



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110499378 A

(43)申请公布日 2019.11.26

(21)申请号 201910861066.2

(22)申请日 2019.09.12

(71)申请人 卓源健康科技有限公司

地址 230088 安徽省合肥市高新区望江西路800号创新产业园一期B3栋501-505

(72)发明人 李敬 王旭 孙宝林 郭建 吴谨

(74)专利代理机构 合肥顺超知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 34120

代理人 张芳

(51)Int.Cl.

C12Q 1/689(2018.01)

C12Q 1/686(2018.01)

C12Q 1/10(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

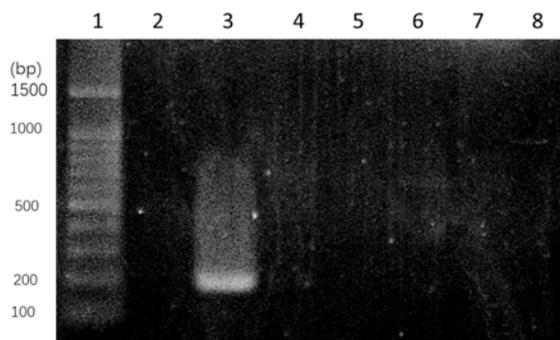
权利要求书2页 说明书6页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法

(57)摘要

本发明提供了一种从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,包括以下步骤:S1、血液中大肠埃希菌基因组DNA的提取;S2、血液中大肠埃希菌PCR检测:S2.1、利用大肠埃希菌基因组DNA序列设计特异性的PCR引物,正向引物如SEQ ID NO.1所示;反向引物如SEQ ID NO.2所示;引物的扩增片段长度为200bp;S2.2、以大肠埃希菌基因组DNA为模板,采用特异性的PCR引物进行PCR扩增;S2.3、对PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳及检测,扩增出长度为200bp的片段则判定为检测出大肠埃希菌。本发明对血液中大肠埃希菌的检测极限达到100CFU/mL,通过直接对临床血液中大肠埃希菌基因组DNA的快速提取并进行特异基因的快速PCR检测,可实现对血液中大肠埃希菌感染及时有效的诊断。



1. 一种从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、血液中大肠埃希菌基因组DNA的提取;

S2、血液中大肠埃希菌PCR检测:

S2.1、利用大肠埃希菌基因组DNA序列设计一段特异性的PCR引物,所述PCR引物包括正向引物和反向引物;

所述正向引物如SEQ ID NO.1所示:5' -TAATGTTCTGCGACGCTCAC-3' ;

所述反向引物如SEQ ID NO.2所示:5' -CCCGGCTAACGTATCCAC-3' ;

引物的扩增片段长度为200bp;

S2.2、以步骤S1中从血液中提取的大肠埃希菌基因组DNA为模板,采用步骤S2.1中的特异性的PCR引物进行PCR扩增;

S2.3、对PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳及检测,扩增出长度为200bp的片段则判定为检测出大肠埃希菌。

2. 根据权利要求1所述的从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,其特征在于,步骤S1中,血液样品中大肠埃希菌基因组DNA的提取具体包括以下步骤:

S1.1、血液样品与酶裂解液等体积混合混匀,37℃孵育15分钟;

S1.2、步骤S1.1中酶裂解液处理的血液样品与碱裂解液等体积混合,轻轻混匀,室温静置裂解5分钟;

S1.3、步骤S1.2中裂解处理后的血液样品与去杂液体按积比为2:1混合,加入去杂液后立即混匀直至出现沉淀,放置离心机中室温12000转/分钟离心10分钟;

S1.4、轻轻吸取上层悬液至DNA吸附柱中,并将DNA吸附柱套在2mL离心管内;12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱;

S1.5、向DNA吸附柱内加入500μL的0.4M KI与异丙醇混合液;12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱;

S1.6、再向DNA吸附柱内加入700μL的80%v/v无水乙醇和10mM pH8.0的Tris-HCl混合液;12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱;

S1.7、重复步骤S1.6 1次;

S1.8、空DNA吸附柱12000转/分钟离心5分钟,并将DNA吸附柱转移至1.5mL离心管内;

