

[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 200610014764.1

[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 1877328A

[22] 申请日 2006.7.12

[21] 申请号 200610014764.1

[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22页 附图8页

[54] 发明名称

用23S核糖体基因探针阵列检测水生动物病原菌的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用23S核糖体基因探针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23srRNA基因内部分序列,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. 一种用 23S 核糖体基因探针阵列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: (气单胞菌属通用探针 AFp1) CTCAGTAGCGGCGAGCGAACG
 序列二: (杀鲑气单胞菌探针 Asal1) TATCGTTACATGAATACATAGTGTAACGAG
 序列三: (嗜水气单胞菌探针 Ahyr1) TAAGTGAATACATAGCTTAACGAGGCGA
 序列四: (豚鼠气单胞菌探针 Acav1) TTAAGTGAATACATAGGTAATAGAGGCGA
 序列五: (梭菌属通用探针 CloFp) CCAGAGTACCACGAGACACGTGAAA
 序列六: (产气荚膜梭菌探针 Cper1) AAGTGGAGGCTATTGTAAGTGAAGAGAA
 序列七: (肉毒梭菌探针 Cbot1) GAGAAATTATGGTTAACCGAACACAAC
 序列八: (鲷鱼爱德化氏菌探针 Eict1) ACGAAGGTGCACAGCTGTGAGTT
 序列九: (杀鱼肠球菌探针 Eserp1) ACTATGTTATGCATAGTATCCGTAAGTGAA
 序列十: (链球菌属通用探针 Strp1) TATAGAAGAATTACCTGGGAAGGTAAGC
 序列十一: (嗜冷屈挠杆菌探针 FleFp) TAGCCCAAACCDAWGTTGTTACGG
 序列十二: (柱状屈挠杆菌探针 1 Fclup1) ACTTTCCAGTAAATTCTAATTCTATCCGC
 序列十三: (柱状屈挠杆菌探针 2 Fclup2) ATAAGTAATAGAAGATAACGATAGTGGTATCC
 序列十四: (多杀巴斯德氏菌探针 1 Pmulp1)
 AGTAAGTTTTAGCTAGCATATTAGAGGAATTG
 序列十五: (多杀巴斯德氏菌探针 2 Pmulp2) GTRACTCGAAAGTATGTTAGTGGAAGTAAAGC
 序列十六: (杀鱼巴斯德氏菌探针 Ppisp) CTTAAGCTAATCTTGCCTTAGGTGAAC
 序列十七: (恶臭假单胞菌探针 1 Pputp1) GACCAGCCCTTAAGTTGATTTGAGAT
 序列十八: (恶臭假单胞菌探针 2 Pputp2) CCGTACACGAAAATCTCTTGTCATG
 序列十九: (荧光假单胞菌探针 1 Pflup1) GACTAGCCCTTAAGTGGCTTTGAGAT
 序列二十: (荧光假单胞菌探针 2 Pflup2) CCTGTACGCGAAAATCTCTTAGTCATG
 序列二十一: (丁香组假单胞菌探针 Psyrp2) ACGCGAAAATCCCTTTGCAATGAA
 序列二十二: (霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1 Vchmip11)
 ACTCGGTGAAGTAGGTGAACAAGCTGG
 序列二十三: (霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 Vchmip12)
 GAAGTAGGTGAACAAGCTGGAAAGCT
 序列二十四: (霍乱弧菌及拟态弧菌探针 3 Vcmap13) GCTGGAAAGCTTGGCGATACAG
 序列二十五: (哈维弧菌探针 1 Vharp11) CTTTTTATGCGTCAGGTGAAACTTCTG
 序列二十六: (哈维弧菌探针 2 Vharp12) GTGAAACTTCTGGAAAGTTGTGCGATA
 序列二十七: (哈维弧菌探针 3 Vharp21) TAACCGGCAACGCATATAAAGTGAA
 序列二十八: (创伤弧菌探针 1 Vvulp11) AAGCTTTACATGTGTTAGACGAACGG
 序列二十九: (创伤弧菌探针 2 Vvulp21) TTGTAGATGCATGTTTCAGTGAAATCG
 序列三十: (副溶血弧菌探针 V.parp21) TTGACGACGTGTGTTTCAGTGAAATC
 序列三十一: (河流弧菌及弗氏弧菌探针 1 Vfifup11) TTTACATGCGTCAGGTGAAGGTTCT
 序列三十二: (河流弧菌及弗氏弧菌探针 2 Vfifup12) TCTGGAAAGGACCGCGAAACAG
 序列三十三: (溶藻弧菌探针 Vfifup21) AGCCGACAGCGCATGTTTCAGTG
 序列三十四: (溶藻弧菌探针 Valgp21) AACTGACGACGCATATTCAGTGAAAT

(2) PCR 扩增待测样品中全部原核微生物的 23s rRNA 基因内的 DNA 片段, 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 23S 核糖体基因探针阵列检测多种水生动物病原菌的方法在检测水生动物病原菌方面的应用。

用 23S 核糖体基因探针阵列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，具体地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、鲟鱼爱德华氏菌、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在逐渐被修正。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。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 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、鲟鱼爱德华氏菌、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：（气单胞菌属通用探针 AFp1） CTCAGTAGCGGCGAGCGAACG

