



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106995804 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201710167108.3

C12R 1/63(2006.01)

(22)申请日 2017.03.20

C12R 1/01(2006.01)

(71)申请人 海南大学

C12R 1/145(2006.01)

地址 570228 海南省海口市美兰区人民大道58号

C12R 1/085(2006.01)

(72)发明人 万逸 周腾 许强 葛鉴

(51)Int.Cl.

C12N 7/01(2006.01)

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/46(2006.01)

C12Q 1/06(2006.01)

C12Q 1/10(2006.01)

C12Q 1/14(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

C12R 1/445(2006.01)

C12R 1/42(2006.01)

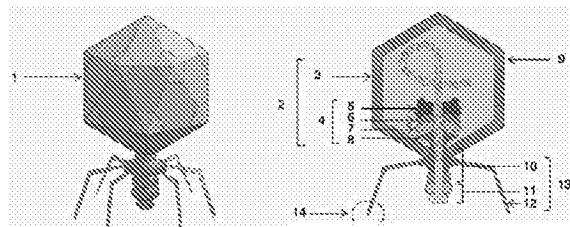
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种乙酰胆碱酯酶标记的工程化噬菌体快速检测微生物

(57)摘要

本工作拟研发了一个乙酰胆碱酯酶标记的工程化噬菌体试剂盒直接分析环境生物样品中微生物,这种乙酰胆碱酯酶标记的工程化噬菌体可以特异性识别病原微生物。当工程化噬菌体识别结合微生物之后,把其基因工程改造的DNA注入微生物体内,在微生物体内重组表达扩增大量的新的带有乙酰胆碱酯酶蛋白的噬菌体。项目主要内容为:重点设计工程化噬菌体与微生物响应材料识别机制和反应动力学,考察这些识别响应的功能模块在微生物快速检测和微生物即时表达分析中作用规律。本工作创新性体现在:为解决涉及微生物检测方法中“在线”、“便携式”和“全自动”的机电工程与生物学复合问题提供参考和借鉴。



1. 一种乙酰胆碱酯酶标记的工程化噬菌体快速检测微生物,其特征在于:包括特异性的噬菌体、功能化的乙酰胆碱酯酶基因。
2. 如权利1中特异性微生物的噬菌体,特异性微生物包括针对大肠杆菌的噬菌体、金黄色葡萄球菌的噬菌体,沙门杆菌的噬菌体,弧菌的噬菌体,阪崎肠杆菌的噬菌体,小肠结肠炎耶尔森氏菌的噬菌体,产气荚膜梭菌的噬菌体、肉毒梭菌的噬菌体、厌氧菌的噬菌体,蜡样芽孢杆菌的噬菌体。
3. 如权利2中乙酰胆碱酯酶功能化的噬菌体:其特征包括:T4噬菌体、T7噬菌体、P2噬菌体、P22噬菌体、λ噬菌体、Φ 29噬菌体。
4. 如权利3中乙酰胆碱酯酶功能化的噬菌体,其特征包括在gp10B蛋白基因末端融合乙酰胆碱酯酶基因。

一种乙酰胆碱酯酶标记的工程化噬菌体快速检测微生物

技术领域

[0001] 本发明设计一种乙酰胆碱酯酶标记的工程化噬菌体快速检测微生物。

背景技术

[0002] 在海洋环境中,病原微生物污染、水体富营养化、微生物腐蚀、微生物污损等都是微生物威胁人类生产生活的表观形式,也是快速微生物检测技术需求的客观条件。现有数据表明,病原微生物污染的损失与微生物鉴定种类快慢密切相关,鉴定确定时间越长,损失也就越大。这是因为,一方面微生物增长和传播的速度快,使环境污染和人类疾病加剧;另一方面无法明确微生物种类导致无法实施针对性防护方案,进而导致某些药物或抗菌剂的滥用。在ISO4883-2003标准中,微生物鉴定时间被认定为微生物检测技术等级划分的重要参数。因此,采取有效的方法快速检测微生物是降低海洋环境中微生物病害和污损有效的手段。

