



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510002514.1

[43] 公开日 2005 年 8 月 31 日

[11] 公开号 CN 1661113A

[22] 申请日 2005.1.21

[21] 申请号 200510002514.1

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院放射
医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 王升启 文思远 徐晓静 陈苏红

权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图 3 页

[54] 发明名称 一套检测肠出血性大肠杆菌和霍乱
弧菌的寡核苷酸探针

[57] 摘要

一套用于检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 的寡核苷酸探针及其用途,属于微生物检测领域(生物工程类检测产品)。探针设计在肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的产志贺样毒素基因 stx1、stx2 和 β -葡糖醛酸糖苷酶基因(uidA);霍乱弧菌 O139 的肠毒素 A 亚单位(ctxA)、毒力协调菌毛 A 亚单位(tcpA)、糖基转移酶(LPSgt)基因等基因序列上,探针长度在 19-60 碱基之间,具有较高的灵敏度和特异性。适用于基于核酸杂交原理的检测技术,尤其适用于基因芯片原理的检测。在一定的使用条件下,能够检测出实验样品中的肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 及其致病性毒素基因。可用于疾病诊断、环境检测、食物中毒检测、食品检疫、细菌学分类、流行病学调查、生物战剂检测等。

1. 一套用于检测肠出血性大肠杆菌 O157: H7 和霍乱弧菌 O139 的寡核苷酸探针, 其特征在于包含以下各组探针的全部或部分探针的组合, 各部分的探针长度在 19—60 碱基之间。
 - a. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 的产志贺样毒素基因 *stx1* 检测探针
 - b. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 的产志贺样毒素基因 *stx2* 检测探针
 - c. 肠出血性大肠杆菌 O157: H7 的 β -葡糖醛酸糖苷酶基因 *uidA* 检测探针
 - d. 霍乱弧菌 O139 的肠毒素 A 亚单位 *ctxA* 检测探针
 - e. 霍乱弧菌 O139 的毒力协调菌毛 A 亚单位基因 *tcpA* 检测探针
 - f. 霍乱弧菌 O139 的糖基转移酶 LPSgt 基因检测探针

2. 如权利要求 1 所述的一套寡核苷酸探针, 其中

a 探针选自下列寡核苷酸序列中的 1 条或数条

- P1 CGTATGTAGA TTCGCTGAAT GTCATTCGCT CTGCAATAGG T
P2 CTGAATGTCA TTCGCTCTGC AATAGGTACT CCATTACAGA CTATTCATC AGG
P3 TGAATGTCAT TCGCTCTGCA ATAGGTACTC CATTA
P4 GTCATTCGCT CTGCAATAGG TACTCCATTA CAGACTATTT CATCAGG
P5 ATCAGGAGGT ACGTCTTTAC TGATGATTGA TAGTGGCACA GGGGATAATT TGTTTG
P6 GGAGGTACGT CTTTACTGAT GATTGATAGT GGCACAGGGG A
P7 GTACGTCTTT ACTGATGATT GATAGTGGCA CAGGG
P8 TACTGATGAT TGATAGTGGC ACAGGGGATA ATTTGTTTGC AGTTGATG
P9 GTTTGCAGTT GATGTCAGAG GGATAGATCC AGAGGAAGGG CG
P10 GTCAGAGGGA TAGATCCAGA GGAAGGGCGG TTAA

b 探针选自下列寡核苷酸序列中的 1 条或数条

- P11 CGTAAATAGT ATACGGACAG AGATATCGAC CCCTCTTGAA CATATATCTC AGG
P12 GTTAAATAGT ATACGGACAG AGATATCGAC CCCTCTTGAA
P13 TAAATAGTAT ACGGACAGAG ATATCGACCC CTCTT
P14 ATATCTCAGG GGACCACATC GGTGTCTGTT ATTAACCACA
P15 TCTCAGGGGA CCACATCGGT GTCTGTTATT AACCA
P16 ACCACATCGG TGTCTGTTAT TAACCACACC CCACC
P17 CCACCGGGCA GTTATTTTGC TGTGGATATA CGAGGGCTTG ATGTCTATCA
P18 GGCAGTTATT TTGCTGTGGA TATACGAGGG CTTGATGTCT
P19 GGCAGTTATT TTGCTGTGGA TATACGAGGG CTTGATGTCT ATCA
P20 AGTTATTTTG CTGTGGATAT ACGAGGGCTT GATGT

c 探针选自下列寡核苷酸序列中的 1 条或数条

- P21 AAAACTCGAC GGCCTGTGGG CATTCACTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA
P22 CTCGACGGCC TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAACGT GTGGA
P23 TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAACGT GTGGAATTGA GCAGCGTTGG
P24 TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAACGT GTGGAATTGA GCAGCGTTGG TGGGAAAGCG
P25 CATTCACTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGT
P26 CATTCACTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGTGGGAA AGCGC
P27 GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGTGGGAA AG
P28 AAAACTGTGG AATTGAGCAG CGTTGGTGGG AAAGCG
P29 TGGAATTGAG CAGCGTTGG
P30 TGGAATTGAT CAGCGTTGG

d 探针选自下列寡核苷酸序列中的 1 条或数条

- P31 ATGTTTCCAC CTCAATTAGT TTGAGAAGTG CCCACTTAGT
P32 TATGTTATAG CCACTGCACC CAACATGT
P33 GCATACCGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTCTGGCT TAGGTGGGAT TCCAT
P34 CATACTGCTC TCATCCAGAT GAACAAGAAG TTTCTGCTTT AGGTG
P35 ATGAACAAGA AGTTTCTGCT TTAGGTGGGA TTCCA
P36 CATACTGCTC TCATCCAGAT GAACAAGAAG TTTCTGCTTT AGGTG
P37 AAGAAGTTTC TGCTTTAGGT GGGATTCCAT ACTCCCAAAT
P38 ATATGGATGG TATCGAGTTC ATTTTGGGGT GCTTG
P39 TGGATGGTAT CGAGTTCATT TTGGGGTGCT TGATGAACAA TTACA
P40 AACAAGAAGT TTCTGCTTTA GGTGGGATTC CATACTCCCA AATAT

e 探针选自下列寡核苷酸序列中的 1 条或数条

- P41 TACAAGCGTA GGGGATATGT TTCCATTTAT CAACGTGAAA GAAGG
P42 TACAAGCGTA GGGGATATGT TTCCATTTAT CAACGTGAAA GAAGGTGCTT
P43 TTCGAAACGA GTGTCGCAGA TGCTGCTACT GGCCTGGCG TAATT
P44 CGAAACGAGT GTCGCAGATG CTGCTACTGG CG
P45 AGTCCATTGC ACCAGGAAGT GCCAACTTAA ACCTA
P46 AGTCCATTGC ACCAGGAAGT GCCAACTTAA ACCTAACTAA TATCACGCAT GTTGAGAAGC
P47 CATTGCACCA GGAAGTGCCA ACTTAAACCT AACTAATATC ACGCATGTTG AGAAG

