

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/531

G01N 33/53

G01N 33/50

G01N 1/28

C12Q 1/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410050071.9

[43] 公开日 2005 年 6 月 29 日

[11] 公开号 CN 1632581A

[22] 申请日 2004.7.2

[21] 申请号 200410050071.9

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物
流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号军医
科学院微生物流行病学研究所

[72] 发明人 端青 裴杰萍 何君 檀华
朱虹

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关畅

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称 一种提取样品中原核微生物 DNA 的
方法及其专用试剂

[57] 摘要

本发明公开了一种提取样品中原核微生物 DNA 的方法及其专用试剂。本发明所提供的提取样品中原核微生物 DNA 的专用试剂，是胶体金标记的抗 -DNA 单克隆抗体；所述抗 -DNA 单克隆抗体是以原核微生物基因组 DNA 与沙门氏菌(密尼苏达株)的偶联物作为抗原免疫小鼠得到的。利用该试剂提取样品中原核微生物 DNA 的方法，包括以下步骤：1) 裂解样品中的原核微生物细胞，得到含有原核微生物 DNA 的裂解液；2) 利用上述胶体金标记的抗 -DNA 单克隆抗体吸附步骤 1) 中得到的裂解液中原核微生物 DNA。该方法得到的吸附有 DNA 的免疫胶体金可直接用于 PCR 扩增。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、提取样品中原核微生物 DNA 的专用试剂，是胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体；所述抗-DNA 单克隆抗体是以原核微生物基因组 DNA 与沙门氏菌密尼苏达株的偶联物作为抗原免疫小鼠得到的。

2、根据权利要求 1 所述的试剂，其特征在于：所述原核微生物基因组 DNA 为细菌基因组 DNA。

3、根据权利要求 2 所述的试剂，其特征在于：所述细菌基因组 DNA 为大肠杆菌基因组 DNA。

4、根据权利要求 1、2 或 3 所述的试剂，其特征在于：所述胶体金的颗粒大小为 20-35nm。

5、根据权利要求 4 所述的试剂，其特征在于：所述胶体金的颗粒大小为 25-30nm。

6、根据权利要求 1、2 或 3 所述的试剂，其特征在于：所述胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体可按如下方法制备：在 30ml pH 8.2 的所述胶体金溶液中加入 650ul 1mg/ml 的所述抗-DNA 单克隆抗体溶液，搅拌 30min，然后加入 10% BSA 3ml 搅拌 30min，再加入 10%PEG 0.6ml 搅拌 30min，于 3000rpm 4℃离心 10min，将得到的上清液于 10000rpm 4℃离心 25min，在得到的沉淀中加保存液 30ml，混匀，9500rpm 4℃离心 25min，在得到的沉淀中加保存液重溶至 3ml，即得到胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体。

7、一种提取样品中原核微生物 DNA 的方法，包括以下步骤：

1) 裂解样品中的原核微生物细胞，得到含有原核微生物 DNA 的裂解液；

2) 利用胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体吸附步骤 1) 中得到的裂解液中原核微生物 DNA；所述抗-DNA 单克隆抗体是以原核微生物基因组 DNA 与沙门氏菌密尼苏达株的偶联物作为抗原免疫小鼠得到的。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述方法中还包括用含 3%FCS 的生理盐水及无菌水清洗所述胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体吸附的 DNA 的步骤。

9、根据权利要求 7 或 8 所述的方法，其特征在于：所述原核微生物基因组 DNA 为细菌基因组 DNA。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：所述细菌基因组 DNA 为大肠杆菌基因组 DNA。

