

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610014761.8

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月13日

[11] 公开号 CN 1877327A

[22] 申请日 2006.7.12

[21] 申请号 200610014761.8

[71] 申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路94号

共同申请人 中华人民共和国天津出入境检验检疫局

[72] 发明人 黄熙泰 侯艳梅 刘寅 张立怀
郑泽军 高旗利 周浩 董志珍
李永君 王玉玲 魏晓娜 霍蕾

权利要求书2页 说明书21页 附图7页

[54] 发明名称

利用核糖体操纵子间区探针检测水生动物病原菌的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种利用核糖体操纵子间区探针组成寡核苷酸微阵列检验多种能够导致水生动物传染病病原菌的方法，其技术原理为分子杂交——酶联免疫显色技术，属于细菌检测技术，其技术方案是用生物信息学方法设计特异性探针，包括设计筛选的34条用作探针的寡核苷酸序列以及与之配套的PCR和杂交反应条件。通过PCR扩增并用地高辛标记细菌16s-23srRNA基因间区序列，并用该PCR产物和一组特异性的寡核苷酸探针杂交，经酶联免疫显色显色后，可以从待测样品中，精确检测出是否存在水生动物传染病病原菌。该方法的优点是，省去了重复的细菌培养筛选环节，节约时间；分子杂交鉴定方法不受培养条件和细菌生理状态的影响，较生理生化鉴定方法更为准确。

1. 一种利用核糖体操纵子间区探针检测水生动物病原菌的方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：

(1) 设计特异性寡核苷酸探针，用于寡核苷酸微阵列检测检测，所设计的特异性寡核苷酸探针序列如下：

序列一：星状诺卡氏菌探针 Nser2 CGAAGAAGTCTAATTTTCGGTA

序列二：星状诺卡氏菌探针 NSER1 GGCAAACCATCAGAGCATG

序列三：巴斯德菌属通用探针 PFire1 TGTTCTTTAAAAA(T/A)T(G/A)GAAACAAGCTG

序列四：多杀巴斯德氏菌探针 2 Pmulii 3 AAGCGAAAGCAAAAAGAGTGAAGCGA

序列五：杀鱼巴斯德氏菌探针 1 Pmulii 2 CAATGAAGAGACAAAAACCGAAATCC

序列六：鲷鱼爱德华氏菌探针 Eict1 ACCCCGTGTCCCCTTCGTCTAGAGG

序列七：鲷鱼爱德华氏菌探针 2 Eict2 TTACAGCACGAAGTGAAACACCTTCG

序列八：迟缓爱德华氏菌探针 1 Etar1 GGTAATAAGGTATTGCAGTAAAGTC

序列九：迟缓爱德华氏菌探针 2 Etar2 ATGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGA

序列十：耶尔森氏菌属通用探针 YerFip1 TACAGCTGAAATTTACCCCGCC

序列十一：鲁氏耶尔森氏菌探针 1 YerFip2 AGATGTACTGTCAGCAATGA(C/T)AAGACA

序列十二：气单胞菌属通用探针 1 AF&Valgip1

GCTGATTTAAAAAGTAGTTCTCAAACATTTGT

序列十三：杀鲑气单胞菌探针 1 AF&Valgip3 AGCTACCCGGTTACCTGCGCGC

序列十四：杀鲑气单胞菌探针 2 AsalValipr GCTCGCGCGCAGGTAACCGGGT

序列十五：豚鼠气单胞菌探针 1 AcavG1ip1 GCCGCTAGCCTCGCAGGCTCGG

序列十六：豚鼠气单胞菌探针 2 AcavG1ip2 GCCTTTACGAAAATCATTGCGAA

序列十七：温和气单胞菌探针 1 Asobculip1 TAATGGCGCTCGGCCTCGCAG

序列十八：温和气单胞菌探针 2 Asobculip2 CGGCACTCGCCATTACCCAAAA

序列十九：鲑鱼肾杆菌探针 1 Rsalip1 AGATTCGATGGTTTGGGAGGTTC

序列二十：鲑鱼肾杆菌探针 2 Rsalip2 GATAACAGGCG (C/A) TCTGCTGATTC

序列二十一：产气荚膜梭菌探针 1 Cperfip1 AATGAATTCTGGATAATATCTCTGTTTAATTT

序列二十二：产气荚膜梭菌探针 2 Cperfip2

AAGGAATACATCTTAGGAC(A/T)ACTAAGATGA

序列二十三：肉毒梭菌探针 1 Cbotrip

TAAATAAGAACTATTCATTAATTGTTAAAATTA(G/A)ATT

序列二十四：肉毒梭菌探针 2 Cbotrip CTTCGAAAAAGAAGGTTTA(A/G)TTTAATGTAG

序列二十五：海分支杆菌探针 2 Mm2 ATTGGATGCG CTGCCTTTTG GTGGC

序列二十六：霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1 VcmI1p1 GAAAGATAAACACCAACAAC(A/C)CATT

序列二十七：霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 VcmI3p2 AATTAAACGCGAGACAACCTTAGGTTG

序列二十八：霍乱弧菌探针 1 VchoI2p1 TCCACCATCTTTAAGCGTTTTCG

序列二十九：霍乱弧菌探针 2 VchoI2p2 TCGCTGAGAATGTTTAAAATGGTT

序列三十：创伤弧菌探针 1 VvulI1p1 ACGACCCACCATTACTTCAAGAGTT

序列三十一：创伤弧菌探针 2 VvulI1p2 GCTCCACCATTCTTGAA(C/T)GCAAT

序列三十二：副溶血弧菌探针 1 Vpar1 TATAAAGTAAAGAGAAGAAGAGTTCCCAA

序列三十三：副溶血弧菌探针 2 Vpar2 TCCATTAGGAATTAAAACCTCAAATATGGG

序列三十四：鳗弧菌探针 1 TTTGA(A/C)ACAATGGGCGATTAGCT

(2) PCR 扩增待测样品中全部原核微生物的 23s rRNA 基因内的 DNA 片，同时进行地高辛标记；

(3) 将寡核苷酸微阵列和地高辛标记的 PCR 产物进行分子杂交；

(4) 杂交结果通过酶联免疫显色技术显色；

(5) 显色结果用肉眼观察，可发现进行杂交的特异性探针位点显色。

2. 运用核糖体操纵子间区探针检测多种水生动物病原菌的方法在检测方面的应用。

利用核糖体操纵子间区探针检测水生动物病原菌的方法

技术领域

本发明涉及一种细菌检验技术，具体的讲是运用核酸分子杂交反应检测致病细菌，特别是水生动物病原菌（包括杀鲑气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、产气荚膜梭菌、肉毒梭菌、鲶鱼爱德华氏菌、杀鱼肠球菌、链球菌、嗜冷屈挠杆菌、柱状屈挠杆菌、多杀巴斯德氏菌、杀鱼巴斯德氏菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌、丁香组假单胞菌、霍乱弧菌、拟态弧菌、哈维弧菌、创伤弧菌、副溶血弧菌、河流弧菌、弗氏弧菌、溶藻弧菌等 23 种细菌）的技术。