序列二：（杀鲑气单胞菌探针 Asa11） TATCGTTACATGAATACATAGTGTAACGAG

序列三：（嗜水气单胞菌探针 Ahyr1） TAAGTGAATACATAGCTTAACGAGGCCA

- 序列四：（豚鼠气单胞菌探针 Acav1） TTACTGAATACATAGGTAATAGAGGCGA
 序列五：（梭菌属通用探针 CloFp） CCAGAGTACCACGAGACACGTGAAA
 序列六：（产气荚膜梭菌探针 Cper1） AAGTGGAGGCTATTGTAAGTGAAGAGAA
 序列七：（肉毒梭菌探针 Cbot1） GAGAAATTATGGTAAACCGAACACAAC
 序列八：（鲷鱼爱德华氏菌探针 Eict 1） ACGAAGGTGCACAGCTGTGAGTT
 序列九：（杀鱼肠球菌探针 Eserp1） ACTATGTTATGCATAGTATCCGTAAGTGAA
 序列十：（链球菌属通用探针 Strp1） TATAGAAGAATTACCTGGGAAGGTAAGC
 序列十一：（嗜冷屈挠杆菌探针 FleFp） TAGCCCAAACCDAWGTTGTTACGG
 序列十二：（柱状屈挠杆菌探针 1 Fclup1） ACTTTCCAGTAAATTCTAATTCTATCCGC
 序列十三：（柱状屈挠杆菌探针 2 Fclup2） ATAAGTAATAGAAGATAACGATAGTGGTATCC
 序列十四：（多杀巴斯德氏菌探针 1 Pmulp1）
 AGTAAGTTTTAGCTAGCATATTAGAGGAATTG
 序列十五：（多杀巴斯德氏菌探针 2 Pmulp2） GTRACTCGAAAGTATGTTAGTGGAACCTAAGC
 序列十六：（杀鱼巴斯德氏菌探针 Ppisp） CTTAAGCTAATCTTGCGTTAGGTGAAC
 序列十七：（恶臭假单胞菌探针 1 Pputp1） GACCAGCCCTTAAGTTGATTTGAGAT
 序列十八：（恶臭假单胞菌探针 2 Pputp2） CCGTACACGAAAATCTCTTGTCATG
 序列十九：（荧光假单胞菌探针 1 Pflup1） GACTAGCCCTTAAGTGGCTTTGAGAT
 序列二十：（荧光假单胞菌探针 2 Pflup 2） CCTGTACGCGAAAATCTCTTAGTCATG
 序列二十一：（丁香组假单胞菌探针 Psyrp2） ACGCGAAAATCCCTTTGCAATGAA
 序列二十二：（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1 Vchmip11）
 ACTCGGTGAAGTAGGTGAACAAGCTGG
 序列二十三：（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 Vchmip12）
 GAAGTAGGTGAACAAGCTGGAAAGCT
 序列二十四：（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 3 Vcmap13） GCTGGAAAGCTTGGCGATACAG
 序列二十五：（哈维弧菌探针 1 Vharp11） CTTTTTATGCGTCAGGTGAAACTTCTG
 序列二十六：（哈维弧菌探针 2 Vharp12） GTGAAACTTCTGGAAAGTTGTGCGATA
 序列二十七：（哈维弧菌探针 3 Vharp21） TAACCGGCAACGCATATAAAGTGAA
 序列二十八：（创伤弧菌探针 1 Vvulp11） AAGCTTTACATGTGTTAGACGAACGG
 序列二十九：（创伤弧菌探针 2 Vvulp 21） TTGTAGATGCAIGTTCAGTGAAATCG
 序列三十：（副溶血弧菌探针 V.parp 21） TTGACGACGTGTGTTTCAGTGAAATC
 序列三十一：（河流弧菌及弗氏弧菌探针 1 Vflup11） TTTACATGCGTCAGGTGAAGGTTCT
 序列三十二：（河流弧菌及弗氏弧菌探针 2 Vflup12） TCTGGAAAGGACCGCGAAACAG
 序列三十三：（溶藻弧菌探针 Vflup 21） AGCCGACAGCGCATGTTTCAGTG
 序列三十四：（溶藻弧菌探针 Valgp21） AACTGACGACGCATATTTCAGTGAAAT

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微生物的 23S rRNA 基因内的部分 DNA 片断，同时进行地高辛标记时所使用的 PCR 引物寡核苷酸序列如下：

引物序列 1: (23S rRNA 基因片段扩增前引物 P23forward)

GCGATTTCYG AAYGGGGRAACCC

引物序列 2: (23S rRNA 基因片段扩增后引物 P23reverse)

TTCGCCTTTCCTCACGGTA CT

其中 Y 代表碱基 C 或 T 中的任意一个; R 代表碱基 A 或 G 中的任意一个。

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 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 气单胞菌属通用探针 AFp1 CTCAGTAGCGGCGAGCGAACG