S1.9、向空DNA吸附柱膜中央加入30μL 10mM Tris-HCl和1mM EDTA混合液,pH为8.0-8.5;12000转/分钟离心2分钟,收集洗脱下来的基因组DNA。

3. 根据权利要求2所述的从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,其特征在于,步骤S1.1中,酶裂解液中含有:0.1mg/mL核糖核酸酶A、1mg/mL蛋白酶K、0.05mg/mL广谱裂解酶、10mg/mL溶菌酶、25mM Tris-HCl、10mM EDTA,pH 8.0-8.5。

4. 根据权利要求2所述的从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,其特征在于,步骤S1.2中,碱裂解液中含有:0.2M NaOH,1%SDS,pH 12-14。

5. 根据权利要求2所述的从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,其特征在于,步骤S1.3中,去杂液中含有:4M NH₄Ac-HAc,pH 4.5-4.8。

6. 根据权利要求1所述的从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,其特征在于,步骤S2.2中,PCR扩增时PCR的反应体系为:10倍PCR buffer (plus Mg²⁺) 1μL,dNTPs底物 (2.5mM each) 0.8μL,2μmol/L的正向引物1μL,2μmol/L的反向引物1μL,EasyTaq DNA polymerase

(Transgen Biology) 0.5 μ L, 基因组DNA模板1 μ L, 双蒸水补足至10 μ L。

7. 根据权利要求1所述的从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法, 其特征在于, 步骤S2.2中, PCR的反应程序为: 95 $^{\circ}$ C预变性5min; 95 $^{\circ}$ C变性30s, 50 $^{\circ}$ C退火20s, 72 $^{\circ}$ C延伸10s, 30次循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸10min, 16 $^{\circ}$ C保存。

8. 根据权利要求1所述的从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法, 其特征在于, 步骤S2中, 提供大肠埃希菌基因组DNA提取的菌含量 ≥ 100 CFU/mL。

一种从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及血液感染病原菌的检测技术领域,具体涉及一种从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法。

背景技术

[0002] 大肠埃希菌俗称大肠杆菌,是人体内常见的细菌种类。一般性的大肠埃希菌并不具有致病性,但其他一些种类如致泻性大肠埃希菌类会引起人类疾病,儿童败血症也与病原性大肠埃希菌密切相关。大肠埃希菌导致的血流感染也已成为革兰氏阴性菌引起的血流感染的罪魁祸首。

[0003] 目前,针对临床血液中病原微生物的检测,医院的传统检验方法仍需经过培养等复杂耗时的中间步骤,像大肠埃希菌这种易于培养的菌种也需涂板划线过夜培养,再到后续的生理生化或耐药性分析,一般会需要3-5天左右。这样会导致感染病人的治疗不及时等一系列问题,更有甚者会直接导致医患关系紧张的状况。

[0004] 所以,寻找一种快速简单和高效率的检测血样中大肠埃希菌的方法具有重大的临床意义和广阔的应用市场。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,通过直接对临床血液中大肠埃希菌基因组DNA的快速提取并进行其特异基因的快速PCR检测,可实现对血液中大肠埃希菌感染的及时有效的诊断,本发明将临床检测周期缩短为3-5h而且操作简单方便,大大提升了临床检验的及时性,具有很好的临床实用价值。

[0006] 为实现以上目的,本发明通过以下技术方案予以实现:

[0007] 一种从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法,包括以下步骤:

[0008] S1、血液中大肠埃希菌基因组DNA的提取;

[0009] S2、血液中大肠埃希菌PCR检测:

[0010] S2.1、利用大肠埃希菌基因组DNA序列设计一段特异性的PCR引物,所述PCR引物包括正向引物和反向引物;

[0011] 所述正向引物如SEQ ID NO.1所示:5'-TAATGTTCTGCGACGCTCAC-3';

[0012] 所述反向引物如SEQ ID NO.2所示:5'-CCCGGCTAACGTATCCAC-3';

[0013] 引物的扩增片段长度为200bp;

[0014] S2.2、以步骤S1中从血液中提取的大肠埃希菌基因组DNA为模板,采用步骤S2.1中的特异性的PCR引物进行PCR扩增;