P48 GCACCAGGAA GTGCCAACTT AACCTAACT AATATCACGC ATGTTGAGAA

P49 CAGGAAGTGC CAACTTAAAC CTAACCTAATA TCACGCATGT TGAGA

P50 GGAAGTGCCA ACTTAAACCT AACTAATATC ACGCATGTTG AG

f 探针选自下列寡核苷酸序列中的 1 条或数条

P51 AATCATTTC A TTCTTCACT TAATGAGCGC ATTATTAACA ATGTAACAGA

P52 TAATGAGCGC ATTATTAACA ATGTAACAGA TTGTGATATG

P53 GAGCGCATT TTAACAATGT AACAGATTGT GATATGATAA GAGCGCATCT

P54 AGCGCATTAT TAACAATGTA ACAGATTGTG ATATGATAAG AGCGCATCTT TAAAA

P55 ATTAACAATG TAACAGATTG TGATATGATA AGAGCGCATC

P56 CAATGTAACA GATTGTGATA TGATAAGAGC GCATC

P57 AGTAGTTCTC AAATTGAAAG TAGCCAATTT GATTCTTCTG CTATAGAAAAG

P58 ATTGAAAGTA GCCAATTTGA TTCTTCTGCT ATAGAAAGGC TTATG

P59 GCCAATTTGA TTCTTCTGCT ATAGAAAGGC TTATG

P60 TCGATAAGAA GAGATAAAGA TCTGAGTTAT CTAAAGATAT TTG

3. 如权利要求 1 所述的一套寡核苷酸探针，其特征在于同时包含 a~f 六组探针。
4. 如权利要求 3 所述的一套寡核苷酸探针，其中 a 探针选自 P7，b 探针选自 P20，c 探针选自 P29，d 探针选自 P36，e 探针选自 P49，f 探针选自 P60。
5. 权利要求 1~4 所述的任一寡核苷酸探针的用途，其特征在于利用探针可对样品中的肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 的相应基因进行检测，尤其适用于基于基因芯片技术的检测。
6. 权利要求 5 所述的寡核苷酸探针的用途，其特征在于利用探针可以检测出肠出血性大肠杆菌 O157:H7 是否携带产志贺样毒素基因 stx1、stx2；霍乱弧菌 O139 是否携带肠毒素 A 亚单位 ctxA、毒力协调菌毛 A 亚单位 tcpA 等致病性毒素基因。
7. 权利要求 5 所述的寡核苷酸探针的用途，其特征在于该检测可用于临床疾病诊断、抗菌素筛选、环境监测与评价、卫生监督与检疫、细菌学分类与流行病学调查等。

一套检测肠出血性大肠杆菌和霍乱弧菌的寡核苷酸探针

技术领域

本发明属于微生物检测技术、尤其是致病菌的核酸检测技术范畴。本发明涉及一套能够检测肠出血性大肠杆菌O157:H7和霍乱弧菌O139的特异性基因及致病性毒性质粒的寡核苷酸探针，该套探针的序列及用途。

背景技术

肠出血性大肠杆菌O157:H7和霍乱弧菌O139是两种主要的肠道致病菌，能引起以腹泻为主要症状的传染病。可通过食物和饮水导致大规模暴发[Nathalie. Analytical Biochemistry, 2001, 289:281-288]。O157:H7的致病性与多个基因有关，其中包括产志贺样毒素基因stx1、stx2， β -葡糖醛酸糖苷酶基因uidA(gusA)等 [Law D.J Appl Microbiol, 2000,88:729-45.]。除O157:H7,O157家族成员中非H7型及其它一些致病性大肠杆菌也可能含有stx基因，因此只对stx基因的检测结果进行鉴定并不可靠，还须结合O157:H7特异性基因的检测才能进行鉴定。O157:H7的uidA 基因中+93位碱基特异性的由T突变为G [Ken J. Molecular and Cellular Probes,2003,17:275-28015]，从而对O157:H7与非H7型进行鉴别。

霍乱弧菌O139型是由O1型变异而来 [Annick Robert-Pilot a.FEMS Microbiology Ecology,2002,40:39-46]。O139和O1型霍乱弧菌都含有两种主要的毒力基因ctxA和tcpA，但它们的糖基转移酶基因（LPSgt）组成却存在差异[R.M.Carter.Journal of Immunological Methods,1995,187:121-125]。通过识别ctxA和tcpA来区分霍乱菌株和非霍乱弧菌，然后根据LPSgt基因的不同DNA序列来区分出O1型和O139菌株。

长期以来，这两种病原菌的实验室诊断主要依靠传统的细菌学检测方法，步骤繁琐且需要数天才能得到结果。免疫学方法也存在特异性和敏感性等问题。近年来,PCR和核酸杂交技术的应用促进了细菌检测技术的发展，但存在一定的局限性。目前，对于多基因同时检测才能鉴定的病原体，基因芯片技术以其特有的优势已被应用于病原体的检测。

寡核苷酸基因芯片(Oligochip)是近年来发展成熟的一种高通量基因检测技术(Hacia J.Nature genetics(Supl),1999,21(1):42-47)。寡核苷酸基因芯片的一个主要用途是多基因平行检测，是一种发展前景好的多基因大规模检测新生物技术。基因芯片技术检测的关键基础是设计、筛选一系列高特异性、高灵敏度、高稳定性的匹配探针，固定于玻璃片等固相载体上，利用探针与样品的杂交反应，一次实验即可确定样品中细菌种类及毒性等相关信息，极大地提高了检测效能。

发明内容

本发明提供了一套用于检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 的寡核苷酸探针,包含以下各组探针的全部或为部分探针的组合,各部分的探针长度在 19—60 碱基之间。

- a. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的产志贺样毒素基因 *stx1* 检测探针
- b. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的产志贺样毒素基因 *stx2* 检测探针
- c. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的 β -葡糖醛酸糖苷酶基因 *uidA* 检测探针
- d. 霍乱弧菌 O139 的肠毒素 A 亚单位 *ctxA* 检测探针
- e. 霍乱弧菌 O139 的毒力协调菌毛 A 亚单位基因 *tcpA* 检测探针
- f. 霍乱弧菌 O139 的糖基转移酶 *LPSgt* 基因检测探针

本发明还提供了各部分探针的核苷酸序列,详见表 1—1。其中 a 探针选自 P1~P10 中的 1 条或数条; b 探针选自 P11~P20 中的 1 条或数条; c 探针选自 P21~P30 中的 1 条或数条; d 探针选自 P31~P40 中的 1 条或数条; e 探针选自 P41~P50 中的 1 条或数条; f 探针选自 P51~P60 中的 1 条或数条。

本发明还提供了一套可以同时检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 的寡核苷酸探针,包含上述 a~f 六个部分。

本发明通过优选,进一步提供了一套特异性好,灵敏度高的探针,其中 a 探针为 P7, b 探针为 P20, c 探针为 P29, d 探针为 P36, e 探针为 P49, f 探针为 P60。