一种提取样品中原核微生物 DNA 的方法及其专用试剂

技术领域

本发明涉及生物技术领域中一种提取样品中原核微生物 DNA 的方法及其专用试剂。

背景技术

聚合酶链反应（PCR）是一种体外核酸扩增技术，在分子生物学和医学领域得到广泛应用。PCR 检测技术的第一步是模板 DNA 的制备，即样本中 DNA 的提取，直接影响 PCR 反应的结果。随着 PCR 技术的发展，已经有许多提取基因组 DNA 的方法。但是要从现场的环境标本如土壤、灰尘和污水中，快速检测致病微生物，由于模板量少，并且含有大量 PCR 抑制剂，往往使实验的敏感性大大降低。长期以来，样本中 DNA 的提取和纯化一直是耗时、繁琐的过程。为提高 PCR 实验的敏感性，许多实验室开始研究提取纯化 DNA 的实验方法，近年来常以二氧化硅作固相吸附剂提取 DNA，如玻璃奶法，硅胶树脂型离心柱法等。利用二氧化硅在高离子强度、低 pH 值条件下吸附 DNA，用洗涤液洗掉吸附在二氧化硅表面的其它杂质，再用低离子强度、高 pH 值缓冲液洗脱吸附在二氧化硅表面上的 DNA 分子，用于分子生物学实验。这些方法避免使用酚-氯仿抽提，但仍需乙醇沉淀、蛋白酶处理，步骤比较烦琐，不适合现场环境标本应用。1997 年英国科学家研究了抗-DNA 单克隆抗体与免疫磁珠结合的方法提取 DNA，收到较好的效果（Adrian R. Gelsthorpe, Keith Gelsthorpe and Robert J Sokol. Extraction of DNA Using Monoclonal Anti-DNA and Magnetic Beads. BioTechniques, 1997, 22:1080-1082）。

发明创造内容

本发明的目的是提供一种提取样品中原核微生物 DNA 的方法及其专用试剂，该方法及其专用试剂尤其适合于提取环境样品，如土壤、灰尘和污水中的原核微生物 DNA。

本发明所提供的提取样品中原核微生物 DNA 的专用试剂，是胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体；所述抗-DNA 单克隆抗体是以原核微生物基因组 DNA 与沙门氏菌（密尼苏达株）的偶联物作为抗原免疫小鼠得到的。

所述小鼠可为 BALB/C 小鼠。

所述原核微生物包括细菌、放线菌和蓝细菌。所述原核微生物基因组 DNA 优选为细菌基因组 DNA，尤其优选为大肠杆菌基因组 DNA。

所述胶体金可按常规方法如柠檬酸盐还原法制备，其颗粒大小可为 20-35nm，优

选为 25-30nm。

所述胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体可按如下方法制备：在 30ml pH 8.2 的所述胶体金溶液中加入 650ul 1mg/ml 的所述抗-DNA 单克隆抗体溶液，搅拌 30min，然后加入 10% BSA（牛血清白蛋白）3ml 搅拌 30min，再加入 10%PEG（聚乙二醇）0.6ml 搅拌 30min，于 3000rpm 4℃离心 10min，将得到的上清液于 10000rpm 4℃离心 25min，在得到的沉淀中加保存液（四硼酸钠 0.4g/ml，BSA 1g/ml，NaN₃ 0.1g/ml，用 HCl 调 PH 值为 7.4）30ml，混匀，9500rpm 4℃离心 25min，在得到的沉淀中加保存液重溶至 3ml，即得到胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体（免疫胶体金）。

本发明所提供的提取样品中原核微生物 DNA 的方法，包括以下步骤：

- 1) 裂解样品中的原核微生物细胞，得到含有原核微生物 DNA 的裂解液；
- 2) 利用胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体吸附步骤 1) 中得到的裂解液中原核微生物 DNA。

可通过常规方法裂解环境样品中的原核微生物细胞，如用 NaI 裂解细胞。

该方法中还包括纯化 DNA 的步骤：用含 3%FCS（小牛血清）的生理盐水及无菌纯水清洗所述胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体吸附的 DNA，可以有效去除 PCR 抑制剂。