[0015] S2.3、对PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳及检测,扩增出长度为200bp的片段则判定为检测出大肠埃希菌。

[0016] 优选地,步骤S1中,血液样品中大肠埃希菌基因组DNA提取具体包括以下步骤:

[0017] S1.1、血液样品与酶裂解液等体积混合混匀,37℃孵育15分钟;

- [0018] S1.2、步骤S1.1中酶裂解液处理的血液样品与碱裂解液等体积混合,轻轻混匀,室温静置裂解5分钟;
- [0019] S1.3、步骤S1.2中裂解处理后的血液样品与去杂液体按积比为2:1混合,加入去杂液后立即混匀直至出现沉淀,放置离心机中室温12000转/分钟离心10分钟;
- [0020] S1.4、轻轻吸取上层悬液至DNA吸附柱中,并将DNA吸附柱套在2mL离心管内;12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱;
- [0021] S1.5、向DNA吸附柱内加入500 μ L的0.4M KI与异丙醇混合液;12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱;
- [0022] S1.6、再向DNA吸附柱内加入700 μ L的80%v/v无水乙醇和10mM Tris-HCl (pH8.0)混合液;12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱;
- [0023] S1.7、重复步骤S1.6 1次;
- [0024] S1.8、空DNA吸附柱12000转/分钟离心5分钟,并将DNA吸附柱转移至1.5mL离心管内;
- [0025] S1.9、向空DNA吸附柱膜中央加入30 μ L 10mM Tris-HCl和1mM EDTA混合液,pH为8.0-8.5;12000转/分钟离心2分钟,收集洗脱下来的基因组DNA。
- [0026] 优选地,步骤S1.1中,酶裂解液中含有:0.1mg/mL核糖核酸酶A、1mg/mL蛋白酶K、0.05mg/mL广谱裂解酶ClyH、10mg/mL溶菌酶、25mM Tris-HCl、10mM EDTA,pH 8.0-8.5。
- [0027] 优选地,步骤S1.2中,碱裂解液中含有:0.2M NaOH,1%SDS,pH 12-14。
- [0028] 优选地,步骤S1.3中,去杂液中含有:4M NH₄Ac-HAc,pH 4.5-4.8。
- [0029] 优选地,步骤S2.2中,PCR扩增时PCR的反应体系为:10倍PCR buffer (plus Mg²⁺) 1 μ L,dNTPs底物(2.5mM each) 0.8 μ L,2 μ mol/L的正向引物1 μ L,2 μ mol/L的反向引物1 μ L,EasyTaq DNA polymerase (Transgen Biology) 0.5 μ L,基因组DNA模板1 μ L,双蒸水补足至10 μ L。
- [0030] PCR的反应程序为:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,50 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸10s,30次循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min,16 $^{\circ}$ C保存。
- [0031] 优选地,步骤S2.2中,提供大肠埃希菌基因组DNA提取的菌含量 \geq 100CFU/mL。
- [0032] 本发明的有益效果是:
- [0033] 本发明区别于传统的临床血液中大肠埃希菌感染检测技术,在检测效率上有了较大的提升。本发明首先利用特定的基因组DNA抽提试剂,简单快速地提取出血样中大肠埃希菌的基因组DNA;再利用大肠埃希菌的特异基因,设计优化用于PCR扩增的特异性引物,然后通过PCR反应快速高效地检测出临床血液中大肠埃希菌感染。本发明克服了临床上传统的培养增菌等费时费力且复杂的检测方法。同时,本发明对血液中大肠埃希菌的检测极限达到100CFU/mL,基本符合在临床上检测应用的要求。本发明所建立的PCR检测方法若应用在临床实际中,将大幅度提高临床上对血液中大肠埃希菌检测的效率和灵敏度。本发明方法具有操作简单方便,检测速度快,特异性强,灵敏度高,稳定性强等显著优势。

附图说明

- [0034] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中的所需要使用的附图作简单介绍,显而易见地,下面描述的附图仅仅是本发明的一些实施例,