4 杀鲑气单胞菌探针 Asa11 TATCGTTACATGAATACATAGTGTAACGAG

5 嗜水气单胞菌探针 Ahyr1 TAAGTGAATACATAGCTTAACGAGGCGA

6 豚鼠气单胞菌探针 Acav1 TTAAGTGAATACATAGGTAATAGAGGCGA

7 梭菌属通用探针 CloFp CCAGAGTACCACGAGACACGTGAAA

8 产气荚膜梭菌探针 Cper1 AAGTGGAGGCTATTGTAAGTGAAGAGAA

9 肉毒梭菌探针 Cbot1 GAGAAATTATGGTTAACCGAACACAAC

10 鲷鱼爱德华氏菌探针 Eict 1 ACGAAGGTGCACAGCTGTGAGTT

11 杀鱼肠球菌探针 Eserp1 ACTATGTTATGCATAGTATCCGTAAGTGAA

12 链球菌属通用探针 IIEser&Strp 1 TATAGAAGAATTACCTGGGAAGGTAAGC

13 嗜冷屈挠杆菌探针 FleFp TAGCCCAAACCDAWGTTGTTACGG

14 柱状屈挠杆菌探针 1 Fclup1 ACTTTCCAGTAAATTCTAATTCTATCCGC

15 柱状屈挠杆菌探针 2 Fclup2 ATAAGTAATAGAAGATAACGATAGTGGTATCC

16 多杀巴斯德氏菌探针 1 Pmulp1 AGTAAGTTTTAGCTAGCATATTAGAGGAATTG

17 多杀巴斯德氏菌探针 2 Pmulp2 GTRACTCGAAAGTATGTTAGTGGAACTAAGC

18 杀鱼巴斯德氏菌探针 Ppisp CTTAAGCTAATCTTGCGTTAGGTGAAC

19 恶臭假单胞菌探针 1 Pputp1GACCAGCCCTTAAGTTGATTTGAGAT

20 恶臭假单胞菌探针 2 Pputp2 CCGTACACGAAAATCTCTTGTCATG

21 荧光假单胞菌探针 1 Pflup1 GACTAGCCCTTAAGTGGCTTTGAGAT

22 荧光假单胞菌探针 2 Pflup 2 CCTGTACGCGAAAATCTCTTAGTCATG

23 丁香组假单胞菌探针 Psyrrp2 ACGCGAAAATCCCTTTGCAATGAA

24 霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1Vchmip11 ACTCGGTGAAGTAGGTGAACAAGCTGG

25 霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 Vchmip12 GAAGTAGGTGAACAAGCTGGAAAGCT

26 霍乱弧菌及拟态弧菌探针 3 Vcmap13 GCTGGAAAGCTTGGCGATACAG

- 27 哈维弧菌探针 1 Vharp11 CTTTTTATGCGTCAGGTGAAACTTCTG
 28 哈维弧菌探针 2 Vharp12 GTGAAACTTCTGGAAAGTTGTGCGATA
 29 哈维弧菌探针 3 Vharp21 TAACCGGCAACGCATATAAAGTGAA
 30 创伤弧菌探针 1 Vvulp11 AAGCTTTACATGTGTTAGACGAACGG
 31 创伤弧菌探针 2 Vvulp 21 TTGTAGATGCATGTTTCAGTGAAATCG
 32 副溶血弧菌探针 Vparp 21 TTGACGACGTGTGTTTCAGTGAAATC
 33 河流弗氏弧菌探针 1 Vflfup11 TTTACATGCGTCAGGTGAAGGTTCT
 34 河流弗氏弧菌探针 2 Vflfup12 TCTGGAAAGGACCGCGAAACAG
 35 溶藻弧菌探针 Vflfup 21 AGCCGACAGCGCATGTTTCAGTG
 36 溶藻弧菌探针 Valgp21 AACTGACGACGCATATTCAGTGAAAT

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
序列三十六(引物)	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℃),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。

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: 实施例 1 某批次活鱼的微阵列检测检出杀鲑气单胞菌的结果。

图 3: 实施例 2 某批次活鱼的微阵列检测检出嗜水气单胞菌的结果。

图 4: 实施例 3 某批次活鱼的微阵列检测检出豚鼠气单胞菌的结果。

图 5: 实施例 4 某批次活鱼的微阵列检测检出产气荚膜梭菌的结果。

图 6: 实施例 5 某批次活鱼的微阵列检测检出肉毒梭菌的结果。

图 7: 实施例 6 某批次活鱼的微阵列检测检出鲷鱼爱德华氏菌的结果。

图 8: 实施例 7 某批次活鱼的微阵列检测检出杀鱼肠球菌的结果。

图 9: 实施例 8 某批次活鱼的微阵列检测检出乙型溶血型链球菌的结果。

图 10: 实施例 9 某批次活鱼的微阵列检测检出嗜冷屈挠杆菌的结果。

图 11: 实施例 10 某批次活鱼的微阵列检测检出柱状屈挠杆菌的结果。

图 12: 实施例 11 某批次活鱼的微阵列检测检出多杀巴斯德氏菌的结果。

图 13: 实施例 12 某批次活鱼的微阵列检测检出杀鱼巴斯德氏菌的结果。

图 14: 实施例 13 某批次活鱼的微阵列检测检出恶臭假单胞菌的结果。

图 15: 实施例 14 某批次活鱼的微阵列检测检出荧光假单胞菌的结果。

图 16: 实施例 15 某批次活鱼的微阵列检测检出霍乱弧菌的结果。

图 17: 实施例 16 某批次活鱼的微阵列检测检出拟态弧菌的结果。

图 18: 实施例 17 某批次活鱼的微阵列检测检出哈维弧菌的结果。

图 19: 实施例 18 某批次活鱼的微阵列检测检出创伤弧菌的结果。

图 20: 实施例 19 某批次活鱼的微阵列检测检出副溶血弧菌的结果。

图 21: 实施例 20 某批次活鱼的微阵列检测检出河流弧菌的结果。

图 22: 实施例 21 某批次活鱼的微阵列检测检出弗氏弧菌的结果。

图 23: 实施例 22 某批次活鱼的微阵列检测检出溶藻弧菌的结果。

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杀鲑气单胞菌疑似菌落。

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 L TE 溶液，置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2. PCR 扩增 23S 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C。