背景技术

目前，水生动物病原微生物检测方法基本上依靠生化鉴定和培养鉴定。这些鉴定费时费力，并且又是在种水平的鉴定上结果并不可靠。随着分子生物学鉴定方法的发展，基于这些方法的细菌分类正逐渐被修正。这一状况从侧面说明了建立分子生物学鉴定方法的必要性。相关研究在国际上已广泛开展，国内这方面研究也在逐渐兴起。

在水生动物病原微生物检测方面，国内基本上采用的是生化方法，鲜有芯片或微阵列应用的文献报道，国际上虽有水生动物致病微生物检验芯片的研究报道，但其检测的范围并不全面。从技术层面讲，目前细菌分子检测运用最多 DNA 靶点是 16S rRNA 基因。但在许多情况下，相近种之间在 16S rRNA 基因序列上的差异非常有限（同属的细菌 16S rRNA 基因序列差别基本上小于 4% 相似度），并且有时候这些差别位点分布比较均匀。所以用 16S rRNA 基因上的差别位点设计相近种鉴别探针难度较大，而且鉴别效果往往不理想。16S-23S rRNA 可变区域多，分子量更大，与 16S rRNA 基因相比变异位点丰富而集中，但在种的水平上具有保守性。再加上一般细菌都有多个拷贝的 rRNA 操纵子，使得利用 16S-23S 设计种特异性探针非常便利，并且大大提高了探针的特异性。

DNA 微阵列在水生动物疫病检测方面有广泛的应用前景，能够大大提高检验的效率，节省人力，时间。真正能够做到一次检验给出可能感染的病原微生物的感染状况的全面信息，并且结果准确，操作简便快速。

发明内容

目前我国尚没有在水生动物疫病检测方面运用寡核苷酸微阵列检测病原菌的标准方法，依然沿用了增菌法、PCR 方法、荧光 PCR 方法检测水生动物疫病病原菌。增菌法需要经过前增菌、分离培养、生化鉴定等经典的检验方法检测目标菌。试验时间长，处理样品量小，而且灵敏度和特异性都相对较低。而 PCR 方法、荧光 PCR 方法检测通量低，一次只能实现一种病原菌的检验。

针对上述情况，本发明克服了现有技术中的缺点，提供了一种运用寡核苷酸微阵列检测病原菌技术检测水生动物疫病病原菌的方法（包括：杀鲑气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、产气荚膜梭菌、肉毒梭菌、鲶鱼爱德华氏菌、杀鱼肠球菌、链球菌、嗜冷屈挠杆菌、柱状屈挠杆菌、多杀巴斯德氏菌、杀鱼巴斯德氏菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌、丁香组假单胞菌、霍乱弧菌、拟态弧菌、哈维弧菌、创伤弧菌、副溶血弧菌、河流弧菌、弗氏弧菌、溶藻弧菌等 23 种细菌）为了解决上述技术问题，本发明是通过以下技术方案实现的：首先用生物信息学方法设计特异性探针序列如下：

序列一：星状诺卡氏菌探针 Nser2 CGAAGAAGTCTAATTTTCGGTA

序列二：星状诺卡氏菌探针 Nser1 GGCAAACCATCAGAGCATG

序列三：巴斯德氏菌属通用探针 PFirc1 TGTTCTTTAAAAA(T/A)T(G/A)GAAACAAGCTG

- 序列四：多杀巴斯德氏菌探针 2 Pmulii 3 AAGCGAAAGCAAAAGAGTGAAGCGA
- 序列五：杀鱼巴斯德氏菌探针 1 Pmulii 2 CAATGAAGAGACAAAAACCGAAATCC
- 序列六：鲷鱼爱德华氏菌探针 Eict1 ACCCCGTGTCCCCTTCGTCTAGAGG
- 序列七：鲷鱼爱德华氏菌探针 2 Eict2 TTACAGCACGAAGTGAAACACCTTCG
- 序列八：迟缓爱德华氏菌探针 1 Etar1 GGTAATAAGGTATTGCAGTAAAGTC
- 序列九：迟缓爱德华氏菌探针 2 Etar2 ATGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGA
- 序列十：耶尔森氏菌属通用探针 YerFip1 TACAGCTGAAATTTACCCCGCC
- 序列十一：鲁氏耶尔森氏菌探针 1 YerFip2 AGATGTACTGTCAGCAATGA(C/T)AAGACA
- 序列十二：气单胞菌属通用探针 1 AF&Valgip1
GCTGATTTAAAAAGTAGTTCTCAAACATTTGT
- 序列十三：杀鲑气单胞菌探针 1 AF&Valgip3 AGCTACCCGGTTACCTGCGCGC
- 序列十四：杀鲑气单胞菌探针 2 AsalValipr GCTCGCGCGCAGGTAACCGGGT
- 序列十五：豚鼠气单胞菌探针 1 AcavG1ip1 GCCGCTAGCCTCGCAGGCTCGG
- 序列十六：豚鼠气单胞菌探针 2 AcavG1ip2 GCCTTTACGAAAATCATTGCGAA
- 序列十七：温和气单胞菌探针 1 Asobculip1 TAATGGCGCTCGGCCTCGCAG
- 序列十八：温和气单胞菌探针 2 Asobculip2 CGGCACTCGCCATTACCCAAAA
- 序列十九：鲑鱼肾杆菌探针 1 Rsalip1 AGATTCGATGGTTTGGGAGGTTT
- 序列二十：鲑鱼肾杆菌探针 2 Rsalip2 GATAACAGGCG (C/A) TCTGCTGATTC
- 序列二十一：产气荚膜梭菌探针 1 Cperfip1 AATGAATCTGGATAATATCTCTGTTTAATTT
- 序列二十二：产气荚膜梭菌探针 2 Cperfip2
AAGGAATACATCTTAGGAC(A/T)ACTAAGATGA
- 序列二十三：肉毒梭菌探针 1 Cbotrip
TAAATAAGAACTATTCATTAATTGTTAAAATTA(G/A)ATT
- 序列二十四：肉毒梭菌探针 2 Cbotiip CTTCGAAAAAGAAGGTTTA(A/G)TTTAATGTAG
- 序列二十五：海分支杆菌探针 2 Mm2 ATTGGATGCGCTGCCTTTTGGTGGC
- 序列二十六：霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1 VcmIip1 GAAAGATAAACACCAACAAC(A/C)CATT
- 序列二十七：霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 VcmI3p2 AATTAAACGCGAGACAACCTTAGGTTG
- 序列二十八：霍乱弧菌探针 1 VchoI2p1 TCCACCATCTTTAAGCGTTTTTCG
- 序列二十九：霍乱弧菌探针 2 VchoI2p2 TCGCTGAGAATGTTTAAAAATGGTT
- 序列三十：创伤弧菌探针 1 VvulI1p1 ACGACCCACCATTACTTCAAGAGTT