本发明根据抗-DNA 单克隆抗体可以特异性的吸附双链 DNA 的特性，制备了可以特异性结合 DNA 的免疫胶体金试剂（胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体），并提供了利用该免疫胶体金试剂提取纯化样品中细菌 DNA 的方法。实验表明免疫胶体金可与 DNA 牢固结合，通过离心可将其富集起来，用含 3%FCS（小牛血清）的生理盐水及灭菌纯水清洗可以有效去除 PCR 抑制剂。应用该方法可以从每 mL 含几个菌的稀释菌液中获得高质量的扩增产物，并可以在每 0.25g 土壤中最低检测到 50 个菌，在每 mL 含 10%牛奶的样本中最低检测到几个类鼻疽菌，大大提高了 PCR 的敏感性。与目前常用的商品化的玻璃奶和离心柱（硅胶树脂膜）法比较，效果基本一致。玻璃奶法在检测土壤和牛奶标本时，在模板量少的时候存在许多非特异扩增，影响结果的观察。离心柱法检测效果较好，但其步骤比较繁琐并需要蛋白酶 K 处理样本。本发明的方法简单，只需 3 步：裂解→结合→清洗，40min 就可获得 PCR 反应所需 DNA，结合了 DNA 的免疫胶体金不需洗脱，可直接用于 PCR 反应。整个过提取过程不需使用有机溶剂，避免了环境污染。免疫胶体金溶液在 4℃可以存放 1-2 个月，将其冻干后可于室温长期存放，因而为该方法广泛应用于核酸提取提供了条件。

本发明的方法及其专用试剂可用于不同原核微生物样品特别是细菌样品 DNA 的提取，可有效去除环境样品中 PCR 抑制剂，浓缩模板，提高 PCR 检测敏感度 3-4 个数量级；操作步骤简单，无需使用有机溶剂，避免了环境污染，吸附有 DNA 的免疫胶体金

可直接用于 PCR 扩增；尤其是在样本含量少、存在大量 PCR 抑制剂时，更有效提高 PCR 技术在检测现场环境标本中的敏感性和实用性。

附图说明

图 1a 为用胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体提取的系列稀释类鼻疽伯克霍尔德菌菌液的 DNA 进行 PCR 扩增得到的产物电泳图谱

图 1b 为以系列稀释类鼻疽伯克霍尔德菌菌液直接进行 PCR 扩增得到的产物电泳图谱

图 2a 为以用免疫胶体金法和玻璃奶法提取的系列稀释类鼻疽伯克霍尔德菌菌液 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到的产物电泳图谱

图 2b 为以用免疫胶体金法和玻璃奶法提取的土壤模拟标本 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到的产物电泳图谱

图 2c 为以用免疫胶体金法和玻璃奶法提取的牛奶模拟标本 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到的产物电泳图谱

图 3a 为以用免疫胶体金法和离心柱法提取的系列稀释类鼻疽伯克霍尔德菌菌液 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到的产物电泳图谱

图 3b 为以用免疫胶体金法和离心柱法提取的土壤模拟标本 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到的产物电泳图谱

图 3c 为以用免疫胶体金法和离心柱法提取的牛奶模拟标本 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到的产物电泳图谱

具体实施方式

实施例 1、胶体金标记的抗-DNA 单克隆抗体的制备

1、抗-DNA 单克隆抗体的制备

(1) 抗原的合成

用按常规方法提取的大肠杆菌 DH5 α 染色体 DNA 按照如下方法与沙门氏菌（密尼苏达株）（中国人民解放军全军菌种保藏中心）37 $^{\circ}$ C 偶联 30min，得到抗原。

(2) 抗-DNA 单克隆抗体的制备

采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物，以步骤(1)中合成的抗原为免疫原，剂量为 50 μ g (0.1mL) 加等体积完全福氏佐剂乳化，进行首次皮下多点注射免疫。一月后，取同样量免疫抗原加不完全福氏佐剂，乳化，进行加强免疫，再过一月后免疫抗原不加佐

