

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510124053.5

[45] 授权公告日 2008年7月23日

[11] 授权公告号 CN 100404691C

[22] 申请日 2005.11.23

[21] 申请号 200510124053.5

[73] 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街20号  
军医科院微生物流行病学研究所

[72] 发明人 宋亚军 王豫 翟俊辉 郭兆彪  
王津 杨瑞馥

[56] 参考文献

CN1450171A 2003.10.22

CN1396270A 2003.2.12

CN1616677A 2005.5.18

US6828110B2 2004.12.7

CN1673389A 2005.9.28

审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

权利要求书1页 说明书20页 附图10页

[54] 发明名称

一种检测生物恐怖相关病原细菌的方法及其专用DNA芯片

[57] 摘要

本发明公开了一种检测生物恐怖相关病原细菌的方法及其专用DNA芯片。该检测生物恐怖相关病原细菌的方法，是将待测样品的DNA用表1中的引物对进行PCR扩增，得到的扩增产物与下述DNA芯片进行杂交，然后检测杂交信号，如果杂交信号为阳性，则待测样品为或含有杂交信号阳性的探针对应的生物恐怖相关病原细菌。所述DNA芯片包括SEQ ID NO: 1-16的DNA序列。本发明在反生物恐怖领域以及临床微生物检测方面具有良好的应用前景。

1、一种检测生物恐怖相关病原细菌的 DNA 芯片，包括 SEQ ID NO: 1—16 的 DNA 序列。

2、根据权利要求 1 所述的 DNA 芯片，其特征在于：所述生物恐怖相关病原细菌为下述八种细菌中的至少一种：炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、布鲁氏菌(*Brucella*)、伯氏考克斯体(*Coxiella burnetii*)、土拉弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*)、普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)和鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)。

3、一种检测生物恐怖相关病原细菌的方法，是分别以待测样品的 DNA 为模板，用下述 1) 至 8) 的 8 对引物对或由从所述 8 对引物对的每对引物对中选出的一个引物对组成的 8 个引物对进行 PCR 扩增，将得到的扩增产物和权利要求 1 或 2 所述的检测生物恐怖相关病原细菌的 DNA 芯片进行杂交，如果杂交信号为阳性，则待测样品为或含有杂交信号阳性的探针对应的生物恐怖相关病原细菌；

所述 8 对引物对如下：

1) 由 Balf-1 和 Balf-B 组成的引物对，和由 Bapa-1 和 Bapa-A 组成的引物对；  
2) 由 Bpfur-2 和 Bpfur-A 组成的引物对，和由 Bps11705-F 和 Bps11705-R 组成的引物对；  
3) 由 Bra31kd-3 和 Bra31kd-C 组成的引物对，和由 Bropm2b-4 和 Bropm2b-D 组成的引物对；  
4) 由 Coxb27kd-5 和 Coxb27kd-C 组成的引物对，和由 Coxb34kd-3 和 Coxb34kd-D 组成的引物对；  
5) 由 Ftfop-1 和 Ftfop-D 组成的引物对，和由 Ft23kd-3 和 Ft23kd-B 组成的引物对；  
6) 由 Rickpor-Rpa-3 和 Rickpor-Rpa-C 组成的引物对，和由 Rpglta-1 和 Rpglta-A 组成的引物对；  
7) 由 Rric190kd-1 和 Rric190kd-A 组成的引物对，和由 Rricompb-3 和 Rricompb-C 组成的引物对；  
8) 由 Ypcalf-2 和 Ypcalf-B 组成的引物对，和由 Yppla-2 和 Yppla-C 组成的引物对。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述方法中，用所述 1) 至 8) 的 8 对引物对进行 PCR 扩增。

5、根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其特征在于：所述生物恐怖相关病原细菌为炭疽芽孢杆菌、类鼻疽伯克霍尔德氏菌、布鲁氏菌、伯氏考克斯体、土拉弗朗西斯氏菌、普氏立克次体、立氏立克次体和鼠疫耶尔森氏菌。

6、根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其特征在于：所述 PCR 为多重 PCR。

## 一种检测生物恐怖相关病原细菌的方法及其专用 DNA 芯片

### 技术领域

本发明涉及一种检测生物恐怖相关病原细菌的方法及其专用 DNA 芯片。

### 背景技术

自从美国经历“炭疽邮件”袭击事件以后，反生物恐怖已经成为国际反恐斗争中一个重要组成部分。应对生物恐怖威胁的先决条件之一就是要对于生物恐怖相关病原进行快速、准确的检测。

目前，利用基因芯片技术实现细菌的通用检测鉴定一直是国内外微生物学家研究的重要领域。目前，细菌通用检测芯片最常用的策略是利用细菌中保守的 16S rRNA 基因或 23S rRNA 基因，设计通用的扩增引物和各细菌特异的寡核苷酸探针固定在芯片上，用通用引物扩增待检测标本并进行标记，与芯片杂交，根据杂交信号进行判断。但是由于种种原因，所设计的一些寡核苷酸探针特异性并不理想，有比较严重的交叉反应现象，检测特异性不强。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种检测生物恐怖相关病原细菌的方法及其专用 DNA 芯片。

本发明所提供的检测生物恐怖相关病原细菌的 DNA 芯片，包括下述 1) 至 16) 中的至少一种探针：

1) 序列表中 SEQ ID No: 1 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 1 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

2) 序列表中 SEQ ID No: 2 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 2 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

3) 序列表中 SEQ ID No: 3 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 3 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

4) 序列表中 SEQ ID No: 4 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 4 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

5) 序列表中 SEQ ID No: 5 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 5 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

6) 序列表中 SEQ ID No: 6 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 6 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

7) 序列表中 SEQ ID No: 7 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 7 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

8) 序列表中 SEQ ID No: 8 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 8 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

9) 序列表中 SEQ ID No: 9 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 9 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列；

10) 序列表中 SEQ ID No: 10 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No:

#### 10 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列;

11) 序列表中 SEQ ID No: 11 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No:

#### 11 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列;

12) 序列表中 SEQ ID No: 12 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No:

#### 12 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列;

13) 序列表中 SEQ ID No: 13 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No:

#### 13 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列;

14) 序列表中 SEQ ID No: 14 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No:

#### 14 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列;

15) 序列表中 SEQ ID No: 15 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No:

#### 15 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列;

16) 序列表中 SEQ ID No: 16 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No:

#### 16 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列。

上述高严谨条件可为在 2× 杂交液 (10×SSC, 0.04%SDS, 200 μg/μl 鲑鱼精 DNA, 10% 硫酸葡聚糖) 中, 在 65°C 下杂交, 之后进行洗芯片。

序列表中的 SEQ ID No: 1 由 334 个脱氧核苷酸组成, 是炭疽芽孢杆菌致死因子基因 (Balf), 可用于检测炭疽芽孢杆菌; 序列表中的 SEQ ID No: 2 由 249 个脱氧核苷酸组成, 是炭疽芽孢杆菌保护性抗原基因 (Bapa), 可用于检测炭疽芽孢杆菌; 序列表中的 SEQ ID No: 3 由 268 个脱氧核苷酸组成, 是类鼻疽伯克霍尔德氏菌 fur 基因 (Bpfur), 可用于检测类鼻疽伯克霍尔德氏菌; 序列表中的 SEQ ID No: 4 由 319 个脱氧核苷酸组成, 是类鼻疽伯克霍尔德氏菌膜蛋白基因 (Bps1), 可用于检测类鼻疽伯克霍尔德氏菌; 序列表中的 SEQ ID No: 5 由 416 个脱氧核苷酸组成, 是布鲁氏菌 31kd 蛋白基因 (Bra31kd), 可用于检测布鲁氏菌; 序列表中的 SEQ ID No: 6 由 413 个脱氧核苷酸组成, 是布鲁氏菌外膜蛋白基因 omp2 (Bromp), 可用于检测布鲁氏菌; 序列表中的 SEQ ID No: 7 由 421 个脱氧核苷酸组成, 是伯氏考克斯体 27kd 抗原基因 (Coxb27kd), 可用于检测伯氏考克斯体; 序列表中的 SEQ ID No: 8 由 296 个脱氧核苷酸组成, 是伯氏考克斯体 34kd 抗原基因 (Coxb34kd), 可用于检测伯氏考克斯体; 序列表中的 SEQ ID No: 9 由 457 个脱氧核苷酸组成, 是土拉弗朗西斯氏菌 fop 基因 (Ftfop), 可用于检测土拉弗朗西斯氏菌; 序列表中的 SEQ ID No: 10 由 330 个脱氧核苷酸组成, 是土拉弗朗西斯氏菌 23 kD 抗原基因 (Ft23kd), 可用于检测土拉弗朗西斯氏菌; 序列表中的 SEQ ID No: 11 由 474 个脱氧核苷酸组成, 是普氏立克次体 rpa 基因 (Rickpor), 可用于检测普氏立克次体; 序列表中的 SEQ ID No: 12 由 214 个脱氧核苷酸组成, 是普氏立克次体 glta 基因 (Rpglta), 可用于检测普氏立克次体; 序列表中的 SEQ ID No: 13 由 371 个脱氧核苷酸组成, 是立氏立克次体 190KD 抗原基因 (Rric190kd), 可用于检测立氏立克次体; 序列表中的 SEQ ID No: 14 由 385 个脱氧核苷酸组成, 是立氏立克次体外膜蛋白基因 (Rricompb), 可用于检测立氏立克次体; 序列表中的 SEQ ID No: 15 由 235 个脱氧核苷酸组成, 是鼠疫耶尔森氏菌荚膜抗原基因 (Ypcalf), 可用于检测鼠疫耶尔森氏菌; 序列表中的 SEQ ID No: 16 由 317 个脱氧核苷酸组成, 是鼠疫耶尔森氏菌 pla 基因 (Yppla), 可用于检测鼠疫耶尔森氏菌。

为了提高检测的准确性, 所述 DNA 芯片包括下述 8 对探针中的至少一对探针: 上述 1)

和 2)、3) 和 4)、5) 和 6)、7) 和 8)、9) 和 10)、11) 和 12)、13) 和 14)、15) 和 16)。

所述生物恐怖相关病原细菌包括下述八种细菌中的至少一种：炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、布鲁氏菌(*Brucella*)、伯氏考克斯体(*Coxiella burnetii*)、土拉弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*)、普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)和鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)。

所述 DNA 芯片优选为包括序列表中 SEQ ID No: 1 至 16 的 DNA 序列或是在高严谨条件下可与序列表中 SEQ ID No: 1 至 16 限定的 DNA 序列杂交的核苷酸序列。

本发明提供的检测生物恐怖相关病原细菌的方法，是分别以待测样品的 DNA 为模板，用下述 1) 至 8) 的 8 对引物对或由从所述 8 对引物对的每对引物对中选出的一个引物对组成的 8 个引物对进行 PCR 扩增，将得到的扩增产物和上述任意一种检测生物恐怖相关病原细菌的 DNA 芯片进行杂交，如果杂交信号为阳性，则待测样品为或含有杂交信号阳性的探针对应的生物恐怖相关病原细菌；

所述 8 对引物对如下：

1) 由 Balf-1 和 Balf-B 组成的引物对，和由 Bapa-1 和 Bapa-A 组成的引物对；2) 由 Bpfur-2 和 Bpfur-A 组成的引物对，和由 Bps11705-F 和 Bps11705-R 组成的引物对；3) 由 Bra31kd-3 和 Bra31kd-C 组成的引物对，和由 Bromp2b-4 和 Bromp2b-D 组成的引物对；4) 由 Coxb27kd-5 和 Coxb27kd-C 组成的引物对，和由 Coxb34kd-3 和 Coxb34kd-D 组成的引物对；5) 由 Ftfop-1 和 Ftfop-D 组成的引物对，和由 Ft23kd-3 和 Ft23kd-B 组成的引物对；6) 由 Rickpor-Rpa-3 和 Rickpor-Rpa-C 组成的引物对，和由 Rpglta-1 和 Rpglta-A 组成的引物对；7) 由 Rric190kd-1 和 Rric190kd-A 组成的引物对，和由 Rricompb-3 和 Rricompb-C 组成的引物对；8) 由 Ypcalf-2 和 Ypcalf-B 组成的引物对，和由 Yppla-2 和 Yppla-C 组成的引物对。