序列三十一：创伤弧菌探针 2 VvulI1p2 GCTCCACCATTCTTGAA(C/T)GCAAT

序列三十二：副溶血弧菌探针 1Vpar1 TATAAAGTAAAGAGAAGAAGAGTTCCCAAA

序列三十三：副溶血弧菌探针 2 Vpar2 TCCATTAGGAATTA AAACTCAA AATATGGG

序列三十四：鳗弧菌探针 1 TTTGA(A/C)ACAATGGGCGATTAGCT

其中 D 代表碱基 A 或 G 或 T 中的任意一个；W 代表碱基 A 或 T 中的任意一个。

然后 PCR 扩增待测样品中全部原核微生物的 16S-23S rRNA 基因内的部分 DNA 片断运用寡核苷酸微阵列检测多种水生动物病原菌的方法包括以下步骤：

1. 设计特异性寡核苷酸探针，用于分子杂交—酶联免疫显色检测；

2. PCR 扩增待测样品中全部原核微生物的 16S-23S rRNA 基因的部分 DNA 片断，同时进行地高辛标记；

3. 将设计的特异性寡核苷酸基因探针点在带有正电荷的尼龙膜（Amersham 公司，美国）上，组成探针微阵列，微阵列的点制按图 1 中的顺序和位置，在长波紫外灯下进行交联 5-10 分钟；本专利申请的所有附图中的点所对应的探针均和图 1 中所示一样为：

1. 阳性对照
2. 阴性对照
3. 星状诺卡氏菌探针 Nser2 CGAAGAAGTCTAATTTTCGGTA
4. 星状诺卡氏菌探针 NSER1 GGCAAACCATCAGAGCATG
5. 巴斯德菌属通用探针 PFire1 TGTTCTTTAAAAA(T/A)T(G/A)GAAACAAGCTG
6. 多杀巴斯德氏菌探针 2 Pmulii 3 AAGCGAAAGCAAAAGAGTGAAGCGA
7. 杀鱼巴斯德氏菌探针 1 Pmulii 2 CAATGAAGAGACAAAAACCGAAATCC
8. 鲷鱼爱德华氏菌探针 Eict1 ACCCCGTGTCCCCTTCGTCTAGAGG
9. 鲷鱼爱德华氏菌探针 2 Eict2 TTACAGCACGAAGTGAAACACCTTCG
10. 迟缓爱德华氏菌探针 1 Etar1 GGTAATAAGGTATTGCAGTAAAGTC
11. 迟缓爱德华氏菌探针 2 Etar2 ATGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGA
12. 耶尔森氏菌属通用探针 YerFip1 TACAGCTGAAATTTACCCCGCC
13. 鲁氏耶尔森氏菌探针 1 YerFip2 AGATGTACTGTCAGCAATGA(C/T)AAGACA
14. 气单胞菌属通用探针 1 AF&Valgip1 GCTGATTTAAAAAGTAGTTCTCAAACATTTGT
15. 杀鲑气单胞菌探针 1 AF&Valgip3 AGCTACCCGGTTACCTGCGCGC
16. 杀鲑气单胞菌探针 2 AsalValipr GCTCGCGCGCAGGTAACCGGGT
17. 豚鼠气单胞菌探针 1 AcavG1ip1 GCCGCTAGCCTCGCAGGCTCGG
18. 豚鼠气单胞菌探针 2 AcavG1ip2 GCCTTTACGAAAATCATTGCGAA

19. 温和气单胞菌探针 1 Asobculip1 TAATGGCGCTCGGCCTCGCAG
 20. 温和气单胞菌探针 2 Asobculip2 CGGCACTCGCCATTACCCAAAA
 21. 鲑鱼肾杆菌探针 1 Rsalip1 AGATTTCGATGGTTTGGGAGGTTC
 22. 鲑鱼肾杆菌探针 2 Rsalip2 GATAACAGGCG (C/A) TCTGCTGATTC
 23. 产气荚膜梭菌探针 1 Cperfip1 AATGAATTCTGGATAATATCTCTGTTTAATTT
 24. 产气荚膜梭菌探针 2 Cperfip2 AAGGAATACATCTTAGGAC(A/T)ACTAAGATGA
 25. 肉毒梭菌探针 1 Cbotrip TAAATAAGAACTATTCATTAATTGTTAAAATTA(G/A)ATT
 26. 肉毒梭菌探针 2 Cbotiip CTTCGAAAAAGAAGGTTTA(A/G)TTTAATGTAG
 27. 海分支杆菌探针 2 Mm2 ATTGGATGCG CTGCCTTTTG GTGGC
 28. 霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1 VcmI1p1 CGAAAGATAAACACCAACAAC(A/C)CATT
 29. 霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 VcmI3p2 AATTAAACGCGAGACAACCTTAGGTTG
 30. 霍乱弧菌探针 1 Vchol2p1 TCCACCATCTTTAAGCGTTTTTCG
 31. 霍乱弧菌探针 2 Vchol2p2 TCGCTGAGAATGTTTAAAAATGGTT
 32. 创伤弧菌探针 1 Vvull1p1 ACGACCCACCATTACTTCAAGAGTT
 33. 创伤弧菌探针 2 Vvull1p2 GCTCCACCATTCTTGAA(C/T)GCAAT
 34. 副溶血弧菌探针 1 Vpar1 TATAAAGTAAAGAGAAGAAGAGTTCCCAAA
 35. 副溶血弧菌探针 2 Vpar2 TCCATTAGGAATTAAACTCAAATATGGG
 36. 鳗弧菌探针 1 TTTGA(A/C)ACAATGGGCGATTAGCT
4. 杂交和杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

