



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 01810598.X

[45] 授权公告日 2005 年 3 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1193103C

[22] 申请日 2001.5.30 [21] 申请号 01810598.X

[30] 优先权

[32] 2000.5.30 [33] KR [31] 2000/29369

[86] 国际申请 PCT/KR2001/000904 2001.5.30

[87] 国际公布 WO2001/092573 英 2001.12.6

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.2

[71] 专利权人 百奥麦雷公司

地址 韩国汉城特别市

[72] 发明人 金贤晶 金娜瑛 尹盛昱 金祯美
朴美宣

审查员 孙大龙

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

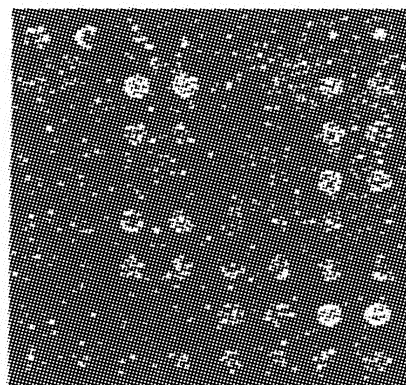
代理人 高龙鑫 楼仙英

权利要求书 3 页 说明书 21 页 序列表 35 页
附图 9 页

[54] 发明名称 用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒及其制备方法, 该试剂盒利用寡核苷酸芯片能快速、准确地大批量区分出与分支杆菌菌种鉴定和抗药性有关的结核分支杆菌 *rpoB* 基因的点突变。本发明的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒含有一个寡核苷酸芯片, 该芯片包含一个由结核分支杆菌分支杆菌菌种鉴定探针和抗药性检测探针组成的复合探针、结核分支杆菌 *rpoB* 基因、以及荧光材料, 其中的荧光材料含有生物素结合蛋白, 作为生物素和相应探针的标记来检测样品扩增产物的杂交。



mt516a

1. 一种用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒，包括：
一个寡核苷酸芯片，所述芯片包括：由分支杆菌 *rpoB* 基因(157bp)的种
特异性 DNA 序列构成的菌种鉴定探针、由一个或多个分支杆菌 *rpoB* 基因
5 (157bp)修饰密码子组成的分支杆菌利福平抗性检测探针和/或 rifabutin 敏感
性检测探针、以及与上述抗药性检测探针相应的由野生型序列组成的对照组
探针；和
用于检测上述核苷酸探针与样品发生杂交的标记物。
2. 根据权利要求 1 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂
10 盒，其中所说的菌种鉴定探针包含 SEQ ID NO 5 到 12。
3. 根据权利要求 1 或 2 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断
试剂盒，其中所说的分支杆菌抗药性检测探针含有一个或多个 *rpoB* 基因密
码子 507-533 的修饰密码子。
4. 根据权利要求 1 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂
15 盒，其中所说的利福平抗性检测探针含有修饰过的 511、513、516、518、522、
526 和 531 密码子。
5. 根据权利要求 4 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂
盒，其中所说的利福平抗性检测探针包含序列为 SEQ ID NO 20 到 36 的探针。
6. 根据权利要求 4 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂
20 盒，其中所说的利福平抗性检测探针进一步包含修饰过的 509、533 和 524
密码子。
7. 根据权利要求 6 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂
盒，其中所说的利福平抗性检测探针进一步包含序列为 SEQ ID NO 41 到 46
的探针。
- 25 8. 根据权利要求 1 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂
盒，其中所说的 rifabutin 敏感性检测探针含有修饰过的 516 和 526 密码子。
9. 根据权利要求 8 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂
盒，其中所说的 rifabutin 敏感性检测探针包含序列为 SEQ ID NO 22、23 和
31 到 36 的探针。

10. 根据权利要求 1 或 2 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的寡核苷酸芯片是利用含有部分 *rpoB* 基因的各个探针通过希夫碱反应而形成的, 经过修饰使其含有一个胺基, 并在玻片上诱导产生一个醛基。

5 11. 根据权利要求 1 或 2 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其进一步包括一个扩增样品 DNA 的装置。

12. 根据权利要求 11 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的装置包括序列为 SEQ ID NO 37 和 38 的生物素-TR8 和 TR9 引物, 所述引物能特异性的扩增 *rpoB* 基因片段 (157bp)。

10 13. 根据权利要求 11 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的装置包括序列为 SEQ ID NO 47 和 48 的生物素-DGR8 和 DGR9 引物, 所述引物能特异性的扩增 *rpoB* 基因片段 (157bp)。

14. 根据权利要求 11 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的标记物是包括所说的生物素结合蛋白的荧光物质。

15 15. 根据权利要求 14 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的荧光材料是抗生蛋白链菌素-R-藻红蛋白。

16. 根据权利要求 11 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的标记物是加入到聚合酶链反应中的酞菁 5-dUTP。

20 17. 根据权利要求 1 或 2 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的探针含有 5'间隔子 T_{10} 。

18. 根据权利要求 1 或 2 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的寡核苷酸芯片还含有能首先检测样品是否为分支杆菌的探针。

25 19. 根据权利要求 18 的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒, 其中所说的结核菌探针含有序列 SEQ ID NO 1 到 4 的探针。20. 一种用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒的制备方法, 该方法包括:

30 (a) 修饰由分支杆菌 *rpoB* 基因 (157bp) 的种特异性 DNA 序列构成的菌种鉴定探针、由一个或多个分支杆菌 *rpoB* 基因 (157bp) 修饰密码子组成的分支杆菌利福平抗性检测探针和/或 rifabutin 敏感性检测探针、以及由野生

型序列组成的与所述的各个抗药性检测探针相应的对照组探针，使其5'末端含有一个胺基；

(b) 在玻片上诱导产生一个醛基；以及

(c) 利用希夫碱反应在玻片上分别固定修饰的探针，以制备一个寡核苷酸芯片。

21. 根据权利要求 20 的诊断试剂盒的制备方法，还包括利用 NaBH_4 来减少在步骤 (c) 中形成的稳定亚胺键的步骤。

22. 包含碱基序列 SEQ ID NO 47 和 48 的一对引物，所述引物能特异性地扩增分支杆菌属菌种的 *rpoB* 基因片段。

23. 一种用于分支杆菌菌种鉴定和利福平抗性检测及 rifabutin 敏感性检测的方法，该方法包括以下步骤：

利用权利要求 22 的引物对通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增样品中的 *rpoB* 基因片段；以及

利用权利要求 1 的诊断试剂盒根据相应的特定菌种的荧光强度区分各菌种。

24. 根据权利要求 23 的用于分支杆菌菌种鉴定和利福平抗性检测及 rifabutin 敏感性检测的方法，其中所说的 PCR 反应中的退火温度为 $64-65^{\circ}\text{C}$ 。

25. 根据权利要求 23 或 24 的用于分支杆菌菌种鉴定和利福平抗性检测及 rifabutin 敏感性检测的方法，其中所说 PCR 反应的循环数为 38-42。

26. 根据权利要求 23 或 24 的用于分支杆菌菌种鉴定和利福平抗性检测及 rifabutin 敏感性检测的方法，其中进行 PCR 反应的引物浓度为 50-100 pmol。

27. 根据权利要求 23 的用于分支杆菌菌种鉴定和利福平抗性检测及 rifabutin 敏感性检测的方法，其中的 PCR 反应还包括加入酞菁 5-dUTP 作为标记物的步骤。

28. 根据权利要求 23 的用于分支杆菌菌种鉴定和利福平抗性检测及 rifabutin 敏感性检测的方法，其中所说的样品是病人的未经培养的唾液、血液或脑脊液。

用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒及其制备方法

技术领域

- 5 本发明涉及用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒及其制备方法,特别地,本发明涉及用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的试剂盒,该试剂盒利用一个寡核苷酸芯片能快速、准确地大批量区分与抗药性相关的分支杆菌 *rpoB* 基因的点突变,及该试剂盒的制备方法。

10 背景技术

- 全世界每年大约有两百万人死于结核,移民的增加、HIV/AIDS 的传播、以及抗药性菌株的出现提高了结核的致命性。免疫系统弱的 AIDS 患者和新生儿会患上结核,这种结核不仅仅能由结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染,还可能由 MOTT(*Mycobacterium other than tuberculosis*,
15 除结核杆菌外的分支杆菌)感染,特别是这些菌株: *Mycobacterium avium*intracellulare (MAI), 龟分支杆菌(*Mycobacterium chelonae*), 偶发分支杆菌(*Mycobacterium fortuitum*),堪萨斯分支杆菌 (*Mycobacterium kansasii*), 蟾分支杆菌(*Mycobacterium xenopi*), 海分支杆菌(*Mycobacterium marinum*), 瘰癧分枝杆菌(*Mycobacterium scrofulaceum*)和斯氏分支杆菌(*Mycobacterium szulgai*)。

结核病通常是利用多种抗结核的药物通过化学疗法进行治疗,由于存在具有不同药物感受性的多种不同的分支杆菌菌株,因此检测和鉴别致病菌对于有效治疗来说是很重要的。

- 25 为了诊断结核,通常要采用到胸腔 X 光检测和唾液检测。胸腔 X 光检测经常将已经治愈了的非活动性结核病或其他形式的胸腔疾病误诊为结核。唾液检测可以通过下列两种典型的方法来完成:唾液涂片显微观察法,在该方法中病人的唾液被很薄地涂布在载玻片上,然后对细菌进行选择染色以进行显微观察;以及培养法,该方法是将细菌在生理条件下培养以用于目测。

唾液涂片显微观察法相对简单、快速,但不能轻易从 MOTT 中区分出结核分支杆菌。已经可以利用培养法对分支杆菌菌株进行检测和鉴定,但由于细菌的生长速度很慢,利用这种方法至少要花 6—8 个星期。在这一过程中,可联合应用一线抗结核药物,但可能会导致治疗的失败和抗药性。事实上,已经发现越来越多的菌株对一线抗结核药物如异烟肼 (INH),利福平 (RIF),链霉素 (STR),乙胺丁醇 (EMB),pyrazinamide (PZA)具有抗药性。

因此,为了实现有效地控制和治疗结核的目的,已经越来越认识到,有必要在感染的初级阶段快速地鉴别出致病菌。近来已发展出在相对短的时间内对分支杆菌种进行鉴别的分子生物学方法,这些方法利用分支杆菌基因的种特异性序列如 IS6110 作为靶 DNA。但是,在不同种类的分支杆菌中 IS6110 基因具有不同的拷贝数,而在有些种中则不存在。一些报道表明 IS6110 基因不是分支杆菌特异性的。因此,利用 IS6110 作为靶 DNA 可能会导致假阳性或假阴性结果。由于 16S rRNA DNA 的高度多态性区域 (highly polymorphic region) 表征了种特异性多态现象,因此也已经被用来进行菌种的鉴别。基于这种方法已经产生了几种商业产品: 能直接应用于样品的 Accuprobe (基因探针,圣地亚哥, CA, U.S.A.)、以及 AMTD (基因探针,圣地亚哥, CA, U. S. A.) 和 Amplicor MTB (Roche 诊断系统,萨默维尔, 新泽西, U. S. A.), 这两种产品在靶 DNA 进行分析之前可利用 PCR (聚合酶链反应) 进行扩增从而使敏感性提高。但是 16S rRNA 基因有时在个别菌株中拥有不同的拷贝数,这将使得准确鉴别菌种变得复杂。而且,为了检测抗药性,必须对 rpoB 基因进行附加的分子生物学分析。

在下文中,将对与药物抗性有关的结核分支杆菌的点突变作详细的说明。已知 RIF 抗性剂 (resistance against RIF) 是一种主要的抗结核药物,它与编码 RNA 聚合酶 β 亚单位的 rpoB 基因的突变有关。迄今为止已发现 30 多种已鉴定出的不同的突变都聚集在 3,534bp rpoB 基因的 81bp 的核心区域。(Amalio Telenti, Paul Imboden, Francine Marchesi, Douglas Lowrie, Sterwart Cole, M. Joseph Colston, Lukas Matter, Kurt Schopfer, 以及 Thomas Bodmer, "Detection of rifampin-resistance mutation in Mycobacterium tuberculosis" THE LACET, Vol. 341, pp. 647-650,1993).