上述 8 对引物对的序列如表 1 所示。

上述方法中，优选所述 1) 至 8) 的 8 对引物对进行 PCR 扩增。

所述生物恐怖相关病原细菌包括炭疽芽孢杆菌、类鼻疽伯克霍尔德氏菌、布鲁氏菌、伯氏考克斯体、土拉弗朗西斯氏菌、普氏立克次体、立氏立克次体和鼠疫耶尔森氏菌。

为了提高检测效率，所述 PCR 优选为多重 PCR。

本发明选择特异基因设计引物进行普通 PCR 或多重 PCR 扩增并标记，利用单个的 PCR 产物作为探针，制备为 DNA 芯片，再进行芯片检测分析。本发明采用特异基因多重 PCR 结合 DNA 芯片的通用检测技术，可以克服传统多重 PCR 凝胶电泳检测方法无法区分的出现的非特异性扩增现象；而当多重 PCR 体系中扩增片段长度相差不大的情况下，通过传统的凝胶电泳检测不能区分出来，而本发明的方法可以很有效地鉴别开来。本发明不仅提高了检测的灵敏度、特异性、稳定性和重现性，并且实现“一对多”的检测目的，即一次实验能检测出一个样品中多个目标细菌，满足反生物恐怖的需要。

本发明选择 8 种生物恐怖相关病原细菌的 16 个特异基因片段（每种目标细菌两个片段），进行普通 PCR 或多重 PCR，完成扩增和荧光标记，从而进行 DNA 芯片杂交分析，给出检测结果。本发明在检测过程中具有较高的灵敏度和特异性，既可以避免以往多重 PCR

检测中可能出现的非特异性结果，又可以避免基于保守基因的基因芯片检测技术中经常出现的交叉反应。本发明实现了在一次实验中同时检测 8 种生物恐怖相关病原细菌（炭疽芽孢杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、布鲁氏菌、土拉弗朗西斯氏菌、类鼻疽伯克霍尔德氏菌、普氏立克次体、立氏立克次体和伯氏考克斯氏体）；而且每个靶细菌选择两个基因进行检测，避免了因为基因突变等原因造成的漏检，也提高了检测的准确性。本发明最低可以检测 11-14CFU/ml 的目标细菌菌液标本，最低可以检测出 6-10ng/ $\mu$ l 的目标细菌 DNA，比传统的 PCR-电泳方法要灵敏 10 倍。本发明可以有效检测出血液和动物感染组织中的目标细菌；本发明可以稳定而特异地实现多种细菌的通用检测，而且即使样品存在过量的无关细菌干扰，仍可以给出正确结果。本发明在反生物恐怖领域以及临床微生物检测方面具有良好的应用前景。

### 附图说明

图 1 为芯片基本技术流程图

图 2 为芯片点样排列示意图

图 3 为琼脂糖凝胶电泳结果图

图 4 为鼠疫耶尔森氏菌特异性试验结果图

图 5 为鼠疫耶尔森氏菌 EV76 菌株  $10^{-8}$  稀释度菌液芯片杂交结果

图 6 为鼠疫耶尔森氏菌 EV76 菌株  $10^{-8}$  稀释度菌液制备模拟血标本芯片杂交结果

图 7 为鼠疫耶尔森氏菌 EV76 菌株染色体 DNA 系列稀释度检测结果

图 8 为鼠疫耶尔森氏菌 EV76 菌株感染 BALB/C 小鼠 48 小时后各组织检测结果

图 9 为炭疽芽孢杆菌特异性试验结果

图 10 为炭疽芽孢杆菌 A16R 菌株  $10^{-8}$  稀释度菌液芯片杂交结果

图 11 为炭疽芽孢杆菌  $10^{-7}$  稀释度菌液制备模拟血标本芯片杂交结果

图 12 为布鲁氏菌特异性试验结果

图 13 为 6pg/ $\mu$ l 布鲁氏菌染色体 DNA 芯片杂交结果

图 14 为土拉弗朗西斯氏菌特异性试验结果

图 15 为类鼻疽伯克霍尔德氏菌特异性试验结果

图 16 为普氏立克次体特异性试验结果

图 17 为立氏立克次体特异性试验结果

图 18 为伯氏考克斯氏体特异性试验结果

图 19 为多种目标细菌同时检测的实验结果

图 20 为杂菌干扰实验检测结果

图 21 为混合样品盲测结果

### 具体实施方式

一、本发明的特异基因多重 PCR 结合 DNA 芯片检测技术的原理

1、DNA 芯片检测技术原理：DNA 微点阵芯片是指同时将大量的探针分子有序地固化于支持物固定到固相支持物（玻片）表面上，组成密集二维分子排列，然后与已标记的待测生物样品中靶分子杂交，借助核酸分子杂交配对的特异性通过特定的仪器比如激光共聚焦扫描或电荷偶联摄影像机（CCD）对杂交信号的强度进行快速、并行、高效地检测分析（图 1）。

2、多重 PCR 原理：一般 PCR 仅应用一对引物，通过 DNA 聚合酶扩增模板，复制出大量的目的片段，它主要用于单一片段的检测，PCR 是常用的微生物检测方法。多重 PCR(multiplex PCR)，又称多重引物 PCR 或复合 PCR，是在同一 PCR 反应体系内加上二对以上引物，可以同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。一般而言，多重 PCR 体系中每对引物扩增片段长度不同，通过琼脂糖凝胶电泳，区分不同大小的扩增片段，可以实现多个靶基因的同时检测。设计多重 PCR 引物时，既要保证扩增的特异性，又要确保不同扩增片段之间的大小差异可以由琼脂糖凝胶电泳加以区分。但是在实际工作中，尤其是设计扩增多个靶基因（五个以上）的多重 PCR 引物时，这一目标较难实现。同时由于多重 PCR 只是通过扩增片段的大小进行结果判断，对于可能出现的假阳性扩增无法区分。

3、特异基因多重 PCR 结合 DNA 芯片检测技术的原理：现有的利用 DNA 芯片技术检测细菌的方法一般都是基于 16S rRNA 或 23S rRNA，设计寡核苷酸探针，利用通用引物扩增标记靶序列，通过严谨杂交实现检测。由于细菌的 rRNA 基因序列十分保守，往往不同细菌的探针仅相差一个核苷酸，在杂交过程中可能会产生交叉反应，造成结果判读的困难。

本发明将多重 PCR 扩增与 DNA 芯片结合起来，如果待测样品中含有一种或多种目标细菌的核酸，多重 PCR 反应将扩增并标记上特异的片段，与 DNA 芯片进行杂交后，通过生物芯片检测装置检测荧光信号，结合探针点样模式即可以判断待测样品中是否含有目标细菌的核酸。

在本发明中，使用目标细菌的特异基因片段产物作为探针，制备芯片，这样可以避免 rRNA 芯片中可能出现的交叉反应，提高了检测的准确性；同时每个目标细菌选择两个特异片段用于检测，在单一基因突变的情况下仍能给出结果，不会出现漏检。此外，传统的多重 PCR 仅仅通过扩增产物大小判断结果，有时会出现假阳性结果，而使用 DNA 芯片杂交判断结果，这种基于序列信息进行检测的方法大大提高了结果的可靠性。

4、芯片点样排列：在本发明中，共使用 16 个探针检测 8 种目标细菌；在每张片基上点 32 个亚矩阵（4×8 排列），每亚矩阵按 4×4 点阵设计，代表一种探针（见图 2）；这样每张玻片容量为  $4 \times 4 \times 32 = 512$  个点，每个探针点重复 32 次，可以避免由于杂交液分布不均等情况造成的假阴性结果。

## 二、本发明的检测生物恐怖相关病原细菌的方法及其专用 DNA 芯片的特性实验

1、特异性实验：本实验主要是选择与目的菌相近缘的或无关的菌株一些菌株，进行多重 PCR 的扩增同时荧光标记，进行芯片的杂交检测，观察是否能够特异地检测出阳性信号，并考察其在检测过程中是否能够避免一些无关的干扰，考察该项技术的特异性。

2、灵敏度评价：本发明的灵敏度评价是主要确定不同样品中，以不同形式存在的目标细菌模板的最低检出率。

(1) 染色体检测灵敏度的评价：提取目标细菌的染色体 DNA，测定浓度后，将其进行 10 倍系列稀释，对各个稀释度取一定的量作为模板，进行荧光标记多重 PCR 扩增后，与芯片杂交，考察此技术检测纯染色体标本的灵敏度。

(2) 细菌菌液检测灵敏度的评价：培养目标细菌，将培养物进行 10 倍系列稀释，利用平板涂抹法对各稀释度进行菌落计数；同时取各个稀释度菌液，提取 DNA 模板，进行荧光标记多重 PCR 扩增后，与芯片杂交，评价本技术检测细菌菌液的灵敏度。

(3) 模拟血标本灵敏度检测：培养目标细菌，将培养物进行 10 倍系列稀释，然后将

各个稀释度菌液取一定的量加入动物或人的血中，形成系列浓度的模拟血标本。提取 DNA 模板，进行荧光标记多重 PCR 扩增后，与芯片杂交，评价本技术检测血液标本的灵敏度。

3、动物感染标本的检测：以一种目标细菌感染动物，解剖后分别取出肝、脾、肺等器官并将其研磨，提取组织总 DNA 后，进行荧光标记多重 PCR 扩增后，与芯片杂交，评价本技术检测动物感染标本的能力。

4、多种靶细菌的同时检测：人工制备含有多种靶细菌 DNA 的标本，进行荧光标记多重 PCR 扩增后，与芯片杂交。考察本技术同时检测多种靶细菌的效果，以及以多重 PCR 为基础的 DNA 芯片检测方法的可行性。

5、杂菌干扰实验的检测：任意选择一种与目标细菌不相关的菌株与目的菌进行不同比例的混合，提取 DNA 模板。考察在过量无关细菌的干扰状态下，本技术检出目标细菌的能力。

6、样品的盲测：取几个目标细菌的染色体 DNA，进行随机组合并编号，本操作由一人完成；然后由另一人进行多重 PCR 扩增标记，芯片杂交，给出检测结果，然后与原始组合情况进行对照，考察本技术进行多样品检测的准确性。

除非有其它说明，本发明的实施使用本领域中的传统分子生物学、细胞生物学，和克隆技术。

实施例 1、含有序列表中序列 1 至 16 的探针的 DNA 芯片的制备及八种生物恐怖相关病原细菌的检测

1、含有序列表中序列 1 至 16 的探针的 DNA 芯片的制备

细菌菌株：八种生物恐怖相关病原细菌：炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、布鲁氏菌 (*Brucella*)、土拉弗朗西斯氏菌 (*Francisella tularensis*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii*) 和伯氏考克斯氏体 (*Coxiella burnetii*)；以及假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*)，均购自病原微生物生物安全国家重点实验室。细菌模板 DNA 提取按照 NaI 裂解—玻璃粉吸附法进行 (杨瑞馥, 郭兆彪, 张敏丽, 等. 核酸诊断技术规范化的研究[J]. 生物技术通讯, 1999, 8(2): 81-88)。

