FPCR 检测混合菌试验

Fig.3 The result of application of IMC-FPCR to detect *C. jejuni* in mixed bacterial solution

1: the detection of 400-1134 primer/probe in mixture containing *C. jejuni*, Ct = 15.766; 2: the detection of 11168 primer/probe in mixture containing *C. jejuni*, Ct = 17.038; 3: the detection of 400-1134 primer/probe in mixture without *C. jejuni*, Ct = 40.0; 4: the detection of 11168 primer/probe in mixture without *C. jejuni*, Ct = 40.0.

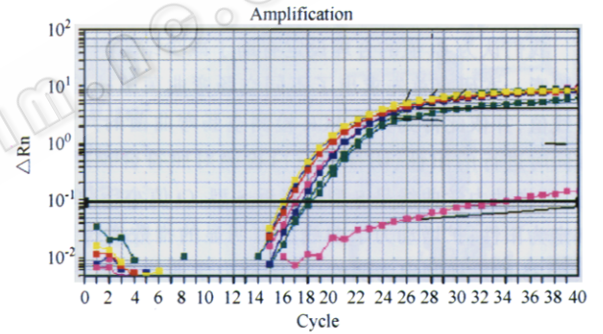


图4 400-1134 引物及探针的 IMC-FPCR 检测梯度稀释的空肠弯曲菌菌液结果

Fig.4 The result of 400-1134 primer/probe detect *C. jejuni* in gradient-diluted solution

1: 10<sup>-2</sup>, Ct = 16.038; 2: 10<sup>-3</sup>, Ct = 16.141; 3: 10<sup>-4</sup>, Ct = 16.361; 4: 10<sup>-5</sup>, Ct = 17.039; 5: 10<sup>-6</sup>, Ct = 17.441; 6: 10<sup>-7</sup>, Ct = 17.965; 7: 10<sup>-8</sup>, Ct = 18.205; 8: 10<sup>-9</sup>, Ct = 40.0.

光 PCR 检测证实,免疫磁珠技术从检样中直接分离和富集目的菌是一个简便有效、且不会伤及细菌的方法。

免疫磁珠吸附法可特异地从检样中分离目的细菌,简化了操作,缩短了时间。煮沸法采用裂解释放原理,提取的细菌 DNA 质量较好,适用于荧光 PCR 检测。值得注意的是,免疫磁珠分离操作过程中应避免检样中的盐浓度过高,在洗涤时则应减缓振荡或小心吹吸,以免造成混合物的碎裂,最后洗涤出的混合物应重悬至均质状态。

#### 3.2 引物及探针的选择

本研究设计的五对引物及探针经检测效力比较,结果显

示 74-UC、RDB 和 JSCIQ 三对引物及探针不适合用于空肠弯曲菌的荧光 PCR 检测,而 400-1134 和 11168 两对引物及探针特异性好、灵敏度高。究其原因,可能是 74-UC、RDB 和 JSCIQ 三对引物的目标序列均定位于 16S rRNA 基因,空肠弯曲菌的 16S rRNA 基因与同属的结肠弯曲菌甚至不同属的其它革兰氏阴性细菌有较高的同源性,因此根据 16S rRNA 基因设计空肠弯曲菌特异性引物及探针难度较大。相比之下,hipO 及 flaA 基因由于其本身的独特性,因而目标序列定位为这两个基因的 400-1134 和 11168 两对引物保证了荧光 PCR 检测的高特异性。

### 3.3 荧光 PCR 检测方法的建立

实时荧光 PCR 技术是在 PCR 扩增时加入一个特异性的荧光标记探针(如 Taqman 探针、分子信标探针)。本研究选用的 Taqman 探针两端分别标记荧光报告基团和荧光淬灭基团,探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切降解,破坏了两个荧光分子之间 FRET,从而发出荧光;即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步<sup>[10]</sup>。

实时荧光 PCR 检测结果的判定来自于对图中曲线及一些重要的参考数据(如循环阈值 Ct 值)。

我们认为 Ct 值的合理设定有助于减少结果判定中的主观因素。本研究首先求出了不同空肠弯曲菌菌株检测时的基线值,并依此得到荧光 PCR 检测空肠弯曲菌的判定标准。在同时进行的阳性、阴性和空白检测对照符合预期的基础上,扩增动力学曲线呈 S 型或接近 S 型,Ct 值小于 30 的检样判定为阳性;扩增动力学曲线没有明显的指数增长期,Ct 值大于 35 的检样判定为阴性;扩增动力学曲线有较明显的上升,Ct 值位于 30~35 之间,需进行重复实验,重复实验的 Ct 值仍处于该区间可判定为阳性。

### 3.4 小结

对比传统的空肠弯曲菌检测方法,本研究建立的空肠弯曲菌 IMC-FPCR 方法具有多方面的优势:①简便快速,IMC-FPCR 法检测空肠弯曲菌可在 1 天内完成,传统的检测方法阴性结果需 5d,阳性结果需 5~14d。②特异性好,单独用免疫磁珠分离方法缺乏种间的特异性,并且由于不能完全消除交叉反应,就有可能和其它杂菌发生非特异性结合;在免疫磁珠分离方法的基础上利用实时荧光 PCR 进行鉴定,专一性更高、结果更准确。③敏感度高,敏感度是检验方法是否成熟有效的重要指标,IMC-FPCR 法对空肠弯曲菌的检测下限为 10cfu/mL,达到甚至超过了传统检测方法的检测下限。④抗干扰性强,免疫磁珠方法直接从检样中捕获靶细菌,去除了 PCR 抑制物质;同时由于荧光 PCR 特异性扩增空肠弯

曲菌 DNA,免疫磁珠吸附的包括结肠弯曲菌在内的其它细菌不会干扰 PCR,IMC-FPCR 技术解决了干扰及抑制问题。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Gong J(龚俊), Liu SL(刘树林). Progress of genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Chinese Journal of Microbiology Immunology*(中华微生物学和免疫学杂志), 2004, 5: 414-418
- [2] Sahin O, Kobalka P, Zhang Q. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95: 1070-1079
- [3] Wu SY(吴蜀豫), Zhang LS(张立实), Ran L(冉陆). Epidemiology of campylobacter and campylobacteriosis. *Chinese Journal of Food Hygiene*(中国食品卫生杂志), 2004, 1: 58-61
- [4] Georgios K, Dang DB, Marianne L et al. Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. *Molecular and Cellular Probes*, 2003, 17: 187-196
- [5] Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K et al. Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Journal of Clinic Microbiology*, 2003, 41: 4071-4080
- [6] Chen J, Griffiths MW. Detection of *Salmonella* and simultaneous detection of *Salmonella* and Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using the magnetic capture hybridization polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 32: 7-11
- [7] Uyttendaele M, Hoorde IV, Debevere J. The use of immunomagnetic separation as a tool in a sample preparation method for direct detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 54: 205-212
- [8] Waage AS, Vardund T, Lund V et al. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Applied Environment Microbiology*, 1999, 65: 1636-1643
- [9] Ertas HB, Cetinkaya B, Muz A et al. Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using fla typing and random amplified polymorphic DNA methods. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 15: 94: 203-209
- [10] Becker K, Pan D, Whitely CB. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 2559-2566
- [11] Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs. endogenous standards. *Mol Cell Probes*, 2000, 14(2): 127-135