表 1 列出了发生在结核分支杆菌 *rpoB* 基因的密码子 507 到 533 处的点突变。如表 1 所示, 在密码子 513、516、526、和 531 中发生点突变的频率更高, 且比其他的突变更具有普遍性。

[表 1]

密码子	不同的核苷 (氨基酸改变)
510	CAG(Gln) > CAT(His)
511	CTG(Leu) > CCG(Pro), CGG(Arg)
512	AGC(Ser) > ACC(Thr), CGC(Arg)
513	CAA(Gln) > CTA(Leu), AAA(Lys), CCA(Pro)
515	ATG(Met) > ATA(Ile)
516	GAC(Asp) > GTC(Val), TAC(Tyr), GAG(Glu), GGC(Gly)
521	CTG(Leu) > ATG(Met)
522	TCG(Ser) > TTG(Leu)
526	CAC(His) > TAC(Tyr), GAC(Asp), CGC(Arg), CTC(Leu), CCC(Pro), CAA(Gln), AAC(Asn), CAG(Gln)
531	TCG(Ser) > TTG(Leu), TGG(Trp), TGT(Cys), CAG(Gln)

Rifabutin (简称为 RIB), 是利福霉素 S 的一种螺环哌啶衍生物, 被用于防止 AIDS 患者的 MAC 感染 (James M. Musser, "Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights", Clinical Microbiology Review, Vol. 8, No. 4, pp. 496-514, 1995)。RIB 抗性剂 (Resistance against RIB) 也与 *rpoB* 基因的点突变相关。但是, 在 RIF 和 RIB 中突变显示的药物敏感性不同: 检测表明对 RIF 有抗性的几种突变体对 RIB 是敏感的。对 RIF 和 RIB 都表现出抗性的突变体也有报道 (Della Bruna C., G. Schiopacassi, D. Ungheri, D. Jabes, E. Morvillo, 和 A. Sanfilippo, "A new spiro-piperidyl rifamycin: in vitro and in vivo studies", J. Antibiot. Vol. 36, pp. 1502-1506, 1983, Dessen A., A. Quenmard, J. S. Blanchard, w. R. Jacobs, Jr., and J. C. Sacchettini, "Crystal structure and function of the isoniazid target of Mycobacterium tuberculosis" Science, Vol. 267, pp.1638-1641, 1995)。RIB 经常被用来治疗 RIF 抗性的感染, 在许多情况下都证明其是有效的 (Gillespie S. H., A. J. Baskerville, R. N. Davidson, D. Felmingham, and A. D. M. Bryceson, "The serum rifabutin concentrations in patient successfully treated for multi-resistant Mycobacterium tuberculosis infection", J. Antimicrobi. Chemother. Vol. 33, pp. 661-674, 1990)。

另外, *rpoB* 基因的种特异性特征已经被用来鉴别各种分支杆菌菌种。韩国专利登记号 (Registration No.) No.234975 公开了一种利用一系列能特异性

地扩增分支杆菌 *rpoB* 基因的新 PCR 引物、并通过 PCR-RFLP(聚合酶链反应后的限制性片段长度多态性)分析法来检测和鉴别分支杆菌菌种的方法。韩国专利登记号 No. 285254 也公开了一种检测和鉴别结核分支杆菌复合体和 MOTT 的方法,该方法中使用可分别以不同大小 (in a respectively different size) 扩增结核分支杆菌复合体和 MOTT 中的 *rpoB* 基因片段的引物。

但是,以上方法在 PCR 扩增之前都要进行细菌培养步骤,只能分析有限的菌种和有限数量的样品,而且,在 PCR 步骤后还要费时地进行限制酶处理步骤和/或电泳步骤。

韩国专利登记号 No. 285253 公开了一种利用巢式 PCR-SSCP(聚合酶链反应一单链构象多态性)和单步巢式 PCR-SSCP 来检测结核分支杆菌的利福平抗性的方法,该方法包括两个 PCR 和多态分析步骤,因此检测出利福平抗性大约要花四天。

Affymetrix 申请的 PCT 国际专利公开号为 No. W097/29212 公开了一种 *rpoB* 基因的 DNA 芯片测序技术,利用该方法,可以分析 *rpoB* 基因中 700bp 的全部碱基序列以获得临床学上的重要信息,如种特异性和抗药性。

发明内容

为了解决以上问题,本发明的一个目的就是提供一种用于分支杆菌鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒,该试剂盒能够快速、准确地大批量区分出与分支杆菌鉴别和抗药性检测相关的特征。

本发明的另一个目的是提供一种用于分支杆菌鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒的制备方法,利用该试剂盒能够快速、准确的大批量区分出与分支杆菌鉴别和抗药性检测相关的特征。

本发明的又一个目的是提供聚合酶链反应 (PCR) 的引物对,利用该引物对可对直接来源于包括唾液样品在内的未经培养的样品中的多种菌种的 *rpoB* 基因片段 (157bp) 进行有效的 PCR 扩增,从而加快分支杆菌菌种的鉴定。

本发明的再一目的是提供聚合酶链反应 (PCR) 的试验条件,从而有效地扩增来源于不同分支杆菌的 *rpoB* 基因的 157bp 片段。

为了实现本发明的以上目的，本发明提供了一种用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒，其包括：一个寡核苷酸芯片，该芯片包括由分支杆菌 *rpoB* 基因的种特异性 DNA 序列构成的种鉴定探针、由一个或多个分支杆菌 *rpoB* 基因修饰密码子组成的分支杆菌抗药性检测探针、以及由野生型序列组成的与各个抗药性检测探针相应的对照组探针；该试剂盒还包括一种用于检测寡核苷酸芯片与样品 DNA 发生杂交的方法。

利用以上组成，可同时进行抗药性检测以及分支杆菌种鉴别，特别地，通过比较抗药性检测探针和对照组探针的杂交信号强度可以分辨出与抗药性相关的分支杆菌 *rpoB* 基因的点突变，而通过比较种特异性探针杂交的强度可以进行菌种的鉴定，因此，能快速、准确地大批量进行分支杆菌种的鉴定和抗药性检测。

在本发明的具体实施方式中，所说的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒中的抗药性检测探针包括一个或多个修饰密码子，这些修饰密码子位于 *rpoB* 基因的 507—533 密码子区。

通过上述组成，由于位于经常发生点突变的 507—533 密码子区的一个或多个修饰密码子可被用作为探针，因此，仅利用分支杆菌 *rpoB* 基因的一部分就能快速、准确的分辨出抗药性。

在本发明的另一个具体实施方式中，所说的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒中的抗药性检测探针是利福平抗性探针和/或 rifabutin 敏感性探针。

通过上述组成，可快速、准确地区分样品是否具有利福平抗性和/或 rifabutin 敏感性。

在本发明地另一个实施方式中，提供了一种用于分支杆菌鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒的制备方法，该方法包括以下步骤：(a)修饰由分支杆菌 *rpoB* 基因的种特异性 DNA 序列构成的菌种鉴定探针、由一个或多个分支杆菌 *rpoB* 基因修饰密码子组成的分支杆菌抗药性检测探针、以及由野生型序列组成的与各个抗药性检测探针相应的对照组探针，使其 5'末端含有一个胺基；(b) 在玻片上诱导产生一个醛基；以及 (c) 利用希夫碱 (Schiff base) 反应在玻片上固定修饰的探针而制备一个寡核苷酸芯片。

通过上述组成,可以很容易地制备出所述诊断试剂盒,该试剂盒的优点在于能同时快速、准确的大批量区分分支杆菌菌种和抗药性。

在本发明的另一方面中,用于分支杆菌鉴定的一对 PCR 引物包括具有一定碱基序列的 DGR8 和 DGR9,利用这些碱基序列,可特异性的扩增分支杆菌 *rpoB* 基因片段(157bp)。

当使用引物对时,从未被培养的临床样品中分离出来的 DNA 可被用作聚合酶链反应的模板,属于分支杆菌属的 44 种菌种的 *rpoB* 基因片段(157bp)能得到有效的扩增。因此,能在较短的时间内进行分支杆菌菌种的鉴定和抗药性检测,例如大约在 6 小时内。通过使用引物对获得的 PCR 产物是 157bp 大小的 DNA,该 DNA 可用作寡核苷酸芯片分析中的靶 DNA(target DNA)。

在本发明的另一个方面涉及到的用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的方法中,将样品中的 *rpoB* 基因片段在合适反应条件下进行 PCR 扩增,反应条件如:退火温度 64°C,反应循环数 40,引物 DGR8 和 DGR9 的浓度为 100pmol。扩增得到的产物通过使用本发明的诊断试剂盒用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测。

DNA 芯片技术产生于二十世纪八十年代早期,该技术提供了一种在同一时间内获得大量基因信息的方法,该方法已经被用于研究基因表达、突变、以及人或细菌基因组多态性。

本发明利用了能快速进行基因分析的 DNA 芯片技术,提供了一种用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒及其制备方法,在该试剂盒中,可将分支杆菌菌种鉴定和与抗药性相关的结核分支杆菌的点突变区分开。

在本发明中,基于在背景技术中描述的药物敏感性和 *rpoB* 基因突变之间的关系,发生在结核分支杆菌的 *rpoB* 基因的突变被用来研究对抗药性菌株的鉴定。更具体的说,将发生分支杆菌点突变频率最高的含有 81bp 核心区域的 *rpoB* 基因片段(157bp)利用特殊的引物对进行 PCR 扩增,然后,将扩增得到的 DNA 与寡核苷酸芯片杂交,从而检测点突变以进行抗药性检测。

使用寡核苷酸芯片的方法包括通过 PCR 扩增来自临床样品的靶 DNA,的步骤。为了将该方法成功地用于临床样品,PCR 应该使用高效引物。

- 在韩国专利申请号 No. 2000-0029369 中，按照仅使用结核分支杆菌的 *rpoB* 基因碱基序列，已经设计出了生物素-TR8 和 TR9 作为引物，利用该引物扩增的 DNA 是 157bp 的片段，该片段含有与利福平抗性相关的发生点突变频率最高的 81bp 的核心区域。然而，生物素-TR8/9 引物的扩增效率并不能满足未经培养样品、例如唾液的需要，因此，由于要进行细菌培养步骤，则使利用这些引物进行的分析时间超过了 6—8 周。甚至，由于这些引物的效能很低，培养样品中的 MOTT 可能得不到扩增。换句话说，如果不能从唾液样品中对 DNA 进行直接扩增，那么对菌种鉴别和抗药性的快速分析就不能完成。
- 因此，本发明结合分支杆菌属的 43 种不同的菌种以及结核分支杆菌的 *rpoB* 基因的碱基序列，设计了一个新的引物对。利用这组引物，可利用从未培养的样品中分离的 DNA 作为模板进行 PCR 反应，通过这个单步的 PCR 反应步骤 (a single PCR step)，上述 43 种菌种和结核分支杆菌的特异性 *rpoB* 基因序列都能得到扩增。将扩增得到的产物应用于 DNA 芯片，则可在很短的时间内同时完成分支杆菌菌种鉴定和 *rpoB* 突变检测。

附图说明

- 图 1 是本发明中用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的寡核苷酸芯片的制备步骤的流程图；
- 图 2 显示了根据本发明用生物素—TR8 和 9 作为引物扩增 *rpoB* 基因、并在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳的结果图；
- 图 3A 到 3J 显示了根据本发明用生物素—dUTP 对临床样品进行 PCR 扩增后与寡核苷酸芯片进行杂交所得的荧光图象；
- 图 4 是图 3A 到 3J 中所用的寡核苷酸芯片的探针的位置排列图；
- 图 5 显示了根据本发明使用探针 SEQ ID NO 5 到 12 的寡核苷酸芯片的排列位置 (array format) 图；
- 图 6A 到 6C 显示了利用图 5 的寡核苷酸芯片进行分支杆菌菌种鉴定的试验结果图；
- 图 7 是寡核苷酸芯片的位置排列图，其中的核苷酸芯片含有碱基序列为

SEQ ID NO 41 到 46 的探针，可以用来检测结核分支杆菌中与利福平抗性相关的附加的（additional）*rpoB* 基因突变；

图 8A 到 8D 显示了利用图 7 的寡核苷酸芯片所得的临床样品（clinical isolates）的有关利福平抗性和 rifabutin 敏感性的诊断结果；

5 图 9A 显示了 PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中的 DNA 条带图，该 PCR 扩增是利用本发明人的在先申请中公开的 PCR 条件进行的，即，退火温度 63°C，35 个循环，用 50pmol 的生物素-TR8 和 TR9 作为引物；

图 9B 显示了 PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中的 DNA 带的图象，该 PCR 扩增是根据本发明的 PCR 条件进行的，即，退火温度 64°C，40 个
10 循环，用 100pmol 的生物素-DGR8 和 DGR9 作为引物；

图 10 显示了本发明中的 11 种唾液样品在最优条件下利用生物素-DGR8 和 DGR9 作为引物进行 PCR 扩增后在 2% 的琼脂糖凝胶中的图象；以及

图 11A 到 11B 显示了利用图 7 的寡核苷酸芯片对唾液样品进行有关利福平抗性进行诊断的结果。

15

实施本发明的最佳方式

下文将参照附图详细介绍本发明的优选实施方式。然而，下述实施例仅仅只是证实本发明的构成和效果，因此，本发明不仅限于下述实施例。

实施例 1-1：分支杆菌基因组 DNA

20 由 the Department of Respiratory Diseases, Asan Medical Center (韩国,汉城)提供经过测序的从 10 份临床样品培养物（clinical isolate cultures）中提取的分支杆菌基因组 DNA，其他的分支杆菌基因组 DNA 从 ATCC(Manassas, VA USA)获得。