剂腹腔注射进行加强免疫，之后5天采血，测定抗体效价。取脾细胞按4:1比例与骨髓瘤细胞 SP2 / 0 进行细胞融合。采用有限稀释或软琼脂平板法筛选杂交瘤细胞，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

细胞冻存和复苏 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $1-5 \times 10^6$ 个/ml 的细胞悬液，分装于冻存管，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

单克隆抗体的制备与纯化 采用体内诱生法，将 Balb/c 小鼠（8 周龄）腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5-10^6$ 个/只，7-10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存。

以大肠杆菌 DNA (75mg/ml) 包被酶标板，以羊抗鼠 IgG-HRP (1: 2000 稀释) 为二抗，进行间接酶联免疫试验 (ELISA) 检测腹水，结果表明抗体可以与 DNA 发生强阳性反应，腹水效价为 1: 10000。

2、胶体金的制备

参照文献（严杰，罗海波，陆德源主编. 现代微生物学实验技术及其应用，人民卫生出版社, 1997），采用柠檬酸盐还原法，具体操作方法如下：将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液，取 100ml 加热至沸，搅动下准确加入 1.6ml 的 1% 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液，液体颜色稳定成葡萄酒红色，即得到约 25-30nm 大小的胶体金颗粒溶液。

3、胶体金的标记

参照文献（严杰，罗海波，陆德源主编. 现代微生物学实验技术及其应用，人民卫生出版社, 1997），将步骤 2 中得到的胶体金溶液的 pH 调至 8.2，将步骤 1 中得到的单抗溶至 1mg/ml，取 650ul 加入到 30ml 的胶体金溶液中，不断搅拌 30min，然后加入 10% BSA（牛血清白蛋白）3ml 搅拌 30min，再加入 10% PEG（聚乙二醇）0.6ml 搅拌 30min，于 3000rpm 4℃ 离心 10min，收集上清，将上清于 10000rpm 4℃ 离心 25min，用枪头吸弃上清，在沉淀中加保存液（四硼酸钠 0.4g/ml，BSA 1g/ml， NaN_3 0.1g/ml，用 HCl 调 PH 值为 7.4）30ml，混匀，9500rpm 4℃ 离心 25min，用枪头吸弃上清，加保存液重溶至 3ml，即为制备好的免疫胶体金，4℃ 保存备用。

实施例 2、检测样品中的类鼻疽伯克霍尔德菌

材料

1. 氯金酸 (HAuCl_4) 购自上海试剂厂。
2. 玻璃奶 购自博大泰克公司。
3. 离心柱 购自天为时代公司基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）。
4. 实验菌株 类鼻疽伯克霍尔德菌 350102 株（中国医学细菌保藏管理中心，

350102)。

5. 引物设计与合成 根据 *Burkholderia pseudomallei ferricuptake regulator gene* 设计引物 (宋亚军, 王津, 张敏丽等. 类鼻疽伯克霍尔德菌 UDPE 检测方法的建立和应用, 中国人兽共患病杂志, 2001, 17 (2) :35), 只取其巢式 PCR 的一对内引物 Fup2 和 Fdown2, 扩增长度为 409bp, 由华美公司合成。

6. PCR 反应体系 天为时代公司 2×Taq PCR MasterMix。

一、提取 DNA

1、系列稀释菌液和模拟标本的制备

系列稀释菌液: 以类鼻疽伯克霍尔德菌为检测样本, 比浊法测定其浓度为 5.4×10^{10} 菌/mL。按常规方法将菌液以水进行 10 倍梯度稀释, 各取 1ml 备用。