此外,本发明还提供了上述寡核苷酸探针的用途,利用一套探针可通过核酸杂交反应对样品中的肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 进行检测,尤其适用于基于基因芯片技术的检测。利用探针可以进一步检测出肠出血性大肠杆菌 O157:H7 是否携带产志贺样毒素基因 *stx1*、*stx2*; 霍乱弧菌 O139 是否携带肠毒素 A 亚单位 (*ctxA*)、毒力协调菌毛 A 亚单位 (*tcpA*) 等致病性毒性质粒。

具体的说,本发明内容是这样实现的:

根据出血性大肠杆菌 O157:H7 的产志贺样毒素基因 *stx1*、*stx2* 和 β -葡糖醛酸糖苷酶基因 (*uidA*); 霍乱弧菌 O139 的肠毒素 A 亚单位 (*ctxA*)、毒力协调菌毛 A 亚单位 (*tcpA*)、糖基转移酶 (*LPSgt*) 基因设计 60 条寡核苷酸探针,探针长度在 19—60 碱基之间。寡核苷酸探针序列与上述基因特定区域 DNA 正链的碱基序列一致(探针序列见表 1—1)。

利用上述的一套探针,可以通过杂交反应对样品中的相应细菌及毒性质粒进行检测,尤其适用于基于基因芯片原理的检测,具有较高的灵敏度和特异性。在进行基于基因芯片原理的检测时,需要把探针全部或其中一部分用适当的方法固定于固相载体上(如玻璃片、硅基片、聚丙烯膜、硝酸纤维素膜、尼龙膜等),成为 M×N 排布的探针阵列,即为基于芯片。然

后利用优化的相应的 PCR 引物扩增待检样品中的细菌，选择引物的要求是能够扩增出所有细菌的包含探针所在区域的片段。在扩增的同时引入荧光标记、生物素标记或其他合适的标记物。扩增产物作为探针检测的靶分子，在一定条件下与芯片共保温 30 分钟至数小时，利用荧光扫描仪或其他相应的检测设备即可以检测到杂交信号。根据探针出现信号的位置可以判定出细菌的种类。

除了基于基因芯片原理的检测外，这套探针也可以用于基于反相斑点杂交的检测：首先将探针固定于合适的载体上，提取待检细菌核酸，并对细菌的核酸进行标记，然后，将标记好的核酸与载体上的探针进行杂交反应，最后，提供合适的仪器设备进行检测。

本发明提供的探针能够快速、准确、高效地检测出样品中的细菌的种类及其所携带的致病性毒性质粒等。如果制备成相应的试剂盒，可以广泛用于临床细菌感染性疾病的诊断、抗菌素筛选、环境监测与评价、卫生监督与检疫、细菌学分类、流行病学调查等方面。

附图说明

图 1 为 O157: H7 和 O139 中靶基因单重和三重 PCR 产物电泳检测结果。1: stx1, 2: stx2, 3: uidA, 4: O157: H7 三重 PCR 扩增产物, 5: DL2000 Marker (可见条带分别为 250bp 和 500bp), 6: O139 三重 PCR 扩增产物, 7: LPSgt, 8: ctxA, 9: tcpA

图 2 为备选寡核苷酸探针微阵列示意图。探针 P1-P60 从左至右、从上至下依次排列为 10 列×6 行的微阵列。第一行至第三行分别为 stx1、stx2 和 uidA 基因的备选探针，检测大肠杆菌 O157: H7。第四行至第六行分别为 ctxA、TcpA、LPSgt 基因的备选探针，检测霍乱弧菌 O139。

图 3 为备选寡核苷酸探针筛选杂交扫描及定量结果(PCR 模板为 10^4 拷贝 DNA)。探针 P1-P60 从左至右、从上至下依次排列为 10 列×6 行的微阵列。第一排至第三排分别为 stx1、stx2 和 uidA 基因的探针，检测大肠杆菌 O157: H7。第四排至第六排分别为 ctxA、tcpA、LPSgt 基因的探针，检测霍乱弧菌 O139。

图 4 为肠出血性大肠杆菌 O157: H7 和霍乱弧菌 O139 检测基因芯片探针排列位置。

图 5 为基因芯片分别与肠出血性大肠杆菌 O157: H7 和霍乱弧菌 O139 的荧光标记三重 PCR 产物杂交结果。

图 6 为肠出血性大肠杆菌 O157: H7 和霍乱弧菌 O139 寡核苷酸芯片灵敏度检测结果。A: 三重 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果，当 PCR 反应模板均为 1000 拷贝时，三重 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳上可见微弱条带。B: 三重 PCR 产物基因芯片检测结果，当 PCR 反应模板均为 80 拷贝时，三重 PCR 产物与基因芯片杂交可见微弱荧光信号。

具体实施方式：

为了进一步说明一套用于同时检测出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 的寡核苷酸探针的实施方式和用途，参照以下实施例进行说明。实施例是为了解释而不是以任何方式限制本发明的范围，本领域技术人员在权利要求的范围内所做出的某些改变和调整也应认为属于本发明的范围。

实施例 1. 检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 寡核苷酸探针的筛选和优化**1. 检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 的寡核苷酸探针的设计**

根据肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的产志贺毒素基因 stx1、stx2 和 β -葡糖醛酸糖苷酶基因 (uidA)；霍乱弧菌 O139 的肠毒素 A 亚单位 (ctxA)、毒力协调菌毛 A 亚单位 (tcpA)、糖基转移酶 (LPSgt) 基因设计 60 条寡核苷酸探针，寡核苷酸探针序列与上述基因特定区域 DNA 正链的碱基序列一致（探针序列见表 1-1）。探针长度在 19—60 碱基之间。探针合成时在其 3' 端氨基修饰，用于探针与载玻片表面的活性醛基发生反应并固定到载体表面。

表 1-1: 检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 的寡核苷酸探针备选序列

探针 序号	探针序列	探针长 度(BP)
P1	CGTATGTAGA TTCGCTGAAT GTCATTCGCT CTGCAATAGG T	41
P2	CTGAATGTCA TTCGCTCTGC AATAGGTA CTATTACAGA CTATTCATC AGG	53
P3	TGAATGTCAT TCGCTCTGCA ATAGGTACTC CATT A	35
P4	GTCATTCGCT CTGCAATAGG TACTCCATTA CAGACTATTT CATCAGG	47
P5	ATCAGGAGGT ACGTCTTTAC TGATGATTGA TAGTGGCACA GGGGATAATT TGTTG	56
P6	GGAGGTACGT CTTTACTGAT GATTGATAGT GGCACAGGGG A	41
P7	GTACGTCTTT ACTGATGATT GATAGTGGCA CAGGG	35
P8	TACTGATGAT TGATAGTGGC ACAGGGGATA ATTTGTTTGC AGTTGATG	48
P9	GTTTGCAGTT GATGTCAGAG GGATAGATCC AGAGGAAGGG CG	42
P10	GTCAGAGGGA TAGATCCAGA GGAAGGGCGG TTAA	35
P11	CGTAAATAGT ATACGGACAG AGATATCGAC CCCTCTTGAA CATATATCTC AGG	53
P12	GTAAATAGT ATACGGACAG AGATATCGAC CCCTCTTGAA	40
P13	TAAATAGTAT ACGGACAGAG ATATCGACCC CTCTT	35
P14	ATATCTCAGG GGACCACATC GGTGTCTGTT ATTAACCACA	40
P15	TCTCAGGGGA CCACATCGGT GTCTGTTATT AACCA	35
P16	ACCACATCGG TGTCTGTTAT TAACCACACC CCACC	35