* 扩增 PCR 产物热变性

DIG 标记的 PCR 产物加热到 95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，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三（3 气单胞菌属通用探针 3 AFp1）

探针位点四（杀鲑气单胞菌探针 4）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 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杀鲑气单胞菌。这说明杀鲑气单胞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嗜水气单胞菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（气单胞菌属通用探针 AFp1）、探针位点五（嗜水气单胞菌探针 Ahyr1）均为深蓝色点即为阳性杂交结果，表明样品中含有嗜水气单胞菌探针，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嗜水气单胞菌。这说明寡核苷酸探针位点三、探针位点五阳性结果是有效的。

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豚鼠气单胞菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（气单胞菌属通用探针 AFp1）、探针位点六（豚鼠气单胞菌探针 Acav1）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 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豚鼠气单胞菌。这说明寡核苷酸探针位点三、探针位点六的阳性结果是有效的。

实施例 4

样本：某批次进口活鱼。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：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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七（梭菌属通用探针 CloFp）、探针位点八（产气荚膜梭菌探针 Cper1）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 5。

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产气荚膜梭菌。这说明寡核苷酸探针位点七、探针位点八的阳性结果是有效的。

实施例 5

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：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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七（梭菌属通用探针 CloFp）、探针位点九（肉毒梭菌探针 Cbot1）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 6。

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。这说明寡核苷酸探针位点七、探针位点九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鲷鱼爱德华氏菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（鲷鱼爱德华氏菌探针 Eict 1）表明样品中含有肉毒梭菌，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鲷鱼爱德华氏菌。这说明寡核苷酸探针位点十的阳性结果是有效的。

实施例 7

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出杀鱼肠球菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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十一（杀鱼肠球菌探针 Eserp1）表明样品中含有杀鱼肠球菌，

见图 8。

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鱼肠球菌。这说明寡核苷酸探针位点十一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乙型溶血型链球菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（链球菌属通用探针 II Eser&Strp 1）表明样品中含有链球菌，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链球菌。这说明寡核苷酸探针位点十二的阳性结果是有效的。

实施例 9

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出嗜冷屈挠杆菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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十三（嗜冷屈挠杆菌探针 FleFp）表明样品中含有嗜冷屈挠杆菌，见图 10。

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嗜冷屈挠杆菌。这说明寡核苷酸探针位点十三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柱状屈挠杆菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（柱状屈挠杆菌探针 1 Fclup1）十五（柱状屈挠杆菌探针 2 Fclup2）表明样品中含有柱状屈挠杆菌，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柱状屈挠杆菌菌。这说明寡核苷酸探针位点十四，十五的阳性结果是有效的。

实施例 11

样本：某批次进口活鱼。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：同实施例 1
- 2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1
- 3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1
- 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十六（多杀巴斯德氏菌探针 1 Pmulp1）探针位点十七（多杀巴斯德氏菌探针 2 Pmulp2）表明样品中含有多杀巴斯德氏菌，见图 12。

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多杀巴斯德氏菌。这说明寡核苷酸探针位点十四的阳性结果是有效的。

实施例 12

样本：某批次进口活鱼。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：同实施例 1
- 2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1
- 3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1
- 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十八（杀鱼巴斯德氏菌探针 Ppisp）表明样品中含有杀鱼巴斯德氏菌，见图 13。

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杀鱼巴斯德氏菌。这说明寡核苷酸探针位点十八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恶臭假单胞菌疑似菌落。

- 1.DNA 抽提：同实施例 1
- 2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1
- 3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1
- 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十九（恶臭假单胞菌探针 1 Pputp1）探针位点二十（恶臭假单胞菌探针 2 Pputp2）表明样品中含有恶臭假单胞菌，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恶臭假单胞菌。这说明寡核苷酸探针位点十九，二十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荧光假单胞菌疑似菌落。

- 1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（荧光假单胞菌探针 1 Pflup1）二十二（荧光假单胞菌探针 2Pflup2）表明样品中含有荧光假单胞菌，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荧光假单胞菌。这说明寡核苷酸探针位点二十一，二十二的阳性结果是有效的。

实施例 15

样本：某批次进口活鱼。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：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1 Vchmip11）探针位点二十四（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 Vchmip12）探针位点二十五（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 3 Vchmip13）表明样品中含有霍乱弧菌，见图 16。