PCR 反应体系中各组分构成比例如下:

成分	浓度	加样量
PCR 缓冲液	10 倍	5 μ L
MgCl ₂	20mmol/L	5 μ L
Taq DNA 聚合酶	5u/ μ L	0.3 μ L
引物 1	10 μ mol/L	2 μ L
引物 2	10 μ mol/L	2 μ L
dNTPs	每种 10mmol/L	0.3 μ L
DIG-dNTPs	DIG-dUTP 1mmol/L	0.3 μ L
DNA 样品		2 μ L
双蒸水		33.1 μ L
总体积		50 μ L

PCR 方法中扩增程序为

- 1) 95°C 10min
- 2) 95°C 30s
- 3) 55°C 20s
- 4) 72°C 30s
- 5) 回到第2) —4) 步, 重复5次
- 6) 95°C 30s
- 7) 68°C 30s
- 8) 回到第6) —7) 步, 重复25次
- 9) 72°C 2min

将浓度为 1mmol/L 的寡核苷酸探针溶液 0.1 μ L 点在带有正电荷的尼龙膜上, 在长波紫外灯下进行交联 5-10 分钟。

其地高辛标记 PCR 产物与寡核苷酸探针杂交方法如下:

* 预杂交

预杂交液先预热到杂交温度 (50°C), 把点入寡核苷酸探针的尼龙膜放入塑料袋, 加入预杂交液, 封好口。预杂交 30min, 50 °C。

* 扩增 PCR 产物热变性

DIG 标记的 PCR 产物加热到 95 °C, 10min, 迅速插入冰浴。

* 地高辛标记靶 DNA 分子与尼龙膜杂交

把预杂交好的芯片装入塑料袋, 加入变性的 DIG 标记的 PCR 产物 10 μ L, 再加入 1 mL 杂交液, 封好口。50 °C, 杂交 1 hr, 温和搅动。

与现有技术相比, 本发明的有益效果是: 该方法具有检测准确、特异性强的特点, 可以快速、准确的鉴定特异的目标细菌。首先, 避免了反复培养, 节约时间; 而且 DNA-DNA 的杂交鉴定方法较生理生化的鉴定方法更为准确, 不受培养条件和细菌生理状态的影响, 这将填补使用 DNA 分子杂交的鉴定方法进行水生动物疫病病原菌检测的空白。

附图说明

图 1: 微阵列的探针位置示意图。

图 2: 某批次活鱼的微阵列检测检出产气荚膜梭菌的结果。

图 3: 某批次活鱼的微阵列检测检出迟缓爱德华的结果。

图 4: 某批次活鱼的微阵列检测检出创伤弧菌的结果。

图 5: 某批次活鱼的微阵列检测检出多杀巴斯德的结果。

图 6: 某批次活鱼的微阵列检测检出副溶血弧菌的结果。

图 7: 某批次活鱼的微阵列检测检出鲑鱼肾杆菌的结果。

图 8: 某批次活鱼的微阵列检测检出海分枝杆菌的结果。

图 9: 某批次活鱼的微阵列检测检出鲷鱼爱德华氏菌的结果。

图 10: 某批次活鱼的微阵列检测检出霍乱弧菌的结果。

图 11: 某批次活鱼的微阵列检测检出鲁氏耶尔森的结果。

图 12: 某批次活鱼的微阵列检测检出鳗弧菌的结果。

图 13: 某批次活鱼的微阵列检测检出拟态弧菌的结果。

图 14: 某批次活鱼的微阵列检测检出肉毒梭菌的结果。

图 15: 某批次活鱼的微阵列检测检出杀鲑气单胞的结果。

图 16: 某批次活鱼的微阵列检测检出杀鱼巴斯德的结果。

图 17: 某批次活鱼的微阵列检测检出豚鼠气单胞的结果。

图 18: 某批次活鱼的微阵列检测检出温和气单胞菌的结果。

图 19: 某批次活鱼的微阵列检测检出星状诺卡氏菌的结果。

具体实施方式

实施例 1

样本: 某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出产气荚膜梭菌疑似菌落。

1. DNA 抽提

取样品鱼鳞片下表皮、肾组织、肝组织、心脏各一克, 匀浆后混合振荡, 取匀浆液 1mL 在冰浴中静置 5 分钟, 然后在室温下 12000 转/分钟, 离心 5 分钟, 弃去上清液, 加入 100 μ L 溶菌酶溶液, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟, 补加 TE 缓冲液 500 μ l, 振荡混匀。加同体积 Tris 饱和酚 pH 值 8.0, 强烈振荡, 12000 转/分钟, 离心 3 分钟, 吸取上清液, 重复酚抽提。吸取上清液, 加入 0.1 倍体积的乙酸钠 (2mol/L), 混匀, 再加等体积的冰乙醇, 混匀后低温静置 30 分钟, 于 12000 转/分钟 离心 5 分钟。弃去上清, 加 70% 冰乙醇振荡洗涤一次, 室温下 12000 转/分钟, 离心 5 分钟, 弃上清。加入 50 μ LTE 溶液, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段

成分	浓度	加样量
PCR 缓冲液	10 倍	5 μ L
MgCl ₂	20mmol/L	5 μ L
Taq DNA 聚合酶	5u/ μ L	0.3 μ L
引物 1	10 μ mol/L	2 μ L
引物 2	10 μ mol/L	2 μ L
dNTPs	每种 10mmol/L	0.3 μ L
DIG-dNTPs	DIG-dUTP 1mmol/L	0.3 μ L
DNA 样品		2 μ L
双蒸水		33.1 μ L
总体积		50 μ L

