



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102687019 A

(43) 申请公布日 2012.09.19

(21) 申请号 201080054628.X *C07K 16/12* (2006.01)
(22) 申请日 2010.12.03 *C12N 15/09* (2006.01)
(30) 优先权数据 *C12Q 1/68* (2006.01)
2009-276115 2009.12.04 JP *G01N 33/53* (2006.01)
2010-023102 2010.02.04 JP
(85) PCT申请进入国家阶段日
2012.06.01
(86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2010/071652 2010.12.03
(87) PCT申请的公布数据
W02011/068189 JA 2011.06.09
(71) 申请人 三菱化学美迪恩斯株式会社
地址 日本东京都
(72) 发明人 皆川温子 广岛丰正 岛田康司
杉山和之 水户部优树 H. 板垣
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 熊玉兰 郭文洁
(51) Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01) 权利要求书 1 页 说明书 20 页
序列表 13 页 附图 10 页

(54) 发明名称
检测属于肺炎支原体和 / 或生殖支原体的微生物的方法

(57) 摘要
提供了用于迅速且特异性地诊断肺炎支原体和 / 或生殖支原体感染病的检测方法以及检测试剂盒。其以肺炎支原体或生殖支原体的 DnaK 为指标。

1. 肺炎支原体或生殖支原体的检测方法,其特征是,以肺炎支原体或生殖支原体的 DnaK 为指标。
2. 权利要求 1 中记载的方法,其中对 DnaK 蛋白质进行免疫学分析。
3. 对肺炎支原体或生殖支原体具有特异性的抗 DnaK 抗体。
4. 肺炎支原体或生殖支原体的检测用试剂盒,其含有权利要求 3 中记载的抗 DnaK 抗体。
5. 权利要求 1 中记载的方法,其以 DnaK 基因为指标。
6. 对肺炎支原体或生殖支原体具有特异性的引物或探针。
7. 肺炎支原体或生殖支原体的检测用试剂盒,其含有权利要求 6 中记载的引物或探针。

检测属于肺炎支原体和 / 或生殖支原体的微生物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及以对于微生物的检测具有特异性的分子作为指标的、该微生物的检测方法,以及该微生物的检测用试剂盒,所述微生物属于作为一般的肺炎的原因微生物的肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)和 / 或生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*)。

背景技术

[0002] (1) 肺炎支原体肺炎的患者比例和症状

肺炎支原体感染病归类为社区获得性非典型肺炎,其在社区获得性肺炎中所占比例是成人 30 ~ 40%,限于 15 ~ 25 岁的年轻成人则波及 60 ~ 70%。肺炎支原体的感染途径是经呼吸道感染,在学校等机构、家族内感染扩大的情况也不少。另外,在肺炎支原体感染病中,肺炎发生为感染病的约 3 ~ 5%,其余成为支气管炎、上呼吸道炎、隐性感染。特征性症状是从感染初期起不伴咳痰的顽固性咳嗽,有时也伴有发热、头痛、咽痛、恶寒、全身倦怠等症状。

[0003] (2) 肺炎支原体感染病的检查现状

肺炎支原体感染病的检查一般为来自患者咽拭子的培养检查、应用患者血清的抗体检查。对于培养检查,肺炎支原体自身仅在特殊的培养基中发育、操作困难、在最终肺炎支原体的鉴定中需要实施 PCR 检查,因此目前的情况是只能在限定的设施中检查,另外,由于培养需要数周,因此需要迅速得到结果的检查。

[0004] 另一方面,抗体检查与一般的培养检查相比操作容易且迅速得到结果,因此是常常应用的检查,但由于支原体的 IgM 抗体效价具有持续性,成问题的是,难以判断是以前的感染还是本次的感染、至抗体效价升高花费时间。为了解决这些问题,提议根据感染急性期和恢复期的随时间的抗体效价升高进行判断,但是,至恢复期进行抗体检查非常花费时间,因此治疗延迟,对患者造成症状的拖延、恶化,并且进一步地,可能产生继发感染引起的感染扩大的不利影响。

[0005] 另外,为了解决上述问题,公开了用于诊断肺炎支原体感染病的、特异性地检测属于肺炎支原体的微生物的有用抗体,以及检测方法。

[0006] 例如,专利文献 1 记载了应用针对约 43 千道尔顿(KDa)的肺炎支原体的膜抗原蛋白质的单克隆抗体的免疫检测法。另外,专利文献 2 记载了应用针对核糖体蛋白质 L7/L12 的抗体,可以准确性良好地进行肺炎支原体的检测。另外,专利文献 3 记载了通过针对肺炎支原体的 P1 蛋白质的单克隆抗体(其仅显示与支原体属的其它种或共存菌群的其它病原种 1% 或更低的交差反应性),可以进行肺炎支原体感染的迅速且特异的诊断。

[0007] 但是,对于上述抗体以及应用该抗体的检测法,为了检测临床样本中属于肺炎支原体的微生物,有时也需要对含有该微生物的样本进行复杂的预处理,另外,具有对于特异性、灵敏度低的肺炎支原体的特异性诊断不充分的问题。

[0008] (3) 生殖支原体和疾病

非淋菌性尿道炎的主要病因菌已知沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)。但是,在非

淋菌性尿道炎患者中,检测出沙眼衣原体的为 30 ~ 40% 左右,多数其症状的来源不明。除了沙眼衣原体,关注支原体属以及脲原体属的微生物,特别地,生殖支原体显示为非淋菌性尿道炎以及性行为感染病的病因菌中的一种。

[0009] (4) 生殖支原体感染病的检查现状

对于生殖支原体感染病,论文中有利用培养法、PCR 法的报告实例,但由于这些方法不能进行迅速的诊断,需要迅速且特异性地检测临床样本中属于生殖支原体的微生物的方法。

[0010] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1 :日本特开昭 63-298 号公报

专利文献 2 :国际公开 W02001/057199 号小册子

专利文献 3 :日本特开平 5-304990 号公报。

发明内容

[0011] 根据以前的方法,不能迅速且特异性地检测属于肺炎支原体和 / 或生殖支原体的微生物。因此目前的情况是,无法迅速地诊断肺炎支原体和 / 或生殖支原体感染病,治疗延迟,对患者造成症状的拖延、恶化,并且进一步地,可能产生继发感染引起的感染扩大的不利影响。如果能够迅速地检测、诊断对这些支原体的感染,则施用对支原体有效的大环内酯类抗生素成为可能,可以在感染初期开始准确的治疗。

[0012] 另一方面,已知肺炎支原体和生殖支原体在血清学上非常相近,但如上述,由于肺炎支原体和生殖支原体的感染部位(组织、器官等)不同,认为如果可以鉴定可特异性地检测两种微生物的分子,则可以以该分子为指标诊断两种感染病。

[0013] 本发明鉴于上述问题作出,其目的是提供:鉴定用于迅速且特异性地诊断肺炎支原体和 / 或生殖支原体感染病的分子、并以该分子为指标的检测方法,以及检测试剂盒。

[0014] 本发明者反复深入研究了上述现状,结果发现,为了迅速且特异性地检测肺炎支原体和 / 或生殖支原体感染,以属于肺炎支原体和 / 或生殖支原体的微生物所具有的 DnaK 为指标。DnaK 蛋白质也称为热休克蛋白 70 (Hsp70),其作为细胞暴露于热等应激条件下时表达量升高而保护细胞的一群蛋白质而发现,目前已知与翻译蛋白质的细胞内输送、重折叠(分子伴侣功能)有关。在免疫学测定法中,以 DnaK 蛋白质为指标的优点是:(1)DnaK 蛋白质是与蛋白质的输送、重折叠有关的蛋白,因此是平素表达的蛋白质,(2)总蛋白质中的 1% 左右是 DnaK,(3)存在形式不是单聚体,存在 3 聚体、6 聚体、其以上的多聚体。

[0015] 本发明根据这些知识而完成。

[0016] 即,根据本发明,提供了以下事项。

[0017] [1] 肺炎支原体或生殖支原体的检测方法,其特征是,以肺炎支原体或生殖支原体的 DnaK 为指标。

[0018] [2] [1] 的方法,其中对 DnaK 蛋白质进行免疫学分析。

[0019] [3] 对肺炎支原体或生殖支原体具有特异性的抗 DnaK 抗体。

[0020] [4] 肺炎支原体或生殖支原体的检测用试剂盒,其含有 [3] 的抗 DnaK 抗体。

[0021] [5] [1] 的方法,其以 DnaK 基因为指标。

[0022] [6] 对肺炎支原体或生殖支原体具有特异性的引物或探针。

[0023] [7] 肺炎支原体或生殖支原体的检测用试剂盒,其含有[6]的引物或探针。

[0024] 本发明中“该微生物”意味着肺炎支原体或生殖支原体,特别是指具有病原性、作为下述疾病的原因菌诊断意义高的微生物。本发明中,“与该微生物特异性地反应的抗体”指与该微生物的种或属特异性地反应的抗体,在微生物感染病的诊断中与该微生物的种特异性地反应的抗体是特别有用的。

[0025] 根据以本发明中的特定分子为指标检测属于肺炎支原体和 / 或生殖支原体的微生物的方法,可以迅速且特异性地诊断该微生物引起的肺炎支原体和 / 或生殖支原体感染病。

附图说明

[0026] [图 1] 是显示比较肺炎支原体 M129 株(P1 基因型 : I 型)和 FH 株(P1 基因型 : II 型)中的 DnaK 基因(序列号 6)的碱基序列(第 1 ~ 720 号)的结果的说明图。

[0027] [图 2] 是在图 1 之后、显示比较肺炎支原体两株中的 DnaK 基因的碱基序列(第 721 ~ 1440 号)的结果的说明图。

[0028] [图 3] 是在图 1 以及图 2 之后、显示比较肺炎支原体两株中的 DnaK 基因的碱基序列(第 1441 ~ 1788 号)的结果的说明图。

[0029] [图 4] 是显示比较肺炎支原体 M129 株(P1 基因型 : I 型)和 FH 株(P1 基因型 : II 型)中的 P1 基因(M129 株 : 序列号 7、FH 株 : 序列号 8)的碱基序列(关于 M129 株的第 1 ~ 717 号)的结果的说明图。

[0030] [图 5] 是在图 4 之后、显示比较肺炎支原体两株中的 P1 基因的碱基序列(关于 M129 株的第 718 ~ 1416 号)的结果的说明图。

[0031] [图 6] 是在图 4 以及图 5 之后、显示比较肺炎支原体两株中的 P1 基因的碱基序列(关于 M129 株的第 1417 ~ 2136 号)的结果的说明图。

[0032] [图 7] 是在图 4 ~ 图 6 之后、显示比较肺炎支原体两株中的 P1 基因的碱基序列(关于 M129 株的第 2137 ~ 2856 号)的结果的说明图。

[0033] [图 8] 是在图 4 ~ 图 7 之后、显示比较肺炎支原体两株中的 P1 基因的碱基序列(关于 M129 株的第 2857 ~ 3564 号)的结果的说明图。

[0034] [图 9] 是在图 4 ~ 图 8 之后、显示比较肺炎支原体两株中的 P1 基因的碱基序列(关于 M129 株的第 3565 ~ 4284 号)的结果的说明图。

[0035] [图 10] 是在图 4 ~ 图 9 之后、显示比较肺炎支原体两株中的 P1 基因的碱基序列(关于 M129 株的第 4285 ~ 4884 号)的结果的说明图。

具体实施方案

[0036] 以下对本发明进行更详细地说明,以下组成要素的说明是本发明实施方案的代表例,本发明不仅特定于这些内容。

[0037] 本发明的肺炎支原体或生殖支原体的检测方法的特征是,以该微生物的 DnaK 为指标,检测肺炎支原体和 / 或生殖支原体(即,肺炎支原体或生殖支原体中的任一种,或肺炎支原体以及生殖支原体两种,特别优选肺炎支原体以及生殖支原体两种),通过检测这些

微生物,可以诊断肺炎支原体感染病和 / 或生殖支原体感染病。

[0038] 根据本发明诊断的肺炎支原体感染病是支原体肺炎。另外,生殖支原体感染病是非淋菌性非衣原体尿道炎、宫颈炎。

[0039] 诊断肺炎支原体感染病时,可以使用可能存在肺炎支原体的样本,例如可列举咽拭子、鼻腔拭子、鼻腔吸引液、鼻涕、喀痰、肺泡洗涤液。诊断生殖支原体感染病时,可以使用可能存在生殖支原体的样本,例如可列举尿、尿道 / 宫颈擦拭物。上述两种感染病是哪一种的识别可根据作为测定对象的样本的采取部位决定。

[0040] 本发明中作为指标的 DnaK 例如肺炎支原体来源的 DnaK 蛋白质(NCBI 号: NP_110122)、DnaK 基因(NCBI 号: NC_000912 REGION: 521837..523624) 或生殖支原体来源的 DnaK 蛋白质(NCBI 号: AAC71527)、DnaK 基因(NCBI 号: L43967 REGION: 374919..376706)。上述列举的蛋白质或基因是属于该微生物的一个菌株的例子,本发明中作为对象的该微生物所具有的 DnaK 序列显示为与上述 DnaK 蛋白质或基因相应的序列。

[0041] 另外,如实施例 8 所示的肺炎支原体的 DnaK 基因在肺炎支原体的 P1 基因型不同的株间也是 100% 一致的,另外,其在不同分离时和过去 50 年间也未见变异。由此认为,肺炎支原体的 DnaK 基因以及 DnaK 蛋白质的序列是稳定的。由此,优选参考前述 NCBI 中公开的基因序列或蛋白质序列。

[0042] 1. 应用抗体的该微生物的检测方法以及试剂盒

检测本发明的肺炎支原体或生殖支原体的方法的第一方案的特征是,应用对该微生物具有特异性的抗 DnaK 抗体。另外,选择特异性抗体时,对该微生物的灵敏度是至少 10^5 CFU/mL 以上、优选 10^4 CFU/mL 以上、更优选 10^3 CFU/mL 以上,对对象以外的微生物的灵敏度是至少 10^7 CFU/mL 以下、优选 10^8 CFU/mL 以下。

[0043] 本发明中可用的抗体可以使用多克隆抗体或单克隆抗体中的任一种,其可以通过以下方法或其它类似的方法取得,但不限于这些方法。

[0044] 该抗体的制备方法的第一方案可以应用上述 DnaK 蛋白质的全长或其部分肽进行制备。对于该 DnaK 蛋白质的基因序列以及氨基酸序列已知的微生物,可以对与其它微生物中该蛋白质的氨基酸序列相似性少的区域合成肽片段。用于制备抗体的肽长度没有特别限定,在针对该 DnaK 蛋白质的抗体的情况下,具有表征该蛋白质的长度即可,优选应用 5 个氨基酸以上、特别优选 8 个氨基酸以上的肽即可。将该肽或全长蛋白质原样地或与 KLH(匙孔血蓝蛋白)、BSA(牛血清白蛋白)等载体蛋白交联后,按需要与佐剂共同接种动物,通过回收其血清可获得包含识别该 DnaK 蛋白质的抗体(多克隆抗体)的抗血清。另外,也可以从抗血清纯化抗体而使用。接种动物是绵羊、马、山羊、兔、小鼠、大鼠等,特别地,在多克隆抗体制备中优选兔、山羊等。另外,也可以通过制备杂交瘤细胞的公知方法获得单克隆抗体,这种情况下优选小鼠。