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霍乱弧菌。这说明寡核苷酸探针位点二十三，二十四，二十五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拟态弧菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 1 Vchmip11）探针位点二十四（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 2 Vchmip12）探针位点二十五（霍乱弧菌及拟态弧菌探针 3 Vchmip13）表明样品中含有拟态弧菌，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拟态弧菌。这说明寡核苷酸探针位点二十三，二十四，二十五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哈维弧菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（哈维弧菌探针 1 Vharp11）探针位点二十八（哈维弧菌探针 2 Vharp12）探针位点二十九（哈维弧菌探针 3 Vharp13）表明样品中含有拟态弧菌，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哈维弧菌。这说明寡核苷酸探针位点，二十七，二十八，二十九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创伤弧菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（创伤弧菌探针 1 Vvulp11）探针位点三十一（创伤弧菌探针 2 Vvulp 21）表明样品中含有创伤弧菌，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创伤弧菌。这说明寡核苷酸探针位点，三十，三十一的阳性结果是有效的。

实施例 19

样本：某批次进口活鱼。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：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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（副溶血弧菌探针 Vparp 21）表明样品中含有副溶血弧菌，见图 20。

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副溶血弧菌。这说明寡核苷酸探针位点，三十二的阳性结果是有效的。

实施例 20

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出河流弧菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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三十三（河流弗氏弧菌探针 1 Vflfup11）探针位点三十四（河流弗氏弧菌探针 2 Vflfup12）表明样品中含有河流弧菌，见图 21。

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河流弧菌。这说明寡核苷酸探针位点，三十三，三十四的阳性结果是有效的。

实施例 21

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出弗氏弧菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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三十三（河流弗氏弧菌探针 1 Vflfup11）探针位点三十四（河流弗氏弧菌探针 2 Vflfup12）表明样品中含有弗氏弧菌，见图 22。

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弗氏弧菌。这说明寡核苷酸探针位点，三十三，三十四的阳性结果是有效的。

实施例 22

样本：某批次进口活鱼。常规微生物培养和生化检测出溶藻弧菌疑似菌落。

1.DNA 抽提：同实施例 1

2.PCR 扩增 23S 基因片段：同实施例 1

3.靶基因扩增产物与尼龙膜上探针的杂交：同实施例 1

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三十五（溶藻弧菌探针 Vflfup 21）探针位点三十六（溶藻弧菌探针 Valgp21）表明样品中含有溶藻弧菌，见图 23。

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溶藻弧菌。这说明寡核苷酸探针位点，三十五，三十六的阳性结果是有效的。

SEQUENCE LISTING

<110> 南开大学

<120> 用 23S 核糖体基因探针阵列检测水生动物病原菌的方法

<130> 20060716

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA	
<213> 气单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(21)	
<400> 1	
ctcagtagcg gcgagcgaac g	21
<210> 2	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 杀鲑气单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(30)	
<400> 2	
tatcgttaca tgaatacata gtgtaacgag	30
<210> 3	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 嗜水气单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(28)	
<400> 3	
taagtgaata catagcttaa cgaggcga	28
<210> 4	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 豚鼠气单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(28)	
<400> 4	
ttactgaata cataggtaat agaggcga	28
<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 梭菌	

<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<400> 5	
ccagagtacc acgagacacg tgaaa	25
<210> 6	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 产气荚膜梭菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(28)	
<400> 6	
aagtggaggc tattgtaact gaagagaa	28
<210> 7	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 肉毒梭菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(27)	
<400> 7	
gagaaattat ggtaaccga acacaac	27
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 鲷鱼爱德华氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(23)	
<400> 8	
acgaaggtgc acagctgtga gtt	23
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 杀鱼肠球菌	
<220>	
<221> misc_feature	

<222> (1)..(30)	
<400> 9	
actatgttat gcatagtatc cgtaagtgaa	30
<210> 10	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 链球菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(28)	
<400> 10	
tatagaagaa ttacctggga aggtaagc	28
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 嗜冷屈挠杆菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(24)	
<400> 11	
tagcccaaac cdawgttgtt acgg	24
<210> 12	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 柱状屈挠杆菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(29)	
<400> 12	
actttccagt aaattctaatt tctatccgc	29
<210> 13	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 柱状屈挠杆菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(32)	
<400> 13	

ataagtaata gaagataacg atagtggat cc	32
<210> 14	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 多杀巴斯德氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(32)	
<400> 14	
agtaagtttt agctagcata ttagaggaat tg	32
<210> 15	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 多杀巴斯德氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(30)	
<400> 15	
gtactcgaaa gtatgttagt ggaactaagc	30
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 杀鱼巴斯德氏菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(27)	
<400> 16	
cttaagctaa tcttgcgta ggtgaac	27
<210> 17	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 恶臭假单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(26)	
<400> 17	
gaccagccct taagttgatt tgagat	26
<210> 18	

<211> 26	
<212> DNA	
<213> 恶臭假单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(26)	
<400> 18	
ccgtacacga aaatctcttg tcaatg	26
<210> 19	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 荧光假单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(26)	
<400> 19	
gactagccct taagtgctt tgagat	26
<210> 20	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 荧光假单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(27)	
<400> 20	
cctgtacgcg aaaatctctt agtcatg	27
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 丁香组假单胞菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(24)	
<400> 21	
acgcgaaaat cccttgcaa tgaa	24
<210> 22	
<211> 27	
<212> DNA	