模拟土壤污染标本: 取 0.25g 土壤, 加各浓度梯度菌液 100ul, 生理盐水 400ul, 混匀, 加 6M NaI 500ul, 共 1ml。

模拟牛奶污染标本: 市售纯牛奶 (伊利) 100ul, 加菌液 100ul, 生理盐水 300ul, 混匀, 加 6M NaI 500ul, 共 1ml。

2、提取原核微生物 DNA

(1) 免疫胶体金法提取 DNA

取步骤 1 中的系列稀释菌液或模拟标本 1ml, 100℃水浴 10min。然后 12000rpm 离心 5min, 收集上清液。在上清中加入实施例 1 中制备的胶体金标记的单抗 10ul, 混匀, 于室温下至微量振动器上振动 15min。9500rpm 离心 10min 或 12000rpm 离心 5min, 吸弃上清, 用含 3%FCS (小牛血清) 的生理盐水 1mL 及灭菌纯水各洗一次, 保留沉淀。将沉淀加入 PCR 反应液中, 直接进行扩增。

(2) 玻璃奶法提取 DNA

实验按试剂盒说明操作: 取步骤 1 中的系列稀释菌液或模拟标本 1ml, 100℃水浴 10min。然后 12000rpm 离心 5min, 收集上清液。取 200 ul 上清液, 加入 3 倍体积溶胶液和 10 ul 玻璃奶, 混匀, 室温下放置 10min, 用 250 ul 漂洗液清洗两次, 离心吸干漂洗液, 然后于 37℃温箱干燥至沉淀成白色, 约 15-20min, 加 20 ul 洗脱缓冲液混匀, 60℃水浴 5 min, 12000rpm 离心 1min, 回收上清备用。

(3) 离心柱法提取 DNA

取步骤 1 中的系列稀释菌液或模拟标本 1ml, 100℃水浴 10min。然后 12000rpm 离心 5min, 收集上清液。取 200 ul 上清液, 加入 20ul 蛋白酶 K (20 mg/ml) 溶液混匀, 加 220 ul 缓冲液 GB, 充分混匀, 70℃放置 10min, 再加入 220 ul 无水乙醇, 充分混匀, 将其全部加入一个吸附柱 CB 中 (吸附柱放入废液收集管中), 12000rpm 离

心 30sec, 弃掉废液。加入 500ul 去蛋白液 GD, 12000rpm 离心 30s, 弃掉废液, 分别加入漂洗液 GW 700ul, 12000rpm 离心 30s, 弃掉废液, 500ul, 12000rpm 离心 30s, 弃掉废液, 再 12000rpm 离心 2min, 尽量除去漂洗液。将吸附柱转入一个干净的离心管中, 加入 20ul 60°C 水浴预热的洗脱缓冲液, 混匀, 室温放置 2-5min, 12000rpm 离心 30s, 离心得到的溶液再加入吸附柱中, 室温放置 2min, 12000rpm 离心 2min。

二、PCR 反应

PCR 反应 (2×TaqPCR MasterMix) 按试剂盒说明操作。每管反应体系为 20ul: 2×TaqPCR 反应液 10ul, 引物各 0.2ul (25uM), 灭菌纯水 5.6ul, 模板 4ul。循环参数为: 94°C×3min; 94°C×40s →58°C×40s →72°C×40s 35 个循环; 72°C×7min。其中, 模板为系列稀释菌液或免疫胶体金法提取的 DNA 或玻璃奶法提取的 DNA 或离心柱法提取的 DNA。用琼脂糖凝胶电泳在紫外灯下观察结果。

以免疫胶体金法提取的系列稀释菌液 DNA 为模板和以系列稀释菌液为模板进行 PCR 扩增, 得到的产物的电泳结果分别如图 1a 和图 1b 所示, 表明使用免疫胶体金法可以获得高质量的扩增产物 (可以检测到 5.4 个菌/mL), 比直接扩增 (最低可检测浓度为 5.4×10^4 个菌/mL) 敏感性提高 10000 倍。图 1a 中, 左起第一孔为 Maker

(DL2000), 第二孔到第八孔含菌量依次为 5.4×10^4 , 5.4×10^3 , 5.4×10^2 , 5.4×10^1 , 5.4, 0.54, 0 个菌/mL; 图 1b 中, 左起第一孔为 Maker (DL2000), 第二孔到第五孔含菌量依次为 5.4×10^4 , 5.4×10^3 , 5.4×10^2 , 5.4×10^1 个菌/mL。