[0045] 另外,可以将该蛋白质的全长或 5 个残基以上、期望地 8 个残基以上的氨基酸序列作为与谷胱甘肽 S- 转移酶等的融合蛋白质纯化、或未纯化地原样用作抗原。也可以这样制备,通过书籍(Antibodies; A laboratory manual, E. Harlow 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press) 中示出的各种方法以及基因克隆法等,应用分离的免疫球蛋白基因,在培养的细胞中表达基因重组抗体。

[0046] 进一步地,通过根据公知的手法从如上述制备的抗体选择与肺炎支原体和 / 或生

殖支原体(即,肺炎支原体或生殖支原体中的任一种,或肺炎支原体以及生殖支原体两种,特别优选肺炎支原体以及生殖支原体两种)特异性地反应、与其以外的病原菌不反应的抗体,可以制备特异性高的该抗体。

[0047] 除前述的方法以外,对于可以作为本发明的标记抗原应用的该 DnaK 的抗体也可以通过以下方法或其它类似的方法取得,但不限于这些方法。

[0048] a) 对于该 DnaK 蛋白质的基因序列以及氨基酸序列已知的微生物,对与其它微生物中的该蛋白质的氨基酸序列相似性少的区域合成肽片段,将其作为免疫原制备多克隆抗体或单克隆抗体,从而可以获得目的抗体。

[0049] 另外,通过通常的基因操作手法,可以获得该基因的全长序列,所述手法为:应用以已知的该基因的两端部位中的 DNA 序列作为引物的 PCR 法的基因扩增、将相同部分序列作为模板探针的杂交法等。

[0050] 其后,构建与其它蛋白质基因的融合基因等,以大肠杆菌等作为宿主利用公知的基因导入手法在宿主内插入该融合基因,大量表达后,对用作融合蛋白质的蛋白质通过抗体亲和柱法等纯化表达蛋白质,从而可以获得目的蛋白质抗原。该情况下,由于该 DnaK 蛋白质的全长蛋白质成为抗原,取得对于在对象以外的微生物间保守的氨基酸部分的抗体也不合乎本发明的目的。因此,对于根据本方法获得的抗原,通过公知的手法取得产生单克隆抗体的杂交瘤,选择产生仅与该微生物反应的抗体的克隆,从而可以取得目的抗体。

[0051] b) 对于该 DnaK 蛋白质的氨基酸序列未知的微生物,一个方法是,由于该 DnaK 蛋白质的氨基酸序列在菌种间 80 ~ 100%、优选 90 ~ 100% 相同,基于其氨基酸序列的相同部分的序列通过 PCR 法进行特定序列部分的基因扩增,通过应用以相同部分序列作为模板探针的杂交法等通常的基因操作手法,可以容易地取得该蛋白质基因。

[0052] 对于目的蛋白质抗原的取得,构建该蛋白质基因与其它蛋白质基因的融合基因等,以大肠杆菌等为宿主通过公知的基因导入手法向宿主内插入该融合基因并使其大量表达。其后,通过对用作融合蛋白质的蛋白质的抗体亲和柱法等,可以取得表达蛋白质。该情况下,由于该 DnaK 蛋白质的全长蛋白质成为抗原,取得对于在对象以外的微生物间保守的氨基酸部分的抗体也不合乎本发明的目的。因此,对于根据本方法获得的抗原,通过公知的手法取得产生单克隆抗体的杂交瘤,选择产生仅与该微生物反应的抗体的克隆,从而可以取得目的抗体。

[0053] c) 或者,作为该 DnaK 蛋白质的氨基酸序列未知情况下的其它方法,制备与已知的该 DnaK 蛋白质的氨基酸序列中在该微生物间保守的共有序列部分相当的 5 ~ 30 个氨基酸的合成肽,针对其肽序列,用公知的方法制备多克隆抗体或单克隆抗体。通过应用该抗体的亲和柱胶体金层析(chromato)纯化目的微生物细胞裂解液,可以获得高度纯化的该 DnaK 蛋白质。对于蛋白质的纯化度不足的情况,应用作为公知纯化手法的离子交换色谱、疏水色谱、凝胶过滤等手法,可以提高纯化度。基于得到的纯化 DnaK 蛋白质抗原,通过公知的方法取得杂交瘤,选择与目的微生物特异性地反应的杂交瘤,从而可以取得目的抗体。

[0054] 作为该抗体的制备方法的第二方案,如实施例 1 所示地,以肺炎支原体作为免疫原,可以制备与该 DnaK 蛋白质反应的肺炎支原体和 / 或生殖支原体具有特异性的抗体。

[0055] 另外,同样地,也可以以生殖支原体作为免疫原进行制备。以上述微生物作为免疫原的情况下,免疫原的配制可以利用公知的方法进行。公知的方法可举出超声波处理、热处

理、表面活性剂处理、福尔马林处理、冷冻融解处理、盐酸处理。

[0056] 对于通过上述的方法得到的对于该微生物具有特异性的本发明的抗体,通过将其应用于各种免疫学分析法,可以提供对该目的微生物特异的各种检测试剂以及试剂盒。

[0057] 该抗体可以在公知的全部免疫学分析法中利用。例如,其可以在下列方法中利用:使该抗体在聚苯乙烯乳胶粒子上吸附的凝集反应法,在微量滴定板中进行的 ELISA 法,免疫胶体金层析 (immunochromato) 法,将用着色粒子或具有显色能的粒子、磁粒子、酶或荧光体标记的该抗体单独或以多个组合的夹心法等。

[0058] 另外,在本发明的以 DnaK 为指标的检测方法中,可以不活跃破坏细胞而特异性地检测肺炎支原体和 / 或生殖支原体,进一步,为了高灵敏度地测定,可以使用公知的微生物的处理方法。具体地,应用下列方法:应用以 TritonX-100、Tween-20、SDS 为首的各种表面活性剂的提取试剂的处理法,应用适当的蛋白酶等酶的酶处理法,以通过物理方法破碎微生物细胞为首的已知的细胞结构破碎方法。期望的是,根据表面活性剂等的组合,对每个微生物根据试剂设定最适的提取条件。

[0059] 另外,在本发明中,应用抗体的该微生物检测用试剂盒与应用该检测方法的检测用试剂盒相当。

[0060] 可以含有至少 1 种本发明的抗体,适应于使用的免疫测定法,可以适当变更使用的抗体的数目、种类、组合。进一步地,作为样本的预处理,也可以包含利用上述提取法的预处理液。

[0061] 2. 应用基因的该微生物的检测方法以及试剂盒

DNA 的提取方法可以适用公知的方法。例如,可列举对样本通过表面活性剂进行可溶化、进行通过除蛋白剂除蛋白等操作而获得 DNA 的方法等。优选地,如果后述的该 DnaK 基因的解析是可能的,例如,在随后通过 PCR 法进行基因扩增的情况下,优选在不含 PCR 反应的阻害物质的状态下配制。

[0062] 样本的预处理方法也可以使用应用上述抗体的该微生物的检测方法和同样的方法。

[0063] DNA 提取量为,提取使随后进行的该 DnaK 基因的解析成为可能的量即可。在用于 PCR 法的情况下,例如,每个反应为 5 ~ 50fg 以上。

[0064] 应用提取的 DNA 进行该 DnaK 基因的解析。该 DnaK 基因的解析根据公知的方法进行。例如,有利用 PCR 法检测该 DnaK 基因的扩增的方法、利用探针法鉴定该 DnaK 基因的方法。例如,利用 PCR 法的该 DnaK 基因的扩增可以是任何方法,只要可以扩增目的碱基序列即可,利用探针法的该 DnaK 基因的鉴定可以是任何方法,只要可以鉴定目的碱基序列即可。

[0065] 为了进行该 DnaK 基因的目的碱基序列的扩增或鉴定,可以适宜选择并应用与肺炎支原体和 / 或生殖支原体显示 80 ~ 100% 同源性、与其以外的病原微生物显示优选 60% 以下的同源性的序列。另外,这些引物、探针只要能扩增目的 DNA 片段即可,也可以在上述的碱基序列中存在变异、缺失、添加。

[0066] 例如,扩增肺炎支原体的 DnaK 基因时,如后述的实施例中那样的,可以基于 NCBI 中公开的肺炎支原体的 DnaK 基因序列 (NCBI 编号: NC_000912 REGION: 521837..523624) 设计 PCR 扩增引物。具体地,为了扩增前述 DnaK 基因的全长,可以使用有义引物 MpDnaK __ S 以及反义引物 MpDnaK __ A。

[0067] 另一方面,扩增生殖支原体 DnaK 基因时,可以基于 NCBI 中公开的生殖支原体的 DnaK 基因序列(NCBI 编号:L43967 REGION: 374919..376706)设计 PCR 扩增引物。

[0068] 另外,如实施例 8 所示地,肺炎支原体的 DnaK 基因在肺炎支原体的 P1 基因型不同的株间也是 100% 一致的,另外,在不同分离时和过去 50 年间也未见到变异。据此,对于特异性地检测肺炎支原体的 DnaK 基因,不必考虑肺炎支原体的株间的差异,通过考虑与其它菌株的差异就能够进行设计。

[0069] 另外,肺炎支原体的 DnaK 蛋白质的序列也考虑为稳定的,因此,认为应用其制备的抗体没有由基因型、地域、年代引起的反应性差异,可以在广泛的地域、年代中使用。

[0070] 应用本发明的基因的该微生物检测用试剂盒相当于应用该检测方法的检测用试剂盒。其为用于在肺炎支原体和 / 或生殖支原体的特异性的检测方法中应用的试剂盒,其特征至少包含用于扩增对该目的 DnaK 基因特异的碱基序列的 2 种引物。

[0071] 另外,作为其它的方案,其特征至少包含用于鉴定对该目的 DnaK 基因特异的碱基序列的 1 种探针。

[0072] 进一步地,作为样本的预处理,也可以包含利用上述提取法的预处理液。

实施例

[0073] 以下通过实施例对本发明进行具体地说明,但它们不限定本发明的范围。

[0074] 实施例 1:肺炎支原体以及生殖支原体特异性的抗原的鉴定,以及该特异性抗体的制备

(1) 对肺炎支原体以及生殖支原体具有特异性的单克隆抗体的制备

(1-1) 免疫菌株的培养以及免疫抗原的配制

将肺炎支原体 6 株(FH Bru Mac M52 PI1428 M129-B7 株:从 ATCC 购买)的各株分别接种到 PPL0 葡萄糖肉汤(含有马血清、新鲜酵母提取物、醋酸亚铊)中,在 37°C 在需氧条件下培养 7 天。将离心回收的各菌体洗涤后,在 PBS 中悬浮并冻融处理,将得到的物质作为免疫抗原。

[0075] (1-2) 免疫

在免疫致敏中,使用 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠(日本クレア社)。将来自各菌体的抗原溶液分别用弗氏完全佐剂(SIGMA 社)乳化,将抗原 100 μ g 在小鼠中皮下注射。其后,在 2 周间将用弗氏不完全佐剂(SIGMA 社)乳化的抗原 50 μ g 皮下注射,直至见到对免疫原的抗体效价升高。进一步地,在细胞融合 3 日前,将用 PBS 稀释的抗原 25 μ g 注射在腹腔内。

[0076] (1-3) 杂交瘤制备

根据常规方法,进行以下的操作。将从免疫致敏小鼠无菌取出的脾脏细胞和骨髓瘤细胞(P3U1)用聚乙二醇 1500 (Roche 社)融合,种植在 96 孔平板中。应用 HAT 培养基选择培养杂交瘤细胞,对于这些培养上清,在以下的 ELISA 条件下实施筛选。在 ELISA 的固相化中,使用衍生自作为免疫原的 6 种的各株的各肺炎支原体抗原 1 μ g/mL。封闭处理后,添加培养上清,使其在 4°C 反应过夜。用洗涤液洗涤 3 次后,添加 2000 倍稀释的 HRP 标记兔抗小鼠 Ig 抗体(Dako 社),在室温反应 1 小时。用洗涤液洗涤 3 次后,添加基质(TMBZ)溶液,在室温反应 10 分钟。反应停止后,测定 450nm 的吸光度。对由此选出的杂交瘤通过限度稀释法实施克隆,建立克隆株。对从其中 16 株产生的单克隆抗体进行以下的研究。得到的克隆

株与来自 6 种各株的免疫抗原中的任一都有反应。

[0077] (1-4) 单克隆抗体的识别蛋白质的分子量的确认

通过蛋白质印迹,确认了上述 16 种单克隆抗体的识别蛋白质的分子量。对肺炎支原体抗原(FH 株)10 μ g 进行 SDS-PAGE,接着在硝酸纤维素膜上印迹。将各克隆的培养上清添加在膜上,在室温反应 1 小时。用洗涤液洗涤 3 次后,添加 1000 倍稀释的 HRP 标记兔抗小鼠 Ig 抗体,在室温反应 1 小时。用洗涤液洗涤 3 次后,添加基质(4-氯-1-萘酚)溶液,并在室温反应 10 分钟。显色后,用蒸馏水洗涤并停止反应。

[0078] 其结果证明,10 种识别 62 ~ 69KDa 的分子,6 种识别 40 ~ 45KDa 的分子。由此,对取得数多的认为抗原性高的 62 ~ 69KDa 的分子,接着尝试抗原的鉴定。

[0079] (1-5) 取得抗体的亚类的鉴定

应用 Iso Strip (Roche 社) 确认识别 62 ~ 69KDa 的分子的单克隆抗体 10 种的亚类时,证明 6 种是 H 链 G1/L 链 κ , 1 种是 H 链 G1/L 链 λ , 1 种是 H 链 2b/L 链 κ , 1 种是 H 链 2b/L 链 λ , 1 种是 H 链 2a/L 链 λ 。

[0080] (2) 肺炎支原体以及生殖支原体特异性的抗原的鉴定

(2-1) 单克隆抗体识别抗原的纯化

(2-1-1) 菌体培养

在抗原纯化中,应用迄今全基因序列确定的肺炎支原体 M129-B7 株菌体。将肺炎支原体(M129-B7 株)在 PPL0 葡萄糖肉汤(含有马血清、新鲜酵母提取物、醋酸亚铊)中接种,在 37°C 在需氧条件下培养 7 日。洗涤离心回收的菌体后,将其在 PBS 中悬浮并冷冻处理。