PCR 方法中扩增程序为

- 1) 95 $^{\circ}$ C 10min
- 2) 95 $^{\circ}$ C 30s
- 3) 55 $^{\circ}$ C 20s
- 4) 72 $^{\circ}$ C 30s
- 5) 回到第 2) —4) 步, 重复 5 次
- 6) 95 $^{\circ}$ C 30s
- 7) 68 $^{\circ}$ C 30s
- 8) 回到第 6) —7) 步, 重复 25 次
- 9) 72 $^{\circ}$ C 2min

3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交

* 预杂交

预杂交液先预热到杂交温度（50℃），把点入寡核苷酸探针的尼龙膜放入塑料袋，加入预杂交液，封好口。预杂交 30min，50℃。

* 扩增 PCR 产物热变性

DIG 标记的 PCR 产物加热到 95℃，10min，迅速插入冰浴。

* 地高辛标记靶 DNA 分子与尼龙膜杂交

把预杂交好的芯片装入塑料袋，加入变性的 DIG 标记的 PCR 产物 10 uL，再加入 1 mL 杂交液，封好口。50℃，杂交 1 hr，温和搅动。

4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点二十三（产气荚膜梭菌探针 1 Cperfp1）、探针位点二十四（产气荚膜梭菌探针 2 Cperfp2）、均深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有产气荚膜梭菌，见图 2。

2 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有产气荚膜梭菌。这说明产气荚膜梭菌寡核苷酸探针的阳性结果是有效的。

实施例 2

样本：某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出迟缓爱德华氏菌疑似菌落。

1. DNA 抽提

2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段

3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交

4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点十（迟缓爱德华氏菌探针 1 Etar1）、探针位点十一（迟缓爱德华氏菌探针 2 Etar2）均为深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有迟缓爱德华氏菌，见图 3。

2 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有迟缓爱德华氏菌。这说明迟缓爱德华氏菌探针阳性结果是有效的。

实施例 3

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出创伤弧菌疑似菌落。

1. DNA 抽提

2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段

3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交

4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点三十二（创伤弧菌探针 1 VvulI1p1）、探针位点三十三（创伤

弧菌探针 2Vvull1p2) 均深蓝色点即为阳性杂交结果, 表明样品中含有创伤弧菌, 见图 4。

5 天后, 常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有创伤弧菌。这说明创伤弧菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 4

样本: 某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出多杀巴斯德氏菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点五 (巴斯德菌属通用探针 PFircl)、探针位点六 (多杀巴斯德氏菌探针 2 Pmulii 3)、均深蓝色点即为阳性杂交结果, 表明样品中含有多杀巴斯德氏菌, 见图 5。

2 天后, 常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有多杀巴斯德氏菌。这说明多杀巴斯德氏菌寡核苷酸探针的阳性结果是有效的。

实施例 5

样本: 某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出副溶血弧菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点三十四 (副溶血弧菌探针 1Vpar1)、探针位点三十五 (副溶血弧菌探针 2Vpar2) 均为深蓝色点即为阳性杂交结果, 表明样品中含有副溶血弧菌, 见图 6。

2 天后, 常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有副溶血弧菌。这说明副溶血弧菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 6

样本: 某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出鲑鱼肾杆菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点二十一 (鲑鱼肾杆菌探针 1 Rsalip1)、探针位点二十二 (鲑鱼肾杆菌探针 2 Rsalip2) 均深蓝色点即为阳性杂交结果, 表明样品中含有鲑鱼肾杆菌, 见图 7。

5 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有鲑鱼肾杆菌。这说明鲑鱼肾杆菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 7

样本：某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出海分枝杆菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点二十七（海分支杆菌探针 2 Mm2）深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有海分支杆菌，见图 8。

2 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有海分支杆菌。这说明海分支杆菌寡核苷酸探针的阳性结果是有效的。

实施例 8

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出鲷鱼爱德华氏菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点八（鲷鱼爱德华氏菌探针 1 Eict1）、探针位点九（鲷鱼爱德华氏菌探针 2 Eict2）均深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有鲁氏耶尔森，见图 9。

5 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有鲷鱼爱德华氏菌。这说明鲷鱼爱德华氏菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 9

样本：某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出霍乱弧菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点二十八（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1）、探针位点二十九（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2）探针位点三十（霍乱弧菌探针 1 VchoI2p1）探针位点三十一（霍乱弧菌探针 2 VchoI2p2）均为深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有霍乱弧菌，见图 10。

2 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有霍乱弧菌。这说明

霍乱弧菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 10

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出鲁氏耶尔森氏菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点十二（耶尔森氏菌属通用探针 YerFip1）、探针位点十三（鲁氏耶尔森氏菌探针 1 YerFip2）均深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有鲁氏耶尔森氏菌，见图 11。

5 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有鲁氏耶尔森氏菌。这说明鲁氏耶尔森氏菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 11

样本：某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出鳘弧菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点三十六（鳘弧菌探针 1）见图 12。

2 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有鳘弧菌。这说明鳘弧菌寡核苷酸探针的阳性结果是有效的。

实施例 12

样本：某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出拟态弧菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

* 结果判读

判读杂交结果尼龙膜上探针位点二十八（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1 VcmI1p1）、探针位点二十九（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 VcmI3p2）均为深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有拟态弧菌，见图 13。

2 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有拟态弧菌。这说明拟态弧菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 13

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出肉毒梭菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

*** 结果判读**

判读杂交结果尼龙膜上探针位点二十五（肉毒梭菌探针 1 Cbotrip）、探针位点二十六（肉毒梭菌探针 2Cbotrip）均深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有肉毒梭菌，见图 14。

5 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有肉毒梭菌。这说明肉毒梭菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 14

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出杀鲑气单胞菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

*** 结果判读**

判读杂交结果尼龙膜上探针位点十四（气单胞菌属通用探针 1 AF&Valgip1）、探针位点十五（杀鲑气单胞菌探针 1 AF&Valgip3）、探针位点十六（杀鲑气单胞菌探针 2 AsalValipr）均深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有杀鲑气单胞菌，见图 15。

5 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有杀鲑气单胞菌。这说明杀鲑气单胞菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 15

样本：某批次出口活鱼。常规微生物培养和生化检测出杀鱼巴斯德氏菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

*** 结果判读**

判读杂交结果尼龙膜上探针位点五（巴斯德菌属通用探针 PFirc1）、探针位点七（杀鱼巴斯德氏菌探针 1 Pmulii 2）均为深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有杀鱼巴斯德氏菌，见图 16。

2 天后，常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有杀鱼巴斯德氏菌。这说明杀鱼巴斯德氏菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 16