以免疫胶体金法或玻璃奶法提取的稀释菌液, 土壤和牛奶模拟标本 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到的产物的电泳结果如图 2a、图 2b 和图 2c 所示, 表明在分别对系列稀释菌液和土壤、牛奶模拟标本的检测中, 应用胶体金法可以达到这两种商品化试剂盒的检测效果, 免疫胶体金法最低可检测浓度分别为 10^0 菌/mL、 10^1 菌/mL、 10^0 菌/mL, 玻璃奶法最低检测浓度分别为 10^1 菌/mL、 10^1 菌/mL、 10^0 菌/mL; 免疫胶体金法在 0.25g/mL 的土壤溶液中可以检测到约 50 个菌, 每 mL10% 的牛奶标本中可以检测到几个菌。图 2a、图 2b 和图 2c 中, 上排为免疫胶体金法, 下排为玻璃奶法检测结果; M 为 Maker (DL2000); 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 和 10^{-1} 分别表示 5.4×10^5 , 5.4×10^4 , 5.4×10^3 , 5.4×10^2 , 5.4×10^1 , 5.4, 0.54 和 0 个菌/mL; 阴表示以水作为阴性对照。

以免疫胶体金法或离心柱法提取的稀释菌液, 土壤和牛奶模拟标本 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到的产物的电泳结果如图 3a、图 3b 和图 3c 所示, 表明免疫胶体金法最低检测浓度分别为 10^0 菌/mL、 10^1 菌/mL、 10^0 菌/mL, 离心柱法最低检测浓度分别为 10^0 菌/mL、 10^1 菌/mL、 10^0 菌/mL。图 3a、图 3b 和图 3c 中, 上排为免疫胶体金法, 下

排为离心柱法检测结果；M为Maker (DL2000)； 10^6 ， 10^5 ， 10^4 ， 10^3 ， 10^2 ， 10^1 ， 10^0 和 10^{-1} 分别表示 5.4×10^6 ， 5.4×10^5 ， 5.4×10^4 ， 5.4×10^3 ， 5.4×10^2 ， 5.4×10^1 ，5.4，0.54和0个菌/mL。

实施例3、检测土拉弗朗西斯菌

具体方法同实施例2，其中，土拉弗朗西斯菌410062株（中国医学细菌保藏管理中心，410062）依次稀释至 3×10^6 ， 3×10^5 ， 3×10^4 ， 3×10^3 ， 3×10^2 ， 3×10^1 ，3个菌/mL，以免疫胶体金法提取的系列稀释菌液DNA为模板和以系列稀释菌液为模板进行PCR扩增（扩增引物FT393和FT642根据Francisella tularensis 17kDa major membrane protein(TUL4) gene设计（Anders sjostedt, Gunnar sandstrom etc, 1990. Nucleotide sequence and T cell epitopes of a membrane protein of Francisella tularensia. J. Immunol. 145:311-317）），扩增长度为250bp。结果表明使用免疫胶体金法可以获得高质量的扩增产物（可以检测到 3×10^3 个菌/mL），比直接扩增（最低可检测浓度为 3×10^6 个菌/mL）敏感性提高1000倍。