[0003] 微生物检测和鉴定的理论广泛依赖于微生物特征产物响应(如ATP响应荧光素酶、大肠杆菌分泌的乙酰胆碱酯酶响应5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D半乳糖苷和H2S响应Fe²⁺等)、微生物细胞表面抗原特异性识别(如抗体-微生物细胞、凝集素-微生物表面糖原、抗生素-微生物表面特异位点和适配体-微生物表面识别位点等)、和微生物基因分析(DNA和16s RNA)。对特征产物响应检测微生物来说,其只测定水样中的微生物数,其特异性很弱。通过在水样中加入三羟甲氨基甲烷,使微生物细胞中ATP释放出来,再加入荧光素酶,这种酶能够与ATP作用引起光化学反应,产生定量光强。对微生物表面抗原特异性识别来说,其以免疫反应为基础来识别和检测微生物,该方法得到的数据准确,但无法作为一种在线活体的检测工具,易受外界因素影响。我们课题组在微生物检测方面开展了一系列的工作:探索了基于酶联免疫反应的无信号标记和纳米材料信号标记的电化学免疫生物传感器来快速检测海洋微生物。这两个方面工作的展开和对比研究,为微生物检测技术发展提供新思路。对微生物基因分析技术来说,其被广泛应用于微生物鉴定中,所用靶点引物是通常依据微生物的16S rRNA 基因特征性序列而设计的,其检测限可达到1 cfu mL⁻¹,不足之处是需要特殊的样品处理和纯化,操作步骤繁琐,有较高的技术要求。本项目从上述微生物检测技术的不足之处出发,研发便携式微生物即时诊断仪器。

[0004] 乙酰胆碱酯酶简称AchE,具有羧肽酶和氨肽酶的活性。乙酰胆碱酯酶参与细胞的发育和成熟,能促进神经元发育和神经再生。Chubbe等的研究证明,AchE具有羧肽酶和氨肽酶的活性。在体外,AchE能水解脑啡肽(Enk)和P物质(SP),但不能水解生长抑素(Som)和血管加压素(VSP)等。进一步的研究证明,AchE作为肽酶,其水解肽的活性部位和作为酯酶的活性部位不同。值得注意的是,神经系统许多非胆碱能的,含大量AchE的神经元同时亦含有各种神经肽类物质。如脊髓背根节的SP能细胞即是AchE强阳性。最近的研究显示,高度纯化的来自电鳗电器官或牛血清的AchE具有蛋白酶样或外切酶的活性。对于血清蛋白质,AchE能发挥C端残基的清除作用。此外,AchE的蛋白酶样作用还得到分子生物学证据的支持,氨基酸分析显示,AchE蛋白质分子与蛋白酶样内切酶以及血清羧肽酶的氨基酸序列相似。在

它们的C端36个残基范围内,有40%氨基酸序列和蛋白酶的活性片段相同。

[0005] 微生物检测技术并非完美,还需要持续发展和创新。微生物检测领域创新点可能基于以下四个方面:一是利用微纳新型电子器件和光电器件在微生物检测上的应用。二是多功能器件集成系统对微生物进行分离、筛选以及检测分析。三是多样品的分析系统结合多通道数据采集系统对微生物进行分析或进行同步多模检测系统。四是基于智能手机的便携式即时检验(point-of-care testing,POCT)技术,使个性化的便携式器件与移动互联网结合。这些都是创新发展微生物检测研究的方向。本工作利用生物分子功能化微米孔来鉴定和分析微生物,其检测的信号主要来自于生物分子与靶点微生物检测会延长微生物通过微米孔的时间,进而获得相关的微生物标准曲线。

发明内容

[0006] 为实现上述目的,本发明采用技术方案为:

一种乙酰胆碱酯酶标记的工程化噬菌体快速检测微生物,其特征在于:包括特异性的噬菌体、功能化的乙酰胆碱酯酶基因。

[0007] 如权利1中特异性微生物的噬菌体,特异性微生物包括针对大肠杆菌的噬菌体、金黄色葡萄球菌的噬菌体,沙门杆菌的噬菌体,弧菌的噬菌体,阪崎肠杆菌的噬菌体,小肠结肠炎耶尔森氏菌的噬菌体,产气荚膜梭菌的噬菌体、肉毒梭菌的噬菌体、厌氧菌的噬菌体,蜡样芽孢杆菌的噬菌体。

[0008] 如权利2中乙酰胆碱酯酶功能化的噬菌体:其特征包括:T4噬菌体、T7噬菌体、P2噬菌体、P22噬菌体、λ噬菌体、Φ 29噬菌体。

[0009] 如权利3中乙酰胆碱酯酶功能化的噬菌体,其特征包括在gp10B蛋白基因末端融合乙酰胆碱酯酶基因。

附图说明

[0010] 图1:乙酰胆碱酯酶功能化的噬菌体

(1)工程化噬菌体;(2)头部;(3)包衣gp-10B蛋白;(4)内核蛋白;(5)gp16蛋白;(6)gp15蛋白;(7)gp14蛋白;(8)连接体gp8;(9)gp10B-乙酰胆碱酯酶融合蛋白;(10)gp6和gp7蛋白;(11)gp11和gp12蛋白;(12)尾部蛋白gp17;(13)尾部;(14)针对特定微生物宿主结合蛋白(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门杆菌等)。

[0011] 图2:基于乙酰胆碱酯酶功能化噬菌体的微生物分析系统。

[0012] 图3:不同浓度硫酸盐还原菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门杆菌检测的检测数值。

具体实施方式

[0013] 下面通过实施例对本发明做进一步说明。

[0014] 实施例1:

硫酸盐还原菌的检测:

实验中用到的微生物利用溶菌肉汤(蛋白胨1%,氯化钠1%,酵母膏0.5%,水100 mL)悬浮培养,单个菌落于30℃,200转摇床条件下过夜培养后4500转/分离心十分钟,并用PBS缓冲

溶液稀释到不同浓度。

[0015] 将100 μL 浓度(10 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0016] 将100 μL 浓度(10^2 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0017] 将100 μL 浓度(10^3 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0018] 将100 μL 浓度(10^4 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0019] 将100 μL 浓度(10^5 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0020] 将100 μL 浓度(10^6 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0021] 将100 μL 浓度(10^7 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0022] 将100 μL 浓度(10^8 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0023] 综合上述的数据，绘制不同浓度下微生物的标准曲线。

[0024] 实施例2：

大肠杆菌检测

实验中用到的微生物利用溶菌肉汤(蛋白胨1%，氯化钠1%，酵母膏0.5%，水100 mL)悬浮培养，单个菌落于 30°C ，200转摇床条件下过夜培养后4500转/分离心十分钟，并用PBS缓冲溶液稀释到不同浓度。

[0025] 将100 μL 浓度(10 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0026] 将100 μL 浓度(10^2 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0027] 将100 μL 浓度(10^3 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0028] 将100 μL 浓度(10^4 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0029] 将100 μL 浓度(10^5 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0030] 将100 μL 浓度(10^6 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0031] 将100 μL 浓度(10^7 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0032] 将100 μL 浓度(10^8 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0033] 综合上述的数据，绘制不同浓度下微生物的标准曲线。

[0034] 实施例3：

金黄色葡萄球菌检测

实验中用到的微生物利用溶菌肉汤(蛋白胨1%，氯化钠1%，酵母膏0.5%，水100 mL)悬浮培养，单个菌落于 30°C ，200转摇床条件下过夜培养后4500转/分离心十分钟，并用PBS缓冲溶液稀释到不同浓度。

[0035] 将100 μL 浓度(10 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性

培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0036] 将100 μL 浓度(10^2 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0037] 将100 μL 浓度(10^3 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0038] 将100 μL 浓度(10^4 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0039] 将100 μL 浓度(10^5 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0040] 将100 μL 浓度(10^6 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0041] 将100 μL 浓度(10^7 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0042] 将100 μL 浓度(10^8 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体，培育30分钟，用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台，产生光信号，测量得到该浓度下的微生物信号。