P17	CCACCGGGCA GTTATTTTGC TGTGGATATA CGAGGGCTTG ATGTCTATCA	50
P18	GGCAGTTATT TTGCTGTGGA TATACGAGGG CTTGATGTCT	40
P19	GGCAGTTATT TTGCTGTGGA TATACGAGGG CTTGATGTCT ATCA	44
P20	AGTTATTTTG CTGTGGATAT ACGAGGGCTT GATGT	35
P21	AAAACCTCGAC GGCCTGTGGG CATTCACTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA	50
P22	CTCGACGGCC TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAACCT GTGGA	45
P23	TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAACCT GTGGAATTGA GCAGCGTTGG	50
P24	TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAACCT GTGGAATTGA GCAGCGTTGG TGGGAAAGCG	60
P25	CATTCAGTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGT	45
P26	CATTCAGTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGTGGGAA AGCGC	55
P27	GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGTGGGAA AG	42
P28	AAAACCTGTGG AATTGAGCAG CGTTGGTGGG AAAGCG	36
P29	TGGAATTGAG CAGCGTTGG	19
P30	TGGAATTGAT CAGCGTTGG	19
P31	ATGTTTCCAC CTCAATTAGT TTGAGAAGTG CCCACTTAGT	40
P32	TATGTTATAG CCACTGCACC CAACATGT	28
P33	GCATACCGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTCTGGCT TAGGTGGGAT TCCAT	55
P34	CATACAGTCC TCATCCAGAT GAACAAGAAG TTTCTGCTTT AGGTG	45
P35	ATGAACAAGA AGTTTCTGCT TTAGGTGGGA TTCCA	35
P36	CATACAGTCC TCATCCAGAT GAACAAGAAG TTTCTGCTTT AGGTG	45
P37	AAGAAGTTTC TGCTTTAGGT GGGATTCCAT ACTCCCAAAT	40
P38	ATATGGATGG TATCGAGTTC ATTTTGGGGT GCTTG	35
P39	TGGATGGTAT CGAGTTCATT TTGGGGTCT TGATGAACAA TTACA	45
P40	AACAAGAAGT TTCTGCTTTA GGTGGGATTC CATACTCCCA AATAT	45
P41	TACAAGCGTA GGGGATATGT TTCCATTTAT CAACGTGAAA GAAGG	45
P42	TACAAGCGTA GGGGATATGT TTCCATTTAT CAACGTGAAA GAAGGTGCTT	50
P43	TTCGAAACGA GTGTGCAGATA TGCTGCTACT GGCCTGGCG TAATT	45
P44	CGAAACGAGT GTCGCAGATG CTGCTACTGG CG	32
P45	AGTCCATTGC ACCAGGAAGT GCCAACTTAA ACCTA	35
P46	AGTCCATTGC ACCAGGAAGT GCCAACTTAA ACCTAACTAA TATCACGCAT GTTGAGAAGC	60
P47	CATTGCACCA GGAAGTGCCA ACTTAAACCT AACTAATATC ACGCATGTTG AGAAG	55

P48	GCACCAGGAA GTGCCAACTT AAACCTAACT AATATCACGC ATGTTGAGAA	50
P49	CAGGAAGTGC CAACTTAAAC CTAACCTAATA TCACGCATGT TGAGA	45
P50	GGAAGTGCCA ACTTAAACCT AACTAATATC ACGCATGTTG AG	42
P51	AATCATTTC A TTCTTTCCT TAATGAGCGC ATTATTAACA ATGTAACAGA	50
P52	TAATGAGCGC ATTATTAACA ATGTAACAGA TTGTGATATG	40
P53	GAGCGCATT TTAACAATGT AACAGATTGT GATATGATAA GAGCGCATCT	50
P54	AGCGCATTAT TAACAATGTA ACAGATTGTG ATATGATAAG AGCGCATCTT TAAA	55
P55	ATTAACAATG TAACAGATTG TGATATGATA AGAGCGCATC	40
P56	CAATGTAACA GATTGTGATA TGATAAGAGC GCATC	35
P57	AGTAGTTCTC AAATTGAAAG TAGCCAATTT GATTCTTCTG CTATAGAAAG	50
P58	ATTGAAAGTA GCCAATTTGA TTCTTCTGCT ATAGAAAGGC TTATG	45
P59	GCCAATTTGA TTCTTCTGCT ATAGAAAGGC TTATG	35
P60	TCGATAAGAA GAGATAAAGA TCTGAGTTAT CTAAGATAT TTG	43

2. 扩增含有靶基因片段的PCR引物的设计和优化

根据O157:H7的毒力基因stx1、stx2和含有特异性突变位点基因uidA及0139的ctxA、tcpA、糖基转移酶基因(LPSgt)基因序列设计引物，引物序列见表1-2。利用引物扩增的PCR产物序列中包含各靶基因片段上的探针序列。所有反向引物序列5'端用荧光素Cy3标记，以保证PCR产物经杂交反应后，带有荧光的反向互补链与核苷酸探针结合产生可检测信号。分别对O157:H7和0139进行三重PCR扩增条件的优化（优化的PCR反应电泳检测结果见附图1）。

表1-2：用于扩增含有探针序列靶基因片段的引物序列

基因名称	引物序列（5' ---3'）	产物长度（bp）	备注
Stx1	GAATTACCT TAGACTTCTC GAC	250	正向引物
	TCCTGTTAAC AAATCCTGTC AC		反向引物
Stx2	TACGATAGAC TTTTCGACTC AAC	207	正向引物
	TCAATAATCA GACGAAGATG GTC		反向引物
UidA	TAATGAGGAG TCCCTTATGT TAC	179	正向引物
	ACTGATCGTT AAAACTGCCT GG		反向引物
ctxA	ACTCAGACGG GATTTGTTAG GC	304	正向引物

	ATCTATCTCT GTAGCCCCTA TTAC		反向引物
tcpA	TTGACCCAAG CACAATGTAA GAC	241	正向引物
	CTACTGTGAA TGGAGCAGTT CC		反向引物
LPSgt	ACATCTGTAG GGATTGTATT GAC	340	正向引物
	ATAACAACCTG AGATATCAAG CGTC		反向引物

3. 寡核苷酸基因芯片的制备和探针的筛选优化

探针纯化、定量后，用基因芯片点样仪点到醛基活化的载玻片上，制成O157:H7和O139备选寡核苷酸探针微阵列（基因芯片，探针排列见附图2）。用荧光标记的PCR扩增产物与基因芯片杂交，得到各探针的杂交效果如附图3所示。针对O157:H7和O139两种病原体的六个基因片段，根据芯片杂交结果选择六条特异性好，灵敏度高的探针。筛选得到的探针序列见表1-3。