针对以上八种生物恐怖相关病原细菌，每种细菌选择两条特异基因作为靶基因，设计引物，详见表 1。所有引物均由上海生工生物有限公司合成。

表 1 8 种生物恐怖相关病原细菌特异性探针引物及其序列

上游引物名称	引物序列(5'--3')	下游引物名称	引物序列(5'--3')	靶基因(简称)	扩增长度



Balf-1	AGGAACATCCCACAGACT	Balf-B	TCATCTTTCTTTGGCTCA	炭疽芽孢杆菌致死因子基因 (Balf)	334bp
Bapa-1	CAAGTGCTGGACCTACGG	Bapa-A	TTGCCTCTGGTGATACATTC	炭疽芽孢杆菌保护性抗原基因 (Bapa)	249bp
Bpfur-2	ACGGCGTAATGCTCTGCG	Bpfur-A	GGTCGGATTGGTCATGGCTAG	类鼻疽伯克霍尔德氏菌 fur 基因 (Bpfur)	268bp
Bps11705-F	CATATTGATCGGGAGCCTTG	Bps11705-R	GGTGCCACTGTAAGTATAG	类鼻疽伯克霍尔德氏菌膜蛋白基因 (Bps1)	319bp
Bra31kd-3	ACGCCTATTTCTTTGTGGG	Bra31kd-C	CCGATCATTGAGGGATTATTT	布鲁氏菌 31kd 蛋白基因 (Bra31kd)	416bp
Bromp2b-4	TCGGGCGTAGATGGTAAA	Bromp2b-D	AACTGGTCGGTGATGTGA	布鲁氏菌外膜蛋白基因 omp2 (Bromp)	413bp
Coxb27kd-5	CAGTGGCAGGAATCCTC	Coxb27kd-C	AACGCTTTATTACCAATGACG A	伯氏考克斯体 27kd 抗原基因 (Coxb27kd)	421bp
Coxb34kd-3	ACGGAAGTTATGTTGCGAATG	Coxb34kd-D	AGGCGTTGTTGTTGCTGAA	伯氏考克斯体 34kd 抗原基因 (Coxb34kd)	296bp
Ftfop-1	AATTCATTGCTCCTTTTG	Ftfop-D	TGTTAGTACCCGCTCTGC	土拉弗朗西斯氏菌 fop 基因 (Ftfop)	457bp
Ft23kd-3	GAAAGCTGATTCGGCTAC	Ft23kd-B	CCATCTTTTGAAACACCC	土拉弗朗西斯氏菌 23 kD 抗原基因 (Ft23kd)	330bp
Rickpor-Rpa-3	AGGTGGCAATGATGAGCG	Rickpor-Rpa-C	AGCCCGACTAATGCGTGT	普氏立克次体 rpa 基因 (Rickpor)	474bp
Rpglta-1	GCTAATGAAGCAGTGATA	Rpglta-A	ACAGCGGATTATTGTCTA	普氏立克次体 glta 基因 (Rpglta)	214bp
Rric190kd-1	AAGGAGCGGGAGATTGTA	Rric190kd-A	TTGGATTTGCGCGATTTT	立氏立克次体 190KD 抗原基因 (Rric190kd)	371bp
Rricompb-3	TGGTGCCGTGACTGATAC	Rricompb-C	GCCAATACCTGTGCCTAA	立氏立克次体外膜蛋白基因 (Rricompb)	385bp
Ypcalf-2	CCCCAATGTCAAACGGCTCT	Ypcalf-B	GGATGACGGCATTCTGCTC	鼠疫耶尔森氏菌荚膜抗原基因 (Ypcalf)	235bp
Yppla-2	TCCATACTATTCTGACCCT G	Yppla-C	TTACCCGCACTCCTTTGCG	鼠疫耶尔森氏菌 pla 基因 (Yppla)	317bp

探针的制备：根据表1的引物，分别以上述制备的八种细菌的DNA为模板，进行PCR扩增

反应, 扩增八种生物恐怖相关病原细菌的十六条特异基因片段, 反应体系: 在30  $\mu$ l 扩增体系中, 10 $\times$ PCR Master Mix (上下游引物浓度为10  $\mu$ mol/L, dATP、dTTP、dGTP和dCTP的浓度为均为0.8 mmol/L, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 %BSA) 3  $\mu$ l, Taq DNA聚合酶 (Promega公司) 1.5 U/ $\mu$ l, 细菌模板DNA溶液5  $\mu$ l (10ng/ $\mu$ l), 灭菌去离子水补足反应体系; 采用PE2400 DNA热循环仪 (PE)。反应程序如下: 先94 $^{\circ}$ C预变性3 min; 再94 $^{\circ}$ C变性50s, 58 $^{\circ}$ C退火50s, 72 $^{\circ}$ C延伸50s, 进行35个循环; 最后终延伸5min; 反应结束后利用酚氯仿抽提法纯化PCR产物, 用NanoDrop ND-1000紫外分光光度计进行定量。

芯片的制备与处理: 纯化的PCR产物99 $^{\circ}$ C热变性10 min后, 用50%的DMSO (二甲基亚砷) 溶解成2.0  $\mu$ g/ $\mu$ l的浓度, 转移至384孔板; 点样用玻片为CSS-1000 醛基化玻片 (美国CEL公司)。将待点样的玻片置于Flexys生物芯片点样仪 (Genomic Solutions Inc.) 上, 设置点样程序, 每张片基上点32个亚矩阵 (4 $\times$ 8 排列), 每亚矩阵按4 $\times$ 4点阵设计 (见图2), 这样每张玻片容量为4 $\times$ 4 $\times$ 32=512个点, 每个点重复32次。图2中1~16号探针依次为: 1: Bp<sub>fur</sub>; 2: Bp<sub>sl</sub>; 3: Rric190kd; 4: Rricompb; 5: Bapa; 6: Balf; 7: Ft23kd; 8: Ftfop; 9: Coxb27kd; 10: Coxb34kd; 11: Yppla; 12: Ypcalf; 13: Bra31kd; 14: Bromp; 15: Rpglta; 16: Rickpor。以上探针名称对应于表1, 即1号、2号探针检测类鼻疽伯克霍尔德氏菌, 3号、4号探针检测立氏立克次体, 5号、6号探针检测炭疽芽孢杆菌, 7号、8号探针检测土拉弗朗西斯氏菌, 9号、10号检测伯氏考克斯氏体, 11号、12号检测鼠疫耶尔森氏菌, 13号、14号检测布鲁氏菌, 15号、16号检测普氏立克次体。点制完毕的芯片在使用前于室温放置至少24h。用UV交联仪 (Heofer) 在60Milli Joule下交联。芯片表面游离醛基的封闭处理: 芯片浸于封闭液 (1.5g NaBH<sub>4</sub>充分溶解于450ml的1 $\times$  PBS中, 加入133ml的无水乙醇, 混匀) 中10min, 缓慢摇动芯片使其充分封闭。用0.1%的十二烷基磺酸钠 SDS (购自Sigma) 漂洗芯片2min, 水中洗涤2min, 95%乙醇洗涤2min, 晾干后即可用于杂交。

## 2、利用步骤1制备的芯片检测八种生物恐怖相关病原细菌

### (1) 芯片靶序列多重PCR体系的建立

将表1中十六对引物组合为三个组合, 以对应的细菌DNA为模板组成混合模板进行PCR扩增反应, 即每组检测六个片段 (见表2), 从而利用这3个PCR反应即检测所有八种生物恐怖剂的十六条特异基因片段。另外, 在每一个组合中分别对组合中的细菌DNA模板进行单一模板的PCR扩增。在30  $\mu$ l 扩增体系中, 10 $\times$ PCR Master Mix (上下游引物浓度为10  $\mu$ mol/L, dATP、dTTP、dGTP和dCTP的浓度为均为0.8 mmol/L, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 %BSA) 3  $\mu$ l, Taq DNA聚合酶 (Promega公司) 1.5 U/ $\mu$ l, 细菌模板DNA溶液5  $\mu$ l (10ng/ $\mu$ l), 灭菌去离子水补足反应体系; 采用PE2400 DNA热循环仪 (PE)。反应程序如下: 先94 $^{\circ}$ C预变性3 min; 再94 $^{\circ}$ C变性50s,

58℃退火 50s, 72℃延伸 50s, 进行 35 个循环; 最后终延伸 5min; 利用琼脂糖凝胶电泳观察, 考核其用于多重 PCR 组合的可行性。结果如图 3 所示, 电泳结果表明三个组合扩增单一模板时, 扩增条带明亮清晰, 表明这三个组合均可以用于多重 PCR 检测。但是在图 3 中, 用“第一组”来扩增布鲁氏菌和土拉弗朗西斯氏菌的混合模板时, 由于 *Bromp*(413bp) 与 *Ftfop*(457bp) (表 1) 两个基因片段的大小比较接近, 在电泳结果只能观察到一条清晰明亮的带, 表明, 通过普通的电泳检测方法难以准确区分片段大小相近的基因。图 3 中 A: 第一组多重 PCR 扩增结果; 泳道 Marker (泳道中条带大小为: 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp), 泳道 1 为布鲁氏菌和土拉弗朗西斯氏菌的混合模板扩增产物, 泳道 2 为土拉弗朗西斯氏菌、炭疽芽孢杆菌、伯氏考克斯氏体和立氏立克次体的混合模板的扩增产物; 泳道 3 为布鲁氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉弗朗西斯氏菌、炭疽芽孢杆菌和立氏立克次体的混合模板的扩增产物; 泳道 4-9 分别为布鲁氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉弗朗西斯氏菌、炭疽芽孢杆菌、伯氏考克斯氏体和立氏立克次体的单一模板的扩增产物。B: 第二组多重 PCR 扩增结果; 泳道 Marker 同上; 泳道 1 为鼠疫耶尔森氏菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌的混合模板的扩增产物; 泳道 2 为土拉弗朗西斯氏菌、伯氏考克斯氏体、类鼻疽伯克霍尔德氏菌和普氏立克次体的混合模板的扩增产物; 泳道 3 为布鲁氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉弗朗西斯氏菌、伯氏考克斯氏体和普氏立克次体的混合模板的扩增产物; 泳道 4-9 分别为布鲁氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉弗朗西斯氏菌、伯氏考克斯氏体、类鼻疽伯克霍尔德氏菌和普氏立克次体的单一模板的扩增产物。C: 第三组多重 PCR 扩增结果; 泳道 Marker 同上; 泳道 1 为炭疽芽孢杆菌和立氏立克次体的混合模板的扩增产物; 泳道 2 为立氏立克次体、普氏立克次体、类鼻疽伯克霍尔德氏菌和鼠疫耶尔森氏菌的混合模板的扩增产物; 泳道 3 为布鲁氏菌、炭疽芽孢杆菌、立氏立克次体、普氏立克次体、类鼻疽伯克霍尔德氏菌和鼠疫耶尔森氏菌的混合模板的扩增产物; 泳道 4-9 分别为布鲁氏菌、炭疽芽孢杆菌、立氏立克次体、普氏立克次体、类鼻疽伯克霍尔德氏菌和鼠疫耶尔森氏菌的单一模板扩增产物。

表 2 三个组合的多重 PCR 反应体系中的引物组合

组号	引物对名称					
第一组	<i>Bromp</i> 2b-4 和 <i>Bromp</i> 2b-D	<i>Yppla</i> -2 和 <i>Yppla</i> -C	<i>Ftfop</i> -1 和 <i>Ftfop</i> -D	<i>Bapa</i> -1 和 <i>Bapa</i> -A	<i>Coxb</i> 34kd-3 和 <i>Coxb</i> 34kd-D	<i>Rricomp</i> b-3 和 <i>Rricomp</i> b-C
第二组	<i>Ypcalf</i> -2 和 <i>Ypcalf</i> -B	<i>Bra</i> 31kd-3 和 <i>Bra</i> 31kd-C	<i>Ft</i> 23kd-3 和 <i>Ft</i> 23kd-B	<i>Coxb</i> 27kd-5 和 <i>Coxb</i> 27kd-C	<i>Rpglta</i> -1 和 <i>Rpglta</i> -A	<i>Bp</i> fur-2 和 <i>Bp</i> fur-A
第三组	<i>Bra</i> 31kd-3 和 <i>Bra</i> 31kd-C	<i>Balf</i> -1 和 <i>Balf</i> -B	<i>Rric</i> 190kd-1 和 <i>Rric</i> 190kd-A	<i>Rickpor</i> -Rpa-3 和 <i>Rickpor</i> -Rpa-C	<i>Bps</i> 11705-F 和 <i>Bps</i> 11705-R	<i>Yppla</i> -2 和 <i>Yppla</i> -C

(2) 待检序列的芯片检测: 对于待检菌株的 DNA (上述提取的八种细菌 DNA) 模板, 均使用三组多重 PCR 体系 (见表 2) 进行扩增。每组多重 PCR 体系为, 在 30  $\mu$ l 扩增体系中, 10  $\times$  PCR Master Mix (六对上下游引物浓度分别为 10  $\mu$ mol/L, dATP、dTTP、dGTP 浓度为 0.8 mmol/L, dCTP 浓度为 0.6 mmol/L, Cy5-dCTP 浓度为 0.2 mmol/L, 100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 %BSA, pH 8.3) 3  $\mu$ l, *Taq* DNA 聚合酶 (Promega