实施例 1-2：寡核苷酸探针和引物的制备

25 表 2 显示了核苷酸探针和引物的序列，所用的每一种生物素-TR8 和 TR9 和探针都是由 Bionics(韩国,汉城)自定义合成，其他的所有试剂都是一级的。

[表 2]

	探针或引物	序列
	<u>结核菌探针</u>	
	Mc1	5'Amine-T10-tcttcggcaccagccag 3'
	Mc2	5'Amine-T10-tcttcggaaccagccag 3'
	Mc5	5'Amine-T10-tcttcggaacgtcgag 3'
	Mex	5'Amine-T10-tcttcggaacctcgag 3'
	<u>分支杆菌菌种鉴定探针</u>	
	Ms1	5'Amine-T10-ggtctgtcacgtgagcgtg 3'
	Ms2	5'Amine-T10-ggtctgtcccgtgagcgtg 3'
5	Ms3	5'Amine-T10-ggtctgtcgcgtgagcgtg 3'
	Ms4	5'Amine-T10-ggtctgtcccgagcgtg 3'
	Ms5	5'Amine-T10-ggtctgtcccgcgagcgtg 3'
	Ms6	5'Amine-T10-ggtctgtcgcgcgagcgtg 3'
	Ms7	5'Amine-T10-ggtctgaccgtgaccgtg 3'
	Ms8	5'Amine-T10-ggtctgagccgggagcgtg 3'
	<u>野生型探针</u>	
	F2	5'Amine-T10-cagccagctgagccaat 3'
10	F3	5'Amine-T10-gctgagccaattcatg 3'
	F4	5'Amine-T10-attcatggaccagaaca 3'
	F5	5'Amine-T10-tggaccagaacaacccg 3'
	F6	5'Amine-T10-caaccgctgtcgggg 3'
	F7	5'Amine-T10-ggttgaccacaagcgc 3'
	5'Amine-T10-ccgactgtcggcgctgg 3'	
	<u>利福平抗性探针</u>	
	mt511	
	mt513	5'Amine-T10-cagccagcagccaat 3'
15	mt516a	5'Amine-T10-gctgagccattcatg 3'
	mt516b	5'Amine-T10-attcatgttcagaaca 3'
	mt518	5'Amine-T10-attcatgtaccagaaca 3'
	mt521	5'Amine-T10-tggaccagcacaacccg 3'
	mt522	5'Amine-T10-caaccgctgtcgggg 3'
	mt526a	5'Amine-T10-caaccgctgttgggg 3'
	mt526b	5'Amine-T10-ggttgacctacaagcgc 3'
	mt526c	5'Amine-T10-ggttgaccgacaagcgc 3'
	mt531	5'Amine-T10-ggttgaccgcaagcgc 3'
0	mt516c	5'Amine-T10-ccgactgttggcgctgg 3'
	mt526d	5'Amine-T10-attcatggagcagaaca 3'
	mt526e	5'Amine-T10-ggttgaccaacaagcgc 3'
	mt526f	5'Amine-T10-ggttgaccgcaagcgc 3'
	mt526g	5'Amine-T10-ggttgacctgaagcgc 3'
	mt526h	5'Amine-T10-ggttgaccagaagcgc 3'
	5'Amine-T10-ggttgaccggaagcgc 3'	
	<u>cf) Rifabutin 敏感性探针</u>	
	<u>Primers</u>	
25	Bio-TR 8	5'biotin-tgcacgtcgcggacctcc 3'
	TR 9	5'tcgccgcgatcaaggagt 3'
	<u>分支杆菌菌种鉴定附加探针</u>	
	MTAB	5'Amine-T10-gcagctgagccaattcat 3'
	MF	5'Amine-a10-cgacgtcgcagctgtcg 3'

根据表 2 所显示的顺序, 选用 SEQ ID NO 1-40。

如表 2 所示, 所设计的用于研究 *rpoB* 基因点突变的寡核苷酸芯片包括 7 个野生型探针、17 个 RIF 抗性探针、以及 8 个 RIB 敏感性探针。

结构显示, 17 个 RIF 抗性探针 SEQ ID NO 20-36 可以区分下列密码子的突变: 密码子 511 (Leu > Pro)、密码子 513 (Gln > Pro)、密码子 516(a: Asp > Val, b: Asp > Tyr, c: Asp > Glu)、密码子 518 (Asn > His)、密码子 521 (Leu > Met)、密码子 522(Ser > Leu)、密码子 526(a: His) Tyr, b:His) Asp, c: His) Arg, d: His) Asn, e: His) Ala, f : His > Cys, g: His) Gln, h: His > Gly)、以及密码子 531(Ser > Leu)。

17 个 RIF 抗性探针中的 8 个 RIB 敏感性探针 SEQ ID NO 22,23 和 31-36 能区分密码子 516 (a:Asp > Val, b: Asp > Tyr, c: Asp > Glu)、以及密码子 526 (d: His > Asn, e: His > Ala, f : His > Cys, g: His > Gln, h: His > Gly)的突变。

正如许多报道中所指出的那样, 含有突变型 516a 和 516b 的菌株表现出截然不同的 RIB 敏感性(James M. Musser, "Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights", Clinical Microbiology Review, Vol. 8, No. 4, pp. 496-514,1995)。在 RIB 敏感性探针中寡核苷酸芯片的现行排列中含有 516a 和 516b 探针。

将为了使分支杆菌菌种和其他细菌区分开而设计的序列为 SEQ ID NO 1-3 的探针 Mc1、Mc2 和 Mc5 混合, 并使其单点附着在一个寡核苷酸芯片上。由探针上所产生的阳性反应可知, Mc1 能检测出结核分支杆菌 (*M. Tuberculosis*)、非洲分支杆菌(*M. africanum*)、亚洲分支杆菌(*M. asiaticum*)、牛型结核菌(2) (*M. bovis*(2))、胃分支杆菌 (*M. gastri*)、鸟分支杆菌(2) (*M. avium*(2))、隐藏分支杆菌 (2) (*M. celatium*(2))、日内瓦分支杆菌 (*M. genavense*)、戈登氏分支杆菌 (*M. gordonae*)、嗜血分支杆菌 (*M. haemophilum*)、中庸分支杆菌 (*M. interjectum*)、中间分支杆菌 (*M. intermedium*)、胞内分支杆菌 (*M. intracellulare*)、堪萨斯分支杆菌 (*M. kansasii*)、麻风分支杆菌 (*M. leprae*)、玛尔摩分支杆菌 (*M. malmoense*)、瘰癧分枝杆菌 (*M. scrofulaceum*)、斯氏分支杆菌 (*M. szulgai*)、蟾分支杆菌 (*M. xenopi*)、土地分支杆菌 (*M. terrae*)、次要分支杆菌 (*M. triviale*)、不产色分支杆菌 (*M. nonchromogenicum*)、金色分支杆菌 (*M. aurum*)、干

田分支杆菌 (*M. chitae*)、外来分支杆菌 (*M. peregrinum*)、草分支杆菌 (*M. phlei*)、耻垢分支杆菌 (*M. smegmatis*)、耐高温分支杆菌 (*M. thermoresistibile*)、以及牦牛分支杆菌 (*M. vaccae*)；Mc2 能检测致病的或非致病的、但临床上很重要的 *M. marium*、下出氏分支杆菌 (*M. shimoidei*)、
5 溃疡分支杆菌 (*M. ulcerans*)、脓肿分支杆菌 (*M. abscessus*)、以及龟分支杆菌 (*M. chelonae*)；Mc5 能检测偶发分支杆菌 (*M. fortuitum*)。而且，为了比较彼此的杂交信号，增加序列为 SEQ ID NO 4 的探针 Mex 作为对照组，该探针能检测不属于分支杆菌但和分支杆菌株相似的白喉棒状杆菌 (*corynebacterium diphtheriae*)，因此能更准确地鉴定被检测的菌株是否属
10 于分支杆菌。

除了能区分分支杆菌和其他相似细菌的探针外，还可加入含有分支杆菌种特异性的 *rpoB* 基因部分序列的 8 个分支杆菌菌种鉴定探针 SEQ ID NO 5 到 12，从而使分支杆菌的鉴别更精确。关于分支杆菌菌种鉴定探针，Ms1 探针能检测出结核分支杆菌 (*M. Tuberculosis*)、非洲分支杆菌、牛型结核菌、
15 以及胃分支杆菌。其他探针被设计用来检测亚洲分支杆菌 (Ms2)、猿猴分支杆菌 (Ms2) (*M. simiae*)、金色分支杆菌 (Ms2)、塞内加尔分支杆菌 (Ms2) (*M. senegalense*)、下出氏分支杆菌 (Ms2) (*M. shimoidei*)、新金色分支杆菌 (Ms2) (*M. neoaurum*)、土地分支杆菌 (Ms2)、戈登氏分支杆菌 (Ms2)、嗜血分支杆菌 (Ms2)、斯氏分支杆菌 (Ms2)、胞内分支杆菌 (Ms2)、堪萨斯分支杆菌 (Ms2)、瘰癧分枝杆菌 (Ms2) (*M. scrofulaceum*)、偶发分支杆菌 (Ms2)、
20 诡诈分支杆菌 (Ms2) (*M. fallax*)、微黄分支杆菌 (Ms2) (*M. flavescens*)、外来分支杆菌 (Ms2) (*M. peregrinum*)、草分支杆菌 (Ms2) (*M. phlei*)、牦牛分支杆菌 (Ms2)、*M. marinum* (Ms2)、溃疡分支杆菌 (Ms2)、千田分支杆菌 (Ms2)、日内瓦分支杆菌 (Ms2)、耻垢分支杆菌 (Ms2)、中间分支杆菌 (Ms3)、
25 玛尔摩分支杆菌 (Ms3)、不产色分支杆菌 (Ms3)、麻风分支杆菌 (Ms3)、鸟分支杆菌 (Ms4)、次要分支杆菌 (Ms4)、隐藏分支杆菌 (Ms4)、中庸分支杆菌 (Ms5)、蟾分支杆菌 (Ms6)、龟分支杆菌 (Ms7)、脓肿分支杆菌 (Ms7)、以及耐高温分支杆菌 (Ms8)。以上是致病的或是非致病的、但临床上很重要的菌种，可以根据需要进行鉴定。

附加的菌种鉴定探针, MTAB 和 MF 被设计用来特异地检测结核分支杆菌(MTAB)、非洲分支杆菌(MTAB)、牛型结核菌(MTAB)、牛型结核菌 BCG (MTAB)、胞内分支杆菌(MTAB)、以及堪萨斯分支杆菌(MTAB)、偶发分支杆菌(MF)、和微黄分支杆菌(MF)。

5 实施例 1-3: 寡核苷酸芯片的制备

图 1 是本发明中用于构建分支杆菌 DNA 鉴定的寡核苷酸芯片的制备步骤的流程图, 如图 1 所示, 该寡核苷酸芯片的制备步骤包括: 第一步(10), 修饰各个分支杆菌复合探针: 使含有分支杆菌 *rpoB* 基因的分支杆菌种特异性 DNA 序列的分支杆菌菌种鉴定探针、含有一个或多个分支杆菌 *rpoB* 基因
10 修饰密码子的分支杆菌抗药性检测探针、以及由野生型序列组成的与各个抗药性检测探针相应的对照组探针, 使其 5'末端含有一个胺基; 第二步(20), 在硅烷化的玻片上引入一个醛基; 以及第三步(30), 利用 Schiff 碱反应在玻片上固定修饰的探针, 从而制备出一个寡核苷酸芯片。

更优选的, 将一个特定的 DNA 探针(见表 2)溶解在 $3\times\text{SSC}$ 中, 使其
15 浓度为 $200\text{pmol}/\mu\text{l}$ 。将 $0.1-0.2\mu\text{l}$ 的 DNA 探针溶液在衍生有醛基的玻片(CEL Associates, Inc., MA, U.S.A) 上点样, 37°C 下在潮湿的培养箱中反应 4 小时, 然后依次用 0.2% 的十二烷基磺酸钠 (SDS)、蒸馏水、 NaBH_4 溶液 (0.1 g NaBH_4 , 30ml PBS , 和 10ml EtOH) 分别处理玻片 1 分钟、1 分钟、5 分钟, 最后, 用蒸馏水冲洗光滑玻片 1 分钟, 风干, 室温避光保藏, 待用。

20 实施例 1-4: 聚合酶链反应(PCR)