表 1-3: 检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 的寡核苷酸探针优化序列

探针 序号	探针序列	探针长度 (BP)
P7	GTACGTCTTT ACTGATGATT GATAGTGGCA CAGGG	35
P20	AGTTATTTTG CTGTGGATAT ACGAGGGCTT GATGT	35
P29	TGGAATTGAG CAGCGTTGG	20
P36	CATACAGTCC TCATCCAGAT GAACAAGAAG TTTCTGCTTT AGGTG	45
P49	CAGGAAGTGC CAACTTAAAC CTAACATAA TCACGCATGT TGAGA	45
P60	TCGATAAGAA GAGATAAAGA TCTGAGTTAT CTAAAGATAT TTG	43

实施例2. 寡核苷酸探针的特异性和灵敏度评价

1. 基因芯片制备 将寡核苷酸探针用点样液（6×SSC，0.1%SDS）稀释至终浓度50μmol/L，取5ul转移至384孔板。用Cartesian芯片制备仪将探针点到醛基片上（探针排列见附图4，芯片分别与肠出血性大肠杆菌O157:H7和霍乱弧菌O139的荧光标记三重PCR产物杂交结果见附图5）。在该探针微阵列中，以荧光引物的反向互补序列作为阳性对照，以无关随机序列作为阴性探针对照，以不含探针的空白点样液作为阴性对照。探针序列见表2-1。

表2-1 肠出血性大肠杆菌O157:H7和霍乱弧菌O139检测基因芯片探针序列

探针名称	探针序列	探针长度 (BP)
stx1	GTACGTCTTT ACTGATGATT GATAGTGGCA CAGGG	35
stx2	AGTTATTTTG CTGTGGATAT ACGAGGGCTT GATGT	35
uidA	TGGAATTGAG CAGCGTTGG	20
ctxA	CATACAGTCC TCATCCAGAT GAACAAGAAG TTTCTGCTTT AGGTG	45
tcpA	CAGGAAGTGC CAACTTAAAC CTAATAATA TCACGCATGT TGAGA	45
LPSgt	TCGATAAGAA GAGATAAAGA TCTGAGTTAT CTAAAGATAT TTG	43
阴性探针对照	TCTTCGCCAG AGGCCTGCTA GCCTGGTTCA AGATACTACC	40
阳性探针对照	荧光引物反向互补序列	20

2. 标准质粒构建 以大肠杆菌O157:H7和霍乱弧菌O139标准菌株中提取的DNA作为模板，用未标记荧光的引物进行常规PCR扩增。扩增产物经纯化后分别与pGEM-T载体连接并转化大肠杆菌DH5 α ，37℃摇菌过夜。用Promega质粒提取试剂盒提取质粒，测序鉴定与标准序列一致。计算所提取质粒的拷贝数并进行10倍系列稀释，-20℃保存，作为PCR扩增的模板。

3. 肠出血性大肠杆菌O157:H7和霍乱弧菌O139寡核苷酸芯片灵敏度检测 将构建的阳性质粒10倍系列稀释，以不同拷贝数的模板进行三重PCR扩增。扩增产物与芯片进行杂交，结果与琼脂糖凝胶电泳检测方法进行比较。当PCR反应模板均为1000拷贝时，三重PCR反应产物，琼脂糖凝胶电泳检测条带可见，芯片杂交信号为阳性。当模板浓度为500拷贝时，三重PCR扩增产物电泳检测为阴性，芯片杂交反应为阳性。将模板再进行2—10倍稀释，其中6倍稀释后扩增产物杂交仍有弱阳性信号，继续稀释则杂交反应阴性（检测结果见附图6）。结果表明：要达到芯片检测的最低样品量，多重PCR扩增的DNA模板量应大于80拷贝。

4. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 寡核苷酸芯片特异性检测

在优化好的三重 PCR 扩增和杂交反应条件下，检测了 146 株不同血清型的肠道菌。其中包括大肠杆菌 O157:H7 W933、882364 标准株，97—O157:H7 等 5 株地方株，3 株 O157 非 H7 型；霍乱弧菌 O139 M045、1837 标准株和 72 株地方分离株，O1 型霍乱弧菌 569B 和小川型；常见肠道菌：侵袭性大肠杆菌 48017、STM408、191、197、247、AT 大肠杆菌、金葡菌 6538、沙门氏菌、耶尔森氏菌、蜡样芽胞杆菌、志贺氏菌、李斯特菌、假单胞菌、变性杆菌等共 146 株。以细菌 DNA 为模板进行两套三重 PCR 扩增，产物与芯片杂交。结果除阳性对照外，其中 8 株大肠杆菌 O157:H7 在 stx1、stx2、uidA 探针处都产生阳性信号，两株 O157 非 H7 型

在 stx1 和 stx2 探针处产生阳性信号，另外三株 O157 非 H7 型和 191、197 及一株不明血清型的大肠杆菌在 stx1 探针处产生信号，但 O157 非 H7 型在 uidA 探针都无信号产生。这说明所检测的 O157: H7 都含有 stx1、stx2 毒力基因，而非 H7 型和一些肠道菌也含有 stx1 或 stx2。uidA 探针可用于检测 O157: H7 的突变位点，与非 H7 型进行鉴别。74 株霍乱弧菌 O139 在 ctxA、tcpA、LPSgt 探针处都产生阳性信号。569B、小川型霍乱弧菌在 ctxA、tcpA 探针处产生阳性信号，表明所检测的 O1 型霍乱弧菌含有 ctxA、tcpA 毒力基因。而本实验 LPSgt 探针则只与 O139 型霍乱弧菌特异结合。而其它肠道菌与检测探针杂交，均无信号产生。这说明所选取的用于鉴别 O157: H7 和 O139 的探针是特异的，也说明本实验建立在两套多重 PCR 基础上，同时定性检测 O157: H7 和 O139 两种肠道致病菌的基因芯片是可靠的。此芯片还可用于辅助鉴别 O1 型霍乱弧菌。

表 2-2: 应用基因芯片检测 146 株肠道菌结果

菌株	数量	stx1	stx2	uidA	ctxA	tcpA	LPSgt
O157: H7	8	+	+	+	-	-	-
O157 非 H7	2	+	+	-	-	-	-
O157 非 H7	3	+	-	-	-	-	-
191、197	2	+	-	-	-	-	-
O139	74	-	-	-	+	+	+
O1	2	-	-	-	+	+	-
其它肠道菌	55	-	-	-	-	-	-

实施例 3. 检测肠出血性大肠杆菌 O157: H7 和霍乱弧菌 O139 寡核苷酸芯片的应用

1. 临床样本收集与DNA提取 取临床病人发病及治疗不同时期的肛拭子。每份样本分成两份，一份用传统细菌培养方法进行常规细菌学检测，共检出89份样本为O139型霍乱弧菌（结果见表3-1）；另一份于碱性蛋白胨水中增菌2-3h，然后煮沸裂解10min，12000rpm离心2min,取上清中DNA作为多重PCR扩增模板。