公司) 1.5 U/ $\mu$ l, 待检模板DNA溶液5  $\mu$ l (都为10ng/ $\mu$ l), 灭菌去离子水补足反应体系; 采用PE2400 DNA 热循环仪 (PE)。设置程序如下: 先94 $^{\circ}$ C预变性3 min; 然后94 $^{\circ}$ C变性50s, 58 $^{\circ}$ C退火50s, 72 $^{\circ}$ C延伸50s, 进行35个循环; 最后终延伸5min。扩增反应结束后将三组扩增产物混合, 利用Amicon Microcon-PCR纯化试剂盒 (购自Millipore 公司) 进行纯化, 最终洗脱体积为30  $\mu$ l, 取15  $\mu$ l纯化产物99 $^{\circ}$ C变性10min, 冰浴骤冷2min; 再与15  $\mu$ l 2 $\times$ 杂交液 (10 $\times$ SSC, 0.04%SDS, 200  $\mu$ g/ $\mu$ l 鲑鱼精DNA, 10%硫酸葡聚糖) 混匀, 放置于内置芯片的杂交盒内, 置于杂交炉中65 $^{\circ}$ C杂交45min。杂交后的芯片依次用洗液A (20 $\times$ SSC, 10%SDS), 洗液B (20 $\times$ SSC), 洗液C (95%乙醇) 中各洗3min、3min、1min。将洗涤完毕的芯片置于GenePix Pro 4.1扫描仪 (Axon Instruments) 内, 设置扫描通道和扫描时间, 进行结果扫描。当信号点的荧光读数高于背景读数8000以上时, 结果中可以看到清晰、明亮的杂交点, 以此作为判断阴性和阳性信号的标准, 荧光读数值越高, 则杂交点的亮度越大, 表示信号越强。

## 实施例 2、利用实施例制备的芯片对八种生物恐怖相关病原细菌的实验验证

### 一、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 的检测

#### 1、特异性实验

分别以提取的鼠疫耶尔森氏菌、假结核耶尔森氏菌、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌或伤寒沙门菌的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个菌分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个菌的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 结果如图 4 所示, 表明鼠疫耶尔森氏菌的模板可以在正确的探针位置 (预期两个探针有杂交信号) 产生阳性信号, 而假结核耶尔森氏菌、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的模板均无特异杂交信号产生, 可见实施例 1 制备的 DNA 芯片对于鼠疫耶尔森氏菌检测具有良好的特异性。

#### 2、细菌菌液检测灵敏度实验

用 LB 斜面转接鼠疫耶尔森氏菌 (EV76) (购自病原微生物生物安全国家重点实验室), 26 $^{\circ}$ C 培养 48h, 悬浮菌体, 制备 10 倍系列稀释 (原菌液稀释 10 倍为  $10^{-1}$  稀释度, 稀释 100 倍为  $10^{-2}$  稀释度, 依此类推……稀释  $10^9$  倍为  $10^{-9}$  稀释度) 直至  $10^{-9}$  稀释度。利用平板涂抹法对细菌进行菌落计数。取各个稀释度菌液 1ml, 收集菌体, 提取 DNA。分别以各个稀释度的菌液的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个稀释度的菌液分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个稀释度的菌液的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 考察细菌系列稀释菌液杂交灵敏度。结果表明, DNA 芯片可以检测到  $10^{-8}$  稀释度的菌液 (图 5), 经过平板计数, 计算出鼠疫耶尔森氏菌菌液的原始浓度为  $1.1 \times 10^9$  CFU/ml, 因此对于鼠疫耶尔森氏菌而言, 检测灵敏度为  $1.1 \times 10^9$  CFU/ml  $\times 10^{-8}$  (稀释度) = 11 CFU/ml。

#### 3、模拟血标本灵敏度实验

用 LB 斜面转接鼠疫耶尔森氏菌 (EV76), 26 $^{\circ}$ C 培养 48h, 悬浮菌体, 制备 10 倍系列稀释 (原菌液稀释 10 倍为  $10^{-1}$  稀释度, 稀释 100 倍为  $10^{-2}$  稀释度, 依此类推……稀释  $10^9$  倍为  $10^{-9}$  稀释度) 直至  $10^{-9}$  稀释度。利用平板涂抹法进行菌落计数。同时取各个稀释度,

各个稀释度中各取 20  $\mu$ l 加入 180  $\mu$ l 兔血, 制备成系列浓度 ( $1-10^{-9}$  稀释度) 的模拟血标本。分别取各个稀释度菌液制备的模拟血标本, 按照 QIAamp 全血 DNA 提取试剂盒操作说明提取 DNA, 分别以各个稀释度菌液制备的模拟血标本的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个稀释度菌液制备的模拟血标本分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后, 将每个稀释度菌液制备的模拟血标本的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 结果表明, DNA 芯片可以检测到  $10^{-7}$  稀释度的菌液制备的模拟血标本(图 6), 经过平板计数, 计算出鼠疫耶尔森氏菌菌液的原始浓度为  $1.1 \times 10^9$  CFU/ml。因此对于鼠疫耶尔森氏菌而言, 模拟血标本检测灵敏度为  $1.1 \times 10^9$  CFU/ml  $\times 10^{-7}$  (稀释度) = 110 CFU/ml。

#### 4、染色体稀释灵敏度实验

用 LB 斜面转接鼠疫耶尔森氏菌 (EV76), 26 $^{\circ}$ C 培养 48 小时, 收集菌体, 用酚氯仿抽提的方法提取染色体 DNA, 紫外分光光度计进行核酸定量后, 将其倍比稀释为 100ng/ $\mu$ l、10ng/ $\mu$ l、1ng/ $\mu$ l、100pg/ $\mu$ l、10pg/ $\mu$ l 和 1pg/ $\mu$ l 的溶液; 随后取各稀释度的 DNA 为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个稀释度的 DNA 分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个稀释度的 DNA 的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 结果表明, 本技术可以检测到 10pg/ $\mu$ l 鼠疫耶尔森氏菌 (EV76) 染色体 DNA; 而在常规的 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳中, 在 100pg/ $\mu$ l 时可以观察到阳性信号, 10pg/ $\mu$ l 稀释度已经观察不到条带(图 7)。可见实施例 1 制备的 DNA 芯片比常规 PCR 凝胶电泳检测灵敏度高一个数量级。图 7 中, A 为 DNA 芯片检测 10pg/ $\mu$ l 染色体 DNA 结果, B 为 PCR-凝胶电泳检测结果。

#### 5、动物感染标本的检测

将鼠疫耶尔森氏菌 EV76 菌株感染 BALB/C 小白鼠, 感染 48 小时解剖, 取出肝、脾、肺器官并将其研磨, 用全血 DNA 提取试剂盒 (QIAGEN) 分别提取组织 DNA 后, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个组织的 DNA 分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个组织的 DNA 的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 结果如图 8 所示, 表明在三种感染组织中均可以检测到鼠疫耶尔森氏菌的特异杂交信号。

#### 二、炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 的检测

##### 1、特异性实验

分别以提取的炭疽芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个菌分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个菌的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 扫描结果如图 9, 表明炭疽芽孢杆菌的模板可以在正确的探针位置产生阳性信号, 而枯草芽孢杆菌、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的模板均无信号产生, 可见实施例 1 制备的 DNA 芯片对于炭疽芽孢杆菌检测具有良好的特异性。

##### 2、细菌菌液检测灵敏度实验

用LB斜面转接炭疽芽孢杆菌，37℃培养24h，悬浮菌体，制备10倍系列稀释直至 $10^{-9}$ 稀释度（原菌液稀释10倍为 $10^{-1}$ 稀释度，稀释100倍为 $10^{-2}$ 稀释度，依此类推……稀释 $10^9$ 倍为 $10^{-9}$ 稀释度）。利用平板涂抹法对细菌进行菌落计数。取各个稀释度菌液1ml，收集菌体，提取DNA。分别以各个稀释度的菌液的DNA作为模板，利用实施例1步骤2的（1）的表2中的引物对组合，按照实施例1步骤2的（2）的方法，每个稀释度的菌液分别单独进行三组多重PCR，扩增反应结束后将每个稀释度的菌液的三组扩增产物分别各自混合，按照实施例1步骤2的（2）的方法分别与实施例1中制备的DNA芯片杂交，考察细菌系列稀释菌液杂交灵敏度。结果如图10所示，表明实施例1制备的DNA芯片可以检测到 $10^{-8}$ 稀释度的菌液。经过平板计数，计算出炭疽芽孢杆菌菌液的原始浓度为 $1.4 \times 10^9$  CFU/ml。因此对于炭疽芽孢杆菌而言，检测灵敏度为 $1.4 \times 10^9$  CFU/ml  $\times 10^{-8} = 14$  CFU/ml。

### 3、模拟血标本检测灵敏度实验

用LB斜面转接炭疽芽孢杆菌 A16R，37℃培养24h，用0.01M的PBS溶液悬浮菌体，制备10倍系列稀释直至 $10^{-9}$ 稀释度（原菌液稀释10倍为 $10^{-1}$ 稀释度，稀释100倍为 $10^{-2}$ 稀释度，依此类推……稀释 $10^9$ 倍为 $10^{-9}$ 稀释度）。利用平板涂抹法进行菌落计数；同时取各个稀释度，各个稀释度中各取 $20 \mu\text{l}$ 加入 $180 \mu\text{l}$ 兔血制备成系列浓度（ $1-10^{-9}$ 稀释度）的模拟血标本。分别取各个稀释度菌液制备的模拟血标本，按照QIAamp全血DNA提取试剂盒操作说明提取DNA，分别以各个稀释度菌液制备的模拟血标本的DNA作为模板，利用实施例1步骤2的（1）的表2中的引物对组合，按照实施例1步骤2的（2）的方法，每个稀释度菌液制备的模拟血标本分别单独进行三组多重PCR，扩增反应结束后，将每个稀释度菌液制备的模拟血标本的三组扩增产物分别各自混合，按照实施例1步骤2的（2）的方法分别与实施例1中制备的DNA芯片杂交，结果如图11所示，表明实施例1制备的DNA芯片可以检测到 $10^{-7}$ 稀释度的菌液制备的模拟血标本。经过平板计数，计算出炭疽芽孢杆菌菌液的原始浓度为 $1.4 \times 10^9$  CFU/ml。因此对于炭疽芽孢杆菌来说，模拟血标本检测灵敏度为 $1.4 \times 10^9$  CFU/ml  $\times 10^{-7} = 140$  CFU/ml。

## 三、布鲁氏菌(*Bruceella*)的检测

### 1、特异性实验

分别以布鲁氏菌、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的DNA作为模板，利用实施例1步骤2的（1）的表2中的引物对组合，按照实施例1步骤2的（2）的方法，每个菌分别单独进行三组多重PCR，扩增反应结束后将每个菌的三组扩增产物分别各自混合，按照实施例1步骤2的（2）的方法分别与实施例1中制备的DNA芯片杂交，扫描结果如图12所示，表明布鲁氏菌的模板可以在正确的探针位置产生阳性信号，而白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的模板均无特异性信号产生，可见实施例1制备的DNA芯片对于布鲁氏菌检测具有良好的特异性。

### 2、染色体稀释灵敏度实验

将布鲁氏菌染色体DNA，倍比稀释成 $100\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $10\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $1\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.01\text{ng}/\mu\text{l}$ ，并在 $1\text{pg}/\mu\text{l} \sim 10\text{pg}/\mu\text{l}$ 设置 $1\text{ng}/\mu\text{l}$ 的递进梯度；随后取各稀释度的DNA为模板，利用实施例1步骤2的（1）的表2中的引物对组合，按照实施例1步骤2的（2）的方法，每个稀释度的DNA分别单独进行三组多重PCR，扩增反应结束后将每个稀释度的DNA的三组扩增产物分别各自混合，按照实施例1步骤2的（2）的方法分别与实施例1中

制备的 DNA 芯片杂交, 结果如图 13 所示, 表明本发明的方法可以检测到 6pg/ $\mu$ l 布鲁氏菌染色体 DNA; 而在常规的 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳中, 在 100pg/ $\mu$ l 时可以观察到阳性信号, 10pg/ $\mu$ l 稀释度已经观察不到条带。

#### 四、土拉弗朗西斯氏菌 (*Francisella tularensis*) 的检测

分别以土拉弗朗西斯氏菌、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个菌分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个菌的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 扫描结果如图 14 所示, 表明土拉弗朗西斯氏菌的模板可以在正确的探针位置产生阳性信号, 而白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的模板均无信号产生, 可见实施例 1 制备的 DNA 芯片对于土拉弗朗西斯氏菌检测具有良好的特异性。

#### 五、类鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*) 的检测

分别以类鼻疽伯克霍尔德氏菌、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个菌分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个菌的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 扫描结果如图 15 所示, 表明类鼻疽伯克霍尔德氏菌的模板可以在正确的探针位置产生阳性信号, 而白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的模板均无信号产生, 可见实施例 1 制备的 DNA 芯片对于类鼻疽伯克霍尔德氏菌检测具有良好的特异性。