[0081] (2-1-2) 利用亲和色谱的识别抗原的纯化

在 CNBr-活化的 Sepharose 4B(GE ヘルスケア社)上,使(1)中得到的单克隆抗体 MCM12 与柱载体结合,制备抗原纯化用亲和柱。对于与柱载体的结合,在 0.1 mol/L NaHCO_3 -NaOH、0.5 mol/L NaCl (pH8.3) 下使 IgG 5mg/mL 凝胶在 4°C 反应过夜。未反应基团的封闭应用 0.2 mol/L 甘氨酸缓冲液(pH8)。

[0082] 将从肺炎支原体菌体提取的蛋白质施用于柱,溶出非吸附级分后,利用 3 mol/L 硫氰酸钠溶出、回收柱吸附级分。将其用 50mmol/L PBS (pH7) 透析,作为纯化物。

[0083] (2-2) 取得单克隆抗体的识别蛋白质的鉴定

(2-2-1) 识别蛋白质在 SDS-PAGE 上的分子量确认

将纯化抗原通过 SDS-PAGE 以及蛋白质印迹进行解析。将纯化抗原 0.1 μ g 进行 SDS-PAGE,接着在硝酸纤维素膜上印迹。将单克隆抗体 MCM12 或单克隆抗体 MCM19 的 10 μ g/mL IgG 溶液分别添加在膜上,在室温反应 1 小时。用洗涤液洗涤 3 次后,添加 1000 倍稀释的 HRP 标记兔抗小鼠 Ig 抗体,在室温反应 1 小时。用洗涤液洗涤 3 次后,添加基质(4-氯-1-萘酚)溶液,使其在室温反应。显色后,用蒸馏水洗涤,停止反应。

[0084] 可以确认,任一抗体都识别纯化抗原。

[0085] (2-2-2) 纯化抗原的 N 末端氨基酸序列解析

根据常规方法,解析纯化抗原蛋白的 N 末端 10 个氨基酸残基。将纯化抗原进行 SDS-PAGE,将在 PVDF 膜上印迹的样本用 50% 甲醇 / 0.1% 三氟乙酸、甲醇洗涤后干燥,实施自 N 末端 10 个循环的氨基酸序列分析。在解析装置中,使用蛋白质测序仪 PPSQ-23A (岛津制作所) 和 PTH 分析仪 SPD-10A (岛津制作所)。

[0086] 其结果是,得到以下的序列。

[0087] STDNGLIIGI (序列号 1)

根据常规方法,通过应用数据库 Swiss-Prot 的检索,得到的序列与肺炎支原体的伴侣蛋白 DnaK 的第 2 ~ 11 个残基的序列完全一致。另外,从该氨基酸序列推定的该 DnaK 的分子量是 65KDa,与蛋白质印迹上的抗体识别抗原的分子量几乎一致。

[0088] 根据以上可以确认,上述取得的抗体是肺炎支原体以及生殖支原体特异性的抗 DnaK 抗体。

[0089] 实施例 2 :利用 ELISA 法取得的抗体的灵敏度以及交差性的研究

在实施例 1 中得到的单克隆抗体内,使用单克隆抗体 MCM12 以及单克隆抗体 MCM19 对该抗体的灵敏度以及交差性进行研究。

[0090] (1) 试验菌株的培养以及配制

(1-1) 灵敏度试验用菌株

将表 1 中示出的肺炎支原体 8 株在 PPL0 葡萄糖肉汤(含有马血清,新鲜酵母提取物,醋酸亚铊)中接种,在 37℃ 需氧培养 4 日,将肉汤的 pH 成为 6.8 的菌作为试验菌应用。对于肉汤中的菌数,用灭菌 PBS 制备 10 梯度稀释液,将其各稀释液在 PPL0(含有马血清、新鲜酵母提取物、醋酸亚铊)琼脂培养基上 10 μ L 接种后,在 37℃ 培养 10 天。将琼脂培养基上的发育集落用 40 倍的光学显微镜测定集落数,算出菌数。

[0091] [表 1]

菌株	ATCC 号
肺炎支原体 FH	15531
肺炎支原体 Bru	15377
肺炎支原体 突变体 22	39505
肺炎支原体 Mac	15492
肺炎支原体 M52	15293
肺炎支原体 PI1428	29085
肺炎支原体 M129-B7	29342
肺炎支原体 UTMB-10P	49894

[0092] (1-2) 交差性试验用菌株 -1

将(1-1)中示出的肺炎支原体以外的支原体属、脲原体属、无胆甾支原体属(Acholeplasma)的各自菌株用表 2 示出的肉汤以及培养条件培养。另外,培养在 37℃ 实施。另外,表 2 中的“需氧”以及“厌氧”分别显示为需氧培养以及厌氧培养。对于肉汤中的菌数,用灭菌 PBS 制备 10 梯度稀释液,将其各稀释液在 PPL0 (含有马血清、新鲜酵母提取物、醋酸亚铊)琼脂培养基上 10 μ L 接种后,在 37℃ 培养 10 天。将琼脂培养基上的发育集落用 40 倍的光学显微镜测定集落数,算出菌数。在试验菌数 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL 下实施。

[0093] [表 2]

菌名	ATCC 号	使用培养基	培养条件
生殖支原体 (<i>Mycoplasma genitalium</i>)	33530	PPLO 葡萄糖肉汤 (铊 (タリウム))	4 日, 需氧
发酵支原体 (<i>Mycoplasma fermentans</i>)	19989	PPLO 葡萄糖肉汤	4 日, 需氧
莱氏无胆甾原体 (<i>Acholeplasma laidlawii</i>)	23206	PPLO 葡萄糖肉汤	4 日, 需氧
目无胆甾原体 (<i>Acholeplasma oculi</i>)	51735	PPLO 葡萄糖肉汤	4 日, 需氧
穿透支原体 (<i>Mycoplasma penetrans</i>)	55252	PPLO 葡萄糖肉汤	4 日, 需氧
梨支原体 (<i>Mycoplasma pirum</i>)	25960	PPLO 葡萄糖肉汤	4 日, 需氧
人型支原体 (<i>Mycoplasma hominis</i>)	23114	PPLO 精氨酸肉汤 (铊)	3 日, 需氧
口腔支原体 (<i>Mycoplasma orale</i>)	23714	PPLO 精氨酸肉汤	3 日, 需氧
唾液支原体 (<i>Mycoplasma salivarium</i>)	23064	PPLO 精氨酸肉汤	3 日, 需氧
关节炎支原体 (<i>Mycoplasma arthritidis</i>)	19611	PPLO 精氨酸肉汤	3 日, 需氧
颊支原体 (<i>Mycoplasma buccale</i>)	23636	PPLO 精氨酸肉汤	3 日, 需氧
咽支原体 (<i>Mycoplasma faucium</i>)	25293	PPLO 精氨酸肉汤	3 日, 厌氧
嗜脂支原体 (<i>Mycoplasma lipophilum</i>)	27104	PPLO 精氨酸肉汤	3 日, 需氧
灵长类支原体 (<i>Mycoplasma primateum</i>)	25948	PPLO 精氨酸肉汤	3 日, 需氧
嗜精支原体 (<i>Mycoplasma spermatophilum</i>)	49695	PPLO 精氨酸肉汤	3 日, 厌氧
微小脲原体 (<i>Ureaplasma parvum</i>)	700970	T- 肉汤	2 日, 需氧
解脲脲原体 (<i>Ureaplasma urealyticum</i>)	27618	T- 肉汤	2 日, 需氧

[0094] (1-3) 交差性试验用菌株 -2

将用于(1-1)以及(1-2)中使用的支原体属、脲原体属、无胆甾支原体属以外的细菌、真菌的交差反应性试验的微生物以及其培养条件分别示于表3~6中。另外,作为使用的培养基,使用心浸液琼脂(デイフコ社)、胰蛋白胍大豆 II 绵羊琼脂培养基(ベクトン デツキンソン社)、巧克力琼脂培养基(日水社)、改良 GAM 琼脂培养基(日水社)、Skirrow 琼脂培养基(ベクトン デツキンソン社)、沙氏葡萄糖琼脂(デイフコ社)。

[0095] 这些菌在琼脂培养基中培养后,使其悬浮于灭菌 PBS 中成为 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL,作为试验菌。对于菌数测定,将悬浮于灭菌 PBS 中的试验菌液用相同缓冲液 10 梯度稀释,将其分别以 50 μ L 接种在琼脂培养基中,用肉眼测定培养基上发育的集落。

[0096] 另外,表中的菌株号栏的空白部分是从临床材料分离鉴定的。

【表 3】

菌株名	菌株号	使用培养基	条件
卡他布兰汉氏菌(<i>Branhamella catarrhalis</i>)		心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
弗氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter freundii</i>)	ATCC 8090	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>)	ATCC 13047	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	ATCC 25932	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
赫氏埃希菌(<i>Escherichia hermannii</i>)	ATCC 33650	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
肺炎克雷伯菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	ATCC 27736	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
非脱羧鞘菌(<i>Lectercia adcarboxylata</i>)		心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
奇异变形杆菌(<i>Proteus mirabilis</i>)	ATCC29906	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
普通变形杆菌(<i>Proteus vulgaris</i>)	ATCC 6380	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
绿脓杆菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	ATCC 27853	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
嗜麦芽假单胞菌(<i>Pseudomonas maltophilia</i>)	IFO 12690	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
猪霍乱沙门菌霍乱亚种肠炎血清型(<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>Choleraesuis</i> serovar <i>enteritidis</i>)	JCM 1652	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
猪霍乱沙门菌霍乱亚种伤寒血清型(<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>Choleraesuis</i> serovar <i>thyphimutium</i>)	JCM 6977	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
粘质沙雷氏菌(<i>Serratia marcescens</i>)	ATCC 13880	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	JCM 2151	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	JCM 2179	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
表皮葡萄球菌(<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	JCM 2414 [†]	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
溶血性葡萄球菌(<i>Staphylococcus haemolyticus</i>)	ATCC29970	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
人葡萄球菌(<i>Staphylococcus hominis</i>)	ATCC27844	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
猪葡萄球菌(<i>Staphylococcus hyicus</i>)	ATCC11249	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧
沃氏葡萄球菌(<i>Staphylococcus warneri</i>)	ATCC27836	心浸液琼脂	37℃, 18小时, 需氧

【表 4】

菌株名	菌株号	使用培养基	培养条件
鸟肠球菌(<i>Enterococcus avium</i>)	JCM8722	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
铅黄肠球菌(<i>Enterococcus casseliflavus</i>)	JCM 5675	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
铅黄肠球菌(<i>Enterococcus casseliflavus</i>)	JCM 5675	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
铅黄肠球菌(<i>Enterococcus casseliflavus</i>)	JCM 5675	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
耐久肠球菌(<i>Enterococcus durans</i>)	JCM8725	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC51299	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>)	JCM 5803	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
屎肠球菌(<i>Enterococcus faecium</i>)	JCM 5804	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
鸭鸡肠球菌(<i>Enterococcus gallinarum</i>)	JCM8728	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
蒙氏肠球菌(<i>Enterococcus mundtii</i>)	JCM8731	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
无乳链球菌(<i>Streptococcus agalactiae</i>)	ATCC13813	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
咽峡炎链球菌(<i>Streptococcus anginosus</i>)		胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
牛链球菌(<i>Streptococcus bovis</i>)	JCM5802 [†]	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
星座链球菌(<i>Streptococcus constellatus</i>)		胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
停乳链球菌(<i>Streptococcus dysgalactiae</i>)	JCM5673	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
马肠链球菌(<i>Streptococcus equinus</i>)	JCM7879 [†]	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
米氏链球菌(<i>Streptococcus milleri</i>)		胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
轻型链球菌(<i>Streptococcus mitis</i>)		胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
变形链球菌(<i>Streptococcus mutans</i>)	JCM5705 [†]	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
口腔链球菌(<i>Streptococcus oralis</i>)		胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
肺炎链球菌(<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	ATCC 10389	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
产脓链球菌(<i>Streptococcus pyogenes</i>)	JCM5707 [†]	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
唾液链球菌唾液亚种(<i>Streptococcus salivaris</i> subsp. <i>salivarius</i>)	JCM5708 [†]	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
血链球菌(<i>Streptococcus sanguis</i>)	JCM5709 [†]	胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧
乳房链球菌(<i>Streptococcus uberis</i>)		胰蛋白陈大豆 II 绵羊琼脂培养基	37℃, 18小时, 需氧

【表 5】

菌株名	菌株号	使用培养基	培养条件
嗜沫嗜血杆菌(<i>Haemophilus aphrophilus</i>)	cultiloops	巧克力琼脂培养基	37℃, 18小时, 5%CO ₂
溶血嗜血杆菌(<i>Haemophilus haemolyticus</i>)	T-30	巧克力琼脂培养基	37℃, 18小时, 5%CO ₂
流感嗜血杆菌(<i>Haemophilus influenzae</i>)	atcc33391	巧克力琼脂培养基	37℃, 18小时, 5%CO ₂
副溶血嗜血杆菌(<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>)	T-13	巧克力琼脂培养基	37℃, 18小时, 5%CO ₂
副流感嗜血杆菌(<i>Haemophilus parainfluenzae</i>)	T-10	巧克力琼脂培养基	37℃, 18小时, 5%CO ₂
奈瑟氏淋球菌(<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	ATCC49981	巧克力琼脂培养基	37℃, 18小时, 5%CO ₂
脑膜炎奈瑟菌(<i>Neisseria meningitidis</i>)血清型B		巧克力琼脂培养基	37℃, 18小时, 5%CO ₂
格氏乳球菌(<i>Lactococcus garvieae</i>)	JCM10343	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
乳酸乳球菌乳酸亚种(<i>Lactococcus lactis subsp Lactis</i>)	JCM5805	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
棉籽糖乳球菌(<i>Lactococcus raffinolactis</i>)	JCM5706	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
肠膜明串珠菌右旋葡聚糖亚种 (<i>Leuconostoc mesenteroides. subsp. dextranicum</i>)	JCM19700	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
肠膜明串珠球菌肠膜亚种(<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>)	JCM6124	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
单核细胞增生李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	4b	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
乳酸片球菌(<i>Pediococcus acidilactici</i>)	JCM8797	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
有害片球菌(<i>Pediococcus damnosus</i>)	JCM5886	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
戊糖片球菌(<i>Pediococcus pentosaceus</i>)	JCM5890	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
微小消化链球菌(<i>Peptostreptococcus micros</i>)	ATCC33270	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
牙龈卟啉单胞菌(<i>Porphyromonas gingivalis</i>)		改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
中间普里沃菌(<i>Prevotella intermedia</i>)	NCTC9336	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
口腔普里沃菌(<i>Prevotella oris</i>)	ATCC33573	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
脑膜炎黄杆菌(<i>Flavobacterium meningosepticum</i>)	KM 506	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
具核黄杆菌具核亚种(<i>Flavobacterium nucleatum sbsp. Nucleatum</i>)		改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
鲍曼不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>)	ATCC23055	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
内氏放线菌(<i>Actinomyces naeslundii</i>)	ATCC19039	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧
马氏棒状杆菌(<i>Corynebacterium matruchotii</i>)	ATCC14266	改良G A M琼脂培养基	37℃, 24小时, 厌氧