2.寡核苷酸芯片检测 用大肠杆菌O157:H7和霍乱弧菌O139寡核苷酸芯片共检测了342份临床样本，用荧光引物对临床样本进行多重不对称PCR扩增，产物混合后与芯片杂交。结果有137份在芯片ctxA、tcpA、LPSgt探针处都出现阳性信号，鉴定为O139型霍乱弧菌，其余205份除阳性对照外，未见杂交信号（结果见表3-1）。结果表明本研究建立的检测大肠杆菌O157: H7和霍乱弧菌O139的基因芯片阳性检出率比常规细菌学检测方法敏感性高。

表3-1 临床标本检测结果

检测方法	检测目标	检出阳性样本数	阳性检出率(%)
细菌培养	生理、生化特征	89	26.0
基因芯片	ctxA, tcpA, LPSgt	137	40.0

以上实施例的技术要点如下：

1. 寡核苷酸合成 寡核苷酸(引物或探针)采用标准亚磷酰胺化学方法在自动合成仪(ABi 8909)上合成。所有荧光引物在合成中用 Cy3 亚磷酰化试剂在 5'端进行标记。所有寡核苷酸探针在 3'端进行氨基修饰, 氨基与探针序列之间以间隔臂(聚乙二醇磷酰化试剂)相连。合成完毕用浓氨水 55°C 作用 15 小时脱保护/切割, OPC 柱纯化。紫外定量, 冻存备用。

2. 多重 PCR 扩增 20ul 常规 PCR 反应体系中, 正、反向引物浓度均为 1 μ mol/L, 100 μ mol/L dNTP, 1U TaqDNA 聚合酶, 1 \times PCR 反应缓冲液, 50-100ng 模板 DNA; 扩增条件为: 预变性(94°C, 5 min); 35 个循环: 变性(94°C, 30 sec), 退火(55°C, 30 sec) 延伸(72°C, 30 sec); 延伸: (72°C, 5 min/)

多重不对称 PCR 反应中, 三对引物之间浓度的改变对目的基因的扩增效率有明显的影响, 每个基因的正向与反向荧光引物的比例和杂交信号的强弱密切相关。经过多次实验优化, 使一个反应管中三个产物均能达到相近而且较好的扩增效率和杂交信号。优化的结果为: O157: H7 多重 PCR 反应中 stx1、stx2 和 uidA 基因的正向引物浓度分别为 0.15 μ mol/L、0.1 μ mol/L、0.1 μ mol/L, 反向荧光标记引物浓度分别为 0.75 μ mol/L、0.5 μ mol/L、0.5 μ mol/L; O139 多重 PCR 反应中 ctxA、tcpA、LPSgt 基因的正向引物浓度分别为 0.15 μ mol/L、0.15 μ mol/L、0.2 μ mol/L, 反向荧光标记引物浓度分别为 0.75 μ mol/L、0.75 μ mol/L、1.0 μ mol/L。20ul 反应体系中, dNTP 为 200 μ mol/L, MgCl₂ 为 3 mmol, 2U TaqDNA 聚合酶, 1 \times PCR 反应缓冲液; 扩增条件为: 预变性(94°C, 5 min); 40 个循环: 变性(94°C, 30 sec), 退火(56°C, 30 sec) 延伸(72°C, 30 sec); 延伸: (72°C, 5 min/)

3. 标准质粒构建 从标准 O157:H7 W933 和霍乱弧菌 O139 M045 菌株中提取 DNA 作为模板, 用每对引物(未标记荧光)进行常规 PCR 扩增。扩增产物经纯化后分别与 pGEM-T 载体连接转化进大肠杆菌 DH5 α 中, 37°C 摇菌过夜, 用 Promega 质粒提取试剂盒提取质粒。经纯化后测序, 鉴定阳性克隆, 计算所提取质粒的拷贝数并进行 10 倍系列稀释, -20°C 保存, 作为 PCR 扩增的模板。

4. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 寡核苷酸芯片制备 寡核苷酸探针用点样

液（6×SSC，0.1%SDS）稀释至终浓度 50μmol/L，取 5ul 转移至 384 孔板。用 Cartesian 芯片制备仪将探针点到醛基片（Telechem）上，点样仪内保持温度为 23℃，相对湿度大于 85%。寡核苷酸芯片制备完毕后，置于载玻片盒内室温放置备用。点样后的芯片在使用前至少在室温放置 24h。

5. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139 寡核苷酸芯片杂交与检测

5.1 寡核苷酸基因芯片预处理 寡核苷酸芯片用0.2%SDS清洗2次，接着以水清洗2次，晾干后用于杂交。

5.2 杂交和杂交后处理 荧光标记的PCR产物变性（98℃、5 min，立即冰浴）后与杂交液（5×SSC，5×Denhardt，10μg/ml鲑精DNA，0.3%SDS）混匀，取10μl转移至芯片反应区，芯片置于杂交盒内，连同杂交盒浸入42℃水浴中反应60分钟，杂交后的芯片依次在洗液A（1×SSC，0.2%SDS），洗液B（0.2×SSC）和洗液C（0.1×SSC）中于室温各洗涤1min。置室温晾干。