进行 PCR 的总体积为 $50\mu\text{l}$, 内含 10mM Tris-HCl ($\text{pH } 8.3$)、 50mM KCl 、 1.5mM MgCl_2 、 1U Taq 聚合酶、以及 50pmol 生物素-TR8 和 TR9 引物(参见表 2)。进一步地, 含有 1mM dATP 、 dGTP 、以及 dCTP 各 $2\mu\text{l}$ 、 dTTP $1.5\mu\text{l}$, 加入 1mM 的生物素- dUTP $0.50\mu\text{l}$, 使其与产生的靶 DNA 中的荧光标记随机
25 结合。表 3 列出 PCR 混合物的组成。

[表 3]

	PCR 反应混合物的组成	量 (μL)
5	10 × PCR buffer (MgCl_2 -free)	5
	MgCl_2 (25 mM)	3
	dNTPs (1 mM each)	2 (dT 1.5)
	Biotin-dUTP (1 mM)	0.5
	Primer 1 : Bio-TR 8 (50 pmol/ μL)	2
	Primer 2 : TR 9 (50 pmol/ μL)	2
	Taq polymerase (5 unit/ μL)	0.2
	Template DNA	1

PCR 在下列条件下进行 35 个循环:

- 预变性: 94°C, 5 分钟
- 变性: 94°C, 30 秒
- 10 -引物退火: 63°C, 30 秒
- 聚合: 72°C, 45 秒
- 最后延伸: 72°C, 5 分钟

通过以上方法获得的是包含 81bp 的核心区域的 157bp 的 PCR 产物, 并已通过 2% 的琼脂糖电泳进行鉴定。

15 实施例 1-5: 杂交和扫描

采用 PCR 扩增的 20 μL 的靶 DNA (157bp) 与 20 μL 脱氧核糖核酸酶 (DNase) 缓冲液和 1 μL DNA 酶 I (DNase I) (0.1U/ μL) 混合, 在 0°C 下处理 5 分钟。将所得靶 DNA 在 99°C 下热处理 10 分钟, 使 DNase I 失活。然后用 4 μL 的 3N NaOH 在 25°C 下处理 5 分钟, 接着用 Tris-HCl (pH 7.2) 2 μL 和 3N HCl 4 μL 在 20 0°C 下处理 5 分钟, 再往上述混合物中加入 50 μL 12 × SSPE (磷酸钠盐-EDTA 缓冲液) 和 0.5 μL 10% SDS, 然后转移到寡核苷酸芯片上, 于 40°C 杂交 3 小时。

杂交后, 用 2 × SSPE 和 0.03% SDS 在 25°C 下冲洗寡核苷酸芯片 3 分钟, 用 1 × SSPE 在 25°C 下冲洗 5 分钟, 然后用 0.2 × SSPE 在 25°C 下冲洗 5 分钟以除去未反应的 DNA。寡核苷酸芯片在 25°C 下风干, 加入 49 μL 3 × SSPE 25 和 1 μL 抗生物素蛋白链菌素-R-藻红蛋白的混合物, 25°C 下处理 10 分钟, 将被染色的寡核苷酸芯片用 1 × SSPE 冲洗两次, 每次 1 分钟, 风干, 用荧光激光扫描仪 (GMS 418 array scanner, TaKaRa, 日本) 扫描。

野生型 (wt) 探针包括根据与密码子 507—533 相应的 rpoB 基因序列设计的 7 种 17mer 探针, 该探针在中间位置 (位点 8—12) 含有突变位点, 并

且在各野生型探针之间具有最大的序列重叠。本发明通过比较利福平抗性探针的信号强度与相应的野生型探针的信号强度能准确的检测出频繁发生的点突变，同时预测在密码子 507—533 处发生的所有点突变。

设计各个探针，使其发生点突变频率最高的位点位于中间位点（8—12 5 位点），这样的探针作为野生型探针，因此通过与野生型探针的信号强度进行比较可以提高检测的敏感性，使检测更准确。试验证明，在每个探针上连接一个 T_{10} 间隔子（ T_{10} spacer）可以提高杂交效率。这可能是因为 T_{10} 间隔减小了空间位阻（steric hindrance），从而提高了靶 DNA 和探针的杂交效率。

图 2 显示了本发明用生物素-TR8 和 TR9 引物扩增 10 个临床样品（clinical 10 isolates）中的 *rpoB* 基因片段（157bp），然后在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳的结果。用 DNase I 消化上述 10 个扩增的 *rpoB* 基因片段（157bp），然后与寡核苷酸芯片杂交。在最佳条件下，即 40°C 下杂交 3 小时后，用抗生物素蛋白链菌素-R-藻红蛋白使寡核苷酸芯片染色，再在 578nm 下进行荧光扫描。通过得到的图象比较野生型（wt）探针的荧光强度和相应的突变（mt） 15 型探针的荧光强度可以分析抗药性。除了在序列的中间位置的几个碱基不同外，突变型探针和野生型探针的序列是一致的。突变的靶 DNA 在相应的突变型探针上比在野生型探针上表现出更强的信号。杂交信号的差别可以根据视觉进行判断，其信号强度也可以利用合适的软件进行数值测定从而作更准确的比较。

20 图 3A 到 3J 显示了本发明扩增的含有生物素-dUTP 的临床样品（clinical samples）利用寡核苷酸芯片所得的荧光图象。图 4 显示了图 3A 到 3J 中所用的探针的位置，其中每个探针被固定在各自独立的块中以便于信号比较，而且为了增加分析的准确性，每个探针都分别固定了两个位置。

在图 3A 中，野生型探针 F1, F2, F4, F5, F6 和 F7 的信号比突变型探针 25 的信号更强，但是突变型探针 516c 的信号比相应的野生型探针 F3 和突变型探针 516a 和 516b 的信号更强。因此，该样品被确定为 516c 突变体。在图 3B 到 3J 中，样品采用与图 3A 相同的方式鉴定。

因此，如图 3A 到 3J 所示，可鉴定含有下列 RIF 抗性突变体的每一临床样品（clinical isolate）：#22 (mt516c)、#24 (mt516b/526e)、#30 (mt531)、#36

(mt516b)、#48 (mt526f)、#82 (mt531/516c)、#87 (mt531/516c)、#90 (mt516c/526d)、#91 (mt531)、以及#94 (mt511/531)。

另外，上述样品中显示具有 RIB 敏感性的临床样品有：#22 (mt516c)、#24 (mt526b/526e)、#36 (mt516b)、#48 (mt526f)、#82 (mt531/516c)、#87 (mt531/516c)、以及#90 (mt516c/526d)。将上述结果与药物敏感性测试的结果进行比较或进行 DNA 测序，#24 表现出非一致性 (discrepancy)，它在药物敏感性测试中表现为 RIB 抗性，但测序结果表明，其是 RIB 敏感性 526e 突变体。寡核苷酸芯片的结果发现，在 RIB 抗性突变体 526b 和 RIB 敏感性突变体 526e 中都表现出信号。基于上述结果，认为该样品中含有两种形式的突变体或两种不同的菌株，因而产生混合结果。

L. B. Heifets 已经报道了将含有 511 (Leu > Pro)、516 (Asp > Tyr)、516 (Asp > Val)、以及 522 (Ser > Leu) 突变的菌株分类为对 rifabutin MIC $\leq 5 \mu\text{g/ml}$ 的、具有低水平抗性的菌株。(Heifets L. B., *Antituberculosis drugs: antimicrobial activity in vitro*, pp. 14-57 in L. B. Heifets (ed.), *Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections*, 1st ed. CRC Press, Boca Raton, Fla, 1991)。对此，除了要进行寡核苷酸芯片试验外，还需要进行药物敏感性测试。

关于密码子 526 突变体，已经清楚鉴定出 His > Gln、Gly、Asn、Ala、或 Cys 为 RIB 敏感性，而 His > Tyr、Pro、Arg、或 Asp 为 RIB 抗性，因此，单独的寡核苷酸芯片试验能区分 RIB 敏感性。

图 5 显示了使用探针 Ms1—Ms8 的寡核苷酸芯片的排列位置图，其中的探针是为了进行菌种鉴定而设计的。图 6A 到 6C 显示了使用图 5 的寡核苷酸芯片进行分支杆菌菌种鉴定的试验结果。对于堪萨斯分支杆菌、偶发分支杆菌、以及瘰癧分枝杆菌来说，显示分支杆菌存在的 Mcmix 探针的信号比对照 Mex 探针的信号要强得多，2 号探针的信号比菌种鉴定探针中的 1、3-8 号探针的信号要强。同样地，临床上很重要的 33 种分支杆菌能得到鉴定。对于结核分支杆菌来说，Mcmix 探针和 1 号探针的信号开启，除了胃分支杆菌外的 MOTT 可通过 Mcmix 探针和 2 号到 8 号探针的信号得到鉴定。

在下面的两个实施例中，用到的材料包括 Jeju University (Jeju, 韩国)提

供的 16 种不同分支杆菌菌种的基因组 DNA、以及由 Bionics (Seoul, 韩国) 自定义合成的 DNA 探针和引物, 所有其他试剂都是一级的。

实施例 2-1: 寡核苷酸探针的制备

检测结核分支杆菌利福平抗性的 *rpoB* 基因突变的附加探针可以和上文提到的抗药性探针一起使用, 三种附加探针及其相应的野生型探针的碱基序列参见表 4。

[表 4]

探针	碱基序列	药物敏感性	鉴定结果
Mt509	5'amine-t10- ggcaccagacagctgag-3'	RFP-R, RBU-S	509 MUTANT
Mt533	5'amine-t10- tgtcggcgccggggccc-3'	RFP-R, RBU-R	533 MUTANT
Mt524	5'amine-t10- tgtcggggtaaccac-3'	RFP-R, RBU-R	524 MUTANT
Wt509	5'amine-t10- ggcaccagccagctgag-3'	RFP-S, RBU-S	509 WILD TYPE
Wt533	5'amine-t10- tgtcggcgctggggccc-3'	RFP-S, RBU-S	533 WILD TYPE
Wt524	5'amine-t10- tgtcggggtagaccac-3'	RFP-S, RBU-S	524 WILD TYPE

通过比较探针的荧光强度, 能检测出诸如密码子 509 (Ser) → AGA (Arg)、密码子 533 CTG (Leu) → CCG (Pro)、密码子 524TTG (Leu) → TTA (Leu) 的突变。在表 4 中, RFP 代表利福平, RBU 代表 rifabutin, R 代表抗性, 以及 S 代表敏感性。

图 7 显示了含有附加 RIF 抗性探针的寡核苷酸芯片的位置排列图。图 8A 到 8D 显示了利用图 7 的寡核苷酸芯片所得的临床样品 (clinical isolates) 的有关利福平抗性和 rifabutin 敏感性的诊断结果。实验中所使用的临床样品是由 Asan Medical Center (Seoul, 韩国)提供的。样品中的突变体采用与实施例 1 相同的方式鉴定, 鉴定结果如图 8A—8D 所示, 为#1 (516a 突变体)、#2 (511 突变体)、#3 (516b 突变体)、以及#4 (531 突变体)。通过比较 Mmix 探针和 Mex 探针而判断出, 所有的样品都是分支杆菌菌株, DNA 测序的结果与寡核苷酸芯片的各结果一致。

实施例 2-2：引物的制备

在先申请中，发明人使用的是生物素-TR8 和 TR9 引物对（primer set），此外本发明中发明人还设计了一对新的引物对（primer set）：生物素-DGR8 和 DGR9，该引物对能从未培养样品，例如唾液中扩增结核分支杆菌和 MOTT，且相对于生物素-TR8/TR9 其效率有所提高。

通过将 43 种菌种的 rpoB 基因的部分碱基序列进行混合而设计出新的引物对：生物素-DGR8、DGR9，这 43 种菌种除结核分支杆菌外，还包括非洲分支杆菌、亚洲分支杆菌、鸟分支杆菌、牛型结核菌,牛型结核菌 BCG strain French 1173P2（M. bovis BCG strain French 1173P2）、隐藏分支杆菌菌株 ATCC51131（M. celatum strain ATCC51131）、隐藏分支杆菌菌株 ATCC51130（M. celatum strain ATCC51130）、胃分支杆菌、日内瓦分支杆菌、戈登氏分支杆菌、嗜血分支杆菌、中庸分支杆菌、中间分支杆菌、胞内分支杆菌、堪萨斯分支杆菌、麻风分支杆菌、玛尔摩分支杆菌、海洋分支杆菌（M. marinum）、鸟分支杆菌副结核亚种（M. avium subsp. Paratuberculosis）、瘰癧分枝杆菌、下出氏分支杆菌（M. shimoidei）、猿猴分支杆菌、斯氏分支杆菌、溃疡分支杆菌, 蟾分支杆菌、土地分支杆菌、次要分支杆菌、不产色分支杆菌、脓肿分支杆菌、金色分支杆菌、龟分支杆菌、千田分支杆菌、诡诈分支杆菌、微黄分支杆菌、偶发分支杆菌 ATCC6841、偶发分支杆菌 ATCC49403、新金色分支杆菌、外来分支杆菌、草分支杆菌、塞内加尔分支杆菌、耻垢分支杆菌、耐高温分支杆菌、以及牝牛分支杆菌。