#### 六、普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*) 的检测

分别以普氏立克次体、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个菌分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个菌的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 扫描结果如图 16 所示, 表明普氏立克次体的模板可以在正确的探针位置产生阳性信号, 而白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的模板均无信号产生, 可见实施例 1 制备的 DNA 芯片对于普氏立克次体检测具有良好的特异性。

#### 七、立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii*) 的检测

分别以立氏立克次体、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个菌分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个菌的三组扩增产物分别各自混合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法分别与实施例 1 中制备的 DNA 芯片杂交, 扫描结果如图 17 所示, 表明立氏立克次体的模板可以在正确的探针位置产生阳性信号, 而白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的模板均无信号产生, 可见实施例 1 制备的 DNA 芯片对于立氏立克次体检测具有良好的特异性。

#### 八、伯氏考克斯氏体 (*Coxiella burnetii*) 的检测

分别以伯氏考克斯氏体、白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的 DNA 作为模板, 利用实施例 1 步骤 2 的 (1) 的表 2 中的引物对组合, 按照实施例 1 步骤 2 的 (2) 的方法, 每个菌分别单独进行三组多重 PCR, 扩增反应结束后将每个菌的三组扩增产物分别

各自混合，按照实施例1步骤2的(2)的方法分别与实施例1中制备的DNA芯片杂交，扫描结果如图18所示，表明伯氏考克斯氏体的模板可以在正确的探针位置产生阳性信号，而白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌的模板均无信号产生，可见实施例1制备的DNA芯片对于伯氏考克斯氏体检测具有良好的特异性。

#### 九、八种生物恐怖相关病原细菌同时检测实验

分别以2、3、4、5、6、8个目标细菌的DNA混合物作为扩增的模板，利用实施例1步骤2的(1)的表2中的引物对组合，按照实施例1步骤2的(2)的方法，每种混合模板分别单独进行三组多重PCR，扩增反应结束后将每种混合模板的三组扩增产物分别各自混合，按照实施例1步骤2的(2)的方法分别与实施例1中制备的DNA芯片杂交，杂交结果如图19所示，表明各个杂交结果均有多组探针出现阳性信号，且信号模式与目标细菌完全吻合，说明本发明的方法完全能够同时检测多种生物恐怖相关病原细菌，同时也表明以多重PCR为基础的DNA芯片检测方法是可行的。其中，图19中，鼠+布表示以鼠疫耶尔森氏菌和布鲁氏菌的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；类+伯表示以类鼻疽伯克霍尔德氏菌和伯氏考克斯氏体的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；鼠+布+炭表示以鼠疫耶尔森氏菌、布鲁氏菌和炭疽芽孢杆菌的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；立+土+普表示以立氏立克次体、土拉弗朗西斯氏菌和普氏立克次体的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；类+炭+伯+布表示以类鼻疽伯克霍尔德氏菌、炭疽芽孢杆菌、伯氏考克斯氏体和布鲁氏菌的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；立+土+鼠+普表示以立氏立克次体、土拉弗朗西斯氏菌、鼠疫耶尔森氏菌和普氏立克次体的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；普+土+布+炭+伯表示以普氏立克次体、土拉弗朗西斯氏菌、布鲁氏菌、炭疽芽孢杆菌和伯氏考克斯氏体的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；立+鼠+土+布+类表示以立氏立克次体、鼠疫耶尔森氏菌、土拉弗朗西斯氏菌、布鲁氏菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；类+鼠+伯+布+立+土表示以类鼻疽伯克霍尔德氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、伯氏考克斯氏体、布鲁氏菌、立氏立克次体和土拉弗朗西斯氏菌的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；类+炭+伯+布+立+土+鼠+普表示以类鼻疽伯克霍尔德氏菌、炭疽芽孢杆菌、伯氏考克斯氏体、布鲁氏菌、立氏立克次体、土拉弗朗西斯氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、和普氏立克次体的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果。

#### 十、杂菌干扰实验

将鼠疫耶尔森氏菌(EV76)与大肠杆菌以1:100、1:1000与1:10000的细胞数目比例进行混合，以提取的各个混合比例的混合菌液的DNA为模板，利用实施例1步骤2的(1)的表2中的引物对组合，按照实施例1步骤2的(2)的方法，每个混合菌液分别单独进行三组多重PCR，扩增反应结束后将每个混合菌液的三组扩增产物分别各自混合，按照实施例1步骤2的(2)的方法分别与实施例1中制备的DNA芯片杂交，结果如图20所示，表明即使在10000倍无关细菌(大肠杆菌)的干扰之下，本发明的方法仍可实现对目标细菌(鼠疫耶尔森氏菌)的准确检测。图20中比例为鼠疫耶尔森氏菌和大肠杆菌的菌数比例。

#### 十一、混合样品盲测实验

选择几个目标细菌的模板DNA，与水一起进行随机组合编号，样品制备由一人完成共制



备6份样品（表3）。然后由另一人利用实施例1步骤2的（1）的表2中的引物对组合，按照实施例1步骤2的（2）的方法，每个样品分别单独进行三组多重PCR，扩增反应结束后将每个样品的三组扩增产物分别各自混合，按照实施例1步骤2的（2）的方法分别与实施例1中制备的DNA芯片杂交，进行样品盲测，根据芯片杂交图谱给出检测结果，判断样品中含有何种目标细菌的核酸，随后与原始样品组成信息进行复核，考察本技术检测未知样品（可能含有多种目标细菌）的能力。

混合样品杂交图谱如图21所示，混合样品组合方式和通过杂交检测后判读结果如表3所示，表明检测全部正确无误，说明本发明的方法完全可以用于检测未知样品中是否含有以上8种生物恐怖相关病原细菌。图21中鼠表示以鼠疫耶尔森氏菌的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；水表示以水代替DNA模板进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；类+伯+鼠+布表示以类鼻疽伯克霍尔德氏菌、伯氏考克斯氏体、鼠疫耶尔森氏菌和布鲁氏菌的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；类+土+鼠+伯表示以类鼻疽伯克霍尔德氏菌、土拉弗朗西斯氏菌、鼠疫耶尔森氏菌和伯氏考克斯氏体的DNA为模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；伯+鼠表示以伯氏考克斯氏体和鼠疫耶尔森氏菌的DNA模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果；布+立表示布鲁氏菌和立氏立克次体的DNA模板，进行三组多重PCR、芯片杂交的检测结果。

表3. 盲测样品组合方式与杂交判读结果

样品编号	样品实际组合	样品杂交结果
1	鼠疫耶尔森氏菌	鼠疫耶尔森氏菌
2	水	阴性
3	类鼻疽伯克霍尔德氏菌+伯氏考克斯氏体+鼠疫耶尔森氏菌+布鲁氏菌	类鼻疽伯克霍尔德氏菌+伯氏考克斯氏体+鼠疫耶尔森氏菌+布鲁氏菌
4	类鼻疽伯克霍尔德氏菌+土拉弗朗西斯氏菌+鼠疫耶尔森氏菌+伯氏考克斯氏体	类鼻疽伯克霍尔德氏菌+土拉弗朗西斯氏菌+鼠疫耶尔森氏菌+伯氏考克斯氏体
5	伯氏考克斯氏体+鼠疫耶尔森氏菌	伯氏考克斯氏体+鼠疫耶尔森氏菌
6	布鲁氏菌+立氏立克次体	布鲁氏菌+立氏立克次体

## 序列表

<160> 16

<210> 1

<211> 334

<212> DNA

<213>炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)

<400> 1

aggaacatcc cacagacttt tctgtagaat tcttggaca aatagcaat gaggtacaag	60
aagtatttgc gaaagctttt gcatattata tcgagccaca gcatcgtgat gttttacagc	120
tttatgcacc ggaagctttt aattacatgg ataaatttaa cgaacaagaa ataaatctat	180
ccttggaga acttaaagat caacggatgc tgtcaagata tgaaaaatgg gaaaagataa	240
aacagcacta tcaacactgg agcgattctt tatctgaaga aggaagagga cttttaaaaa	300
agctgcagat tcctattgag ccaaagaaag atga	334

<210> 2

<211> 249

<212> DNA

<213>炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)

<400> 2

caagtgctgg acctacggtt ccagaccgtg acaatgatgg aatccctgat tcattagagg	60
tagaaggata tacggttgat gtcaaaaata aaagaacttt tctttacca tggatttcta	120
atattcatga aaagaaagga ttaaccaa ataaatcadc tcctgaaaaa tggagcacgg	180
cttctgatcc gtacagtgat ttcgaaaagg ttacaggacg gattgataag aatgtatcac	240
cagaggcaa	249

<210> 3

<211> 268

<212> DNA

<213>类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)

<400> 3

acggcgtaat gctctgcgcg atccgctggg tcacgctgtc gtacgacgaa caggcggcca	60
gtccgaccac ggcgacagct gcgatgacgg tgctccgcac gcggctcctc tgaagttgca	120
aaagcgatct tggaatcatg tccctcaccg tgctggccct tgtccaaggc cgcgagagaa	180
gtcacagat gactgaaaag gcgaaaagcc ggtactattg aagccctgca ttgtactcta	240
gggacgccta gccatgacca atccgacc	268

<210> 4

<211> 319

<212> DNA

<213>类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)

## &lt;400&gt; 4

catattgac	gggagccttg	ggtccacgct	gccggctgtg	gctggtacgg	taataggcgg	60
cggggctcaa	taccccaatt	cggtaggcgg	aacgagttct	acgaccggcg	atttgggcaa	120
cagctatatt	ggtgcgagcg	gtatgggtac	cgccattact	ggggataatg	attgcctgag	180
cttgacttcg	accgcaacg	tgctaaacag	tgcgaatgtc	ggctggcttt	tgggaacgac	240
ttcacagacc	accgatcctg	gtccgttgta	ccccggcccc	ggcgcgga	acaaccagac	300
tatcagttac	agtggcacc					319

## &lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 416

&lt;212&gt; DNA

<213>布鲁氏菌(*Brucella*)

## &lt;400&gt; 5

acgcctat	ctttgtgggc	ggctatccga	cgggcgcaat	ctcggaactg	gccatctcga	60
acggtatttc	gctcgttccg	atctccgggc	cggaagcgga	caagattctg	gagaaatatt	120
ccttcttctc	gaaggatgtg	gttctctgcc	gagcctataa	ggacgtggcg	gaaacaccga	180
cccttgccgt	tgccgcacag	tgggtgacga	gcgccaagca	gccggacgac	ctcatctata	240
acatcaccaa	ggttctcttg	aacgaggata	cacgcaaggc	actcgatgcg	ggccatgcga	300
agggcaagct	catcaagctc	gatagtgcga	cgagcagcct	cggtattccg	ctgcatcccg	360
gcgcagaacg	cttttacaag	gaagcgggcg	tgctgaaata	atccctcaat	gatcgg	416

## &lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 413

&lt;212&gt; DNA

<213>布鲁氏菌(*Brucella*)

## &lt;400&gt; 6

tcgggcgtag	atggtaaata	tggtaatgaa	accagcagcg	gcaccgtcat	ggagttcgcg	60
tatateccagc	tcggttgtct	gcgcgttggt	atcgatgaat	cggaattcca	taccttcacc	120
ggttacctcg	gcatgtcat	caacgatgac	gtgatctcgg	ctggctccta	ccgcaccggc	180
aagatctcgt	acaccttcac	tggcgaaac	ggcttctcgg	ctgtgategc	tctogaacag	240
ggtggcgaag	acgttgacaa	cgattacacg	atcgacggtt	acatgccgca	cgttgttggc	300
ggcctgaaat	atgctggcgg	ctggggttcg	atcgctggtg	ttgttgcccta	tgactcggtc	360
atagaagaat	gggctgccaa	ggttcgtggc	gacgtcaaca	tcaccgacca	gtt	413

## &lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 421

&lt;212&gt; DNA

<213>伯氏考克斯氏体(*Coxiella burnetii*)

## &lt;400&gt; 7

cagtggcagg caatcctcat ggcaatgta cattggtga attttcgat tatcaatgtg 60  
 gccattgcaa agccatgaat tctgttattc aagctatcgt gaaacaaaat aaaaacctcc 120  
 gcgttgcttt caaagaactg cccatttttg gcggccaatc gcaatacgtt gccaaagtat 180  
 cattagcagc cgctaaacaa ggaaaatatt atgctttcca cgacgcgctg ctcagtgtcg 240  
 acggccaatt atcagaacaa atcacccttc aaaccgcaga aaaagtagga ttaaatgttg 300  
 ctcagctcaa aaaagacatg gataatcctg ctatccaaaa acaactgcgt gataacttcc 360  
 aattagctca atcgttacag ctagcaggca ccccgacgtt cgtcattggt aataaagcgt 420  
 t 421