5.3 扫描和结果判定 芯片用芯片扫描仪GenePix 4000B进行扫描,用GenePix Pro 4.0软件分析结果。

序列表

<110>中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所

<120>一套检测肠出血性大肠杆菌和霍乱弧菌的寡核苷酸探针

<160>60

<210>1

<211>41

<212>DNA

<213>人工序列

<400>1

CGTATGTAGA TTCGCTGAAT GTCATTCGCT CTGCAATAGG T 41

<210>2

<211>53

<212>DNA

<213>人工序列

<400>2

CTGAATGTCA TTCGCTCTGC AATAGGTACT CCATTACAGA CTATTCATC AGG 53

<210>3

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>3

TGAATGTCAT TCGCTCTGCA ATAGGTACTC CATT 35

<210>4

<211>47

<212>DNA

<213>人工序列

<400>4

GTCATTCGCT CTGCAATAGG TACTCCATTA CAGACTATTT CATCAGG 47

<210>5

<211>56

<212>DNA

<213>人工序列

<400>5

ATCAGGAGGT ACGTCTTTAC TGATGATTGA TAGTGGCACA GGGGATAATT TGTTTG 56

<210>6

<211>41

<212>DNA

<213>人工序列

<400>6

GGAGGTACGT CTTTACTGAT GATTGATAGT GGCACAGGGG A 41

<210>7

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>7

GTACGTCTTT ACTGATGATT GATAGTGGCA CAGGG 35

<210>8

<211>48

<212>DNA

<213>人工序列

<400>8

TACTGATGAT TGATAGTGGC ACAGGGGATA ATTTGTTTGC AGTTGATG 48

<210>9

<211>42

<212>DNA

<213>人工序列

<400>9

GTTTGCAGTT GATGTCAGAG GGATAGATCC AGAGGAAGGG CG 42

<210>10

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>10

GTCAGAGGGA TAGATCCAGA GGAAGGGCGG TTAA 35

<210>11

<211>53

<212>DNA

<213>人工序列

<400>11

CGTAAATAGT ATACGGACAG AGATATCGAC CCCTCTTGAA CATATATCTC AGG 53

<210>12

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<400>12

GTAAATAGT ATACGGACAG AGATATCGAC CCCTCTTGAA 40

<210>13

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>13

TAAATAGTAT ACGGACAGAG ATATCGACCC CTCTT 35

<210>14

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<400>14

ATATCTCAGG GGACCACATC GGTGTCTGTT ATTAACCACA 40

<210>15

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>15

TCTCAGGGGA CCACATCGGT GTCTGTTATT AACCA 35

<210>16

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>16

ACCACATCGG TGTCTGTTAT TAACCACACC CCACC 35

<210>17

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<400>17

CCACCGGGCA GTTATTTTGC TGTGGATATA CGAGGGCTTG ATGTCTATCA 50

<210>18

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<400>18

GGCAGTTATT TTGCTGTGGA TATACGAGGG CTGATGTCT 40

<210>19

<211>44

<212>DNA

<213>人工序列

<400>19

GGCAGTTATT TTGCTGTGGA TATACGAGGG CTGATGTCT ATCA 44

<210>20

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>20

AGTTATTTTG CTGTGGATAT ACGAGGGCTT GATGT 35

<210>21

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<400>21

AAACTCGAC GGCCTGTGGG CATTCACTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA 50

<210>22

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>22

CTCGACGGCC TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAAC TGTGA 45

<210>23

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<400>23

TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAAC TGTGAATTGA GCAGCGTTGG 50

<210>24

<211>60

<212>DNA

<213>人工序列

<400>24

TGTGGGCATT CAGTCTGGAT CGCGAAAAC TGTGAATTGA GCAGCGTTGG TGGGAAAGCG 60

<210>25

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>25

CATTCAGTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGT 45

<210>26

<211>55

<212>DNA

<213>人工序列

<400>26

CATTCAGTCT GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGTGGGAA AGCGC 55

<210>27

<211>42

<212>DNA

<213>人工序列

<400>27

GGATCGCGAA AACTGTGGAA TTGAGCAGCG TTGGTGGGAA AG 42

<210>28

<211>36

<212>DNA

<213>人工序列

<400>28

AAAACGTGG AATTGAGCAG CGTTGGTGGG AAAGCG 36

<210>29

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<400>29

TGGAATTGAG CAGCGTTGG 19

<210>30

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<400>30

TGGAATTGAT CAGCGTTGG 19

<210>31

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<400>31

ATGTTTCCAC CTCAATTAGT TTGAGAAGTG CCCACTTAGT 40

<210>32

<211>28

<212>DNA

<213>人工序列

<400>32

TATGTTATAG CCACTGCACC CAACATGT 28

<210>33

<211>55

<212>DNA

<213>人工序列

<400>33

GCATACCGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTTCTGGCT TAGGTGGGAT TCCAT 55