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出豚鼠气单胞菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

*** 结果判读**

判读杂交结果尼龙膜上探针位点十四(气单胞菌属通用探针 1 AF&Valgip1)、探针位点十七(豚鼠气单胞菌探针 1 AcavG1ip1) 探针位点十八(豚鼠气单胞菌探针 2 AcavG1ip2) 均深蓝色点即为阳性杂交结果, 表明样品中含有豚鼠气单胞菌, 见图 17。

5 天后, 常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有豚鼠气单胞菌。这说明豚鼠气单胞菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 17

样本: 某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出温和气单胞菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

*** 结果判读**

判读杂交结果尼龙膜上探针位点十四(气单胞菌属通用探针 1 AF&Valgip1)、探针位点十九(温和气单胞菌探针 1 Asobculip1) 探针位点二十(温和气单胞菌探针 2 Asobculip2) 均深蓝色点即为阳性杂交结果, 表明样品中含有温和气单胞菌, 见图 18。

5 天后, 常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有温和气单胞菌。这说明温和气单胞菌探针的阳性结果是有效的。

实施例 18

样本: 某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出星状诺卡氏菌疑似菌落。

1. DNA 抽提
2. PCR 扩增 16S-23S rRNA 基因片段
3. 靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交
4. 杂交阳性斑点的酶联免疫显色

杂交斑点的酶联免疫显色按照 Roche 公司地高辛 DNA 标记与检测试剂盒说明进行。

*** 结果判读**

判读杂交结果尼龙膜上探针位点三(星状诺卡氏菌探针 Nser2)、探针位点四(星状诺卡氏菌探针 NSER1) 均深蓝色点即为阳性杂交结果, 表明样品中含有星状诺卡氏菌, 见图 19。

5 天后, 常规微生物培养经使用生化检测仪得出结论被测样品中含有星状诺卡氏菌。这说明星状诺卡氏菌探针的阳性结果是有效的。

SEQUENCE LISTING

- <110> 南开大学
 <120> 利用核糖体操纵子间区探针检测水生动物病原菌的方法
 <130> 20060710
 <160> 34
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 星状诺卡氏菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <400> 1
 cgaagaagtc taatttcggt a 21
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 星状诺卡氏菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <400> 2
 ggcaaaccat cagagcatg 19
 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 巴斯德菌属
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)
 <400> 3
 tgttctttaa aaaatatgag aaacaagctg 30
 <210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 多杀巴斯德氏菌
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(25)	
<400> 4	
aagcgaaagc aaaagagtga agcga	25
<210> 5	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 杀鱼巴斯德氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(27)	
<400> 5	
caatgaagag acaaaaaacc gaaatcc	27
<210> 6	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 鲷鱼爱德华氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<400> 6	
accccgtgtc cccttctgtct agagg	25
<210> 7	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 鲷鱼爱德华氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(26)	
<400> 7	
ttacagcacg aagtgaaca ccttcg	26
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 迟缓爱德华氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<400> 8	

ggtaataagg tattgcagta aagtc	25
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 迟缓爱德华氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<400> 9	
atggggctat agctcagctg ggaga	25
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 耶尔森氏菌属	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(22)	
<400> 10	
tacagctgaa atttaccg cc	22
<210> 11	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 鲁氏耶尔森氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(28)	
<400> 11	
agatgtactg tcagcaatga ctaagaca	28
<210> 12	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 气单胞菌属	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(32)	
<400> 12	
gctgatttaa aaagtagttc tcaaacattt gt	32
<210> 13	

<211> 22	
<212> DNA	
<213> 杀鲑气单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(22)	
<400> 13	
agctaccgg ttacctgccc gc	22
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 杀鲑气单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(22)	
<400> 14	
gctcgcgcgc aggtaaccgg gt	22
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 豚鼠气单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(22)	
<400> 15	
gccgctagcc tcgaggctc gg	22
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 豚鼠气单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(23)	
<400> 16	
gcctttacga aaatcattgc gaa	23
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> 温和气单胞菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <400> 17
 taatggcgct cggcctcgca g 21
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 温和气单胞菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <400> 18
 cggcactcgc cattaccaa aa 22
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 鲑鱼肾杆菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <400> 19
 agattcgatg gtttgggagg ttc 23
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 鲑鱼肾杆菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <400> 20
 gataacaggc gcatctgctg attc 24
 <210> 21
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 产气荚膜梭菌
 <220>

<221> misc_feature	
<222> (1)..(32)	
<400> 21	
aatgaattct ggataaatc tctgtttaa tt	32
<210> 22	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 产气荚膜梭菌探针	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(31)	
<400> 22	
aaggaataca tcttaggaca tactaagatg a	31
<210> 23	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 肉毒梭菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(38)	
<400> 23	
taaataagaa ctattcatta attgttaaaa ttagaatt	38
<210> 24	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 肉毒梭菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(31)	
<400> 24	
cttcgaaaa gaaggtttaa gtttaagtga g	31
<210> 25	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 海分支杆菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	

<400> 25	
attggatgcg ctgcctttg gtggc	25
<210> 26	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 霍乱弧菌及拟态弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(26)	
<400> 26	
gaaagataaa caccaacaac accatt	26
<210> 27	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 霍乱弧菌及拟态弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(26)	
<400> 27	
aattaaacgc gagacaactt aggttg	26
210> 28	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 霍乱弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(23)	
<400> 28	
tccaccatct ttaagcgttt tcg	23
<210> 29	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 霍乱弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<400> 29	
tcgctgagaa tgtttaaaaa tggtt	25

<210> 30	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 创伤弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<400> 30	
acgaccacc attactcaa gagtt	25
<210> 31	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 创伤弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(24)	
<400> 31	
gctccacat tcttgaactg caat	24
<210> 32	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 副溶血弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(30)	
<400> 32	
tataaagtaa agagaagaag agttcccaaa	30
<210> 33	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 副溶血弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(30)	
<400> 33	
tccattagga attaaaactc aaaatatggg	30
<210> 34	

<211> 24

<212> DNA

<213> 鳗弧菌

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(24)