用于设计生物素-DGR8 和 DGR9 引物的 rpoB 基因部分碱基序列 SEQ ID NO 49-92 在表 5 中列出。

[表 5]

	菌株	DGR9	DGR8
1	结核分支杆菌	tc gccgcatca aggagt	gga ggtccgac gtgca
2	非洲分支杆菌	tc gccgcatca aggagt	gga ggtccgac gtgca
3	亚洲分支杆菌	tt gccgcatca aggagt	gga agtgcgtgac gtgca
4	鸟分支杆菌	tg gccgcatca aggagt	gga ggtccgac gtgca
5	牛型结核菌	tc gccgcatca aggagt	gga ggtccgac gtgca
6	牛型结核菌 BCG strain French 1173P2	tc gccgcatca aggagt	gga ggtccgac gtgca
7	隐藏分支杆菌菌株 ATCC51131	tg gccgcatca aggagt	cga ggtccgac gtgca

5	8	隐藏分支杆菌菌株 ATCC51130	tg gcggccatca aggagt	gga ggtcgcgcac gtgca
	9	胃分支杆菌	tc gccgccatta aggagt	gga ggtcgcgcac gtgca
	10	日内瓦分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	cga ggtcgcgcac gtgca
	11	戈登氏分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	gga agtacgtgac gtgca
	12	嗜血分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	gga agtacgtgac gtgca
10	13	中庸分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	cga ggtcgcgcac gtgca
	14	中间分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	gga agtcgtgac gtgca
	15	胞内分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	gga ggtcgtgac gtcca
	16	堪萨斯分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	gga ggtcgtgac gtcca
	17	麻风分支杆菌	tc gccgcatca aggaat	aga ggtcgtgac gtgca
15	18	玛尔摩分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	gga ggtcgtgac gtgca
	19	海洋分支杆菌	tt gcggcgatca aggagt	gga agttcgtgac gtgca
	20	鸟分支杆菌副结核 亚种	tg gcggcgatca aggagt	gga ggtcgcgcac gtgca
	21	瘰癧分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	tga ggtcgcgcac gtgca
	22	下出氏分支杆菌	tt gccgcgatca aggagt	gga agttcgtgac gtgca
20	23	猿猴分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	tga ggtcgcgcac gtgca
	24	斯氏分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	gga ggtcgtgac gtgca
	25	溃疡分支杆菌	tt gccgcgatca aggagt	gga agttcgtgac gtgca
	26	蟾分支杆菌	tg gccgcgatca aggagt	gga ggtcgtgac gtgca
	27	土地分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	tga ggtcgtgac gtgca
25	28	次要分支杆菌	tc gccgcgatca aggagt	gga ggtcgcgcac gtgca
	29	不产色分支杆菌	tc gccgccatca aggaat	gga agttcgtgac gtgca
	30	脓肿分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	cga ggtcgcgcac gtgca
	31	金色分支杆菌	tt gccgcgatca aggagt	gga agtcgtgac gtgca
	32	龟分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	tga ggtcgcgcac gtgca
	33	千田分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	cga ggttcgtgac gtgca
	34	诡诈分支杆菌	tg gccgcgatca aggagt	gga ggtcgcgcac gtgca
	35	微黄分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	cga agtcgtgac gtgca
	36	偶发分支杆菌菌株 ATCC6841	tg gcggcgatca aggagt	tga ggtcgcgcac gtcca
	37	偶发分支杆菌菌株 ATCC49403	tg gcggcgatca aggagt	tga ggtcgcgcac gtcca
	38	新金色分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	tga ggtcgcgcac gtgca
	39	外来分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	tga ggtcgcgcac gtgca
	40	草分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	cga ggtcgcgcac gtgca
	41	塞内加尔分支杆菌	tg gccgcgatca aggagt	tga ggtcgcgcac gtgca
	42	耻垢分支杆菌	tg gcggcgatca aggagt	cga ggtcgcgcac gtgca
	43	耐高温分支杆菌	tg gccgcgatca aggagt	cga ggtcgcgcac gtcca
	44	牝牛分支杆菌	tg gcggcgatca aggaat	cga ggtcgcgcac gtgca

在表 6 中,通过上述方法制备的生物素-DGR8 和 DGR9 的碱基序列被列出,并和在先申请中的生物素-TR8 和 TR-9 进行了比较。

[表 6]

引物	碱基序列
biotin -TR8	5' biotin t g c a c g t c g c g g a c c t c c 3'
TR9	5' t c g c c g c g a t c a a g g a g t 3'
biotin-DGR8	5' biotin t g S a c g t c R c g N a c Y t c 3'
DGR9	5' t B g c S g c B a t Y a a g g a R t 3'

参数) B: c, t, g

N: c, t, g, a

R: g, a

S: c, g

Y: c, t

实施例 2-3: 聚合酶链反应(PCR)

为了寻找使用新设计的生物素-DGR8 和 DGR9 引物对进行 PCR 的最佳条件,反应条件如下述进行变化:

A: 温度程序

a. 94°C 5 分钟, 94°C 30 秒, 47°C 30 秒, 以及 72°C 45 秒

b. 94°C 5 分钟, 94°C 30 秒, 63°C 30 秒, 以及 72°C 45 秒

c. 94°C 5 分钟, 94°C 30 秒, 64°C 30 秒, 以及 72°C 45 秒

d. 94°C 5 分钟, 94°C 30 秒, 65°C 30 秒, 以及 72°C 45 秒

通过 2% 的凝胶电泳分析,使用生物素-DGR8 和生物素-DGR9 引物进行 PCR 的产量根据退火温度而发生改变,当退火温度为 64°C 或 65°C 时获得最大产量,在 47 或 63°C 时获得少量的不同大小的副产品。

B. 反应循环

以生物素-DGR8 和生物素-DGR9 作为引物,64°C 下退火,进行 35 或 40 个循环,聚合酶链反应的扩增产物通过 2% 的琼脂糖凝胶鉴定表现为单一条带,扩增产物的量根据反应循环数而变化,进行 40 个循环时产量更高。因此,最优 PCR 条件是 64°C 和 40 个循环。

C. 引物浓度

使用不同浓度的生物素-DGR8 和 DGR9 引物: 50pmol、100pmol、500pmol 和 1000pmol, 聚合酶链反应的退火温度设定为 64℃, 进行 40 个循环, 发现在 50~100pmol 浓度范围内产量增加, 但超过 100pmol 时产量下降, 因此,

5 生物素-DGR8 和 DGR9 引物的浓度在 50~100pmol 范围内被认为是合适的。

利用上文试验测得的最佳反应条件, 对 16 种不同的分支杆菌菌种进行 PCR 扩增。图 9A 显示了 PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中的 DNA 条带图, 该 PCR 扩增是在发明人的在先申请中公开的 PCR 条件下进行的, 即, 退火温度 63℃, 35 个循环, 50pmol 生物素-TR8 和 TR9 引物。图 9B 显示了 PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中的 DNA 条带图, 该 PCR 扩增是在
10 本发明的 PCR 条件下进行的, 如退火温度 64℃, 40 个循环, 100pmol 生物素-DGR8 和 DGR9 引物。

如图 9A 和 9B 所示, 本发明的引物对生物素-DGR8 和 DGR9 在扩增 16 种分支杆菌菌种的 rpoB157bp 区域时都表现出比生物素-TR8 和 TR9 引物对
15 更高的效率。其 157bp 的扩增产物可以作为靶 DNA 用于核苷酸芯片分析。

实施例 2-4: 唾液样品的抗药性诊断

从 Department of Respiratory Diseases, Asan Medical Center (Seoul, 韩国) 的结核患者或可能的结核患者的唾液样品中直接提取得到 11 个 DNA 样品。

图 10 显示了根据本发明的实施例 2-3 中的最优条件, 即: 64℃、40 个
20 循环、使用 100pmol 的生物素-DGR8 和 DGR9 引物, 对唾液样品进行 PCR 扩增后的产物在 2% 琼脂糖凝胶中的图象。如图 10 所示, 在 #16 和 #36 样品中没有检测到结核分支杆菌, 除了上述 #16 和 #36 样品外的其他 9 个样品检测结果显示结核分支杆菌阳性。因此 (Thus), 利用图 7 中的寡核苷酸芯片诊断来检测抗药性, 结果检测到 8 个样品是野生型的, 其中包括 #6、#20、
25 #26、#27、#29、#38、#41、#49, 也就是说, 这些是利福平敏感性菌株。#57 是在密码子 509 和 513 处发生突变的抗性菌株。图 11A 到 11B 显示了寡核苷酸芯片分别检测 #27 (野生型) #57 (509,513 突变体) 所获得的图象。将这 8 种野生型菌株进行 DNA 测序的结果和使用寡核苷酸芯片进行检测的结果是一致的, 通过药物敏感性测试检测到 #57 是利福平抗性菌株。

实施例 2-5：随机标记插入酞菁 5-dUTP (Cyanine 5-dUTP)

- 相对于在先申请在 PCR 随机结合生物素标记后采用抗生蛋白链菌素-R-藻红蛋白着色的方法，已设计出的新的检测方法可减少检测时间。更具体的说，用酞菁 5-dUTP (NEN, U. S. A) 代替生物素-dUTP 进行 PCR 以使酞菁
- 5 (cyanine) 随机与扩增产物结合，这样，在扫描之前就不需要进行单独的着色步骤，因此，可快速、简便地获得明显可见的结果。在进行聚合酶链反应时，所用酞菁 5-dUTP 的浓度与已知方法中生物素-dUTP 的浓度相同，优选地，使用没有被生物素修饰的 DGR8 作为引物。除了着色步骤被删除以及在 633nm 处进行荧光扫描外，试验条件与已有方法的条件相同。
- 10 在实施例 2-1 到 2-5 没有特别说明的部分和实施例 1-1 到 1-5 相同，因此这些步骤被省略。

工业应用

- 最后，如同上文所述，仅利用分支杆菌 rpoB 基因的一部分 (157bp)，
- 15 本发明能协同、快速且准确地大批量进行分支杆菌菌种的鉴定和抗药性检测，这能为治疗结核提供有用的信息，从而能给予患者进行合适的药物治疗。因此，在分支杆菌感染的早期阶段，可以为分支杆菌感染的患者提供合适的抗生素药剂和其他必须的治疗。

<110>	百奥麦雷公司 (biomedlab Co., Ltd.)	
<120>	用于分支杆菌菌种鉴定和抗药性检测的诊断试剂盒及其制备方法	
<130>	SGG1601PCT	
<150>	KR10-2000-0029369	
<151>	2000-05-30	
<160>	92	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	1	
	tcttcggcac cagccag	17
<210>	2	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	海洋分支杆菌 (Mycobacterium marinum)	
<400>	2	
	tcttcggaac cagccag	17
<210>	3	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	偶发分支杆菌 (Mycobacterium fortuitum)	

<400> 3

tcttcggaac gtcgcag

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> 白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)

<400> 4

tcttcggaac ctcgcag

17

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 结核分支杆菌、非洲分支杆菌、牛型结核菌、胃分支杆菌, MTB复合物
(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. gastri*, MTB complex)

<400> 5

ggtctgtcac gtgagcgtg

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> 亚洲分支杆菌、猿猴分支杆菌、金色分支杆菌、塞内加尔分支杆菌、下出氏
分支杆菌、新金色分支杆菌 (*Mycobacterium asiaticum*, *M. simiae*,
M. aurum, *M. senegalense*, *M. shimoidei*, *M. terrae*, *M. neoaurum*)

<400> 6

ggtctgtccc gtgagcgtg

19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> 中间分支杆菌、麻风分支杆菌、玛尔摩分支杆菌、不产色分支杆菌
(*Mycobacterium intermedium*, *M.leprae*, *M.malmoense*, *M.nonchromogenicum*)

<400> 7

ggtctgtcgc gtgagcgtg 19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> 鸟份枝杆菌副结核亚种、鸟分支杆菌、次要分支杆菌、隐藏分支杆菌
(*Mycobacterium avium paratuberculosis*, *M.avium*, *M.triviale*, *M.celatum*)

<400> 8

ggtctgtccc gggagcgtg 19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> 中庸分支杆菌 (*Mycobacterium interjectum*)

<400> 9

ggtctgtccc gcgagcgtg 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> 蟾分支杆菌 (*Mycobacterium xenopi*)