【表 6】

菌株名	菌株号	使用培养基	培养条件
空肠弯曲杆菌(<i>Campylobacter jejuni</i>)		Skirrow 琼脂培养基	37℃, 48 小时, 略微需氧
结肠弯曲杆菌(<i>Campylobacter coli</i>)		Skirrow 琼脂培养基	37℃, 48 小时, 略微需氧
白色假丝酵母(<i>Candida albicans</i>)血清型 A	A207	沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
白色假丝酵母(<i>Candida albicans</i>)血清型 B	B792	沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
杜氏假丝酵母(<i>Candida dubliniensis</i>)		沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
光滑假丝酵母(<i>Candida glabrata</i>)		沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
星形假丝酵母(<i>Candida stellatoidea</i>)		沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
近平滑假丝酵母(<i>Candida parapsilosis</i>)		沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
李也蒙假丝酵母(<i>Candida guilliermondii</i>)		沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
乳酒假丝酵母(<i>Candida kefyr</i>)		沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
热带假丝酵母(<i>Candida tropicalis</i>)		沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
克鲁斯假丝酵母(<i>Candida krusei</i>)		沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧
新型隐球菌(<i>Cryptococcus neoformans</i>)	ATCC24064	沙氏葡萄糖琼脂	25℃, 48 小时, 需氧

[0097] (2) ELISA 法中的灵敏度以及交差性的研究

(2-1) ELISA 法的构建

(2-1-1) 固相化抗体配制方法以及固相化方法

将含单克隆抗体 MCM19 的腹水进行硫酸铵分级分离后,应用 rProteinA Sepharose FF (GE ヘルステア社) 纯化 IgG,用 BCA 法实施蛋白质定量。在 96 孔的微量滴定板中使纯化 IgG 抗体(10 μ g/mL) 固相化。

[0098] (2-1-2) 碱性磷酸酶标记用抗体配制方法以及标记物制备方法

将含单克隆抗体 MCM12 的腹水进行硫酸铵分级分离后,应用 MEP Hypercel (日本ポール社) 实施 IgG 纯化。进一步地,将 IgG 用胃蛋白酶 F(ab')₂ 化后,将 F(ab')₂ 与碱性磷酸酶进行交联反应,制备碱性磷酸酶标记抗体。

[0099] (2-1-3) ELISA 法的实施方法

洗涤固相化 96 孔微量滴定板后,用含 1%BSA 的 0.1mmol/L TBS (pH7.5) 室温封闭 1 小时。添加试验菌液 100 μ L,在室温反应 1 小时。洗涤后,添加碱性磷酸酶标记抗体(10 μ g/mL),在室温反应 1 小时。洗涤后,用基质(pNPP)溶液显色 30 分钟,在反应停止后测定 405nm 下的吸光度。

[0100] (3) 灵敏度试验

用前述的 ELISA 测定试验菌(1-1),从见到吸光度 0.05 以上的最高稀释倍率的试验液算出菌数并在表 7 中示出。

[0101] 根据表 7 的结果,通过使用本单克隆抗体的 ELISA,对肺炎支原体的灵敏度判断为 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL。

[0102] [表 7]

菌株	ATCC 号	在ELISA中见到OD=0.05 以上的吸光度的菌数
肺炎支原体 FH	15531	3.1×10^4
肺炎支原体 Bru	15377	9.8×10^4
肺炎支原体 突变体 22	39505	8.0×10^4
肺炎支原体 Mac	15492	2.5×10^4
肺炎支原体 M52	15293	2.5×10^3
肺炎支原体 P11428	29085	3.5×10^3
肺炎支原体 M129-B7	29342	3.8×10^4
肺炎支原体 UTMB-10P	49894	2.3×10^3

[0103] (4) 交差性试验

用前述的 ELISA 测定试验菌(1-2)(表 2 中记载的肺炎支原体以外的支原体属、脲原体属、无胆甾支原体属)以及试验菌(1-3)(表 3 ~ 6 中记载的其它细菌、真菌)。

[0104] 生殖支原体以外的微生物全部吸光度不足 0.010。另一方面,对于生殖支原体,从见到吸光度 0.05 以上的最高稀释倍率的试验液算出菌数时,菌数为 6.9×10^4 cfu/mL。

[0105] 如这些结果所示可知,使用本单克隆抗体的 ELISA 见到与生殖支原体的交差性,与其以外的微生物没有交差性。

[0106] 根据以上确认,与诊断肺炎支原体或生殖支原体感染病时可能成为障碍的多数细菌以及真菌没有交差。

[0107] 实施例 3 :通过免疫胶体金层析法取得的抗体的灵敏度以及交差性的研究

(1) 免疫胶体金层析法的构建

(1-1) 作为检测用标记物的金胶体标记抗肺炎支原体抗体的制备

在通过在直径 40nm 的金胶体溶液(田中贵金属社) 18mL 中加入 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH11)2mL 而调节 pH 的金胶体溶液中,加入 100 μ g/mL 的单克隆抗体 MCM12 溶液 2.5mL 进行搅拌。搅拌 1 小时后,加入 1 质量% 聚乙二醇(Mw. 20000, 和光纯药社) 水溶液 1mL 进行搅拌,随后加入 10 质量%BSA 水溶液(SIGMA 社) 2mL 进行搅拌。将此溶液在 4 $^{\circ}$ C、8000G 离心 15 分钟后,留下 1mL 左右并移去上清,通过超声波发生器对金胶体进行再分散。其后,在 20mL 的含 BSA 磷酸缓冲液中分散,再次在 4 $^{\circ}$ C、8000G 离心 15 分钟后,留下 1mL 左右并移去上清,通过超声波发生器对金胶体进行再分散,制备金胶体标记抗体溶液。

[0108] (1-2) 金胶体保持垫的制备

将(1-1)中制备的金胶体标记抗体溶液用上述含 BSA 磷酸缓冲液稀释,渗透切为 20mm \times 300mm 的玻璃纤维垫(ミリポア社),在室温干燥过夜,制备金胶体抗体保持垫。

[0109] (1-3) 抗体固定化膜(色谱载体)的制备

对于切断为 30mm \times 300mm 的硝酸纤维素膜(ミリポア社),通过如下方法,固定化抗体而制备抗体固定化膜。使膜的长边在下,在距下方 16mm 的位置,将配制为 5mg/mL 的固定化用单克隆抗体 MCM19 溶液应用涂布机(BioDot 社)涂布为宽 1mm 左右的线状,使其干燥,制备抗体固定化膜。

[0110] (1-4) 免疫色谱试剂盒的装配

在背粘着片(日荣化工社)上重叠粘贴抗体固定化膜、金胶体保持垫、吸收垫(日本ポール社),通过将些重叠粘贴部件用刀具切断以使部件的长边侧为 6mm 宽,制备免疫色谱用试验条。将它们放入外壳,制成试验用免疫色谱试剂盒。

[0111] (1-5) 试验方法

用含 TritonX-100 的磷酸缓冲液溶解培养菌、PBS 洗涤菌、培养上清、培养菌的沉淀,制备各浓度的试验用肺炎支原体抗原(或菌株)溶液。在各试验用免疫胶体金层析试剂盒中,使各浓度的试验用肺炎支原体抗原(或菌株)溶液以 100 μ L 滴下,15 分后目测抗体固定膜的涂布抗肺炎支原体单克隆抗体的部位,见到染色的情况判定为“阳性”,未见染色的情况判定为“阴性”。

[0112] (2) 灵敏度试验

用前述的免疫胶体金层析法测定实施例 2 的试验菌(1-1),根据见到在测试线(test line)中出现的染色的最高稀释倍率的试验液算出菌数,并在表 8 中示出。

[0113] [表 8]

菌株	ATCC 号	在免疫胶体金层析法中见到染色的菌数
肺炎支原体 FH	15531	3.1×10^4
肺炎支原体 Bru	15377	9.8×10^4
肺炎支原体 突变体 22	39505	8.0×10^4
肺炎支原体 Mac	15492	2.5×10^4
肺炎支原体 M52	15293	2.5×10^3
肺炎支原体 P11428	29085	3.5×10^3
肺炎支原体 M129-B7	29342	3.8×10^4
肺炎支原体 UTMB-10P	49894	2.3×10^3

[0114] 根据表 8 的结果判断,在使用本单克隆抗体的免疫胶体金层析法中对肺炎支原体的灵敏度是 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL。

[0115] (3) 交差试验

用前述的免疫胶体金层析法测定实施例 2 的试验菌(1-2)(表 2 中记载的肺炎支原体以外的支原体属、脲原体属、无胆甾支原体属)以及试验菌(1-3)(表 3 ~ 6 中记载的其它细菌、真菌)。

[0116] 生殖支原体以外的微生物全部是阴性,即,未见染色。另一方面,生殖支原体见到染色,根据最高稀释倍率的试验液算出菌数时,菌数为 6.9×10^4 cfu/mL。

[0117] 如这些结果所示,使用本单克隆抗体的免疫胶体金层析法见到与生殖支原体的交差性,但其以外的微生物没有见到交差性。

[0118] 根据以上确认,与诊断肺炎支原体或生殖支原体感染病时可能成为障碍的多数细菌以及真菌没有交差。

[0119] 实施例 4:临床样本的评价

从怀疑有支原体感染病的患者 3 名以及健康人 33 名采取咽拭子,按照实施例 3 的免疫胶体金层析法,实施肺炎支原体的检测。其结果如表 9 所示,怀疑有支原体感染病的患者 3 名见到阳性反应,健康人 33 名为阴性。

[0120] 另外,按照常规方法从相同样本提取 DNA,扩增肺炎支原体 P1 基因的一部分(肺炎支原体 M129-B7 NCBI 编号:NC_000912),应用 Jensen 等人(APMIS. 1989;97(11):1046-8.)的定性 PCR 法的修改方法,实施肺炎支原体的基因检测,对两者进行比较。其结果如表 9 所示,阳性、阴性均为两者一致。

[0121] [表 9]

		免疫胶体金层析		合计
		阳性	阴性	
PCR	阳性	3	0	3
	阴性	0	33	33
合计		3	33	36

阳性一致率 :100% (3/3)

阴性一致率 :100% (33/33)

总体一致率 :100% (36/36)。

[0122] 接着,应用免疫胶体金层析法以及定性 PCR 法的任一均为阳性的样本的 DNA,应用扩增生殖支原体 16s rRNA 区域的一部分(生殖支原体 G7 NCBI 编号:L43967)的 Yoshida 等(J Clin Microbiol. 2002;40(4):1451-5.)的生殖支原体定量 PCR 法的修改方法,实施生殖支原体的基因检测。其结果如表 10 所示,从所有例子中未检测到生殖支原体的基因。

[0123] 另外,利用该手法确认,生殖支原体的基因的扩增是可能的。

[0124] [表 10]

临床样本	生殖支原体 PCR
样本 A	-
样本 B	-
样本 C	-

[0125] 以上的结果示出,使用本发明的抗体,可以特异性地肺炎检测支原体、诊断支原体感染病。

[0126] 实施例 5 :肺炎支原体培养菌株的 DnaK 基因的扩增

测定对象应用从 ATCC 购买的 8 株肺炎支原体(肺炎支原体 FH :ATCC 号 15531,肺炎支原体 Bru :ATCC 号 15377,肺炎支原体 Mac :ATCC 号 15492,肺炎支原体突变体 22 :ATCC 号 39505,肺炎支原体 M52 :ATCC 号 15293,肺炎支原体 PI1428 :ATCC 号 29085,肺炎支原体 M129-B7 :ATCC 号 29342 和,肺炎支原体 UTMB-10P :ATCC 号 49894)。将 8 株这些肺炎支原体用 PPLO 培养基培养,提取 DNA。

[0127] 对于 DNA 提取,应用スマイテラスト EX-R&D 试剂盒(医学生物学研究所),将其在 10mmol/L Tris-HCl,1mmol/L EDTA Buffer pH8.0(ニッポンジーン)(以下称为 TE Buffer)中悬浮,在 -40℃ 冷冻保存。

[0128] 将提取的 DNA 用 16s rRNA 区域的支原体通用定量 PCR 测定基因拷贝数,应用 TE Buffer 进行 10 倍梯度稀释,分别稀释为 2×10^6 至 2×10^0 拷贝 / μ L,并在 DnaK 基因检测中使用。

[0129] 16s rRNA 区域的支原体通用定量 PCR 如下实施。

[0130] 设计扩增 16s rRNA 基因区域的支原体属共有引物,应用实时 PCR 法,根据标准品,算出提取的肺炎支原体 DNA 的基因拷贝数。实时 PCR 应用 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science)。

[0131] 引物序列使用以下。

[0132] 肺炎支原体 M129-B7 全部基因组 : GenBank 登录号 NC_000912

FmY4 : 5' -TGGGGAGCAAA (C/T) AGGATTAG-3' (序列号 2)

nt 119, 081-119, 100 20mer

MGS0-2 : 5' -CACCATCTGTCACCTCTGTAACTC-3' (序列号 3)

nt 119, 332-119, 356 25mer

PCR 条件为, 95°C 反应 10 分钟, 然后 94°C 变性 10 秒, 60°C 退火 2 秒, 72°C、12 秒, 进行 50 个循环。

[0133] 标准品应用重组了肺炎支原体(M129 株)的 16s rRNA 的一部分(771bp:16s rRNA 的 302 ~ 1072 号)的 pT7Blue T-Vector (タカラバイオ)的稀释系列($10^7, 10^5, 10^3, 10^2, 10^1$ 拷贝 / 试验)。

[0134] 标准品的拷贝数根据以下的计算公式算出。

根据 DNA 浓度 ($\mu\text{g/mL}$) = $\text{ABS}(260\text{nm}) \times 50$, 和 1 Kbp DNA 的 $1 \text{ pmol} = 0.66 \mu\text{g}$

[数学式 1]

$$\text{拷贝 (拷贝 / mL)} = \frac{1}{0.66} \times \left\{ \frac{1000\text{bp}}{\text{质粒长} + \text{重组DNA长}} \times (\text{A}260 \times 50) \times (6.02 \times 10^{23}) \right\} \times 10^{-12}$$

接着, 肺炎支原体 DnaK 基因的 PCR 扩增如下实施。对于 PCR 反应液, 在大塚蒸馏水 (大塚制药) $18 \mu\text{L}$ 中加入 Premix EX Taq Hot Start Version (TaKaRa) $25 \mu\text{L}$ 、有义引物 $10 \text{ pmol} / \mu\text{L}$ MpDnaK_S 以及反义引物 $10 \text{ pmol} / \mu\text{L}$ MpDnaK_A 各 $1 \mu\text{L}$, 成为 $45 \mu\text{L}$ 的主混合物 (master mixture), 添加 $5 \mu\text{L}$ 提取 DNA, 制成共计 $50 \mu\text{L}$ 。PCR 阴性对照应用 TE Buffer。为了扩增 DnaK 基因全长 1, 788bp, 上述有义引物设计于 DnaK 基因的起始密码子的 5' 侧上流 81bp, 反义引物设计于终止密码子的 3' 侧下流 53bp。具体地, 肺炎支原体 M129 (GenBank 登录号 NC_000912) 的 521, 756 号至 521, 782 号为有义引物, MpDnaK_S、523, 655 号至 523, 677 号为反义引物 MpDnaK_A。