<400> 34

tttgaacaca atgggcgatt agct

24

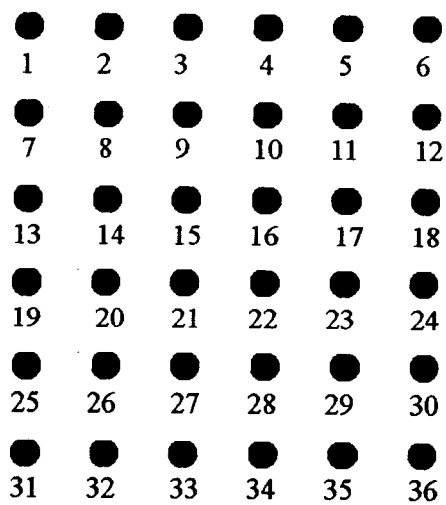


图 1

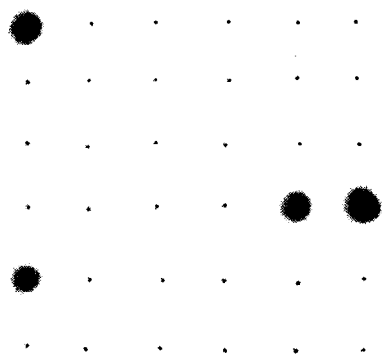


图 2

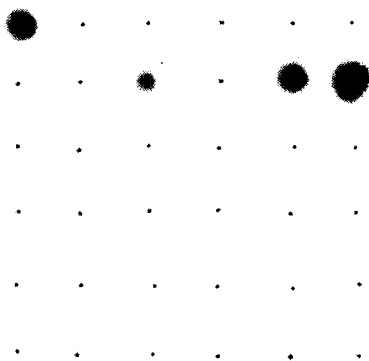


图 3

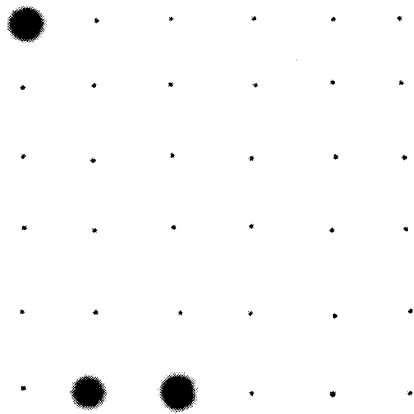


图 4

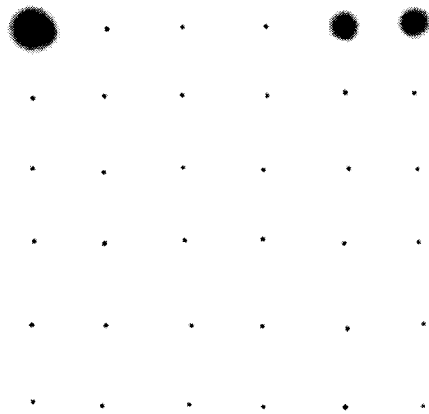


图 5

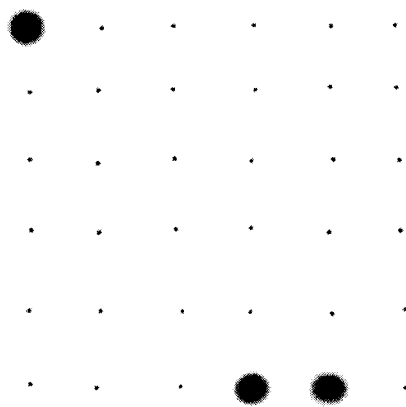


图 6

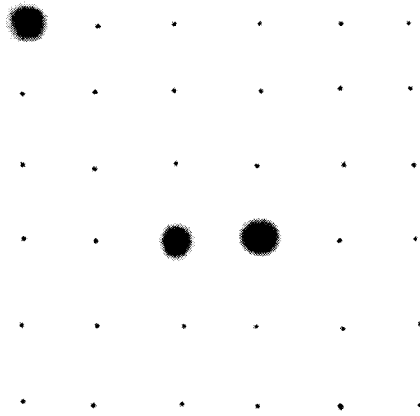


图 7

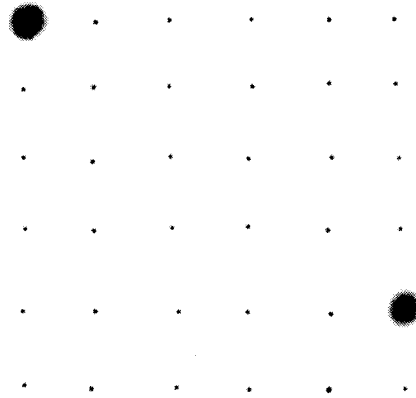


图 8

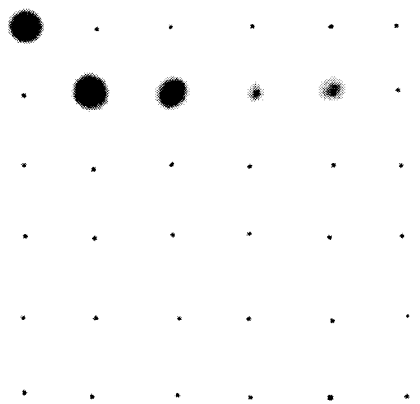


图 9

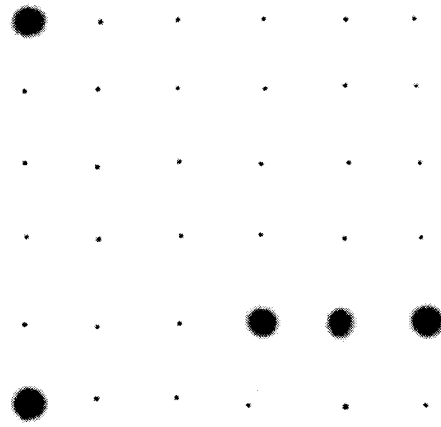


图 10

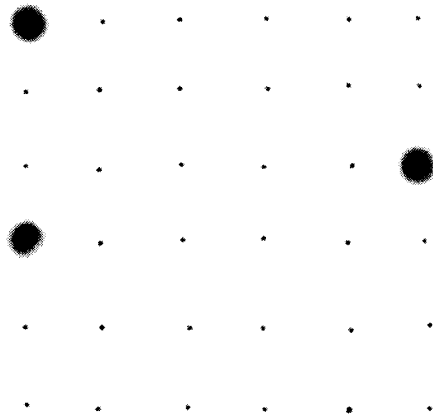


图 11

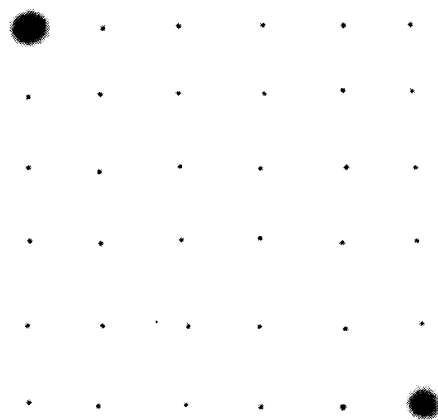


图 12

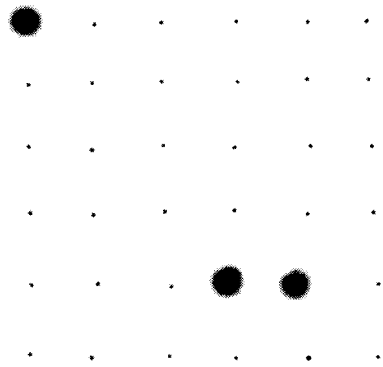


图 13

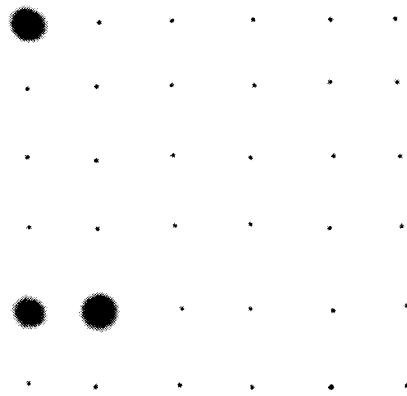


图 14

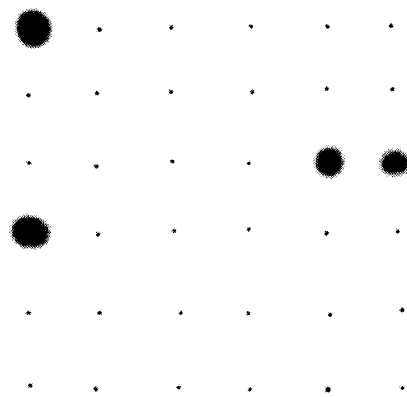


图 15

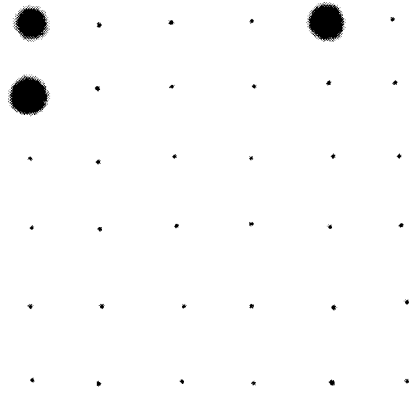


图 16

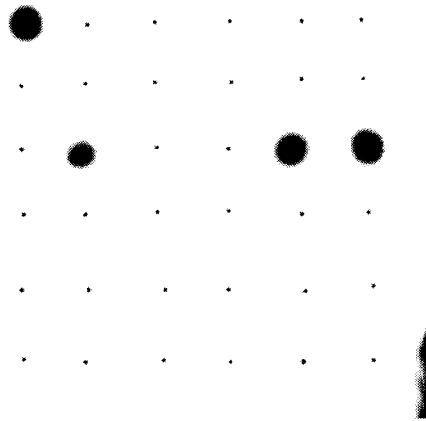


图 17

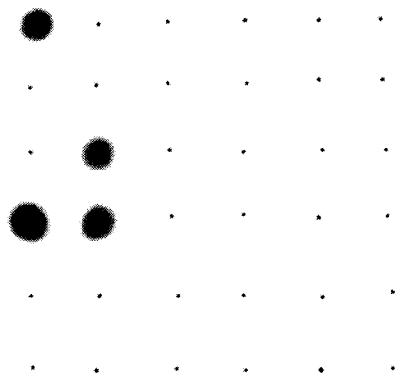