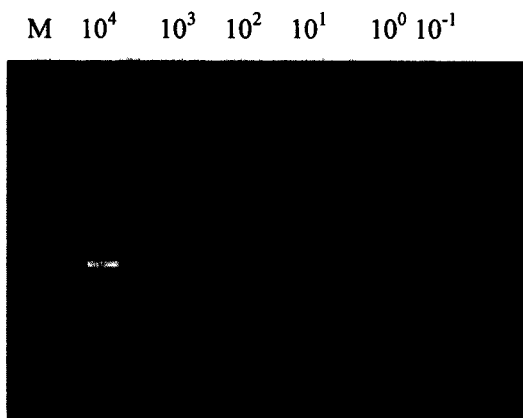


图 1a

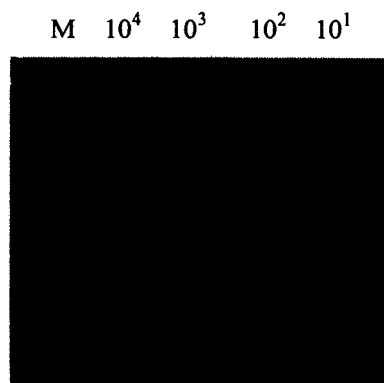


图 1b

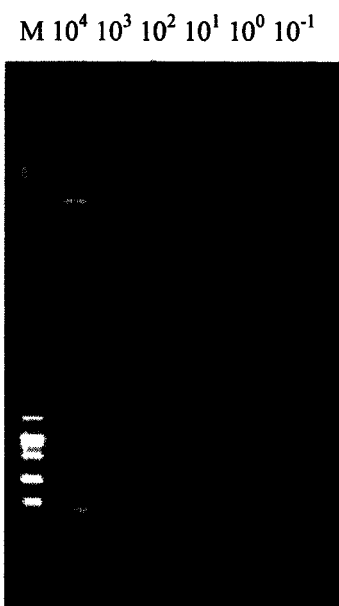


图 2a

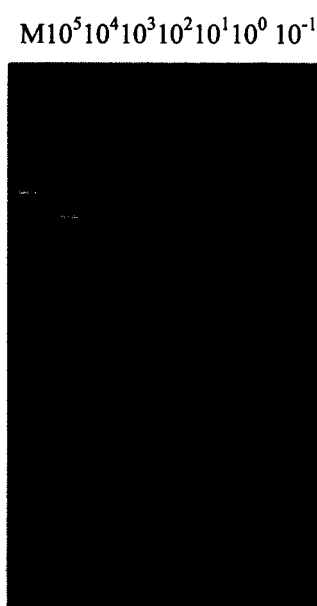


图 2b



图 2c

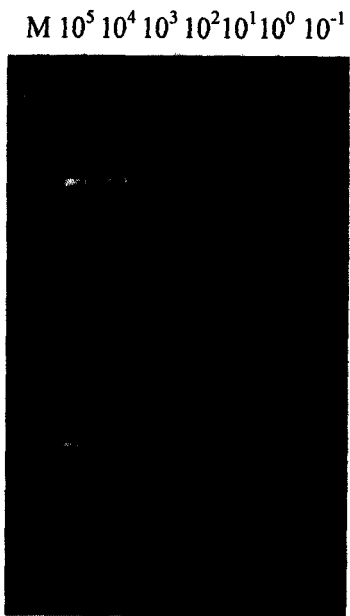


图 3a



图 3b



图 3c

专利名称(译)	一种提取样品中原核微生物DNA的方法及其专用试剂		
公开(公告)号	CN1632581A	公开(公告)日	2005-06-29
申请号	CN200410050071.9	申请日	2004-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	端青 裴杰萍 何君 檀华 朱虹		
发明人	端青 裴杰萍 何君 檀华 朱虹		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N1/28 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1291039C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种提取样品中原核微生物DNA的方法及其专用试剂。本发明所提供的提取样品中原核微生物DNA的专用试剂，是胶体金标记的抗-DNA单克隆抗体；所述抗-DNA单克隆抗体是以原核微生物基因组DNA与沙门氏菌(密尼苏达株)的偶联物作为抗原免疫小鼠得到的。利用该试剂提取样品中原核微生物DNA的方法，包括以下步骤：1)裂解样品中的原核微生物细胞，得到含有原核微生物DNA的裂解液；2)利用上述胶体金标记的抗-DNA单克隆抗体吸附步骤1)中得到的裂解液中原核微生物DNA。该方法得到的吸附有DNA的免疫胶体金可直接用于PCR扩增。

M 10⁴ 10³ 10² 10¹ 10⁰ 10⁻¹