<213> 霍乱弧菌及拟态弧菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <400> 22
 actcggtgaa gtaggtgaac aagctgg 27
 <210> 23
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 霍乱弧菌及拟态弧菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <400> 23
 gaagtaggtg aacaagctgg aaagct 26
 <210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 霍乱弧菌及拟态弧菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <400> 24
 gctggaaagc ttggcgatac ag 22
 <210> 25
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 哈维弧菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <400> 25
 cttttatgc gtcaggtgaa acttctg 27
 <210> 26
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 哈维弧菌
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <400> 26
 gtgaaacttc tggaaagttg tgcgata 27
 <210> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 哈维弧菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <400> 27
 taaccggcaa cgcatataaa gtgaa 25
 <210> 28
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 创伤弧菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <400> 28
 aagctttaca tgtgttagac gaacgg 26
 <210> 29
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 创伤弧菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <400> 29
 ttgtagatgc atgttcagtg aaatcg 26
 <210> 30
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 副溶血弧菌
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)

<400> 30	
ttgacgacgt gtgttcagtg aaatc	25
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 河流弧菌及弗氏弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<400> 31	
tttaccatgcg tcaggtgaag gttct	25
<210> 32	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 河流弧菌及弗氏弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(22)	
<400> 32	
tctggaaagg accgcgaaac ag	22
<210> 33	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 溶藻弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(22)	
<400> 33	
agccgacagc gcatgttcag tg	22
<210> 34	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 溶藻弧菌	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(26)	
<400> 34	
aactgacgac gcatattcag tgaat	26