<210>34

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>34

CATACAGTCC TCATCCAGAT GAACAAGAAG TTTCTGCTTT AGGTG 45

<210>35

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>35

ATGAACAAGA AGTTTCTGCT TTAGGTGGGA TTCCA 35

<210>36

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>36

CATACAGTCC TCATCCAGAT GAACAAGAAG TTTCTGCTTT AGGTG 45

<210>37

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<400>37

AAGAAGTTTC TGCTTTAGGT GGGATTCCAT ACTCCCAAAT 40

<210>38

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>38

ATATGGATGG TATCGAGTTC ATTTGGGGT GCTTG 35

<210>39

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>39

TGGATGGTAT CGAGTTCATT TTGGGGTGCT TGATGAACAA TTACA 45

<210>40

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>40

AACAAGAAGT TTCTGCTTTA GGTGGGATTC CATACTCCCA AATAT 45

<210>41

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>41

TACAAGCGTA GGGGATATGT TTCCATTTAT CAACGTGAAA GAAGG 45

<210>42

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<400>42

TACAAGCGTA GGGGATATGT TTCCATTTAT CAACGTGAAA GAAGGTGCTT 50

<210>43

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>43

TTCGAAACGA GTGTCGCAGA TGCTGCTACT GCGCTGGCG TAATT 45

<210>44

<211>32

<212>DNA

<213>人工序列

<400>44

CGAAACGAGT GTCGCAGATG CTGCTACTGG CG 32

<210>45

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>45

AGTCCATTGC ACCAGGAAGT GCCAACTTAA ACCTA 35

<210>46

<211>60

<212>DNA

<213>人工序列

<400>46

AGTCCATTGC ACCAGGAAGT GCCAACTTAA ACCTAACTAA TATCACGCAT GTTGAGAAGC 60

<210>47

<211>55

<212>DNA

<213>人工序列

<400>47

CATTGCACCA GGAAGTGCCA ACTTAAACCT AACTAATATC ACGCATGTTG AGAAG 55

<210>48

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<400>48

GCACCAGGAA GTGCCAACTT AACCTAACT AATATCACGC ATGTTGAGAA 50

<210>49

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>49

CAGGAAGTGC CAACTTAAAC CTAATAATA TCACGCATGT TGAGA 45

<210>50

<211>42

<212>DNA

<213>人工序列

<400>50

GGAAGTGCCA ACTTAAACCT AACTAATATC ACGCATGTTG AG 42

<210>51

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<400>51

AATCATTTC A TTCTTCACT TAATGAGCGC ATTATTAACA ATGTAACAGA 50

<210>52

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<400>52

TAATGAGCGC ATTATTAACA ATGTAACAGA TTGTGATATG 40

<210>53

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<400>53

GAGCGCATT A TTAACAATGT AACAGATTGT GATATGATAA GAGCGCATCT

50

<210>54

<211>55

<212>DNA

<213>人工序列

<400>54

AGCGCATTAT TAACAATGTA ACAGATTGTG ATATGATAAG AGCGCATCTT TAAA 55

<210>55

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<400>55

ATTAACAATG TAACAGATTG TGATATGATA AGAGCGCATC 40

<210>56

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>56

CAATGTAACA GATTGTGATA TGATAAGAGC GCATC 35

<210>57

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<400>57

AGTAGTTCTC AAATTGAAAG TAGCCAATTT GATTCTTCTG CTATAGAAAG 50

<210>58

<211>45

<212>DNA

<213>人工序列

<400>58

ATTGAAAGTA GCCAATTTGA TTCTTCTGCT ATAGAAAGGC TTATG 45

<210>59

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<400>59

GCCAATTTGA TTCTTCTGCT ATAGAAAGGC TTATG 35

<210>60

<211>43

<212>DNA

<213>人工序列

<400>60

TCGATAAGAA GAGATAAAGA TCTGAGTTAT CTAAAGATAT TTG 43

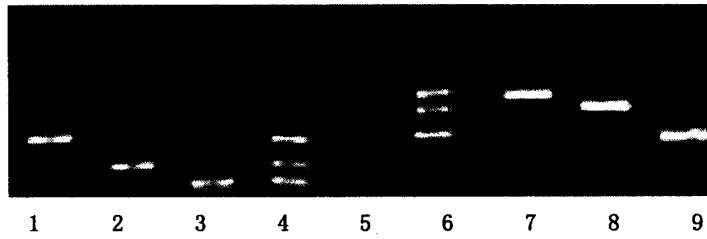


图 1

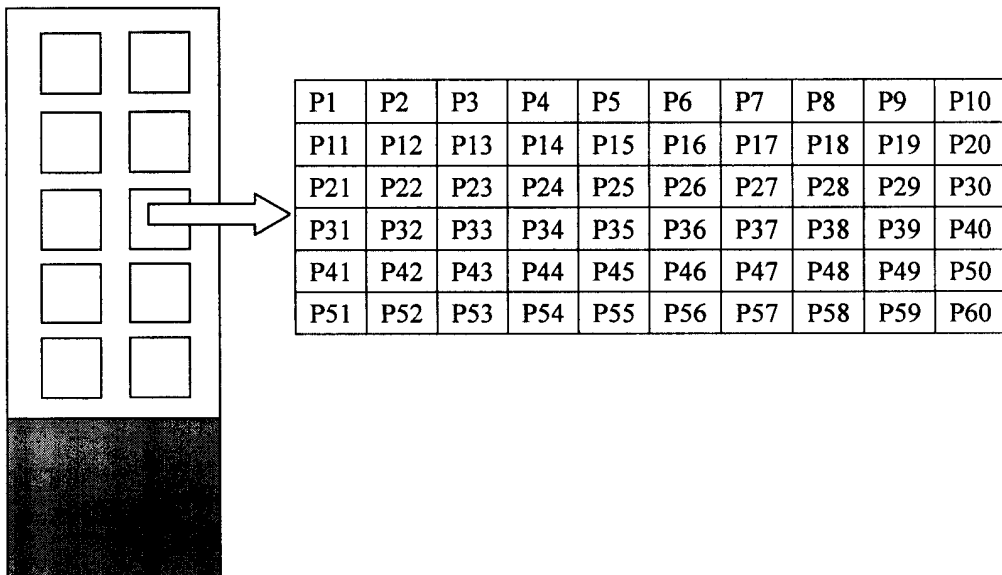


图 2

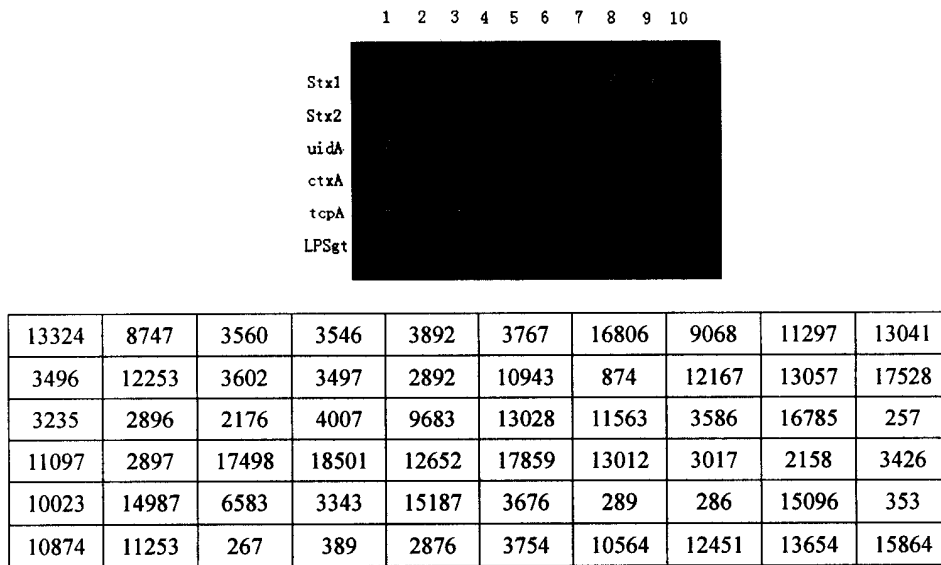


图 3

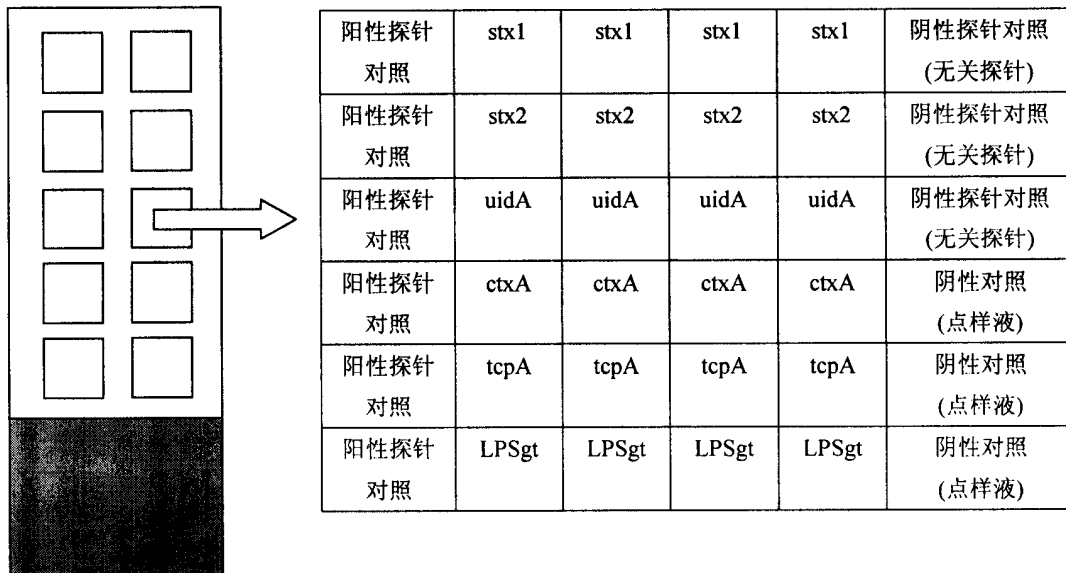
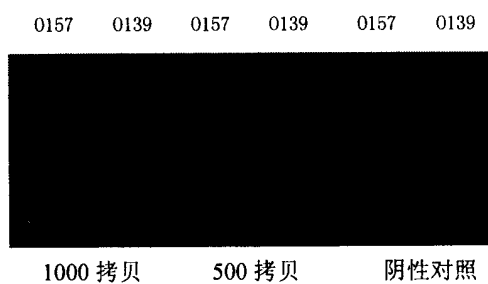


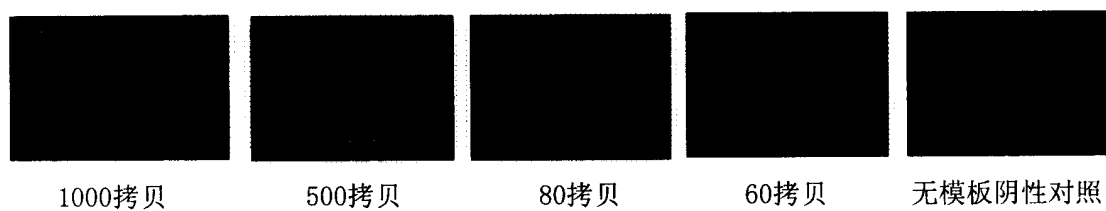
图 4



图 5



A



B

图 6