[0135] MpDnaK_S : 5' -CTCAAACGCTAAAAGTGCTAACG-3' 23mer (序列号 4)

MpDnaK_A : 5' -AAACCATTATTACAGGTCAAATAAGAC-3' 27mer (序列号 5)

接着 PCR 反应使用 Mastercycler (エツペンドルフ), 在 94°C 变性 30 秒, 在 50°C 退火 30 秒, 在 72°C、2 分钟, 进行 50 个循环, 最后在 72°C、5 分钟温育的条件实施。反应后, 应用 PCR 产物 $5 \mu\text{L}$, 进行 2% 琼脂糖电泳, 用溴乙啶染色后, 通过紫外线照射确认约 1, 900bp 的扩增条带。

[0136] 对上述配制的 8 株肺炎支原体进行研究, 结果确认, 8 株全部扩增至 10^2 拷贝 / 试验。

[0137] 实施例 6 : 与从人分离的支原体培养菌株的交差性

测定对象应用从 ATCC 购买的 17 株支原体 (生殖支原体 : ATCC 号 33530, 人型支原体 : ATCC 号 23114, 微小脲原体 : ATCC 号 700970, 解脲脲原体 : ATCC 号 27618, 发酵支原体 : ATCC 号 19989, 莱氏无胆甾原体 : ATCC 号 23206, 目无胆甾原体 : ATCC 号 51735, 穿透支原体 : ATCC 号 55252, 梨支原体 : ATCC 号 25960, 口腔支原体 : ATCC 号 23714, 唾液支原体 : ATCC 号 23064, 关节炎支原体 : ATCC 号 19611, 颊支原体 : ATCC 号 23636, 咽支原体 : ATCC 号 25293, 嗜脂支原体 : ATCC 号 27104, 灵长类支原体 : ATCC 号 25948 和嗜精支原体 : ATCC 号 49695)。将 17 株这些支原体在各 PPL0 培养基中培养, 与实施例 5 同样地提取 DNA, 用 16s rRNA 区域的定量 PCR 测定基因拷贝数, 并分别稀释为 2×10^5 拷贝 / μL 。

[0138] 除测定对象使用 17 株上述支原体以外,与实施例 5 同样地对肺炎支原体 DnaK 基因 PCR 进行研究,结果在全部 17 株中没有确认到扩增条带。可以扩增肺炎支原体的 DnaK 基因的 DNA 浓度的 10,000 倍浓度的 DNA 样本也未见交差性,因此得知肺炎支原体 DnaK 基因 PCR 特异性非常高。

[0139] 实施例 7 :从临床样本扩增肺炎支原体 DnaK 基因

测定对象的样本应用利用国立感染症研究所“病原体检测手册”第 1309-1344 页“支原体肺炎”的项目中记载的肺炎支原体 P1 基因区域的巢式 PCR 为阳性的临床样本 46 例(咽拭子 40 例,鼻涕 2 例,鼻咽吸引液 1 例,鼻咽拭子 3 例)和为阴性的 30 例(健康人咽拭子 10 例,临床样本咽拭子 10 例,鼻涕 4 例,鼻咽吸引液 3 例,鼻咽拭子 3 例)的提取 DNA。

[0140] 实施肺炎支原体 DnaK 基因的 PCR,结果在全部 46 例 P1 基因 PCR 阳性中确认 DnaK 基因的扩增。另一方面,30 例 P1 基因 PCR 阴性中的任一都未见 DnaK 基因的扩增。

[0141] [表 11]

		DnaK 基因 PCR		合计
		阳性	阴性	
P1 基因 PCR	阳性	46	0	46
	阴性	0	30	30
合计		46	30	76

[0142] 实施例 8 :培养菌株和临床样本的 DnaK 基因碱基序列的解析

使用 BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 利用 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 解读用 DnaK 基因 PCR 见到扩增的实施例 5 的 ATCC 株 8 株、实施例 7 的临床样本 8 例(咽拭子 7 例,鼻咽拭子 1 例)的 PCR 产物的碱基序列。

[0143] 其结果是,上述 ATCC 株 8 株和临床样本 8 例的 PCR 产物的 DnaK 基因 1,788bp(序列号 6)全部 100%一致,与在 GenBank 中登录的 M129 株(Acc 号 NC_000912)和 FH 株(Acc 号 CP002077)也 100%一致。图 1~图 3 中示出 M129 株和 FH 株的同源性。

[0144] 另一方面,对于 P1 基因,按照参考文献(JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1996, p. 447-449 Vol. 34, No. 2)通过 PCR-RFLP 法进行型鉴别时,实施例 5 的 ATCC 株 8 株分为 2 群。具体地,M129-B7 株、M52 株、PI1428 株、突变体 22 株这 4 株可分类为 I 型,FH 株、Bru 株、Mac 株、UTMB-10P 株这 4 株可分类为 II 型。图 4~图 10 中示出代表性 M129 株(序列号 7)和 FH 株(序列号 8)的同源性。

[0145] 根据该结果,DnaK 基因在 P1 基因型不同的株间也是 100%一致的,另外,不同分离地和在过去 50 年间分离的株中也没有见到碱基序列的变异,因此认为获得的抗体没有由基因型、地域、年代引起的反应性差异。

[0146] 产业上的利用可能性

根据本发明,可以特异性地且灵敏度良好地检测从口腔/鼻腔擦过物、尿、组织样品、体液或培养物采取的样本中含有的肺炎支原体和/或生殖支原体,特别地,其对于肺炎支原体引起的非典型肺炎的诊断或生殖支原体引起的非淋菌性尿道炎以及性感染病的诊断是重要的,在药品工业中是有用的。

[0147] 以上针对特定的方案对本发明进行说明,但对本领域技术人员显而易见的改变、改良包含在本发明的范围内。

<210> 3	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 肺炎支原体	
<400> 3	
caccatctgt cactctgtta acctc	25
<210> 4	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 肺炎支原体	
<400> 4	
ctcaaacgct aaaagtgcta acg	23
<210> 5	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 肺炎支原体	
<400> 5	
aaaccattat tacaggtcaa ataagac	27
<210> 6	
<211> 1788	
<212> DNA	
<213> 肺炎支原体	
<400> 6	
atgagtacag ataacggctt aattatcggc attgaccttg gtaccactaa ctctgtgtg	60
tcggatcatgg agaatggacg cccagtagtg ttggaaaacc ctgaaggtaa acgcaccacc	120
ccttcgattg tttcttacia gaacaacgaa attattgtgg gtgatgctgc gaaacggcaa	180

atggttaacta accctaatac tattgtttcc attaagcgtt taatgggtac ctccaataag	240
gtaaccgtta agaatcctga tggttctacc aaagagttaa ctctgaaga ggtatcagcg	300
caaatcttga gctacctcaa ggactatgcg gaaaagaaga ttggtaaac gatttcccgt	360
gctgttatta ccgtacctgc ttactttaac gatgcagaac ggaacgctac taaaaccgct	420
ggtaagattg ctggtttaaa cgttgagcgg attattaacg aacctaccgc cgctgcattg	480
gcttatggga tcgacaagtc taaccgagaa atgaaagtct tgggtgtacga ccttgggtgt	540
ggtacctttg acgtttcctt acttgacatt gctgaaggta ccttcgaagt attagccact	600
gctggggaca accgtttggg tggatgatgac tgggacaaca agattattga gttcatctta	660
gcgcacattg cccaagaaca caatgggctt aacttgtcca atgacaagat ggctatgcaa	720
cgcttaaagg aagcggctga acgtgctaag attgaacttt ccgccaact agaagcaatt	780
atctctttac cgttcttaac ggttaccgaa aagggtccgg taaacgttga acttaagcta	840
accctgcta agtttgaaga aattaccaa caattactag aacgtactcg caaccaatt	900
tcggatgttt tacgtgaagc caagattaaa ccagaagaaa ttaatgaaat cttgttgggt	960
ggtggatcga cccggatgcc agcagtgcaa aaactagtgg aatcaatggt accaggacac	1020
agtccaaacc gctcaattaa cccggatgag gtggtagcca ttgggtctgc catccaaggg	1080
ggtgtgttac gcggtgatgt aaaggacgtg ttactgttgg acgttactcc tttaacgctc	1140
tcgattgaaa cccttgggtg tgtagcaact ccgttaatta agcgtaaac caccattcct	1200
gtaagtaaga gtcaaatctt ctctacagcg caagacaacc aagaatcagt ggatgtgggt	1260
gtttgtcaag gggaacgccc aatggcacgt gacaacaagt ctttgggtcg cttaactta	1320
gggggcatcc aaccagcacc caagggtaaa ccccaaattg aaattacctt tagcttggac	1380

gccaacggga tcttaaactg gaaggctaaa gatttaacca ctcaaaagga aaacagtatt 1440
 actattagtg acaacggcaa cttgtccgaa gaggaaatcc aaaagatgat tcgtgatgcg 1500
 gaagccaaca aggagcgtga caatgtgatt cgtgaacgca ttgagctccg taacgaaggt 1560
 gaaagcatcg tgagcacgat taaggagatt ctccaaagtc ccgaagcgaa ggacttcctt 1620
 aaagaagaga aggaaaaact cgacaagatt accggtggta ttgatgcagc aattaaggcc 1680
 aatgactaca ccaagttaaa agccgaaatc gaaaacttca agaagtgaag ggaagaaatg 1740
 gccaagaagt acaaccctaa cggggatcaa ggtcaaccag cacaataa 1788

<210> 7

<211> 4884

<212> DNA

<213> 肺炎支原体

<400> 7

atgcacaaa ccaaaaaaac tgccttgtec aagtccactt ggatttctcat cctcaccgcc 60
 accgcctccc tcgcgacggg actcaccgta gtgggacact tcacaagtac caccacgacg 120
 ctcaagegcc agcaatthag ctacaccgcg cctgacgagg tcgcgctgcg ccacaccaat 180
 gccatcaacc cgcgcttaac cccgtgaacg tatcgtaaca cgagcttttc ctccctcccc 240
 ctcacgggtg aaaatcccgg ggcgtgggcc ttagtgcgcg acaacagcgc taagggcate 300
 actgccggca gtggcagtca acaaaccacg tatgatccca cccgaaccga agcggettig 360
 accgcatcaa ccacctttgc gttacgccgg tatgacctcg ccgggcgcgc cttatacgac 420
 ctcgatTTTT cgaagttaaa cccgcaaacg cccacgcgcg accaaaccgg gcagatcacc 480
 tttaacccct ttggcggttt tggtttgagt ggggctgcac cccaacagtg aaacgaggtc 540

aaaaacaagg tccccgtcga ggtggcgcaa gacccctcca atccctaccg gtttgccgtt	600
ttactcgtgc cgcgcagcgt ggtgtactat gagcagttgc aaaggggggtt gggcttacca	660
cagcagcgaa ccgagagtgg tcaaaatact tccaccaccg gggcaatgtt tggcttgaag	720
gtgaagaacg ccgaggcgga caccgcaag agcaatgaaa aactccaggg cgctgaggcc	780
actggttctt caaccacate tggatctggc caatccaccc aacgtggggg ttcgtcaggg	840
gacaccaaag tcaaggcttt aaaaatagag gtgaaaaaga aatcggactc ggaggacaat	900
ggtcagctgc agttagaaaa aatgatctc gccaacgctc ccattaagcg gagcgaggag	960
tccggtcagt ccgtccaact caaggcggac gattttggta ctgcccttc cagttcggga	1020
tcaggcggca actccaatcc cggttccccc accccctgaa ggccgtggct tgcgactgag	1080
caaattcaca aggacctccc caaatgatec gcctegatcc tgattctgta cgatgcgcct	1140
tatgcgcgca accgtaccgc cattgaccgc gttgatcact tggatcccaa ggccatgacc	1200
gcgaactatc cgcccagttg aagaacgccc aagtgaaacc accacggttt gtgggactga	1260
aaggcgcgcg atgttttgct ccaaaccacc gggttcttca acccgcgccg ccaccccgag	1320
tggtttgatg gcgggcagac ggtegcggat aacgaaaaga ccgggtttga tgtggataac	1380
tctgaaaaca ccaagcaggg ctttcaaaag gaagctgact ccgacaagtc ggccccgate	1440
gccctcccgt ttgaagcgta cttegccaac attggcaacc tcacctggtt cgggcaagcg	1500
cttttggtgt ttggtggcaa tggccatggt accaagtcgg cccacaccgc gcctttgagt	1560
ataggtgtct ttagggtgcg ctataatgca actggtacca gtgctactgt aactggttga	1620
ccatatgcct tactgttctc aggcattggtc aacaaacaaa ctgacgggtt aaaggatcta	1680

ccctttaaca ataaccgctg gtttgaatat gtaccacgga tggcagttgc tggcgctaag	1740
ttcgttggta gggaactcgt tttagcgggt accattacca tgggtgatac cgctaccgta	1800
cctcgcttac tgtacgatga acttgaaage aacctgaact tagtagcgca aggccaaggt	1860
cttttacgcg aagacttgca actcttcaca ccctacggat gagccaatcg tccggattta	1920
ccaatcgggg cttgaagtag tagtagtagt agtagtcaca acgcacccta ctacttccac	1980
aataaccccg attgacaaga cegtccaate caaatgtgg ttgatgcctt tattaagccc	2040
tgagaggaca agaacggtaa ggatgatgcc aaatacatct acccttaccg ttacagtggc	2100
atgtgagctt gacaggtata caactggfcc aataagctca ctgaccaacc attaagtgt	2160
gactttgtca atgagaatgc ttaccaacca aactccttgt ttgctgctat tctcaatccg	2220
gaattgttag cagctcttcc cgacaagggt aaatacggta aggaaaacga gtttgcctgt	2280
aacgagtacg agcgctttaa ccagaagtta acggtagctc ctaccaagg aacaaactga	2340
tcccacttct cccccacgct tteccgttcc tccaccgggt tcaaccttgt ggggtcgggt	2400
ctcgaccagg tgttggatta tgtgccctgg attgggaatg ggtacaggta tggcaataac	2460
caccggggcg tggatgatat aaccgcgctt caaaccagcg cggggtcgct cagcgggaatt	2520
agtacgaaca caagtggttc gcgttccctt ctcccagcgt tttccaacat cggcgtcggc	2580
ctcaaagega atgtccaage caccctcggg ggcagtcaga cgatgattac aggcggttcg	2640
cctcgaagaa cctcagacca agccaacctc cagctctgaa cgggggcggg gtgaaggaat	2700
gataaggctt caagtggaca aagtgacgaa aaccacacca agttcacgag cgctacgggg	2760
atggaccage agggacaate aggtacctcc gcggggaate ccgactcgtt aaagcaggat	2820
aatattagta agagtgggga tagtttaacc acgcaggacg gcaatgcgat cgatcaacaa	2880