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 35

gcgatttcyg aayggggraa ccc

23

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<400> 36

ttcgccttc cctcacgga ct

22

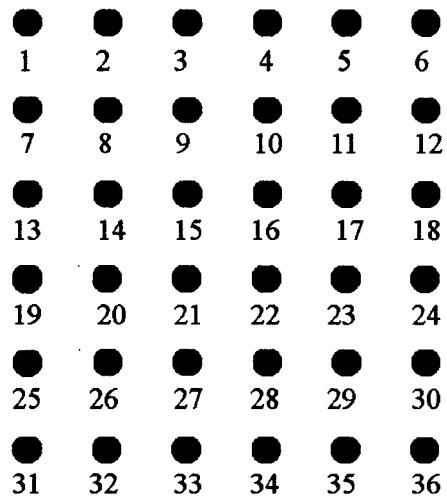


图 1

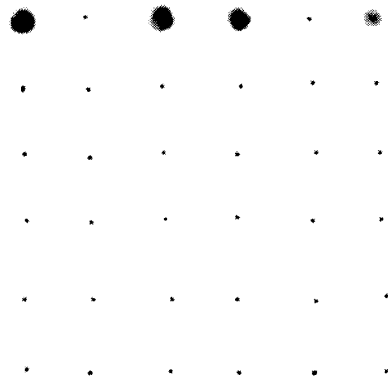


图 2

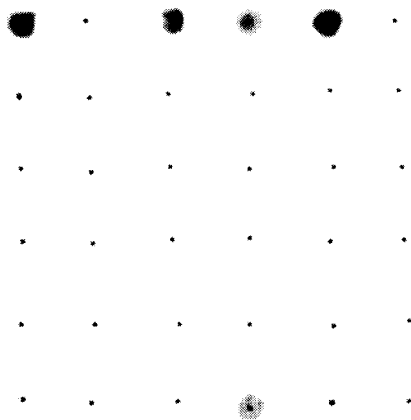


图 3

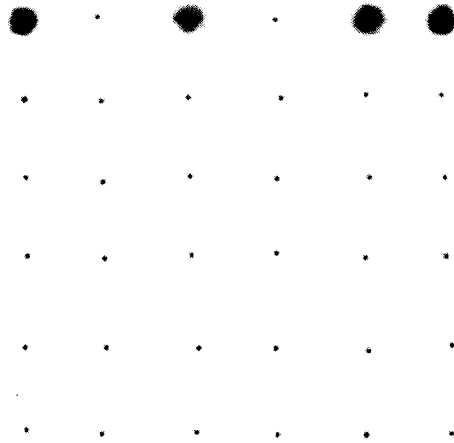


图 4

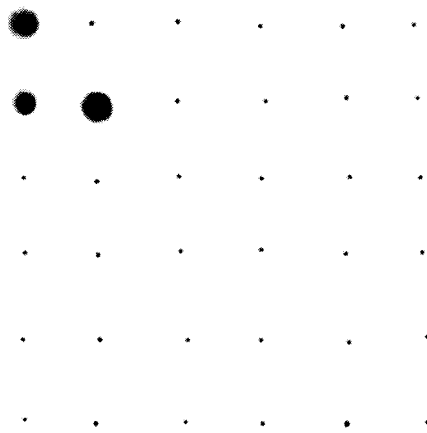


图 5

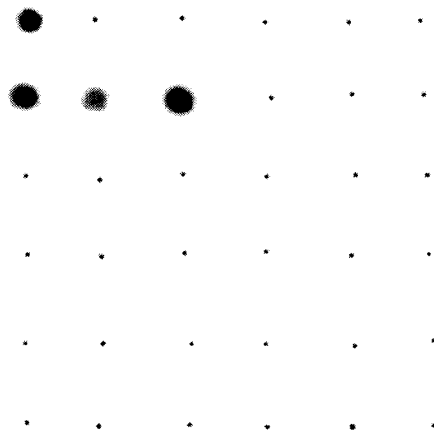


图 6

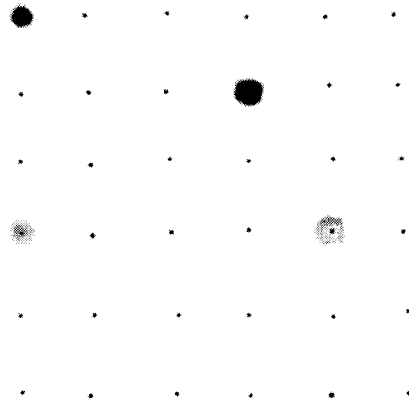


图 7

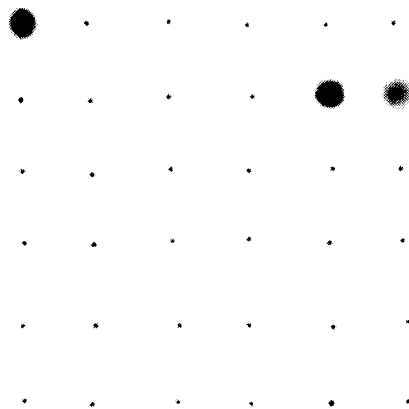


图 8

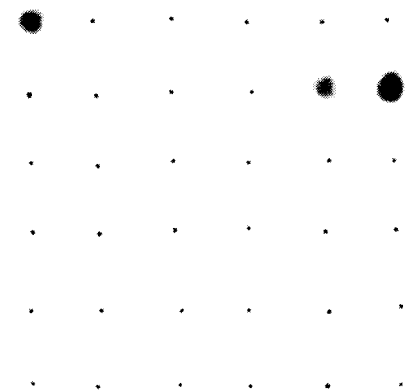


图 9

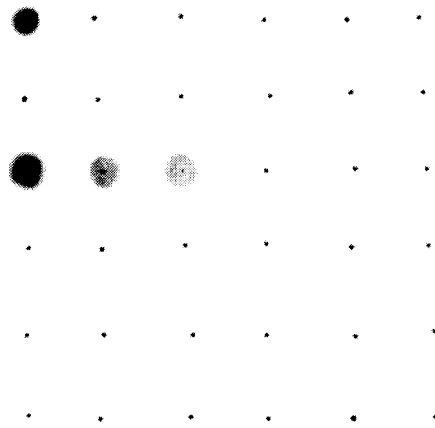


图 10

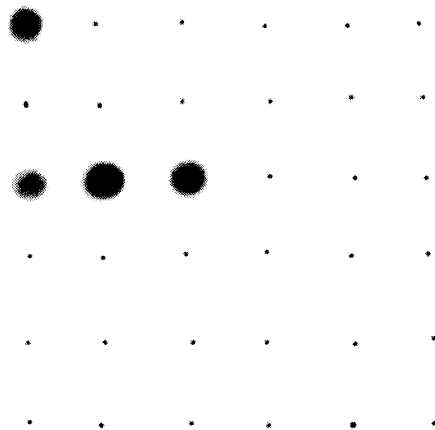


图 11

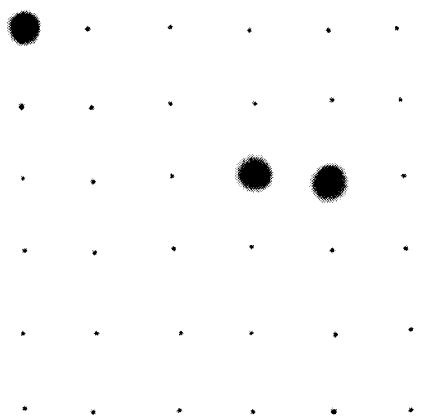


图 12

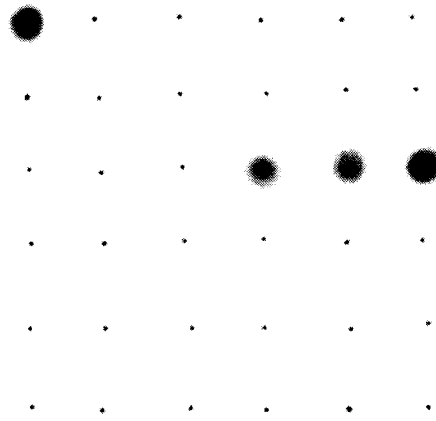