对于本领域普通技术人员来说,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0035] 图1为大肠埃希菌引物检测的特异性实验结果;其中,1:Marker (100bp);2:阴性对照;3:大肠埃希菌;4:金黄色葡萄球菌;5:沙门氏菌;6:绿脓杆菌;7:单增生李斯特菌;8:肺炎克雷伯菌。

[0036] 图2为血液中大肠埃希菌检测的灵敏度实验结果;其中,1:Marker (100bp);2:阴性对照;3:阴性血样;4:阳性对照;5-13:分别为 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 CFU/mL大肠埃希菌。

[0037] 图3为血液中大肠埃希菌检测方法的临床应用实例。其中,1:Marker (100bp);2:阴性对照组;3:阳性对照组;4-9:分别为临床血液实验组。

具体实施方式

[0038] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0039] 实施例一:特异性的PCR引物设计

[0040] 利用大肠埃希菌基因组DNA序列设计一段特异性的PCR引物,特异性的PCR引物包括正向引物和反向引物。正向引物如SEQ ID NO.1所示:5'-TAATGTTCTGCGACGCTCAC-3'。反向引物如SEQ ID NO.2所示:5'-CCCGGCTAACGTATCCAC-3'。引物的扩增片段长度为200bp。

[0041] 实施例二:

[0042] 利用大肠埃希菌特异引物检测血液中加入的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、单核细胞增生李斯特菌和肺炎克雷伯菌等致病菌。本实施例向每100 μ L血液中加入OD₆₀₀为0.1的上述各类病原菌。本实施例列包括了血液中细菌基因组DNA的提取和PCR扩增检测。本方法包括以下步骤:

[0043] (1)收取100 μ L培养的OD₆₀₀=0.1的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、单核细胞增生李斯特菌和肺炎克雷伯菌。12000转/分钟离心1分钟,收集沉淀的菌体。

[0044] (2)取6组100 μ L新鲜的血液,6组100 μ L新鲜的血液分别加入经步骤(1)沉淀的大肠埃希菌菌体、金黄色葡萄球菌菌体、沙门氏菌菌体、绿脓杆菌菌体、单核细胞增生李斯特菌菌体和肺炎克雷伯菌菌体,重悬沉淀的菌体,充分吹打混合均匀。

[0045] (3)向每组血液中加入100 μ L酶裂解液,37 $^{\circ}$ C孵育15分钟。其中酶裂解液中含有:0.1mg/mL核糖核酸酶A、1mg/mL蛋白酶K、0.05mg/mL广谱裂解酶ClyH、10mg/mL溶菌酶、25mM Tris-HCl、10mM EDTA,pH 8.0-8.5。

[0046] (4)再加入200 μ L碱裂解液,轻轻混匀,室温静置裂解5分钟。其中碱裂解液中含有:0.2M NaOH,1%SDS,pH 12-14。

[0047] (5)再加入200 μ L去杂液,立即混匀,放置离心机中室温12000转/分钟离心10分钟。其中去杂液中含有:4M NH₄Ac-HAc,pH 4.5-4.8。

[0048] (6)轻轻吸取上清液至DNA吸附柱中,并将DNA吸附柱套在2mL离心管内。12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0049] (7) 向DNA吸附柱内加入500 μ L体积的0.4M KI与异丙醇混合液(KI溶于异丙醇中, KI的浓度为0.4M)。12000转/分钟离心1分钟, 去除离心管内的废液, 将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0050] (8) 再向DNA吸附柱内加入700 μ L的80%v/v无水乙醇和10mM Tris-HCl (pH8.0) 混合液(80%v/v无水乙醇中Tris-HCl的浓度为10mM)。12000转/分钟离心1分钟, 去除离心管内的废液, 将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0051] (9) 重复步骤(8)一次。

[0052] (10) 空DNA吸附柱12000转/分钟离心5分钟, 并将DNA吸附柱转移至1.5mL离心管内。

[0053] (11) 向空DNA吸附柱膜中央加入30 μ L 10mM Tris-HCl和1mM EDTA混合液(混合液中Tris-HCl的浓度为10mM, EDTA的浓度为1mM), pH8.0-8.5。12000转/分钟离心2分钟, 收集洗脱下来的基因组DNA。