<210> 8

<211> 296

<212> DNA

<213> 伯氏考克斯氏体 (*Coxiella burnetii*)

<400> 8

acggaagtta tgttgcgaat gcgcattatt ggctcgggtga aatttatctt caacagaaag 60  
 atcggaaaaa tgccgcccac gaatttcaaa ccgtaaggga taaatttccc aaatcggaaa 120  
 aggtacttga tgcgaaatta aaattagcca tcattgatgc ggaagacggg aaaattaaac 180  
 aggctaagga agaattaacc gaaattaaaa aacaacaccc tgaatctacg gcagcacaac 240  
 tcgccaatat ccgactccaa caattggagg aagtcgattc agcaacaaca acgcct 296

<210> 9

<211> 457

<212> DNA

<213> 土拉弗朗西斯氏菌 (*Francisella tularensis*)

<400> 9

aatttcattg ctccttttgc aaatacttat agcgccttga ctaacaagga caatacttgg 60  
 ggtcctcaag atagaactgg ccagtggtac ttaggtgtag atgctaaccg tctagctaga 120  
 actcctaact ctccatcagg tgctggtgct aacttcacaa tcggttataa catcaataaa 180  
 tacttcgctg tacagtacaa ccaattagtt ggtagagtat ttgctggttt aggtgaaggt 240  
 gttgtaaact ttagtaataa tactatgttt actccatatt ctgcagggtg tgctggttgg 300  
 gcaaatctag caggtcaagc aacaggtgct tgggatgtgg gtggtggtct taagtttgaa 360  
 ctatctagaa atgttcaagc aagtgttgac tacagatata tccaaacaat ggcacctagt 420  
 aatatttctg gtgctaattg cagagcgggt actaaca 457

<210> 10

<211> 330

<212> DNA

<213> 土拉弗朗西斯氏菌 (*Francisella tularensis*)

<400> 10

gaaagctgat tcggttacag ctgctgctag tgtaatacgt ttatctataa cgccaggctc 60  
 tataaatcca acaataagta ttactcttgg tgttctaatt aatcaaatg ttagaactaa 120

aattgaagag aaagtttcga gtatattaca agcaagtgct acagatatga aaattaagtt	180
aggtaattct aataaaaaac aagagtataa aactgatgaa gcatggggta ttatgataga	240
tctatctaatt ttagagttat atccaataag tgctaaggct tttagtatta gtatagagcc	300
aacagaactt atgggtgttt caaaagatgg	330

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 474

&lt;212&gt; DNA

<213> 普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*)

&lt;400&gt; 11

aggtggcaat gatgagcgtg agcaaacctt aaaccaaagtg ttagtcgaaa tggatgggtt	60
tgaggcaaac gaggtgtgg taattattgc agctacaaac cgtccagacg ttcttgatcg	120
tgcattactg cgtcctggta gatttgatcg tcaaatgtct gttgcaaacc ctgatataaa	180
tggtcgtgag caaattctaa aagtacattt aaaaaaatt aaatataata gtacgggtact	240
agcacgaatt attgctcgtg gaactcctgg tttctccggt gctgaacttg ctaatttagt	300
taatgaagct gcgcttattg ctgagaggct tggtaaaaaa gaagtagata tgcacgatat	360
ggaagaagca aaagataagg ttttgatggg tgttgtcgt cgctctattg caatgtcaga	420
gaaggagaaa agattaactg cgtatcatga aggaggacac gcattagtcg ggct	474

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; DNA

<213> 普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*)

&lt;400&gt; 12

gctaataagag cagtgataaa tatgcttaaa gaaattggca gttctgagaa tattcctaaa	60
tatgtagcta aagctaaaga taagaatgat ccatttaggt taatgggttt tggatcatcga	120
gtatataaaa gctatgacc gcgtgccgca gtacttaaag aaacttgtaa agaagtatta	180
aatgaattag gtcagttaga caataatccg ctgt	214

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 371

&lt;212&gt; DNA

<213> 立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)

&lt;400&gt; 13

aaggagcggg agattgtagc acggcaggta ccacttttaa tacaacaaat atagtacttg	60
atattacagg tcaattagaa cttggagcta ctacggcaaa tgtagtttta tttaatgatg	120
ctgttcaatt aactcaaacc ggtaatatg gcggtttctt agattttaat gcaaaaaacg	180
gtatggtaac attaaataac aatgtaaatg ttgcgggagc agtccaaaat accggcggta	240
ctaataacgg tacgttaata gttttagggtg caagtaatct taatagagta aacgggattg	300
ctatgttaaa agtaggtgca ggaaatgtaa ctattgcaa aggcggtaaa gttaaaatcg	360
gcgaaatcca a	371

<210>	14	
<211>	385	
<212>	DNA	
<213>	立氏立克次体( <i>Rickettsia rickettsii</i> )	
<400>	14	
	tggtgccgtg actgatacga ttgcttttga aaattcaagt ttaggtgcag ttgtattctt	60
	acctagagge attccattca atgatgcagg caacacaatg cctttaacaa ttaaaagtac	120
	cgtaggtaat aaaacagcta aaggttttga tgttcctagc gtggttgttt taggtgttga	180
	tagtgtcatc gctgacggtc aagtaatcgg tgatcaaaat aatatcgtag gtctaggtct	240
	tggaagcgat aacggcataa tcgttaatgc tactacatta tatgcaggta tcagtactct	300
	aaacaataat caaggtactg tcacacttag cggtggtggt cctaataccc ctggtacagt	360
	ttatggctta ggcacaggta ttggc	385
<210>	15	
<211>	235	
<212>	DNA	
<213>	鼠疫耶尔森氏菌( <i>Yersinia pestis</i> )	
<400>	15	
	ccccaatgtc aaacggctct taattgtatt caatcctcgc tcggcataaa tatacgaacg	60
	ctgccatcct tgttgtttcc accatgaggt tgaactacga aagcgccaag ccctatggt	120
	taatccccgt tgcaactgag cataataaga gtccagagac ttgcctcctt ctctgaattt	180
	tctgtctgc atgttcgtat tataattcat gaacagagca ggaatgccgt catcc	235
<210>	16	
<211>	317	
<212>	DNA	
<213>	鼠疫耶尔森氏菌( <i>Yersinia pestis</i> )	
<400>	16	
	tccatactca tttctgacc tgaatgccag ggggtggacg tctctggctt ccgggtcagg	60
	taatatggat gactacgact ggatgaatga aaatcaatct gagtggacag atcactcatc	120
	tcactctgct acaaagtta atcatgcaa tgaatatgac ctcaatgtga aaggctggtt	180
	actccaggat gagaattata aagcaggat aacagcagga taccaggaaa cacgtttcag	240
	ttggacagct acaggtgggt catatagtta taataatgga gcttataccg gaaacttccc	300
	gaaaggagtg cgggtaa	317