[0043] 综合上述的数据，绘制不同浓度下微生物的标准曲线。

[0044] 实施例4：

沙门杆菌检测检测

实验中用到的微生物利用溶菌肉汤(蛋白胨1%，氯化钠1%，酵母膏0.5%，水100 mL)悬浮培养，单个菌落于30°C，200转摇床条件下过夜培养后4500转/分离心十分钟，并用PBS缓冲溶液稀释到不同浓度。

[0045] 将100 μL 浓度(10 cfu mL^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基，并于 37 °C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金

胶体,培育30分钟,用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台,产生光信号,测量得到该浓度下的微生物信号。

[0046] 将100 μL 浓度(10^2 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基,并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体,培育30分钟,用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台,产生光信号,测量得到该浓度下的微生物信号。

[0047] 将100 μL 浓度(10^3 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基,并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体,培育30分钟,用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台,产生光信号,测量得到该浓度下的微生物信号。

[0048] 将100 μL 浓度(10^4 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基,并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体,培育30分钟,用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台,产生光信号,测量得到该浓度下的微生物信号。

[0049] 将100 μL 浓度(10^5 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基,并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体,培育30分钟,用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台,产生光信号,测量得到该浓度下的微生物信号。

[0050] 将100 μL 浓度(10^6 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基,并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体,培育30分钟,用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台,产生光信号,测量得到该浓度下的微生物信号。

[0051] 将100 μL 浓度(10^7 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基,并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体,培育30分钟,用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台,产生光信号,测量得到该浓度下的微生物信号。

[0052] 将100 μL 浓度(10^8 cfu ml^{-1})菌液和乙酰胆碱酯酶标记的噬菌体加入到一次性培养基,并于 37°C 反应8小时。再加入乙酰胆碱酯酶响应的碘代硫代乙酰胆碱和纳米金胶体,培育30分钟,用微生物诊断仪的激发光源激发传感器平台,产生光信号,测量得到该浓度下的微生物信号。

[0053] 综合上述的数据,绘制不同浓度下微生物的标准曲线。

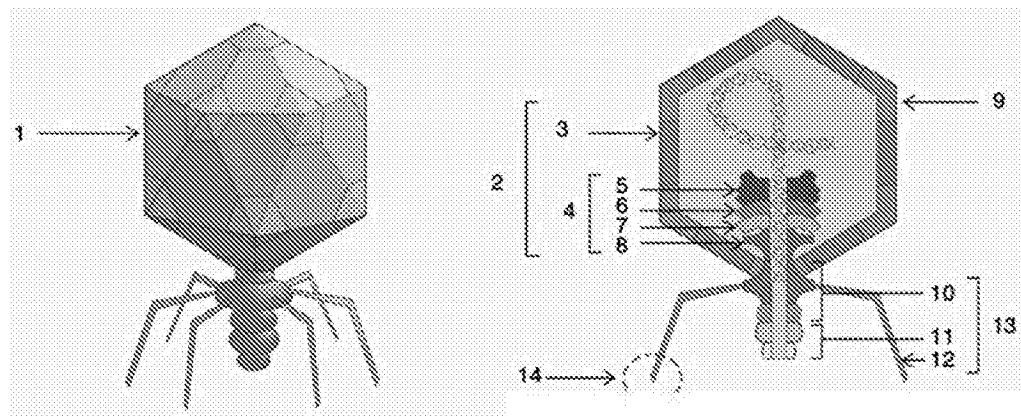


图1



图2

浓度 (CFU)	硫酸盐还原菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门杆菌
1	0.2	0.5	0.5	0.1
10	0.5	0.7	10.3	0.9
100	2.4	1.3	30.5	1.6
1000	12.9	3.5	43.8	3.9
10000	23.9	7.8	63.9	5.7
100000	33.6	10.5	100.6	11.4
1000000	42.5	15.7	158.8	23.7
10000000	53.9	20.9	190.4	43.3
100000000	75.6	25.6	222.1	62.8

图3