[0054] (12) 以从步骤(11)所提取的大肠埃希菌基因组DNA为模板, 采用上述特异性的PCR引物进行PCR扩增, 具体为:

[0055] PCR反应体系: 10倍PCR buffer (plus Mg^{2+}) 1 μ L, dNTPs底物(2.5mM each) 0.8 μ L, 2 μ mol/L的正向引物(SEQ ID NO.1) 1 μ L, 2 μ mol/L的反向引物(SEQ ID NO.2) 1 μ L, EasyTaq DNA polymerase (Transgen Biology) 0.5 μ L, 基因组DNA模板1 μ L, 双蒸水补足至10 μ L。

[0056] PCR反应程序: 95 $^{\circ}$ C预变性5min; 95 $^{\circ}$ C变性30s, 50 $^{\circ}$ C退火20s, 72 $^{\circ}$ C延伸10s, 30次循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸10min; PCR扩增产物16 $^{\circ}$ C保存。

[0057] (13) 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物(见图1), 扩增出长度为200bp的片段则判定为检测出大肠埃希菌。由图1可以看出, 大肠埃希菌特异性引物仅扩增出特定的大肠埃希菌基因而在其他致病菌中未扩增出目的条带。说明本发明中设计的大肠埃希菌引物的特异性高。

[0058] 实施例三:

[0059] 利用大肠埃希菌特异引物检测血液中加入的大肠埃希菌。本实施例向每100 μ L血液中分别加入 $10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3,$

[0060] $10^2, 10^1, 10^0$ CFU的大肠埃希菌。本实施例包括了血液中细菌基因组DNA的提取和PCR扩增检测。本方法包括以下步骤:

[0061] (1) 收取培养的 $10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0$ CFU的大肠埃希菌。12000转/分钟离心1分钟, 收集沉淀的菌体。

[0062] (2) 取9组100 μ L新鲜的血液, 9组100 μ L新鲜的血液分别加入经步骤(1)沉淀的不同菌落数目的大肠埃希菌菌体, 重悬沉淀的菌体, 充分吹打混合均匀。

[0063] (3) 向其中加入100 μ L酶裂解液, 37 $^{\circ}$ C孵育15分钟。其中酶裂解液中含有: 0.1mg/mL核糖核酸酶A、1mg/mL蛋白酶K、0.05mg/mL广谱裂解酶ClyH、10mg/mL溶菌酶、25mM Tris-HCl、10mM EDTA, pH 8.0-8.5。

[0064] (4) 再加入200 μ L碱裂解液, 轻轻混匀, 室温静置裂解5分钟。碱裂解液中含有: 0.2M NaOH, 1% SDS, pH 12-14。

[0065] (5) 再加入200 μ L去杂液, 立即混匀, 放置离心机中室温12000转/分钟离心10分钟。去杂液中含有: 4M $NH_4Ac-HAc$, pH 4.5-4.8。

[0066] (6) 轻轻吸取上清液至DNA吸附柱中,并将DNA吸附柱套在2mL离心管内。12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0067] (7) 向DNA吸附柱内加入500 μ L的0.4M KI与异丙醇混合液。12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0068] (8) 再向DNA吸附柱内加入700 μ L的80%v/v无水乙醇和10mM Tris-HCl (pH8.0) 混合液。12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0069] (9) 重复步骤(8)一次。

[0070] (10) 空DNA吸附柱12000转/分钟离心5分钟,并将DNA吸附柱转移至1.5mL离心管内。

[0071] (11) 向空DNA吸附柱膜中央加入30 μ L 10mM Tris-HCl和1mM EDTA混合液,pH8.0-8.5。12000转/分钟离心2分钟,收集洗脱下来的基因组DNA。

[0072] (12) 以从步骤(11)所提取的大肠埃希菌基因组DNA为模板,采用上述特异性的PCR引物进行PCR扩增,具体为:

[0073] PCR反应体系:10倍PCR buffer (plus Mg^{2+}) 1 μ L,dNTPs底物(2.5mM each) 0.8 μ L,2 μ mol/L的正向引物(SEQ ID NO.1) 1 μ L,2 μ mol/L的反向引物(SEQ ID NO.2) 1 μ L,EasyTaq DNApolymerase (Transgen Biology) 0.5 μ L,基因组DNA模板1 μ L,双蒸水补足至10 μ L。