<400> 10

ggtctgtcgc gcgagcgtg 19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213>	龟分支杆菌、脓肿分支杆菌 (<i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>M. abscessus</i>)	
<400>	11	
	ggtctgaccc gtgaccgtg	19
<210>	12	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	耐高温分支杆菌 (<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>)	
<400>	12	
	ggtctgagcc gggagcgtg	19
<210>	13	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	
<400>	13	
	cagccagctg agccaat	17
<210>	14	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	
<400>	14	
	gctgagccaa ttcattg	17
<210>	15	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	

<400>	15	
attcatggac cagaaca		17
<210>	16	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	16	
tggaccagaa caaccg		17
<210>	17	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	17	
caaccgctg tcgggt		17
<210>	18	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	18	
ggttgaccca caagcg		17
<210>	19	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	19	
ccgactgtcg gcgctg		17

<210> 20
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 20
cagccagccg agccaat 17

<210> 21
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 21
gctgagccca tcatgg 17

<210> 22
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 22
attcatggtc cagaaca 17

<210> 23
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 23
attcatgtac cagaaca 17

<210>	24	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	24	
	tggaccagca caaccg	17
<210>	25	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	25	
	caaccgatg tcgggt	17
<210>	26	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	26	
	caaccgctg ttgggt	17
<210>	27	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	27	
	ggttgacctg caagcg	17
<210>	28	
<211>	17	

<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	28	
	ggttgaccga caagcgc	17
<210>	29	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	29	
	ggttgaccgc caagcgc	17
<210>	30	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	30	
	ccgactgttg gcgctgg	17
<210>	31	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	31	
	attcatggag cagaaca	17
<210>	32	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	

<400> 32
ggttgaccaa caagcgc 17

<210> 33
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 33
ggttgaccgc caagcgc 17

<210> 34
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 34
ggttgacctg caagcgc 17

<210> 35
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 35
ggttgaccga gaagcgc 17

<210> 36
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 36

ggttgaccgg caagcgc		17
<210>	37	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	37	
tgcacgtcgc ggacctcc		18
<210>	38	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
<400>	38	
tcgccgcgat caaggagt		18
<210>	39	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	结核分支杆菌、非洲分支杆菌、牛型结核菌、牛型结核菌BCG、胞内分支杆菌、堪萨斯分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis, M.africanum, M.bovis, M.bovisBCG, M.intracellulare, M.kansasii)	
<400>	39	
gcagctgagc caattcat		18
<210>	40	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	偶发分支杆菌、微黄分支杆菌 (Mycobacterium fortuitum, M.flavescens)	
<400>	40	

cgacgtcgca gctgtcg 17

<210> 41
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 41
ggcaccagac agctgag 17

<210> 42
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 42
tgtcggcgcc ggggccc 17

<210> 43
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 43
tgtcgggggt aaccac 17

<210> 44
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 44
ggcaccagcc agctgag 17

<210> 45
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 45
tgtcggcgct ggggcc 17

<210> 46
<211> 17
<212> DNA
<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 46
tgtcggggtt gaccac 17

<210> 47
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 该序列与44种分支杆菌菌株的rpoB基因结合 (this sequence is combined with the rpoB genes of 44 species belonged to Mycobacterium)

<400> 47
tgsacgtcrc gnacytc 17

<210> 48
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 该序列与44种分支杆菌菌株的rpoB基因结合 (This sequence is combined with the rpoB genes of 44 species belonged to Mycobacterium)

<400> 48

tbgcsgcbat yaaggart 18

<210> 49

<211> 306

<212> DNA

<213> 结核分支杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 49

tgcgtacggt cggcgagctg atccaaaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc 60

gggtggtccg ggagcggatg accacccagg acgtggaggc gatcacaccg cagacgttga 120

tcaacatccg gccggtggtc gccgcgatca aggagtott cggcaccagc cagctgagcc 180

aattcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg ggttgaccca caagcgccga ctgtcggcgc 240

tggggcccgg cggctctgtca cgtgagcgtg ccgggctgga ggtccgcgac gtgcaccggt 300

cgcact 306

<210> 50

<211> 306

<212> DNA

<213> 非洲分支杆菌 (Mycobacterium africanum)

<400> 50

tgcgtacggt cggcgagctg atccaaaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc 60

gggtggtccg ggagcggatg accacccagg acgtggaggc gatcacaccg cagacgttga 120

tcaacatccg gccggtggtc gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgagcc	180
aattcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg ggttgacca caagcgccga ctgtcggcgc	240
tggggcccgg cggctgttca cgtgagcgtg ccgggctgga ggtccgcgac gtgcaccctt	300
cgact	306

<210> 51
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 亚洲分支杆菌 (Mycobacterium asiaticum)

<400> 51	
tgcgaccgt gggcgagtg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc cggatggagc	60
gcgtcgtccg cgagcggatg accactcagg acgtcgaggc gatcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg gccggtcgtt gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctttcgg gtttgacca caagcgccgc ctgtcggcgc	240
tggggcccgg cggctgttcc cgtgagcgtg ccggcctgga agtgcgtgac gtgcaccctt	300
cgact	306

<210> 52
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> 鸟分支杆菌 (Mycobacterium avium)

<400> 52	
tgcgaccgt cggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc cggatggagc	60
gcgtcgtccg cgagcggatg accaccagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg tcccgctcgtg gggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtccc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gggtcaccca caagcgccgc ctgtcggcgc	240
tgggcccggg tggctgtcc cgggagcggg ccgggctgga ggtccgcgac gtgcacccgt	300
	300
<210> 53	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 牛型结核菌 (Mycobacterium bovis)	
<400> 53	
tgcgtaggt cggcgagctg atccaaaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc	60
gggtggtccg ggagcggatg accacccagg acgtggaggc gatcacaccg cagacgttga	120
tcaacatccg gccggtggtc gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgagcc	180
aattcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg ggttgaccca caagcgccga ctgtcggcgc	240
tgggcccggg cggctgtca cgtgagcgtg ccgggctgga ggtccgcgac gtgcacccgt	300
cgcact	306
<210> 54	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 牛型结核菌BCG株French 1173P2 (Mycobacterium bovis BCG strain French 1173P2)	
<400> 54	
tgcgtaggt cggcgagctg atccaaaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc	60
gggtggtccg ggagcggatg accacccagg acgtggaggc gatcacaccg cagacgttga	120

tcaacatccg gccggtggc gccgcgatca aggagtctt cggcaccagc cagctgagcc	180
aattcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gggtgacca caagcgccga ctgtcggcgc	240
tggggcccg cggtctgtca cgtgagcgtg ccgggctgga ggtccgcgac gtgcacccgt	300
cgcaact	306

<210> 55
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 隐藏分支杆菌菌株ATCC51131(Mycobacterium celatum strain ATCC51131)

<400> 55	
ttctaccgt cggtagctg atccagaacc agatccgagt cggcatgtcc cgcattggagc	60
gggtgggtcc cgagcggatg accactcagg acgtcaggc gatcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg tccgtctgtg gccgcgatca aggagtctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gggtgacca caagcggcgc ctgaacgcac	240
tgggcccggg tggctgttcc cgggagcggg cgggcctcga ggtgcgcgac gtgcacccga	300
gtcaact	306

<210> 56
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 隐藏分支杆菌菌株ATCC51130(Mycobacterium celatum strain ATCC51130)

<400> 56	
ttctaccgt cggtagctg atccagaacc agatccgagt cggcatgtcc cgcattggagc	60
gggtgggtcc cgagcggatg accactcagg acgtcaggc gatcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg tcccgctgtg gcggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtccg ggctgaccca caagcggcgc ctgaacgcac	240
tgggcccggg tggctgtcc cgggagcggg cgggcctcga ggtgcgcgac gtgcacccga	300
gtcact	306

<210> 57

<211> 306

<212> DNA

<213> 胃分支杆菌 (Mycobacterium gastri)

<400> 57

tgcgcacggt gggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc aggatggagc	60
gcgtcgtccg ggagcggatg accactcagg acgtcgaggc catcacgccg cagacgctga	120
tcaacattcg cccggtggtc gccgccatta aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gcctgaccca caagcgccgg ctttcggcgc	240
tgggccccgg cggctgttca cgtgagcgtg ccgggctgga ggtccgcgac gtgcacccgt	300
cgcact	306

<210> 58

<211> 306

<212> DNA

<213> 日内瓦分支杆菌 (Mycobacterium genavense)

<400> 58

tgcgcacggt gggcgatctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc	60
gggtgttccg tgagcggatg accactcagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg tccggtgtg gggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcag gtctcaccca caagcgccgg ttgtcggcgc	240
tggggccggg cggctgtcc cgtgagcggg cgggcctcga ggtccgcgac gtgcaccgt	300
cgact	306

<210> 59
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 戈登氏分支杆菌 (Mycobacterium gordonae)

<400> 59	
tgcgaccgt gggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc cggatggagc	60
gcgtcgtgcg cgagcggatg accactcagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg gccggtcgtc gcccgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgc	240
tggggccggg tggctgtcc cgtgagcgtg cgggtctgga agtacgtgac gtgcaccgt	300
cgact	306

<210> 60
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 嗜血分支杆菌 (Mycobacterium haemophilum)

<400> 60	
tgcgaccgt gggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc cggatggagc	60
gcgtcgtgcg cgagcggatg accactcagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg gccggtcgtc gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgc	240
tggggccggg tggctgttcc cgtgagcgtg cgggtctgga agtacgtgac gtgcacccgt	300
cgact	306

<210> 61

<211> 306

<212> DNA

<213> 中庸分支杆菌 (Mycobacterium interjectum)

<400> 61

tgcgcaccgt cggtagcgtg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc aggatggagc	60
gcgtcgtccg ggagcggatg accaccagg acgtcaggc gatcacgccg cagacgtga	120
tcaacatccg gccggtcgtc gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gcctaccca caagcggcgc ctgtcggcgc	240
tggggccggg cggctgttcc cgcgagcggg ccggcctcga ggtccgac gtgcaccga	300
accact	306

<210> 62

<211> 306

<212> DNA

<213> 中间分支杆菌 (Mycobacterium intermedium)

<400> 62

tgcgtaccgt cggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc cgcattgagc	60
gcgttgtccg cgagcggatg accactcagg acgtcaggc catcacgccg cagacctga	120

tcaacatccg gccggtgggc gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgt	240
tgggcccggg tggctgtcgc cgtgagcgtg ccgggctgga agtccgtgac gtgcaccctt	300
cgcaact	306

<210> 63
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 胞内分支杆菌 (Mycobacterium intracellulare)

<400> 63	
tgcgcaccgt gggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc	60
gcgtcgtccg cgagcggatg accacgcagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg gccggtcgtc gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgagcc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgt	240
tgggcccggg cggctgtcgc cgtgagcgtg ccgggctgga agtccgtgac gtgcaccctt	300
cgcaact	306

<210> 64
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 堪萨斯分支杆菌 (Mycobacterium kansasii)

<400> 64	
tgcgcaccgt gggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc	60
gcgtcgtccg cgagcggatg accacgcagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg gccggtcgtc gccgcgatca aggagttott cggcaccagc cagctgagcc 180

agttcatgga ccagaacaac ccgctgtccg gtctgaccca caagcgccgc ctctcggcgc 240

tgggccccgg cggctgttcc cgtgagcgcg ccggcctgga ggtccgtgac gtccaccctt 300

cgcaact 306

<210> 65

<211> 306

<212> DNA

<213> 麻风分支杆菌 (Mycobacterium leprae)

<400> 65

tgcgcacggt cggcgaattg atccagaacc agatccgggt cggatgtcg cggatggagc 60

gggtggtccg ggagcggatg accaccagg acgtcaggc gatcacgccg cagacgctga 120

tcaatatccg tccggtggtc gccgctatca aggaattctt cggcaccagc cagctgtcgc 180

agttcatgga tcagaacaac cctctgtcgg gcctgaccca caagcgccg ctgtcggcgc 240

tgggccccgg tggttgtcg cgtgagcgtg ccgggctaga ggtccgtgac gtgcaccctt 300

cgcaact 306

<210> 66

<211> 306

<212> DNA

<213> 玛尔摩分支杆菌 (Mycobacterium malmoeense)

<400> 66

tgcgcacggt cggggagctg atccagaacc agatccgct cggcatgtcg cggatggagc 60

gcgtcgtccg ggagcggatg accaccagg acgtcaggc gatcacgccg cagacgctga 120

tcaacatccg gccggtggc gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg ggctgaccca caagcgccgg ctgtcggcgc	240
tgggcccggg tggctgtcg cgtgagcgtg ccggcttga ggtccgtgac gtgcacccgt	300
cgcaact	306

<210> 67
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 海洋分支杆菌 (Mycobacterium marinum)

<400> 67	
tgcgcacggt gggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc	60
gggtggtccg ggagcggatg accacccagg acgtcgaggc gatcacgccg cagacgctga	120
tcaacatccg tccggtcgtt gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctctccg gtctcaccca caagcgccgc ctctcggcgc	240
tgggcccggg cggctgtcc cgtgagcgcg ccggcttga agttcgtgac gtgcacccgt	300
cgcaact	306