图 18

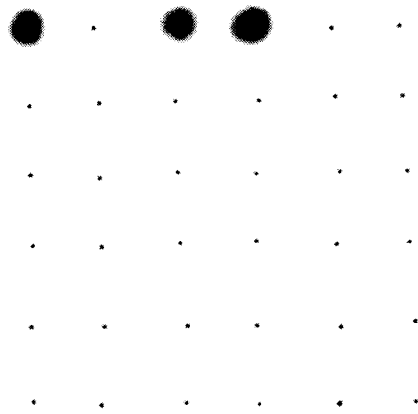


图 19

专利名称(译)	利用核糖体操纵子间区探针检测水生动物病原菌的方法		
公开(公告)号	CN1877327A	公开(公告)日	2006-12-13
申请号	CN200610014761.8	申请日	2006-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	黄熙泰 侯艳梅 刘寅 张立怀 郑泽军 高旗利 周浩 董志珍 李永君 王玉玲 魏晓娜 霍蕾		
发明人	黄熙泰 侯艳梅 刘寅 张立怀 郑泽军 高旗利 周浩 董志珍 李永君 王玉玲 魏晓娜 霍蕾		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78 C12Q1/04		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用核糖体操纵子间区探针组成寡核苷酸微阵列检验多种能够导致水生动物传染病病原菌的方法，其技术原理为分子杂交——酶联免疫显色技术，属于细菌检测技术，其技术方案是用生物信息学方法设计特异性探针，包括设计筛选的34条用作探针的寡核苷酸序列以及与之配套的PCR和杂交反应条件。通过PCR扩增并用地高辛标记细菌16s - 23srRNA基因间区序列，并用该PCR产物和一组特异性的寡核苷酸探针杂交，经酶联免疫显色显色后，可以从待测样品中，精确检测出是否存在水生动物传染病病原菌。该方法的优点是，省去了重复的细菌培养筛选环节，节约时间；分子杂交鉴定方法不受培养条件和细菌生理状态的影响，较生理生化鉴定方法更为准确。

●	●	●	●	●	●
1	2	3	4	5	6
●	●	●	●	●	●
7	8	9	10	11	12
●	●	●	●	●	●
13	14	15	16	17	18
●	●	●	●	●	●
19	20	21	22	23	24
●	●	●	●	●	●
25	26	27	28	29	30
●	●	●	●	●	●
31	32	33	34	35	36