[0074] PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,50 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸10s,30次循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min;PCR扩增产物16 $^{\circ}$ C保存。

[0075] (14) 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物(见图2),扩增出长度为200bp的片段则判定为检测出大肠埃希菌。由图2可以得到,本发明的临床血液中大肠埃希菌检测下限值可以达到100CFU/mL。

[0076] 实施例四:

[0077] 6组不同的临床血液样品中大肠埃希菌感染的快速检测实例,

[0078] 具体包括以下步骤:

[0079] (1) 取6组不同的100 μ L新鲜的临床血液样本。

[0080] (2) 向每组新鲜临床血液样本中加入100 μ L酶裂解液,37 $^{\circ}$ C孵育15分钟。其中酶裂解液中含有:0.1mg/mL核糖核酸酶A、1mg/mL蛋白酶K、0.05mg/mL广谱裂解酶ClyH、10mg/mL溶菌酶、25mM Tris-HCl、10mM EDTA,pH 8.0-8.5。

[0081] (3) 再加入200 μ L碱裂解液,轻轻混匀,室温静置裂解5分钟。碱裂解液中含有:0.2M NaOH,1%SDS,pH 12-14。

[0082] (4) 再加入200 μ L去杂液,立即混匀,放置离心机中室温12000转/分钟离心10分钟。去杂液中含有:4M $NH_4Ac-HAc$,pH 4.5-4.8。

[0083] (5) 轻轻吸取上清液至DNA吸附柱中,并将DNA吸附柱套在2mL离心管内。12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0084] (6) 向DNA吸附柱内加入500 μ L的0.4M KI与异丙醇混合液。12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0085] (7) 再向DNA吸附柱内加入700 μ L的80%v/v无水乙醇和10mM Tris-HCl (pH8.0) 混合液。12000转/分钟离心1分钟,去除离心管内的废液,将2mL离心管重新套入DNA吸附柱。

[0086] (8) 重复步骤(7)一次。

[0087] (9) 空DNA吸附柱12000转/分钟离心5分钟,并将DNA吸附柱转移至1.5mL离心管内。

[0088] (10) 向空DNA吸附柱膜中央加入30 μ L 10mM Tris-HCl和1mM EDTA混合液,pH8.0-8.5。12000转/分钟离心2分钟,收集洗脱下来的基因组DNA。

[0089] (11) 以从步骤(10)所提取的大肠埃希菌基因组DNA为模板,采用上述特异性的PCR引物进行PCR扩增,具体为:

[0090] PCR反应体系:10倍PCR buffer (plus Mg²⁺) 1 μ L,dNTPs底物(2.5mM each) 0.8 μ L,2 μ mol/L的正向引物(SEQ ID NO.1) 1 μ L,2 μ mol/L的反向引物(SEQ ID NO.2) 1 μ L,EasyTaq DNAPolymerase (Transgen Biology) 0.5 μ L,基因组DNA模板1 μ L,双蒸水补足至10 μ L。

[0091] PCR反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s,50 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸10s,30次循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min;PCR扩增产物16 $^{\circ}$ C保存。

[0092] (12) 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物(见图3),扩增出长度为200bp的片段则判定为检测出大肠埃希菌。可以图3看出,4、5、7和8号孔临床血液实验组检测出200bp大肠埃希菌特异基因。6和9号孔临床血液实验组未检测出大肠埃希菌。