gaggccacca actacaccaa cctccccccc aacctcacc ccaccgctga ttgaccgaac	2940
gcgctgtcat tcaccaacaa gaacaacgcg cagcgcgccc agctcttcct ccgcggcttg	3000
ttgggcagca tcccgggtgtt ggtgaatcga agtgggtccg attccaacaa attccaagcc	3060
accgacaaa aatggctcta caccgactta cattcggacc aaaccaaact gaacctcccc	3120
gcttacggtg aggtgaatgg gttgttgaat ccggcgttgg tggaaaccta ttttgggaac	3180
acgcgagcgg gtggttcggg gtccaacacg accagttcac ccggtatcgg ttttaaaatt	3240
cccgaacaaa ataatgatte caaagccacc ctgatcacc ccgggttggc ttgaacgccc	3300
caggacgtcg gtaacctcgt tgtcagtggc accacggtga gcttccagct cggcgggtgg	3360
ctggtcacct tcacggactt tgtcaaacc cgcgcggtt acctcggctt ccagttaacg	3420
ggcttggatg caagtgatgc gacgcagegc gccctcattt gggccccccg gccctgagcg	3480
gcctttcgtg gcagttgggt caaccggttg ggccgcgtgg agagtgtgtg ggatttgaag	3540
ggggtgtggg cggatcaagc tcagtcggac tcgcaaggat ctaccaccac cgcaacaagg	3600
aacgccttac cggagcacc gaatgctttg gcctttcagg tgagtgtggt ggaagcgagt	3660
gcttacaagc caaacacgag ctccggccaa acccaatcca ctaacagttc ccctacctg	3720
cacttgggtga agcctaagaa agttacceaa tccgacaagt tagacgacga tcttaaaaaac	3780
ctgttggacc ccaaccaggt tcgcaccaag ctgcgcaaaa gctttgttac agaccattec	3840
accagcccc agccccaatc gctcaaaaaca acgacaccgg tatttgggac gagtagtggt	3900
aacctcagta gtgtgcttag tgggtgggggt gctggagggg gttcttcagg ctcaggtcaa	3960
tctggcgtgg atctctcccc cgttgaaaaa gtgagtgggt ggcttgtggg gcagttacca	4020

agcacgagtg acggaaacac ctcctccacc aacaacctcg cgcctaatac taatacgggg	4080
aatgatgtgg tgggggttgg tcgactttct gaaagcaacg ccgcaaagat gaatgacgat	4140
gttgatggta ttgtacgcac cccactcgct gaactgttag atggggaagg acaaacagct	4200
gacactggtc cacaaagcgt gaagttcaag tctcctgacc aaattgactt caaccgcttg	4260
tttaccacc cagtcaccga tctgtttgat ccggttaacta tgttgggtga tgaccagtac	4320
ataccgctgt ttattgatat cccagcaagt gtgaacccta aaatggttcg tttaaaggtc	4380
ttgagctttg acaccaacga acagagctta ggtctccgct tagagttctt taaacctgat	4440
caagataccc aaccaaaaca caacgttcag gtcaatccga ataacgggtga cttcttacca	4500
ctgttaacgg cctccagtca aggtccccaa accttgttta gtccgtttaa ccagtgacct	4560
gattacgtgt tgccgttagc gateactgta cctattgttg tgattgtgct cagtgttacc	4620
ttaggacttg ccattggaat cccaatgcac aagaacaaac aggccctgaa ggctggggtt	4680
gcgctatcaa accaaaaggt tgatgtgttg accaaagcgg ttggtagtgt ctttaaggaa	4740
atcattaacc gcacaggtat cagtcaagcg ccaaaacgct tgaaacaaac cagtgcggct	4800
aaaccaggag caccccgcc accagtacca ccaaagccag gggctcctaa gccaccagtg	4860
caaccaccta aaaaaccgc ttag	4884

<210> 8

<211> 4905

<212> DNA

<213> 肺炎支原体

<400> 8

atgcacaaa ccaaaaaaac tgccttgcc aagtccactt ggattctcat cctcaccgcc 60

accgcctccc tcgcgacggg actcaccgta gtgggacact tcacaagtac caccacgacg	120
ctcaagcgcc agcaatthag ctacaccgc cctgacgagg tcgcgctgcg ccacaccaat	180
gccatcaacc cgcgcttaac cccgtgaacg tatcgtaaca cgagcttttc ctccctcccc	240
ctcacgggtg aaaatcccgg ggcgtgggcc ttagtgcgcg acaacagcgc taagggcac	300
actgccggca gtggcagtea acaaaccacg tatgatccca cccgaaccga agcggctttg	360
accgcatcaa ccacctttgc gttacgccgg tatgacctcg ccgggcgcgc cttatacgac	420
ctcgatTTTT cgaagttaa cccgcaaacg cccacgcgcg accaaaccgg gcagatcacc	480
tttaaccct ttggcggctt tggtttgagt ggggctgcac cccaacagtg aaacgaggtc	540
aaaaacaagg tccccgtega ggtggcgcaa gaccctcca atccttatcg gtttgccgtt	600
ttactcgtgc cgcgtagcgt ggtgtactat gagcagttgc agcgggggtt agcgtccct	660
aaccaaggga gttcgtcagg ctacagacgc actaaccaaa caggcgcaat gtttgcttg	720
aaggtgaagg atgcaaccgt ggatagttag aagcaatcaa cggaaagctt aaagggcgaa	780
gaatcgagtt ccagttccac cacatcttcc acctccacca cccaacgtgg gggttcgtca	840
aatgaaaaca aagtcaaggc gttgcaggtg gcggtgaaaa agaaatccgg gagtcagggc	900
aactccggtg accaaggcac cgaacaggtg gaacttgaat ctaatgattt agccaacgcc	960
ccgattaac ggggctccaa taacaaccag caagtccaac tcaaggcgga cgatTTTgt	1020
actgccccctt ccagttcggg atcaggcacc caagatggca cccccacccc ctgaacgcg	1080
tggTTaacga ctgagcaaat tcacaacgac cccgccaat tcgccgcctc gatcctgatt	1140
ctgtacgatg cgccttatgc gcgcaaccgt accgccattg accgcgttga tcaactggat	1200
cccaaggcca tgaccgcgaa ctatccgccc agttgaagaa cgcccaagtg aaaccaccac	1260

ggtttgtggg actgaaaggc gcgcgatgtt ttgctccaaa ccaccgggtt cttcaaccgc	1320
cgccgccacc ccgagtgggt tgatggcggg cagacggctc cggataacga aaagaccggg	1380
tttgatgtgg ataactctga aaacaccaag cagggttttc aaaaggaagc tgactccgac	1440
aagtccgccc cgatcgcctt cccgtttgaa gcgtacttcg ccaacattgg caacctcacc	1500
tggttcgggc aagcgctttt ggtgtttggg ggcaatggcc atgttaccaa gtcggcccac	1560
accgcgctt tgagtatagg tgtctttagg gtgcgctata atgcaactgg taccagtget	1620
actgtaactg gttgaccata tgccttactg ttctcaggca tggtaacaa acaaactgac	1680
gggttaaaga atctaccctt taacaataac cgctggtttg aatatgtacc acggatggca	1740
gttgctggcg ctaagttcgt tggtagggaa ctcgttttag cgggtacat taccatgggt	1800
gataccgcta ccgtacctg cttactgtac gatgaacttg aaagcaacct gaacttagta	1860
gcgcaaggcc aaggtctttt acgcaagac ttgcaactct tcacacccta cggatgagcc	1920
aatcgctcgg atttaccat cggggcttga agtagtagta gtagtagtca caacgcaccc	1980
tactacttcc acaataacce cgattgacaa gaccgtccaa tccaaagtgt gttgatgcc	2040
tttattaage cctgagagga caagaacggt aaggatgatg ccaataacat ctacccttac	2100
cgttacagtg gcatgtgagc ttgacaggta tacaactggt ccaataagct cactgaccaa	2160
ccattaagtg ctgactttgt caatgagaat gcttaccac caaactcctt gtttgetget	2220
attctcaate cggaattggt agcagctctt cccgacaagg ttaaatacgg taaggaaaac	2280
gagtttgctg ctaacgagta cgagcgcttt aaccagaagt taacggtagc tectacccaa	2340
ggaacaaact gateccactt ctccccacg ctttccggtt tctccaccgg gtccaactt	2400

gtggggtcgg tgctcgacca ggtgttggat tatgtgccct ggattgggaa tgggtacagg	2460
tatggcaata accaccgggg cgtggatgat ataaccgcgc ctcaaaccag cgcggggtcg	2520
tccagcggaa ttagtacgaa cacaagtggg tcgcttccct ctctccccgac gttttccaac	2580
atcggcgtcg gcctcaaage gaatgtccaa gccaccctcg ggggcagtca gacgatgatt	2640
acaggcggtt cgcctcgaag aaccctcgac caagccaacc tccagctctg aacgggggcg	2700
gggtgaagga atgataagge ttcaagtgga caaagtgacg accacaccaa gttcacgagc	2760
gctacgggga tgggccagca ggaacaatca ggtacctccg cggggaatcc cgactcgta	2820
aagcaggata agattagtaa gagtggggat agtttaacca cgcaggacgg caatgctgat	2880
gatcaacaag aggccaccaa ctacaccaac ctcccccca acctcaccce caccgtgat	2940
tgaccgaacg cgctgtcatt caccaacaag aacaacgcgc agcgcgcca gctgttctg	3000
cgcggcctgt tgggcagcat cccggtgttg gttaataagt cggccaaga tgataacagt	3060
aagtttaagg cggaggacca aaaatggtcc tacaccgact tacagtcgga ccaaaccaaa	3120
ctgaacctcc ccgcttacgg tgaggtgaat gggttgttga atccggcgtt ggtggaacc	3180
tattttggga acacgcgagc gagtggttcg gggccaaca cgaccagttc acccggtatc	3240
ggttttaaaa ttcccgaaca aagtggcaca aacacaacgt cgaaggctgt gctgateacc	3300
cccgggttgg cttgaacgcc gcaagacgtt ggtaacctcg ttgtcagtgg caccagette	3360
agcttccage tcggcgggtg gttagttacg ttcacggact ttatcaaacc ccgcgtggt	3420
tacctegggc tccagttaac gggcttggat gcaagtgatg cgacgcagcg cgtctcatt	3480
tgggcccccc ggccctgagc ggccttctgt ggcagttggg tcaaccggtt ggcccgctg	3540
gagagtgtgt gggatttgaa gggggtgtgg gcggatcaag ctcaagtcga ctcgcaagga	3600

tctaccacca cgcacaag ggacgcctta cgggagcacc cgaatgcttt ggcctttcag	3660
gtgagtgtgg tggaagcgag tgcttacaag ccaaacacga gctccggcca aaccaatcc	3720
actaacagtt cccctacct gcacttgggtg aagcctaaga aagttatcca atccgacaag	3780
ttagacgacg atcttaaaaa cctgttggac cccaaccagg ttcgcaccaa gctgcgccaa	3840
agctttggta cagaccatte caccagccc cagccccaat cgctcaaaac aacgacaccg	3900
gtatattggga cgagtagtgg taacctcagt agtgtgctta gtggtggggg tgctggaggg	3960
ggttcttcag gctcaggtea atctggcgtg gatctctccc ccgttgaaaa agtgagtggg	4020
tggcttgtgg ggcagttacc aagcacgagt gacggaaaca cctcctccac caacaacctc	4080
gcgcctaata ctaatacggg gaatgatgtg gtggggggtg gtcgactttc tgaagcaac	4140
gccgcaaaga tgaacgacga tgttgatggt attgtacgca cccactcgc tgaactgtta	4200
gatggggaag gacaaacagc tgacactggt ccacaaagcg tgaagttaa gtctcctgac	4260
caaattgact tcaaccgctt gtttaccac ccagtcaccg atctgtttga tccgtaact	4320
atgttgggtg atgaccagta cataccgctg tttattgata tcccagcaag tgtgaaccct	4380
aaaatggttc gtttaaaggt cttgagcttt gacaccaacg aacagagctt aggtctccgc	4440
ttagagttct ttaaacctga tcaagatacc caaccaaaca acaacgttca ggtcaatccg	4500
aataacggtg acttcttacc actgttaac gcctccagtc aaggccccca aacctgttt	4560
agtcggttta accagtgacc tgattacgtg ttgccgtag cgatcactgt acctattgtt	4620
gtgattgtgc tcagtgttac cttaggactt gccattggaa tcccaatgca caagaacaaa	4680
caggccttga aggctgggtt tgcgctatca aaccaaaggt ttgatgtgtt gaccaaagcg	4740

gttgtagtg tctttaagga aatcattaac cgcacaggta tcagtcaagc gccaaaacgc	4800
ttgaaacaaa ccagtgcggc taaaccagga gcaccccgcc caccagtacc accaaagcca	4860
gggctccta agccaccagt gcaaccacct aaaaaacccg cttag	4905

M129_DnaK	ATGAGTACAGATAACGGCTTAATTATCGGCATTGACCTTGGTACCTAACTCCTGTGT	60
FH_DnaK	ATGAGTACAGATAACGGCTTAATTATCGGCATTGACCTTGGTACCTAACTCCTGTGT	60

M129_DnaK	TCGGTCATGGAGAATGGACGCCAGTAGTGTGGAAAACCTGAAGGTAACGCACCACC	120
FH_DnaK	TCGGTCATGGAGAATGGACGCCAGTAGTGTGGAAAACCTGAAGGTAACGCACCACC	120

M129_DnaK	CCTTCGATTGTTTCTTACAAGAACAACGAAATTATTGTGGGTGATGCTGCGAAACGGCAA	180
FH_DnaK	CCTTCGATTGTTTCTTACAAGAACAACGAAATTATTGTGGGTGATGCTGCGAAACGGCAA	180

M129_DnaK	ATGGTAACTAACCTAATACTATTGTTCCATTAAGCGTTTAAATGGGTACCTCCAATAAG	240
FH_DnaK	ATGGTAACTAACCTAATACTATTGTTCCATTAAGCGTTTAAATGGGTACCTCCAATAAG	240

M129_DnaK	GTAACCGTTAAGAATCCTGATGGTCTACCAAAGAGTTAACTCCTGAAGAGGTATCAGCG	300
FH_DnaK	GTAACCGTTAAGAATCCTGATGGTCTACCAAAGAGTTAACTCCTGAAGAGGTATCAGCG	300

M129_DnaK	CAAATCTTGAGCTACCTCAAGGACTATGCGGAAAAGAAGATTGGTAAAACGATTTCCCGT	360
FH_DnaK	CAAATCTTGAGCTACCTCAAGGACTATGCGGAAAAGAAGATTGGTAAAACGATTTCCCGT	360