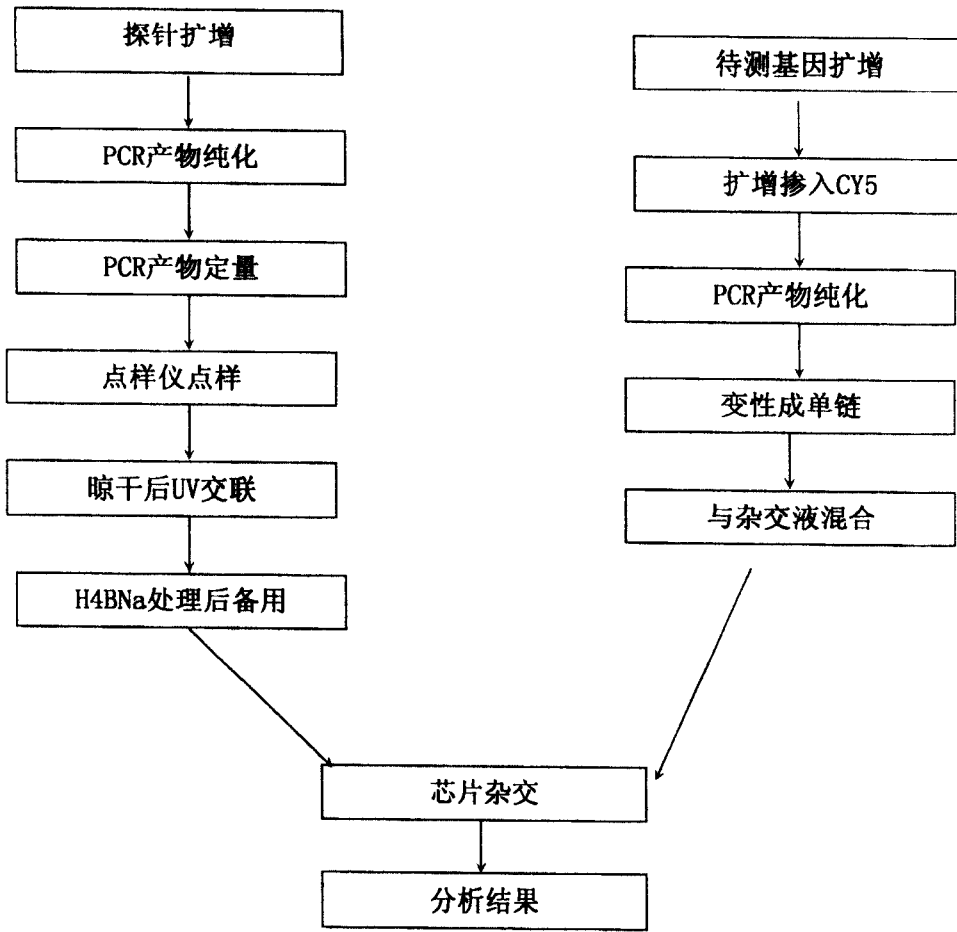


图 1

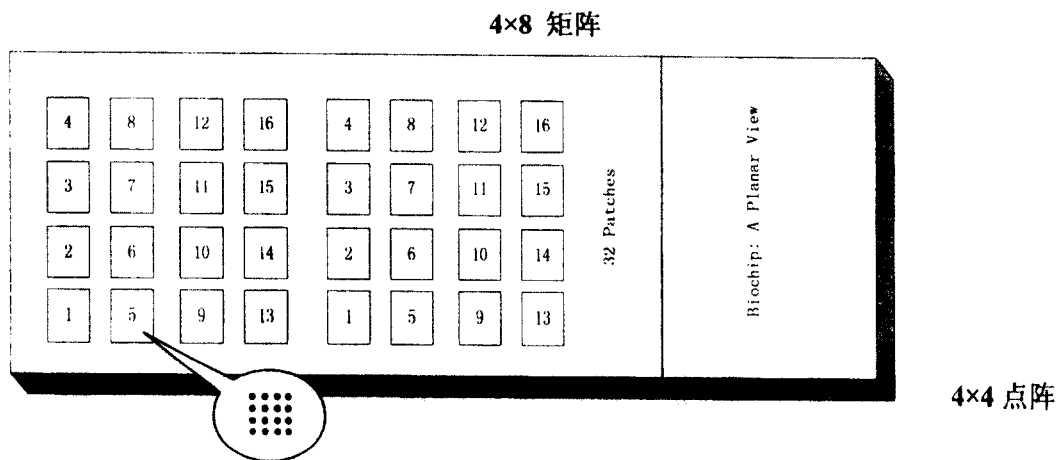


图 2

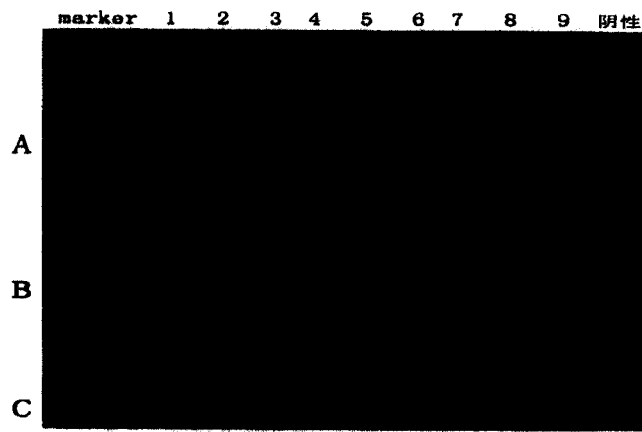


图 3

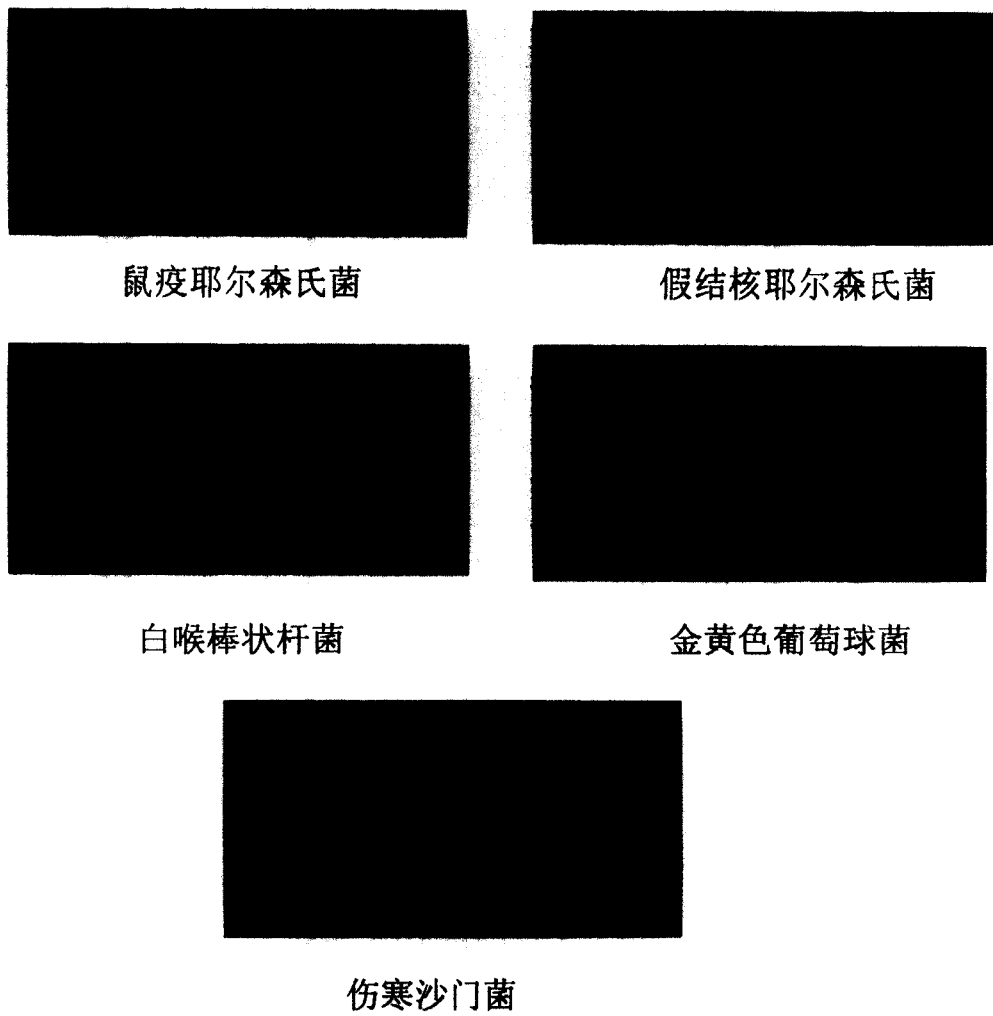


图 4





图 5



图 6

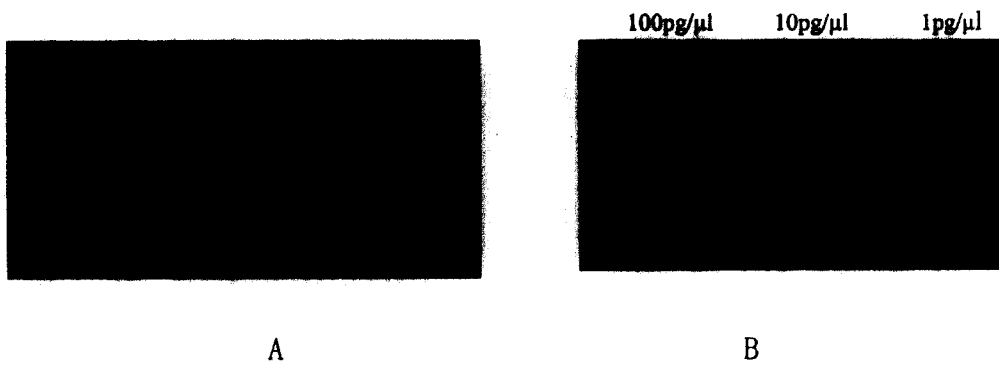
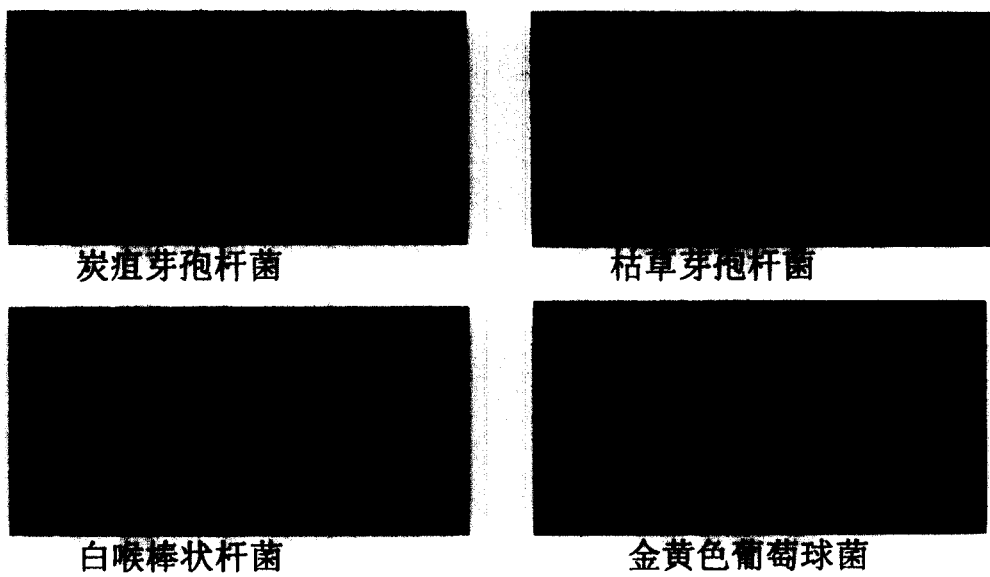


图 7



图 8



伤寒沙门菌

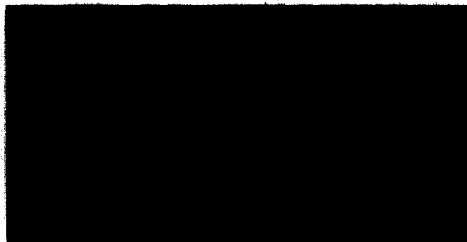
图 9



图 10



图 11



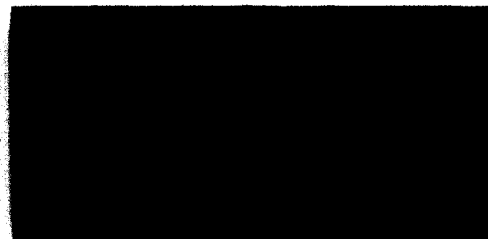
布鲁氏菌



白喉棒状杆菌



伤寒沙门菌



金黄色葡萄球菌

图 12

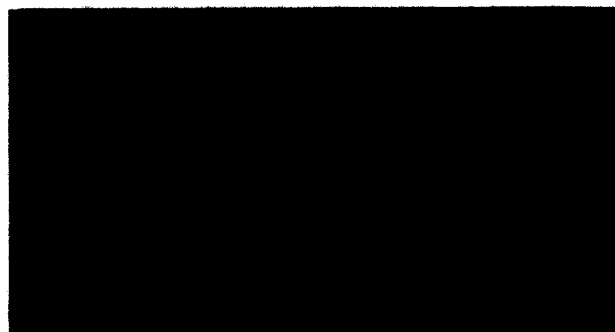


图 13

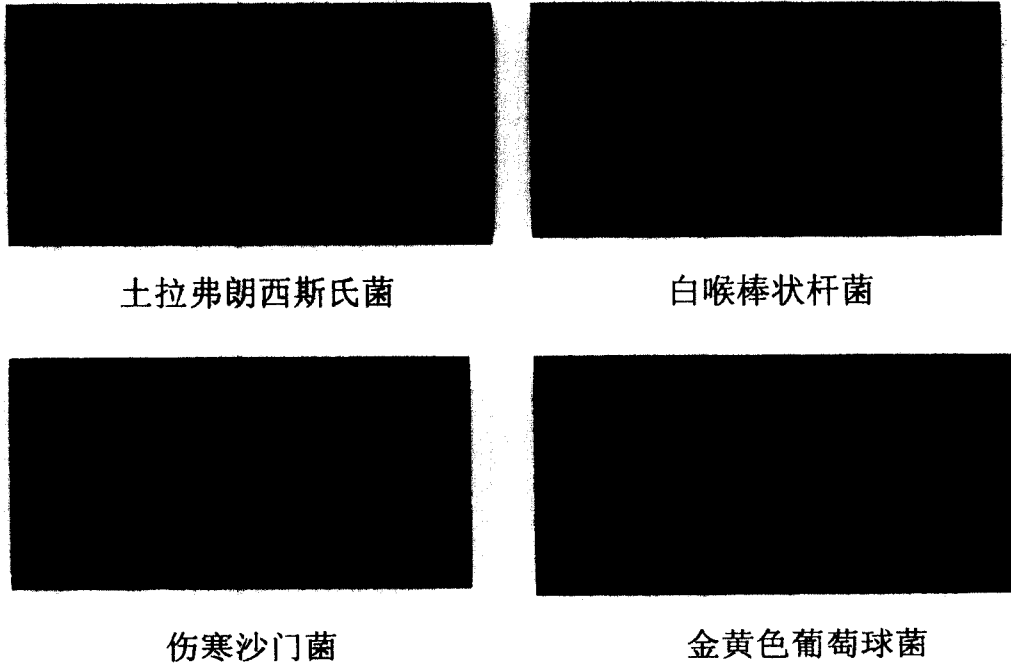


图 14

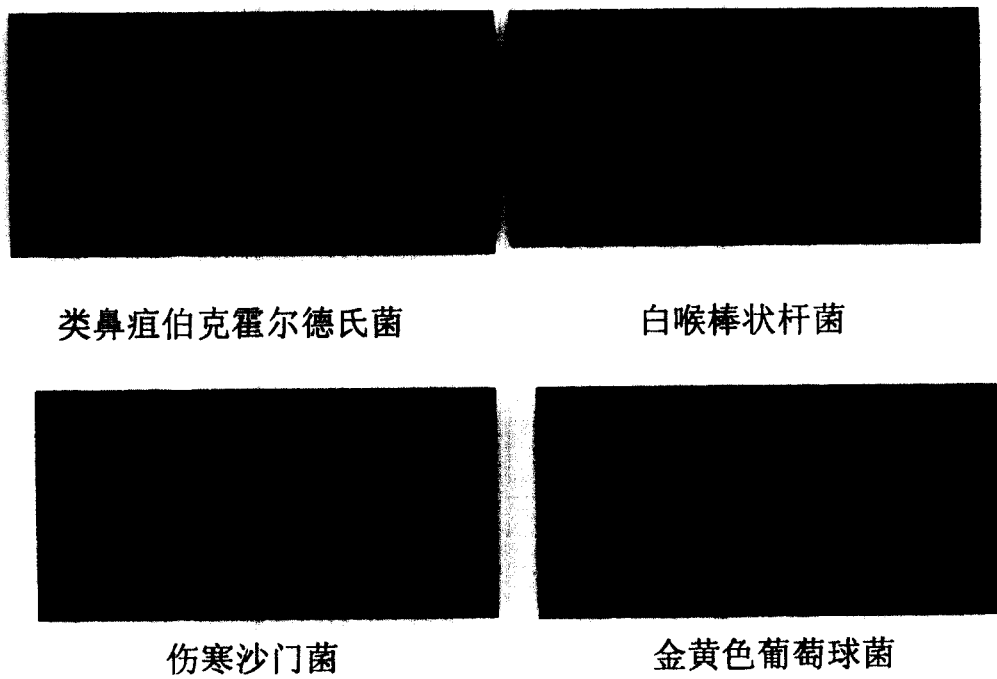
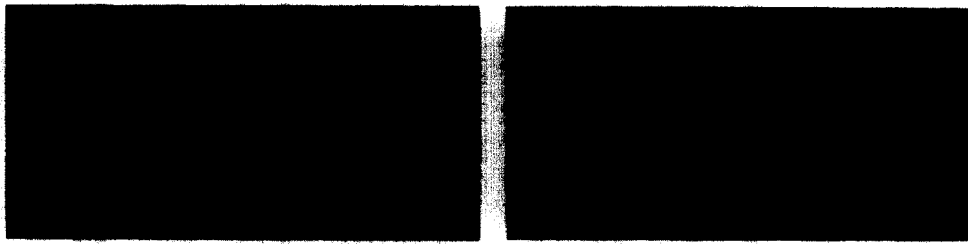
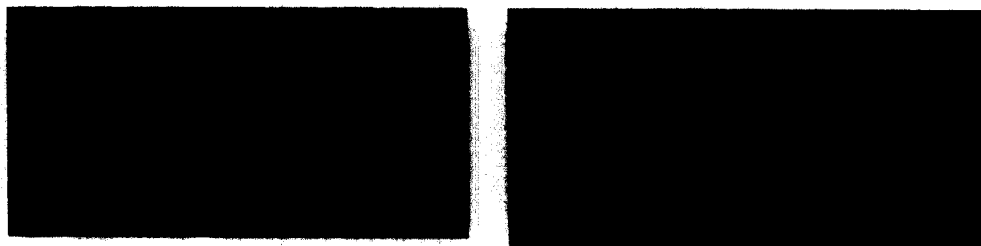