<210> 68
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 鸟分支杆菌副结核亚种(Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis)

<400> 68	
tgcgcaccgt cggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc cggatggagc	60
gcgtcgtccg cgagcggatg accacccagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg tcccgtcgtg gcggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagttgtccc 180

agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg ggctcaccca caagcgccgc ctgtcggcgc 240

tgggcccggg tggctgttcc cgggagcgtg ccgggctgga ggtccgcgac gtgcacccgt 300

cccact 306

<210> 69

<211> 306

<212> DNA

<213> 瘰癧分枝杆菌 (Mycobacterium scrofulaceum)

<400> 69

tgcgacccgt cggtagagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcg cgtatggagc 60

gtgtcgtgcg tgagcgcatg accaccagg acgtcgaggc gatcaccccg cagaccctga 120

tcaacatccg ccccgtcgtg gcggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc 180

agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgc 240

tgggccccgg cggctgttcc cgtgagcgcg ccggccttga ggtccgcgac gtgcactcca 300

gccact 306

<210> 70

<211> 306

<212> DNA

<213> 下出氏分支杆菌 (Mycobacterium shimoidei)

<400> 70

tgcgacgggt gggtagagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc 60

gggtgggtccg ggagcggatg accaccagg acgtcgaggc gatcacgccg cagacgtga 120

tcaacatccg tccggtcgtt gccgcgatca aggagttctt cggaaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtccg gtctcaccca caagcgccgc ctctcggcgc	240
tggggccggg cggctgttcc cgtgagcgtg ccgggctgga agttcgtgac gtgcacccgt	300
cgcaact	306

<210> 71
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 猿猴分支杆菌 (Mycobacterium simiae)

<400> 71	
tgcgaccgt gggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcc cgcatggagc	60
gcgtcgtcgc tgagcggatg accaccagg acgtcaggc gatcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg tcccgctgtg gccgcgatca aggagttctt cggtagcagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgcttccg gtctgaccca caagcgtgc ctgtcggcgc	240
tgggccccgg cggctgttcc cgtgagcgtg ccggccttga ggtccgcgac gtgcacgcc	300
gccact	306

<210> 72
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 斯氏分支杆菌 (Mycobacterium szulgai)

<400> 72	
tgcgaccgt gggcgagttg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc cggatggagc	60
gcgtcgtcgc cgagcggatg accaccagg acgtcaggc gatcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg gcccgctgct gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctctccg gtctgaccca caagcggcgt ctgtccgctc	240
tggggccggg cggctctgtcc cgtgagcggg ccgggctgga ggtccgtgac gtgcacccgt	300
cgcaact	306

<210> 73
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 溃疡分支杆菌 (Mycobacterium ulcerans)

<400> 73	
tgcgcacggg gggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcg cggatggagc	60
gggtggtccg ggagcggatg accacccagg atgtcgaggc gatcacgccg cagacgtga	120
tcaacatccg tccggtcgtt gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctctccg gtctgaccca caagcggcgt ctgtccgctc	240
tggggccggg cggctctgtcc cgtgagcggg ccgggctgga agttcgtgac gtgcacccgt	300
cgcaact	306

<210> 74
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 蟾分支杆菌 (Mycobacterium xenopi)

<400> 74	
tgcgcacggg cggcgagctg atccaaaacc agatccgggt cggcatgtcg aggatggagc	60
gggtggtccg cgagcggatg accactcagg acgtcgaggc gatcaccccg cagaccttga	120

tcaacatccg ccccggtggtg gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga tcagaacaac ccgctgtcgg ggctcaccca caagcggcgg ctctcggcgc	240
tgggtccggg cgggtgtcgc cgcgagcggg ccgggctgga ggtccgtgac gtgcactcga	300
gccact	306

<210> 75

<211> 306

<212> DNA

<213> 土地分支杆菌 (Mycobacterium terrae)

<400> 75

tgcgcacggt ggggtgagctg atccagaacc agatccgggt cgggtgtcc cggatggagc	60
gtgtggtccg cgagcggatg accaccagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg cccggtggtc gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgccgg ctgtcggcgc	240
tgggcccggg tgggtgtcc cgtgagcgtg ccgggcttga ggtccgtgac gtgcaccgt	300
cccact	306

<210> 76

<211> 306

<212> DNA

<213> 次要分支杆菌 (Mycobacterium triviale)

<400> 76

tgcgcaccgt cggggagttg atccagaacc agatccgggt cgggctgtcc cggatggagc	60
gggtggtgcg cgagcggatg accaccagg atgtcgaggc gatcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg cccggtggtc gccgcgatca aggagtctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtccg ggctgacca caagcgccgg ctgtcggcgc	240
tggggcccgg cgggctctcc cgggagcggg ccgggctgga ggtccgcgac gtgcacccca	300
gccact	306
<210> 77	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 不产色分支杆菌 (Mycobacterium nonchromogenicum)	
<400> 77	
tgcgcaccgt gggtagctg atccagaacc agatccgggt cgggctgtcc cggatggagc	60
gcgtggtcg cgagcggatg accaccagg acgtcgaggc catcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg cccggtggtc gccgcatca aggaattctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcag gtctgacca caagcggcgt ctgtcggcgc	240
tgggccccgg tggctgtcg cgtgagcgcg ccggcctgga agttcgtgac gtgcaccgt	300
cccact	306
<210> 78	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 脓肿分支杆菌 (Mycobacterium abscessus)	
<400> 78	
tgcgtaccgt cggcgagctg attcagaacc agatccgggt cggcctgtcc cgtatggagc	60
gcgtcgtcgc tgagcgcgtg accacgcagg acgtcgaggc gatcaccccg cagaccctga	120

tcaacatccg tcccgctgtg gcggcgatca aggagttctt cggaaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gcctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgc	240
tgggccccgg tggctgacc cgtgaccgcg ccggcctcga ggtccgcgac gtgcaccct	300
cgcaact	306

<210> 79
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 金色分支杆菌 (Mycobacterium aurum)

<400> 79	
tgcgaccgt gggcgagtg atccagaacc agatccgggt cggcatgtcc cggatggagc	60
gcgtctcgcg cgagcggatg accactcagg acgtcgaggc gatcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg gccggtcgtt gccgcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctctcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgcttccg gtctgaccca caagcgccgc ctgtcggcgc	240
tgggccccgg cggctctgcc cgtgagcgtg ccggcctgga agtgcgtgac gtgcaccct	300
cgcaact	306

<210> 80
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 龟分支杆菌 (Mycobacterium chelonae)

<400> 80	
tgctaccgt cggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcg cgtatggagc	60
gcgtctgcg tgagcgcagt accactcagg acgtcgaggc gatcaccgcc cagaccctga	120

tcaacatccg tcccgtcgtg gcggcgatca aggagttctt cggaaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctttcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggctc	240
tgggccccgg tggctgacc cgtgaccgcg ctggccttga ggtccgcgac gtgcaccct	300
cgcaact	306

<210> 81

<211> 306

<212> DNA

<213> 千田分支杆菌 (Mycobacterium chitae)

<400> 81

tgcgcaccgt gggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcc cgcattggagc	60
---	----

gcgtcgtcgc cgagcggatg accaccagg acgtcaggc catcacgccg cagaccctga	120
---	-----

tcaacatccg tcccgtcgtg gcggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
---	-----

agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg ggctgaccca caagcgtcgt ctctcggcgc	240
---	-----

tgggccccgg cggctgtcc cgtgagcgcg ccggtctga ggttcgtgac gtgcaccct	300
--	-----

cgcaact	306
---------	-----

<210> 82

<211> 306

<212> DNA

<213> 诡诈分支杆菌 (Mycobacterium fallax)

<400> 82

tgcgcaccgt gggcagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcc cggatggagc	60
--	----

gcgtcgtcgc cgagcggatg accaccagg acgtcaggc gatcaccgcc cagaccctga	120
---	-----

tcaacatccg tcccggtgtg gcggcgatca aggagttctt cgggaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gcctgaccca caagcgccgg ctgtccgcgc	240
ttggccccgg cggctgttcc cgtgagcgcg ccggcctgga ggtccgcgac gtgcacgcca	300
gccact	306

<210> 83
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 微黄分支杆菌 (Mycobacterium flavescens)

<400> 83	
tgcgcaccgt cggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcg cggatggagc	60
gcgtcgtccg tgagcggatg accaccagg acgtcgaggc gatcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg tcccgctgtg gcggcgatca aggagttctt cggtagctcg cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgccgc ctgtcggcgc	240
ttggccccgg tggctgttcc cgtgagcgcg ccggcctcga agtccgtgac gtgcaccgct	300
cgcact	306

<210> 84
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> 偶发分支杆菌菌株ATCC6841(Mycobacterium fortuitum strain ATCC6841)

<400> 84	
tgcgcaccgt gggcgagctg atccagaacc agatccgct cggcctgtcc cgcattggagc	60
gcgtcgtcgc tgagcgcatt accaccagg acgtcgaggc gatcaccccg cagaccctga	120

tcaacatccg tcccgctgtg gcggcgatca aggagttctt cggaacgtcg cagctgtcgc	180
agttcatgga tcagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgc	240
tgggccccgg cggctgttcc cgtgagcgcg ccggccttga ggtccgcgac gtccactcgt	300
cgcaact	306

<210> 85

<211> 306

<212> DNA

<213> 偶发分支杆菌菌株ATCC49403(*Mycobacterium fortuitum* strain ATCC49403)

<400> 85

tgcgaccgt gggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcc cgcattggagc	60
---	----

gcgtcgtcgc tgagcgcatg accaccagg acgtcaggc gatcaccccg cagaccctga	120
---	-----

tcaacatccg tcccgctgtg gcggcgatca aggagttctt cggaacgtcg cagctgtcgc	180
---	-----

agttcatgga tcagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgc	240
---	-----

tgggccccgg cggctgttcc cgtgagcgcg ccggccttga ggtccgcgac gtccactcgt	300
---	-----

cgcaact	306
---------	-----

<210> 86

<211> 306

<212> DNA

<213> 新金色分支杆菌 (*Mycobacterium neoaurum*)

<400> 86

tgcgaccgt gggcgagctg atccagaatc agatccgggt cggcctgtcg cgcattggagc	60
---	----

gggtcgtcgc cgagcgcatg accaccagg acgtcaggc gatcaccccg cagaccctga	120
---	-----

tcaacatccg tcccgtcgtg gcggcgatca aggagttctt cgggaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgc	240
tgggccccgg tggctgttcc cgtgagcgtg ccggacttga ggtccgcgac gtgcactcca	300
gccact	306
<210> 87	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 外来分支杆菌 (Mycobacterium peregrinum)	
<400> 87	
tgcgaccgt cggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcg cgtatggagc	60
gtgtcgtgcg tgagcgcgtg accaccagg acgtcgaggc gatcaccccg cagaccctga	120
tcaacatccg ccccgctcgtg gcggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctgtcggcgc	240
tgggccccgg cggctgttcc cgtgagcgtg ccggccttga ggtccgcgac gtgcactcca	300
gccact	306
<210> 88	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 草分支杆菌 (Mycobacterium phlei)	
<400> 88	
tgcgaccgt cggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcg cgtatggagc	60
gcgtcgtgcg cgagcgcgtg accaccagg acgtcgaggc gatcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg tccgctcgtg gcggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgccgc ctgtcggcgc	240
tgggccccgg cggtctgtcc cgtgagcgcg ccggcctcga ggtccgcgac gtgcaccaca	300
gccact	306
<210> 89	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 塞内加尔分支杆菌 (Mycobacterium senegalense)	
<400> 89	
tgcgaccgt gggtagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcc cgcattggagc	60
gcgtcgtcgc tgagcggatg accaccagg acgtcaggc gatcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg tccgctcgtg gcggcgatca aggagttctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgcttcgg gtctgaccca caagcgtcgc ctgtcggcgc	240
tgggccccgg cggtctgtcc cgtgagcgtg ccggcctga ggtccgcgac gtgcacgcca	300
gccact	306
<210> 90	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 耻垢分枝杆菌 (Mycobacterium smegmatis)	
<400> 90	
tgcgaccgt cggtgagctg atccagaacc agatccggt gggcctgtcc cgcattggagc	60
gtgtcgtcgc tgagcgcgtg accaccagg acgtcaggc gatcacgccg cagaccctga	120

tcaacatccg tcccgtcgtg gcggcgatca aggagtctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgt ctttcggcgc	240
tgggccccgg cggctctgcc cgtgagcgcg ctggcctcga ggtccgcgac gtgcacccca	300
gccact	306
<210> 91	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 耐高温分支杆菌 (Mycobacterium thermoresistibile)	
<400> 91	
tgcgacccgt cggcgagctg atccagaacc agatccgggt cggcctgtcc cgcattggagc	60
gcgtcgtgcg cgagcggatg accaccagg acgtcgaggc gatcacgccg cagaccctga	120
tcaacatccg ccccgctcgtg gcggcgatca aggagtctt cggcaccagc cagctgagcc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgccgg ctgtcggcgc	240
tgggccccgg cggctctgagc cgggagcgcg ccggcctcga ggtccgcgac gtccaccgt	300
cgcact	306
<210> 92	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> 牦牛分支杆菌 (Mycobacterium vaccae)	
<400> 92	
tgcgacccgt cggtagctg atccagaacc agatccggt cggcctctcg cgtatggagc	60
gtgtcgtccg cgagcggatg accaccagg acgtcgaggc gatcactccg cagaccctga	120

tcaacatccg tcccgtcgtg gcggcgatca aggaattctt cggcaccagc cagctgtcgc	180
agttcatgga ccagaacaac ccgctgtcgg gtctgaccca caagcgtcgc ctgtcggcgc	240
tgggccccgg cggctgtgcc cgtgagcgcg ccggcctcga ggtccgcgac gtgcactcca	300
gccact	306