[0093] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

序列表

<110> 卓源健康科技有限公司

<120> 一种从临床血液中检测大肠埃希菌病原菌的方法

<160> 2

<170> PatentIn Version 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

taatgttctgcgacgtcac 20

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

cccgctaacgtatccac 18

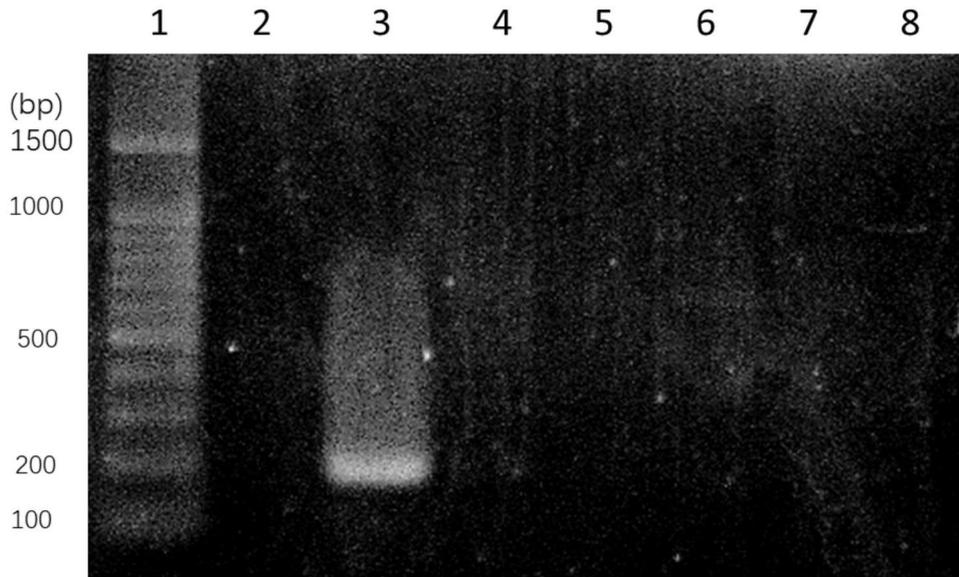


图1

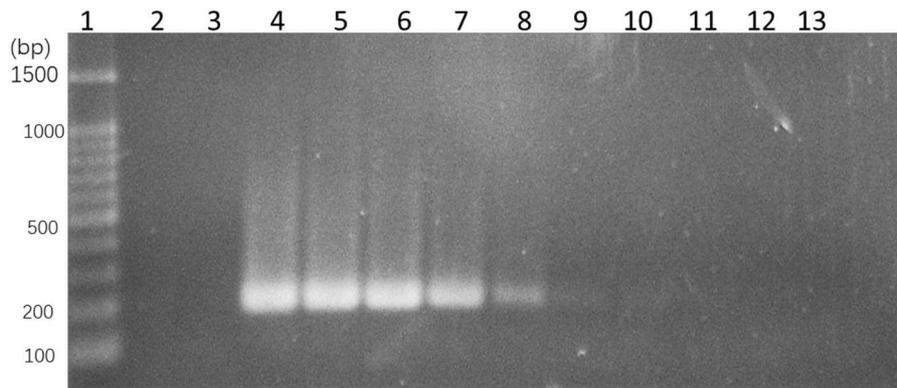


图2

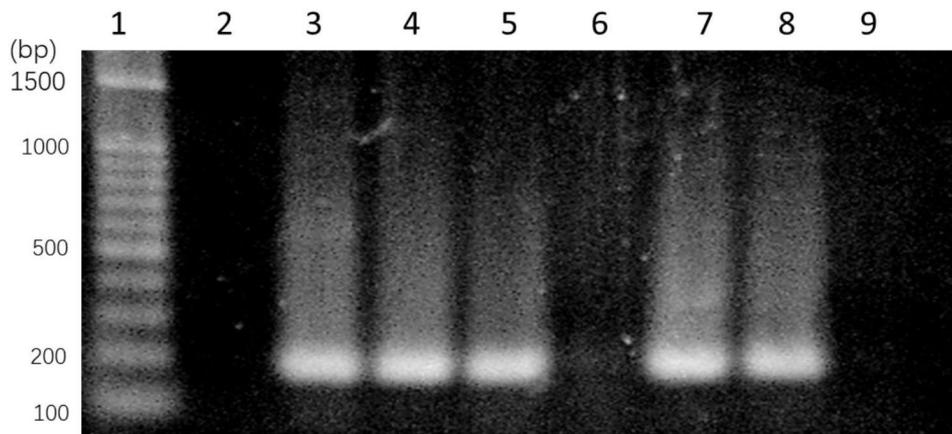


图3