M129_DnaK	GCTGTTATTACCGTACCTGCTTACTTTAACGATGCAGAACGGAACGCTACTAAAACCGCT	420
FH_DnaK	GCTGTTATTACCGTACCTGCTTACTTTAACGATGCAGAACGGAACGCTACTAAAACCGCT	420

M129_DnaK	GGTAAGATTGCTGGTTAAACGTTGAGCGGATTATTAACGAACCTACCGCCGCTGCATTG	480
FH_DnaK	GGTAAGATTGCTGGTTAAACGTTGAGCGGATTATTAACGAACCTACCGCCGCTGCATTG	480

M129_DnaK	GCTTATGGGATCGACAAGTCTAACCGAGAAATGAAAGTCTTGGTGTACGACCTTGGTGGT	540
FH_DnaK	GCTTATGGGATCGACAAGTCTAACCGAGAAATGAAAGTCTTGGTGTACGACCTTGGTGGT	540

M129_DnaK	GGTACCTTTGACGTTTCCTTACTTGACATTGCTGAAGGTACCTTCGAAGTATTAGCCACT	600
FH_DnaK	GGTACCTTTGACGTTTCCTTACTTGACATTGCTGAAGGTACCTTCGAAGTATTAGCCACT	600

M129_DnaK	GCTGGGACAACCGTTTGGGTGGTGTACTGGGACAACAAGATTATTGAGTTCATCTTA	660
FH_DnaK	GCTGGGACAACCGTTTGGGTGGTGTACTGGGACAACAAGATTATTGAGTTCATCTTA	660

M129_DnaK	GCGCACATTGCCAAGAACAACAATGGGCTTAACTTGCCAATGACAAGATGGCTATGCAA	720
FH_DnaK	GCGCACATTGCCAAGAACAACAATGGGCTTAACTTGCCAATGACAAGATGGCTATGCAA	720

图 1

M129_DnaK	CGCTTAAAGGAAGCGGCTGAACGTGCTAAGATTGAACTTTCGCCCAACTAGAAAGCAATT	780
FH_DnaK	CGCTTAAAGGAAGCGGCTGAACGTGCTAAGATTGAACTTTCGCCCAACTAGAAAGCAATT	780

M129_DnaK	ATCTCTTACCGTTCTTAACGGTTACCGAAAAGGGTCCGGTAAACGTTGAACCTAAGCTA	840
FH_DnaK	ATCTCTTACCGTTCTTAACGGTTACCGAAAAGGGTCCGGTAAACGTTGAACCTAAGCTA	840

M129_DnaK	ACCCGTGCTAAGTTTGAAGAAATTACCAAACAATTACTAGAACGTACTCGCAACCCAATT	900
FH_DnaK	ACCCGTGCTAAGTTTGAAGAAATTACCAAACAATTACTAGAACGTACTCGCAACCCAATT	900

M129_DnaK	TCGGATGTTTTACGTGAAGCCAAGATTAACCAGAAGAAATTAATGAAATCTTGTGGTG	960
FH_DnaK	TCGGATGTTTTACGTGAAGCCAAGATTAACCAGAAGAAATTAATGAAATCTTGTGGTG	960

M129_DnaK	GGTGGATCGACCCGGATGCCAGCAGTGCAAAAAGTGGGAATCAATGGTACCAGGACAC	1020
FH_DnaK	GGTGGATCGACCCGGATGCCAGCAGTGCAAAAAGTGGGAATCAATGGTACCAGGACAC	1020

M129_DnaK	AGTCCAAACCGCTCAATTAACCCGGATGAGGTGGTAGCCATTGGTGCTGCCATCCAAGGG	1080
FH_DnaK	AGTCCAAACCGCTCAATTAACCCGGATGAGGTGGTAGCCATTGGTGCTGCCATCCAAGGG	1080

M129_DnaK	GGTGTGTACGCGGTGATGTAAGGACGTGTACTGTTGGACGTTACTCCTTTAACGCTC	1140
FH_DnaK	GGTGTGTACGCGGTGATGTAAGGACGTGTACTGTTGGACGTTACTCCTTTAACGCTC	1140

M129_DnaK	TCGATTGAAACCCCTTGGTGGTGTAGCAACTCCGTTAATTAAGCGTAACACCACCATTCTT	1200
FH_DnaK	TCGATTGAAACCCCTTGGTGGTGTAGCAACTCCGTTAATTAAGCGTAACACCACCATTCTT	1200

M129_DnaK	GTAAGTAAGAGTCAAATCTTCTCTACAGCGCAAGACAACCAAGAATCAGTGGATGTGGTG	1260
FH_DnaK	GTAAGTAAGAGTCAAATCTTCTCTACAGCGCAAGACAACCAAGAATCAGTGGATGTGGTG	1260

M129_DnaK	GTTTGTCAAGGGGAACGCCCAATGGCACGTGACAACAAGTCTTTGGGTCGCTTTAACTTA	1320
FH_DnaK	GTTTGTCAAGGGGAACGCCCAATGGCACGTGACAACAAGTCTTTGGGTCGCTTTAACTTA	1320

M129_DnaK	GGGGGCATCCAACCAGCACCCAAGGGTAAACCCCAAATTGAAATTACCTTTAGCTTGGAC	1380
FH_DnaK	GGGGGCATCCAACCAGCACCCAAGGGTAAACCCCAAATTGAAATTACCTTTAGCTTGGAC	1380

M129_DnaK	GCCAACGGGATCTTAAACGTGAAGGCTAAAGATTTAACCACTCAAAGGAAAACAGTATT	1440
FH_DnaK	GCCAACGGGATCTTAAACGTGAAGGCTAAAGATTTAACCACTCAAAGGAAAACAGTATT	1440

图 2

M129_DnaK	ACTATTAGTGACAACGGCAACTTGTCCGAAGAGGAAATCCAAAAGATGATTCGTGATGCG	1500
FH_DnaK	ACTATTAGTGACAACGGCAACTTGTCCGAAGAGGAAATCCAAAAGATGATTCGTGATGCG	1500

M129_DnaK	GAAGCCAACAAGGAGCGTGACAATGTGATTCGTGAACGCATTGAGCTCCGTAACGAAGGT	1560
FH_DnaK	GAAGCCAACAAGGAGCGTGACAATGTGATTCGTGAACGCATTGAGCTCCGTAACGAAGGT	1560

M129_DnaK	GAAAGCATCGTGAGCACGATTAAGGAGATTCTCCAAAGTCCCGAAGCGAAGGACTTCCT	1620
FH_DnaK	GAAAGCATCGTGAGCACGATTAAGGAGATTCTCCAAAGTCCCGAAGCGAAGGACTTCCT	1620

M129_DnaK	AAAGAAGAGAAGGAAAACTCGACAAGATTACCGGTGGTATTGATGCAGCAATTAAGGCC	1680
FH_DnaK	AAAGAAGAGAAGGAAAACTCGACAAGATTACCGGTGGTATTGATGCAGCAATTAAGGCC	1680

M129_DnaK	AATGACTACACCAAGTTAAAAGCCGAAATCGAAAACCTCAAGAAGTGAAGGGAAGAAATG	1740
FH_DnaK	AATGACTACACCAAGTTAAAAGCCGAAATCGAAAACCTCAAGAAGTGAAGGGAAGAAATG	1740

M129_DnaK	GCCAAGAAGTACAACCCTAACGGGGATCAAGGTCAACCAGCACAATAA	1788
FH_DnaK	GCCAAGAAGTACAACCCTAACGGGGATCAAGGTCAACCAGCACAATAA	1788

图 3

M129_P1	AAGGTGAAGAACGCCGAGGCGGACCCGGAAG--AGCAATGAAAACTCCA-GGGCGCT	774
FH_P1	AAGGTGAAGGATGCAACCGTGGATAGTTCGAAGCAATCAACGGAAAGCTTAAAGGGCGAA	780
	***** * ** * *** * ***** * ** * ** * ** * *****	
M129_P1	GAGGCCACTGGTTCTTCAACCACATCTGGATCTGGCCAATCCACCCAACGTGGGGGTTCG	834
FH_P1	GAATCGAGTTCAGTTCACCACATCT---TCCACCTCCACCACCAACGTGGGGGTTCG	837
	** * * * ** ***** ** * *****	
M129_P1	TCAGGGACACCAAAGTCAAGGCTTTAAAAATAGAGGTGAAAAAGAAATC--GGA	892
FH_P1	TCAAATGAAAACAAAGTCAAGGCGTTGCAGGTGGCGGTGAAAAAGAAATCCGGGAGTCAG	897
	** * ** ***** * * * * ***** ** * *	
M129_P1	AG-----GACAATGGTCAGCTGCAGTTAGAAAAAATGATCTGCCAAC	936
FH_P1	GGCAACTCCGGTGACCAAGGCACCGAACAGGTGGA	957
	* ** * ** * * ** ***** * *****	
M129_P1	GCTCCCATTAAGCGGAGCGAGGAGTCCGGTTCAGTCCGTC	996
FH_P1	GCCCCGATTAACCGGGCTCCAATAACAACCAGCAAGTCCA	1017
	** * ***** ** * * * *****	
M129_P1	GGTACTGCCCTTCCAGTTCGGGATCAGGCGCAACTCCAATCCCGTTCCCCACCCC	1056
FH_P1	GGTACTGCCCTTCCAGTTCGGGATCAGGCA-----CCCAAGATGGCACCCCACCCC	1071
	***** ***** ** * ** *****	
M129_P1	TGAAGGCGTGGCTTGC	1116
FH_P1	TGAACGCGTGGTTAACGACTGAGCAAATTCACAAGCACCTCCCAAATGATCCGCTCG	1131
	**** ***** * ***** **** * ***** *****	
M129_P1	ATCCTGATTCTGTACGATGCGCCTATGCGCGCAACCGTACCGCATTGACCGGTTGAT	1176
FH_P1	ATCCTGATTCTGTACGATGCGCCTATGCGCGCAACCGTACCGCATTGACCGGTTGAT	1191

M129_P1	CACTTGGATCCCAAGGCCATGACCGGAACTATCCGCCAGTTGAAGAACGCCAAGTGA	1236
FH_P1	CACTTGGATCCCAAGGCCATGACCGGAACTATCCGCCAGTTGAAGAACGCCAAGTGA	1251

M129_P1	AACCACCACGTTTGTGGGACTGAAAGGCGCGGATGTTTTGCTCCAAACCACCGGGTTC	1296
FH_P1	AACCACCACGTTTGTGGGACTGAAAGGCGCGGATGTTTTGCTCCAAACCACCGGGTTC	1311

M129_P1	TTCAACCCGCGCCGCCACCCGAGTGGTTGATGGCGGCGAGCGGTCGGGATAACGAA	1356
FH_P1	TTCAACCCGCGCCGCCACCCGAGTGGTTGATGGCGGCGAGCGGTCGGGATAACGAA	1371

M129_P1	AAGACCGGTTTGTGATAACTCTGAAAACACCAAGCAGGGCTTCAAAGGAAGCT	1416
FH_P1	AAGACCGGTTTGTGATAACTCTGAAAACACCAAGCAGGGCTTCAAAGGAAGCT	1431

图 5

M129_P1	GACTCCGACAAGTCGGCCCCGATCGCCCTCCCGTTTGAAGCGTACTTCGCCAACATTGGC	1476
FH_P1	GACTCCGACAAGTCGGCCCCGATCGCCCTCCCGTTTGAAGCGTACTTCGCCAACATTGGC	1491

M129_P1	AACCTCACCTGGTTCGGGCAAGCGCTTTTGGTGTGGTGGCAATGGCCATGTTACCAAG	1536
FH_P1	AACCTCACCTGGTTCGGGCAAGCGCTTTTGGTGTGGTGGCAATGGCCATGTTACCAAG	1551

M129_P1	TCGGCCACACCGCGCCTTTGAGTATAGGTGTCTTTAGGGTGGCTATAATGCAACTGGT	1596
FH_P1	TCGGCCACACCGCGCCTTTGAGTATAGGTGTCTTTAGGGTGGCTATAATGCAACTGGT	1611

M129_P1	ACCAGTGCTACTGTAAGTGGTTGACCATATGCCTTACTGTTCTCAGGCATGGTCAACAAA	1656
FH_P1	ACCAGTGCTACTGTAAGTGGTTGACCATATGCCTTACTGTTCTCAGGCATGGTCAACAAA	1671

M129_P1	CAAAGTACCGGTTAAAGGATCTACCTTTAACAATAACCGCTGGTTGAATATGTACCA	1716
FH_P1	CAAAGTACCGGTTAAAGAATCTACCTTTAACAATAACCGCTGGTTGAATATGTACCA	1731

M129_P1	CGGATGGCAGTTGCTGGCGCTAAGTTCGTTGGTAGGGAAGTGGTTTGGCGGTACCATT	1776
FH_P1	CGGATGGCAGTTGCTGGCGCTAAGTTCGTTGGTAGGGAAGTGGTTTGGCGGTACCATT	1791

M129_P1	ACCATGGGTGATACCGTACCGTACCTCGCTTACTGTACGATGAAGTGAAGCAACCTG	1836
FH_P1	ACCATGGGTGATACCGTACCGTACCTCGCTTACTGTACGATGAAGTGAAGCAACCTG	1851

M129_P1	AACCTAGTAGCGCAAGGCCAAGGCTCTTTACGCGAAGACTTGCAACTCTTACACCCCTAC	1896
FH_P1	AACCTAGTAGCGCAAGGCCAAGGCTCTTTACGCGAAGACTTGCAACTCTTACACCCCTAC	1911

M129_P1	GGATGAGCCAATCGTCCGATTTACCAATCGGGGCTTGAAGTAGTAGTAGTAGTAGT	1956
FH_P1	GGATGAGCCAATCGTCCGATTTACCAATCGGGGCTTGAAGTAGTAGTAGTAGTAGT—GT	1968

M129_P1	CACAACGCACCCTACTACTTCCACAATAACCCCGATTGACAAGACCGTCCAATCCAAAAT	2016
FH_P1	CACAACGCACCCTACTACTTCCACAATAACCCCGATTGACAAGACCGTCCAATCCAAAAT	2028

M129_P1	GTGGTTGATGCCTTTATTAAGCCCTGAGAGGACAAGAACGGTAAGGATGATGCCAAATAC	2076
FH_P1	GTGGTTGATGCCTTTATTAAGCCCTGAGAGGACAAGAACGGTAAGGATGATGCCAAATAC	2088

M129_P1	ATCTACCCTTACCGTTACAGTGGCATGTGAGCTTGACAGGTATACAAGTGGTCCAATAAG	2136
FH_P1	ATCTACCCTTACCGTTACAGTGGCATGTGAGCTTGACAGGTATACAAGTGGTCCAATAAG	2148

图 6

M129_P1	CTCACTGACCAACCATTAAGTGCTGACTTTGTCAATGAGAATGCTTACCAACCAAACCTCC	2196
FH_P1	CTCACTGACCAACCATTAAGTGCTGACTTTGTCAATGAGAATGCTTACCAACCAAACCTCC	2208