图 15



普氏立克次体

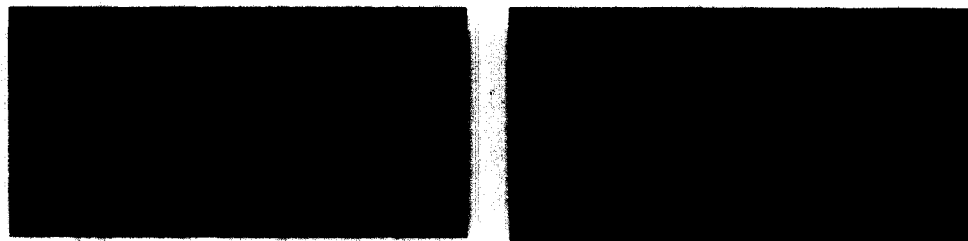
白喉棒状杆菌



伤寒沙门菌

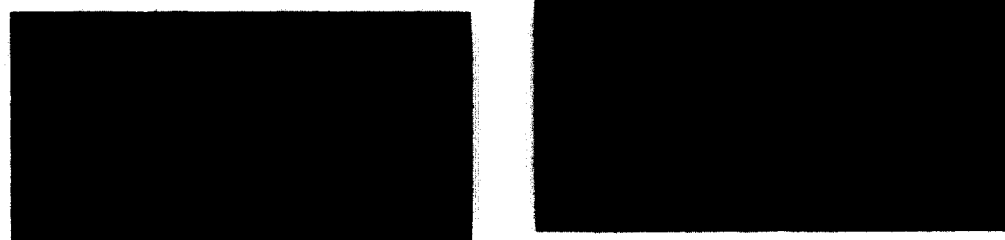
金黄色葡萄球菌

图 16



立氏立克次体

白喉棒状杆菌



伤寒沙门菌

金黄色葡萄球菌

图 17

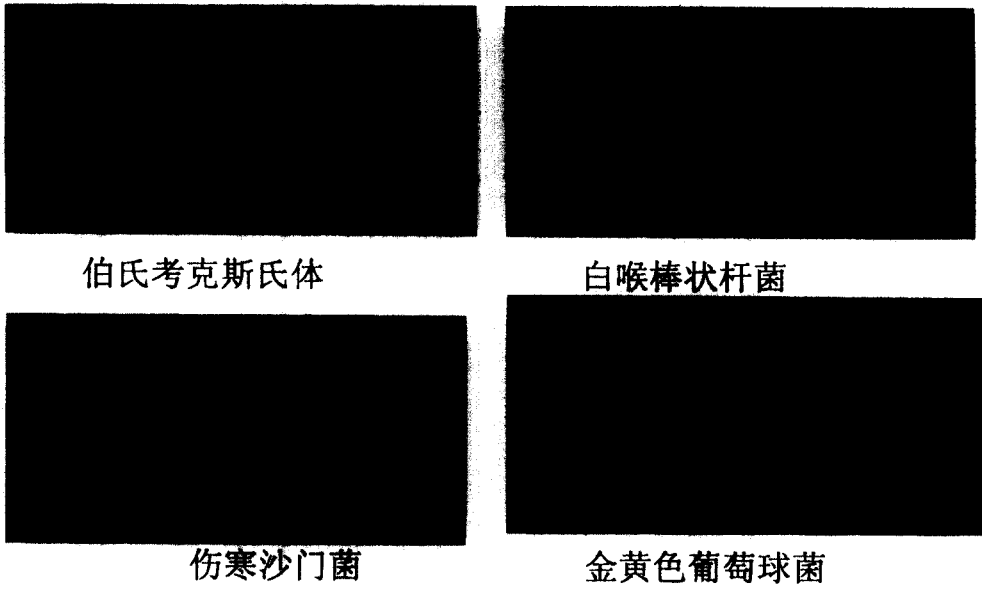


图 18

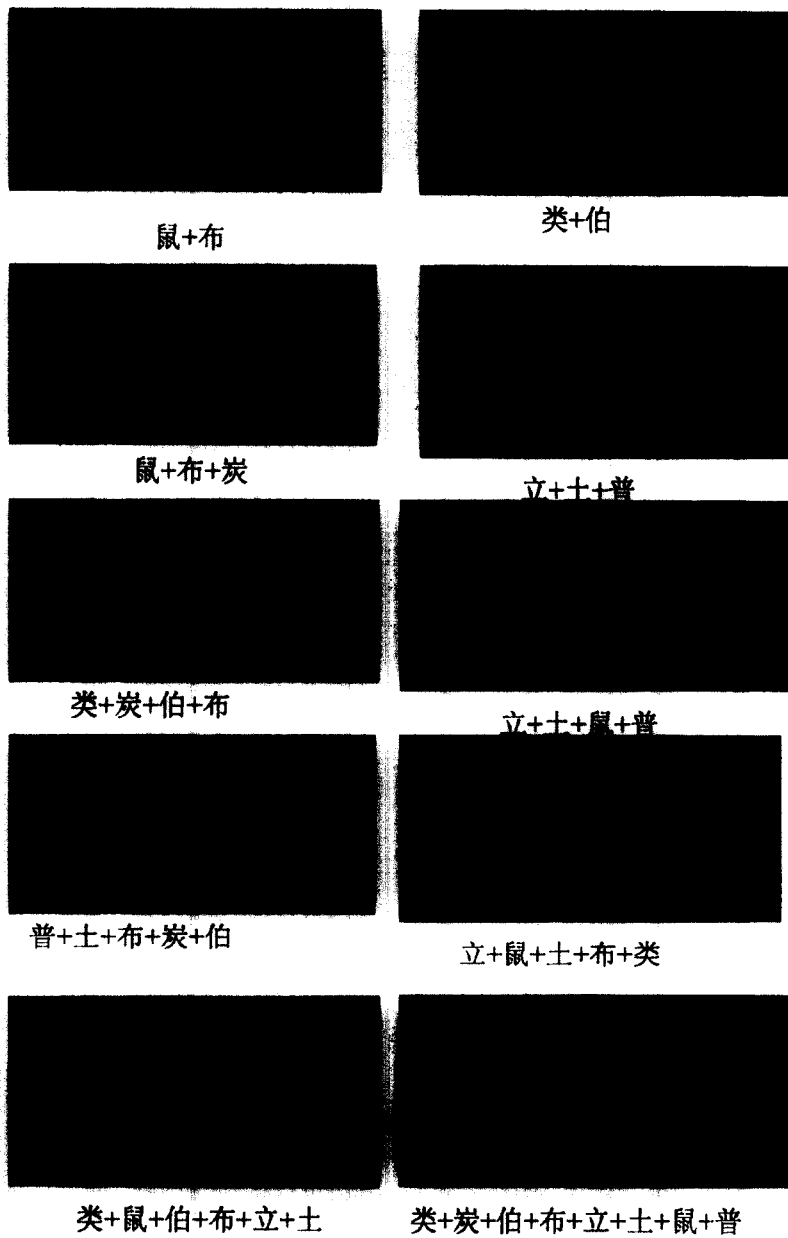
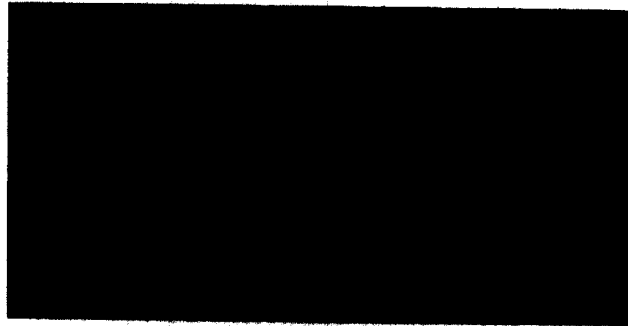
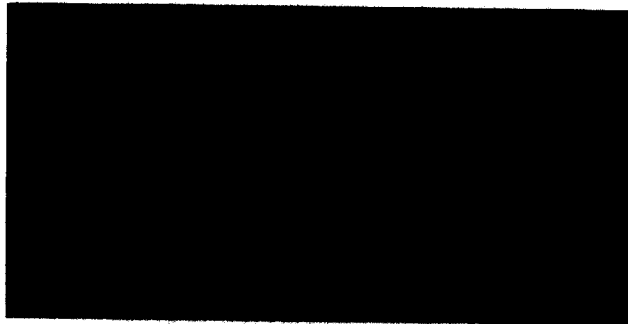


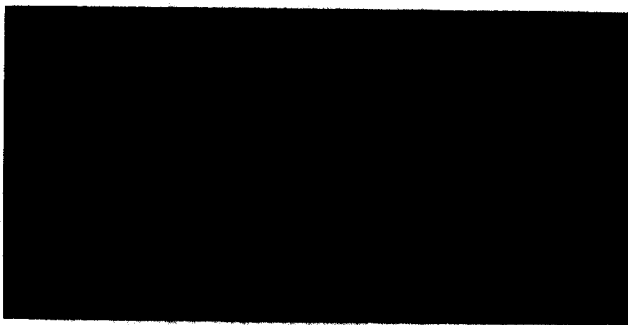
图 19



1: 100



1: 1000



1: 10000

图 20

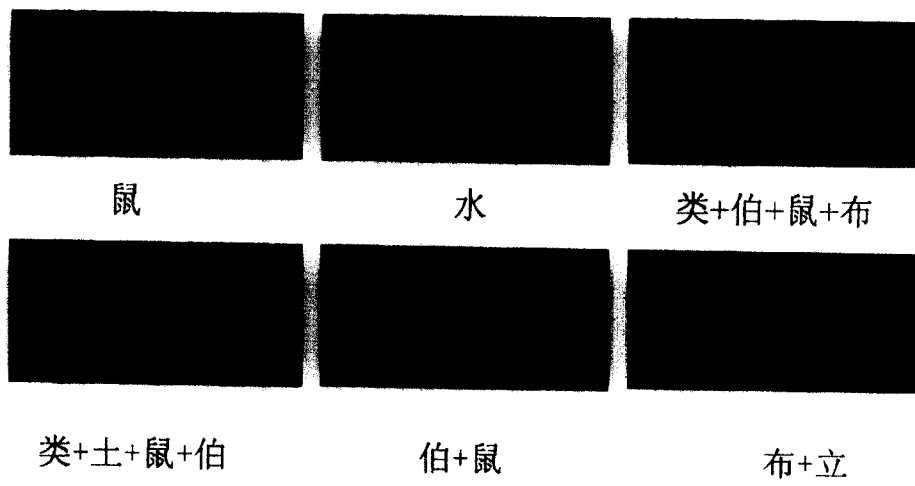


图 21