图 13

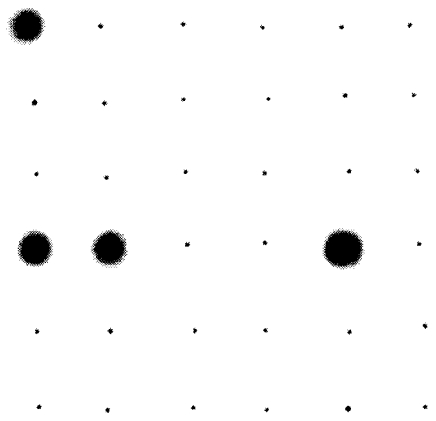


图 14

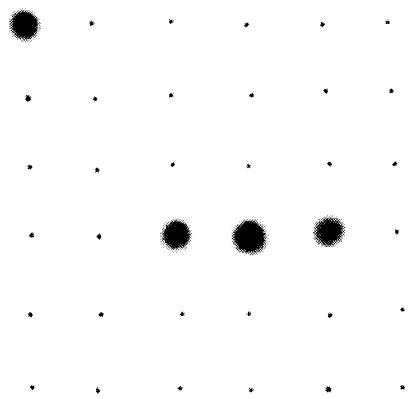


图 15

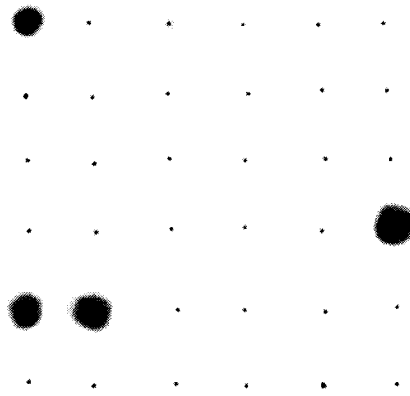


图 16

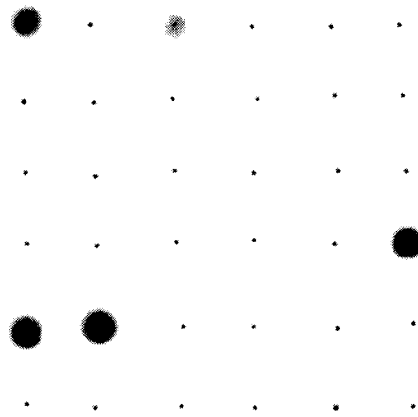


图 17

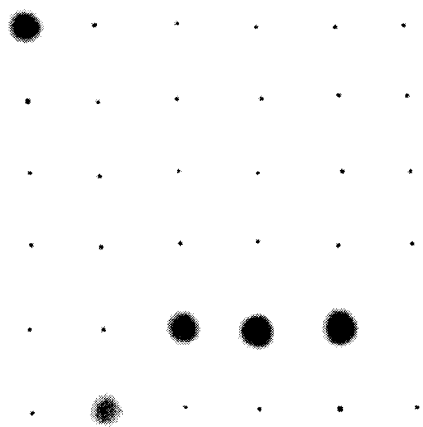


图 18

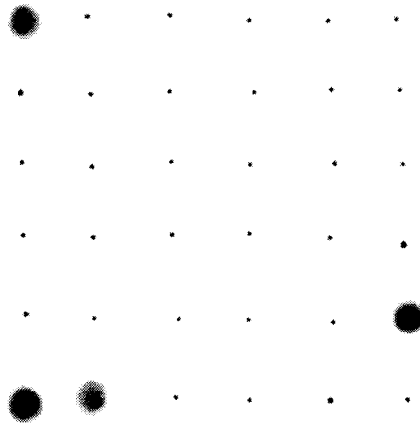


图 19

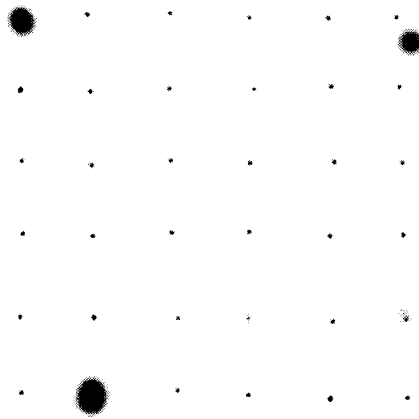


图 20

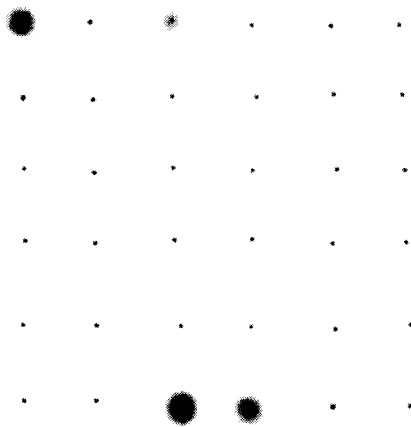


图 21

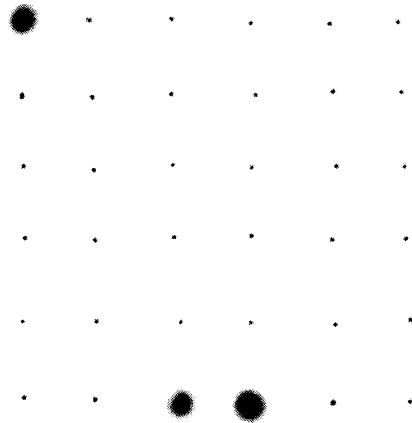


图 22

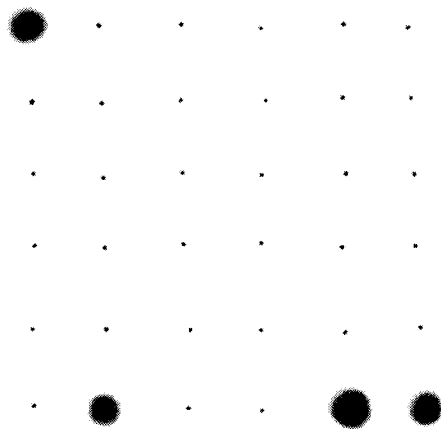


图 23

专利名称(译)	用23S核糖体基因探针阵列检测水生动物病原菌的方法		
公开(公告)号	CN1877328A	公开(公告)日	2006-12-13
申请号	CN200610014764.1	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)

本发明公开了一种用23S核糖体基因探针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23srRNA基因内部分序列，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