M129_P1	TTGTTTGCTGCTATTCTCAATCCGGAATTGTTAGCAGCTCTCCCGACAAGGTTAAATAC	2256
FH_P1	TTGTTTGCTGCTATTCTCAATCCGGAATTGTTAGCAGCTCTCCCGACAAGGTTAAATAC	2268

M129_P1	GGTAAGGAAAACGAGTTTGTGCTAACGAGTACGAGCGCTTTAACCAGAAGTTAACGGTA	2316
FH_P1	GGTAAGGAAAACGAGTTTGTGCTAACGAGTACGAGCGCTTTAACCAGAAGTTAACGGTA	2328

M129_P1	GCTCCTACCCAAGGAACAACTGATCCCCTTCTCCCCACGCTTCCCGTTTCTCCACC	2376
FH_P1	GCTCCTACCCAAGGAACAACTGATCCCCTTCTCCCCACGCTTCCCGTTTCTCCACC	2388

M129_P1	GGGTTCAACCTTGTGGGGTCGGTGCTCGACCAGGTGTTGGATTATGTGCCCTGGATTGGG	2436
FH_P1	GGGTTCAACCTTGTGGGGTCGGTGCTCGACCAGGTGTTGGATTATGTGCCCTGGATTGGG	2448

M129_P1	AATGGGTACAGGTATGGCAATAACCACCGGGCGTGGATGATATAACCGCGCCTCAAACC	2496
FH_P1	AATGGGTACAGGTATGGCAATAACCACCGGGCGTGGATGATATAACCGCGCCTCAAACC	2508

M129_P1	AGCGCGGGGTCGTCCAGCGGAATTAGTACGAACACAAGTGGTTCGCGTTCCTTTCTCCCG	2556
FH_P1	AGCGCGGGGTCGTCCAGCGGAATTAGTACGAACACAAGTGGTTCGCGTTCCTTTCTCCCG	2568

M129_P1	ACGTTTTCCAACATCGGCGTCGGCCTCAAAGCGAATGTCCAAGCCACCCTCGGGGGCAGT	2616
FH_P1	ACGTTTTCCAACATCGGCGTCGGCCTCAAAGCGAATGTCCAAGCCACCCTCGGGGGCAGT	2628

M129_P1	CAGACGATGATTACAGGCGGTTCCGCTCGAAGAACCCTCGACCAAGCCAACCTCCAGCTC	2676
FH_P1	CAGACGATGATTACAGGCGGTTCCGCTCGAAGAACCCTCGACCAAGCCAACCTCCAGCTC	2688

M129_P1	TGAACGGGGCGGGGTGAAGGAATGATAAGGCTTCAAGTGGACAAAGTGACGAAAACCAC	2736
FH_P1	TGAACGGGGCGGGGTGAAGGAATGATAAGGCTTCAAGTGGACAAAGTGACGA---CCAC	2745

M129_P1	ACCAAGTTCACGAGCGCTACGGGGATGGACCAGCAGGACAATCAGGTACCTCCGCGGGG	2796
FH_P1	ACCAAGTTCACGAGCGCTACGGGGATGGGCCAGCAGGAACAATCAGGTACCTCCGCGGGG	2805

M129_P1	AATCCCGACTCGTTAAAGCAGGATAATATTAGTAAGAGTGGGGATAGTTTAACCACGCAG	2856
FH_P1	AATCCCGACTCGTTAAAGCAGGATAAGATTAGTAAGAGTGGGGATAGTTTAACCACGCAG	2865

图 7

M129_P1	GACGGCAATGCGATCGATCAACAAGAGGCCACCAACTACACCAACCTCCCCCAACCTC	2916
FH_P1	GACGGCAATGCGATGGATCAACAAGAGGCCACCAACTACACCAACCTCCCCCAACCTC	2925

M129_P1	ACCCCAACCGCTGATTGACCGAACGCGCTGTTCATTCACCAACAAGAACAACGCGCAGCGC	2976
FH_P1	ACCCCAACCGCTGATTGACCGAACGCGCTGTTCATTCACCAACAAGAACAACGCGCAGCGC	2985

M129_P1	GCCCAGCTCTTCTCCGCGGCTTGTGGGCAGCATCCCGGTGTTGGTAATCGAAGTGGG	3036
FH_P1	GCCCAGCTGTTCTCGCGGCTTGTGGGCAGCATCCCGGTGTTGGTAATAAGTCCGGC	3045
	***** **	
M129_P1	TCCGATTCCAACA---AATTCCAAGCCACCGACCAAAAATGGTCTACACCGACTTACAT	3093
FH_P1	CAAGATGATAACAGTAAGTTAAGGCGGAGGACCAAAAATGGTCTACACCGACTTACAG	3105
	*** ** * * * *****	
M129_P1	TCGGACCAAACCAAACCTAACCTCCCGCTTACGGTGAGGTGAATGGGTTGTGAATCCG	3153
FH_P1	TCGGACCAAACCAAACCTAACCTCCCGCTTACGGTGAGGTGAATGGGTTGTGAATCCG	3165

M129_P1	GCGTTGGTGAAACCTATTTTGGGAACACGCGAGCGGGTGGTTCGGGGTCCAACACGACC	3213
FH_P1	GCGTTGGTGAAACCTATTTTGGGAACACGCGAGCGAGTGGTTCGGGGTCCAACACGACC	3225

M129_P1	AGTTCACCCGGTATCGGTTTTAAATTCCTGAAACAAAATA-----ATGAT-TCCAAA	3264
FH_P1	AGTTCACCCGGTATCGGTTTTAAATTCCTGAAACAAAAGTGGCACAACACAACGTCGAAG	3285
	***** * * * * *	
M129_P1	GCCACCCTGATCACCCCGGGTTGGCTTGAACGCCAGGACGTCGGTAACCTCGTTGTC	3324
FH_P1	GCTGTGCTGATCACCCCGGGTTGGCTTGAACGCCAAGACGTTGGTAACCTCGTTGTC	3345
	* *****	
M129_P1	AGTGGCACCACGGTGAGCTTCCAGCTCGGCGGGTGGCTGGTCACCTTACCGACTTTGTC	3384
FH_P1	AGTGGCACCAGCTTCCAGCTCGGCGGGTGGTGGTACGTTACGTTACCGACTTTATC	3405
	***** * ***** * * * ***** *	
M129_P1	AAACCCGCGCGGGTTACCTCGGTCTCCAGTTAACGGGCTTGGATGCAAGTATGCGACG	3444
FH_P1	AAACCCGCGCTGGTTACCTCGGGTCTCCAGTTAACGGGCTTGGATGCAAGTATGCGACG	3465
	***** *****	
M129_P1	CAGCGGCCCTCATTTGGGCCCCCGGCCCTGAGCGGCTTTCGTGGCAGTTGGGTCAAC	3504
FH_P1	CAGCGGCTCTCATTTGGGCCCCCGGCCCTGAGCGGCTTTCGTGGCAGTTGGGTCAAC	3525
	***** *****	
M129_P1	CGGTTGGGCCGCGTGAGAGTGTGTGGGATTTGAAGGGGGTGTGGGCGGATCAAGCTCAG	3564
FH_P1	CGGTTGGGCCGCGTGAGAGTGTGTGGGATTTGAAGGGGGTGTGGGCGGATCAAGCTCAG	3585

图 8

M129_P1	TCCGACTCGCAAGGATCTACCACCACCGCAACAAGGAACGCCTTACCGGAGCACCCGAAT	3624
FH_P1	TCCGACTCGCAAGGATCTACCACCACCGCAACAAGGACGCCTTACCGGAGCACCCGAAT	3645

M129_P1	GCTTTGGCCTTTCAGGTGAGTGTGGTGAAGCGAGTGCTTACAAGCCAAACACGAGCTCC	3684
FH_P1	GCTTTGGCCTTTCAGGTGAGTGTGGTGAAGCGAGTGCTTACAAGCCAAACACGAGCTCC	3705

M129_P1	GGCCAAACCCAATCCACTAACAGTTCGCCCTACCTGCACTTGGTGAAGCCTAAGAAAGTT	3744
FH_P1	GGCCAAACCCAATCCACTAACAGTTCGCCCTACCTGCACTTGGTGAAGCCTAAGAAAGTT	3765

M129_P1	ACCCAATCCGACAAGTTAGACGACGATCTTAAAAACCTGTTGGACCCCAACCAGGTTCCG	3804
FH_P1	ATCCAATCCGACAAGTTAGACGACGATCTTAAAAACCTGTTGGACCCCAACCAGGTTCCG	3825
	* *****	
M129_P1	ACCAAGCTGCGCCAAAGCTTTGGTACAGACCATTCCACCCAGCCCAGCCCAATCGCTC	3864
FH_P1	ACCAAGCTGCGCCAAAGCTTTGGTACAGACCATTCCACCCAGCCCAGCCCAATCGCTC	3885

M129_P1	AAAACAACGACACCCGGTATTGGGACGAGTAGTGGTAACCTCAGTAGTGTGCTTAGTGGT	3924
FH_P1	AAAACAACGACACCCGGTATTGGGACGAGTAGTGGTAACCTCAGTAGTGTGCTTAGTGGT	3945

M129_P1	GGGGGTGCTGGAGGGGGTTCTTCAGGCTCAGGTCAATCTGGCGTGGATCTCTCCCCGTT	3984
FH_P1	GGGGGTGCTGGAGGGGGTTCTTCAGGCTCAGGTCAATCTGGCGTGGATCTCTCCCCGTT	4005

M129_P1	GAAAAGTGAGTGGGTGGCTTGTGGGCAGTTACCAAGCAGAGTGACGGAAACACCTCC	4044
FH_P1	GAAAAGTGAGTGGGTGGCTTGTGGGCAGTTACCAAGCAGAGTGACGGAAACACCTCC	4065

M129_P1	TCCACCAACAACCTCGCGCTAATACTAATACGGGAATGATGTGGTGGGGTTGGTCGA	4104
FH_P1	TCCACCAACAACCTCGCGCTAATACTAATACGGGAATGATGTGGTGGGGTTGGTCGA	4125

M129_P1	CTTCTGAAAGCAACGCCGCAAAGATGAATGACGATGTTGATGGTATTGTACGCACCCA	4164
FH_P1	CTTCTGAAAGCAACGCCGCAAAGATGAATGACGATGTTGATGGTATTGTACGCACCCA	4185

M129_P1	CTCGCTGAACTGTTAGATGGGAAGGACAAACAGCTGACACTGGTCCACAAAGCGTGAAG	4224
FH_P1	CTCGCTGAACTGTTAGATGGGAAGGACAAACAGCTGACACTGGTCCACAAAGCGTGAAG	4245

M129_P1	TTCAAGTCTCCTGACCAAATTGACTTCAACCCTGTTTACCCACCCAGTCACCGATCTG	4284
FH_P1	TTCAAGTCTCCTGACCAAATTGACTTCAACCCTGTTTACCCACCCAGTCACCGATCTG	4305

图 9

M129_P1	TTTGATCCGGTAACTATGTTGGTGTATGACCAGTACATACCGCTGTTTATTGATATCCCA	4344
FH_P1	TTTGATCCGGTAACTATGTTGGTGTATGACCAGTACATACCGCTGTTTATTGATATCCCA	4365

M129_P1	GCAAGTGTGAACCCTAAAATGGTTCGTTTAAAGGTCTTGAGCTTTGACACCAACGAACAG	4404
FH_P1	GCAAGTGTGAACCCTAAAATGGTTCGTTTAAAGGTCTTGAGCTTTGACACCAACGAACAG	4425

M129_P1	AGCTTAGGTCTCCGCTTAGAGTTCCTTAAACCTGATCAAGATACCCAACCAAACAACAAC	4464
FH_P1	AGCTTAGGTCTCCGCTTAGAGTTCCTTAAACCTGATCAAGATACCCAACCAAACAACAAC	4485

M129_P1	G TTCAGGTCAATCCGAATAACGGTGACTTCTTACCACTGTTAACGGCCTCCAGTCAAGGT	4524
FH_P1	G TTCAGGTCAATCCGAATAACGGTGACTTCTTACCACTGTTAACGGCCTCCAGTCAAGGT	4545

M129_P1	CCCCAAACCTTGTTTAGTCCGTTTAAACCAGTGACCTGATTACGTGTTGCCGTTAGCGATC	4584
FH_P1	CCCCAAACCTTGTTTAGTCCGTTTAAACCAGTGACCTGATTACGTGTTGCCGTTAGCGATC	4605

M129_P1	ACTGTACCTATTGTTGTGATTGTGCTCAGTGTTACCTTAGGACTTGCCATTGGAATCCCA	4644
FH_P1	ACTGTACCTATTGTTGTGATTGTGCTCAGTGTTACCTTAGGACTTGCCATTGGAATCCCA	4665

M129_P1	ATGCACAAGAACAACAGGCCTTGAAGGCTGGGTTTGCCTATCAAACCAAAGGTTGAT	4704
FH_P1	ATGCACAAGAACAACAGGCCTTGAAGGCTGGGTTTGCCTATCAAACCAAAGGTTGAT	4725

M129_P1	GTGTTGACCAAAGCGGTTGGTAGTGTCTTAAAGGAAATCATTAAACGCACAGGTATCAGT	4764
FH_P1	GTGTTGACCAAAGCGGTTGGTAGTGTCTTAAAGGAAATCATTAAACGCACAGGTATCAGT	4785

M129_P1	CAAGCGCCAAAACGCTTGAAACAAACCAGTGCGGCTAAACCAGGAGACCCCGCCACCA	4824
FH_P1	CAAGCGCCAAAACGCTTGAAACAAACCAGTGCGGCTAAACCAGGAGACCCCGCCACCA	4845

M129_P1	GTACCACCAAAGCCAGGGGCTCCTAAGCCACCAGTGCAACCACCTAAAAAACCCTTAG	4884
FH_P1	GTACCACCAAAGCCAGGGGCTCCTAAGCCACCAGTGCAACCACCTAAAAAACCCTTAG	4905

图 10

专利名称(译)	检测属于肺炎支原体和/或生殖支原体的微生物的方法		
公开(公告)号	CN102687019A	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	CN201080054628.X	申请日	2010-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社		
[标]发明人	皆川温子 广岛丰正 岛田康司 杉山和之 水户部优树 H 板垣		
发明人	皆川温子 广岛丰正 岛田康司 杉山和之 水户部优树 H.板垣		
IPC分类号	G01N33/569 C07K16/12 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q2521/301 C07K16/1253 G01N2469/10 C12Q1/689 G01N33/56933		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	2009276115 2009-12-04 JP 2010023102 2010-02-04 JP		
其他公开文献	CN102687019B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了用于迅速且特异性地诊断肺炎支原体和/或生殖支原体感染病的检测方法以及检测试剂盒。其以肺炎支原体或生殖支原体的DnaK为指标。

		DnaK基因PCR		合计
		阳性	阴性	
P1基因PCR	阳性	46	0	46
	阴性	0	30	30
合计		46	30	76