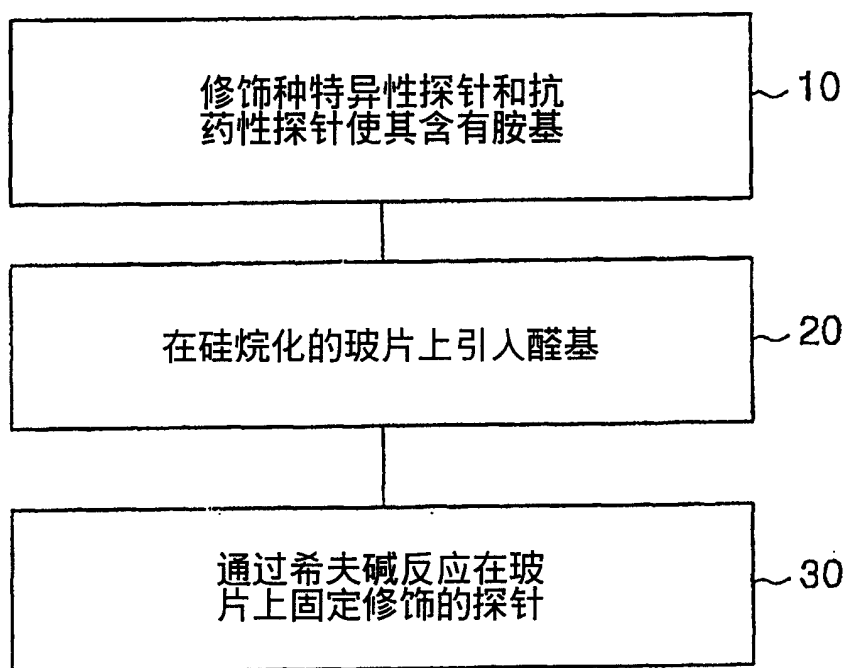
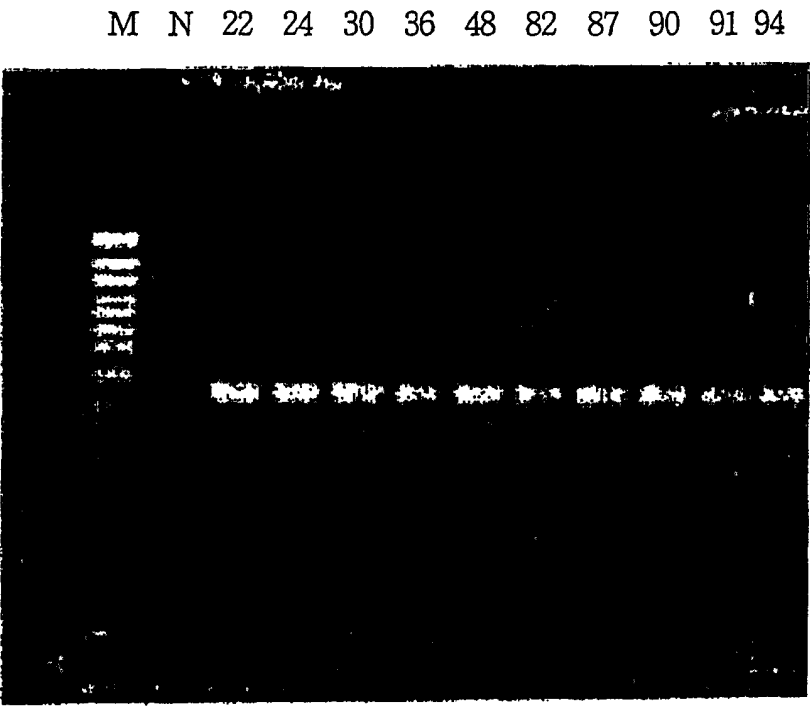
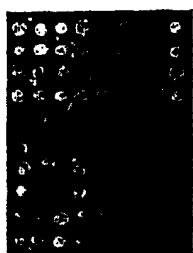


图 1



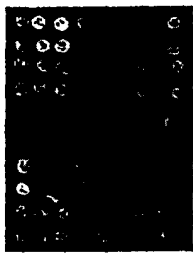
M: 标记, N: 阴性对照
编号: 临床样品编号

图 2



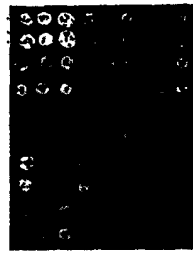
#22(mt516c)

图 3a



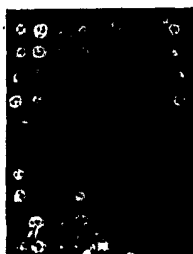
#24(mt526b/mt526e)

图 3b



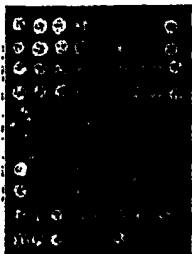
#30(mt531)

图 3c



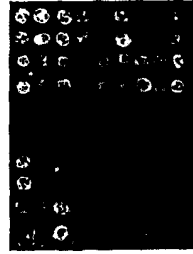
#36(mt516b)

图 3d



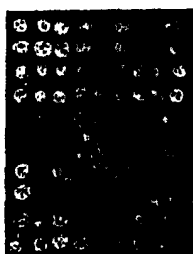
#48(mt526f)

图 3e



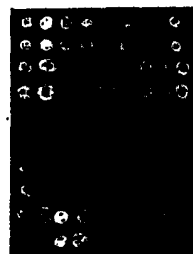
#82(mt531/mt516c)

图 3f



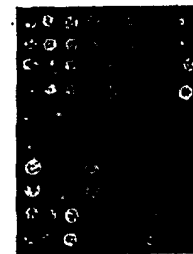
#87(mt531/mt516c)

图 3g



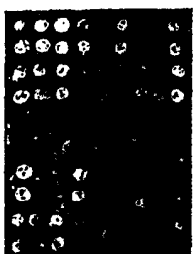
#90(mt516c/mt526d)

图 3h



#91(mt531)

图 3i



#94(mt511/mt531)

图 3j

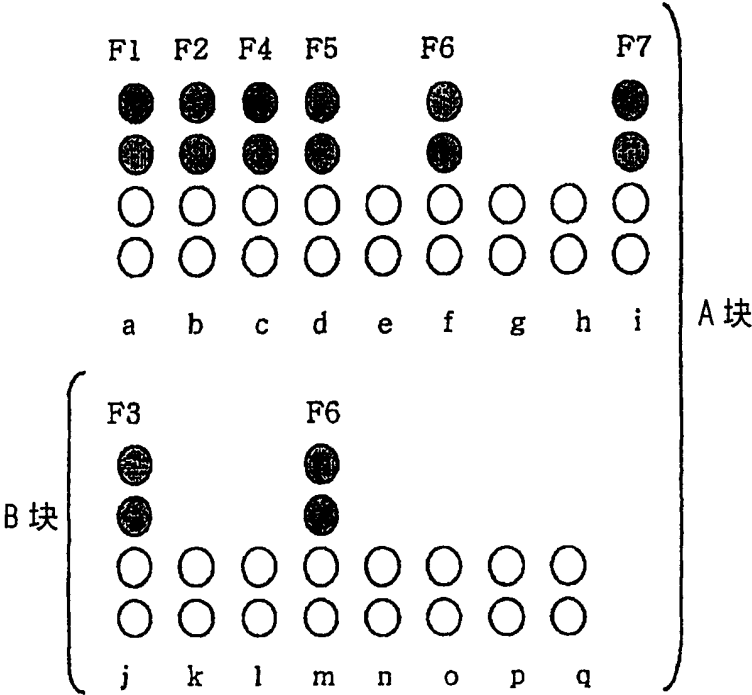
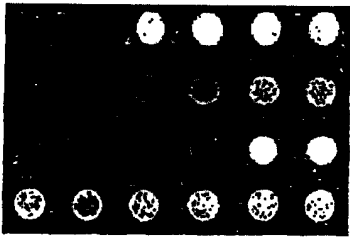


图 4

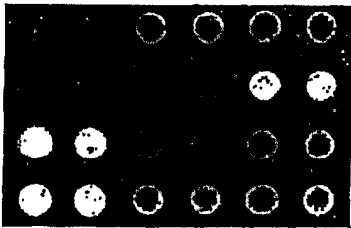
		PROBE 5	PROBE 5	PROBE 1	PROBE 1
		PROBE 6	PROBE 6	PROBE 2	PROBE 2
MEX	MEX	PROBE 7	PROBE 7	PROBE 3	PROBE 3
MC MIX	MC MIX	PROBE 8	PROBE 8	PROBE 4	PROBE 4

图 5



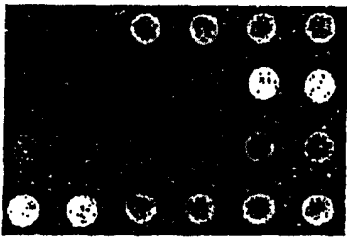
堪萨斯分析杆菌

图 6a



偶发分支杆菌

图 6b

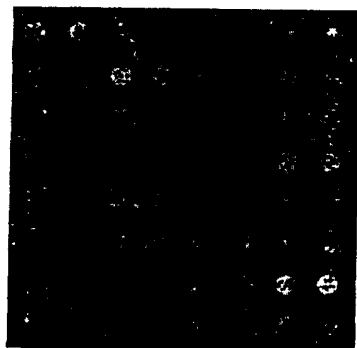


瘰癧分支杆菌

图 6c

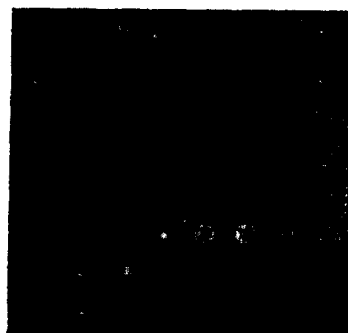
MCmix	MCmix	Mt516b	Mt516b	Mt524	Mt524	Wt533	Wt533
Mex	Mex	Mt516a	Mt516a	Mt522	Mt522	Wt531	Wt531
Mt526h	Mt526h	Mt509	Mt509	Mt521	Mt521	Wt526	Wt526
Mt526g	Mt526g	Mt533	Mt533	Mt518	Mt518	Wt524	Wt524
Mt526f	Mt526f	Mt531	Mt531	Mt513	Mt513	Wt521	Wt521
Mt526e	Mt526e	Mt526c	Mt526c	Mt511	Mt511	Wt518	Wt518
Mt526d	Mt526d	Mt526b	Mt526b	Wt516	Wt516	Wt513	Wt513
Mt516c	Mt516c	Mt526a	Mt526a	Wt509	Wt509	Wt511	Wt511

图 7



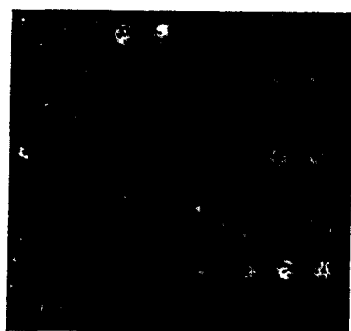
mt516a

图 8a



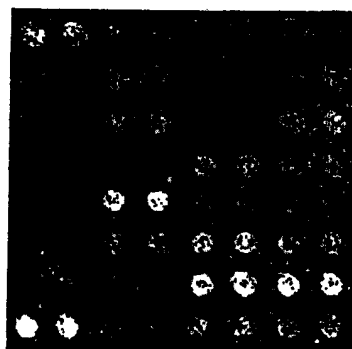
mt511

图 8b



mt516b

图 8c



mt531

图 8d

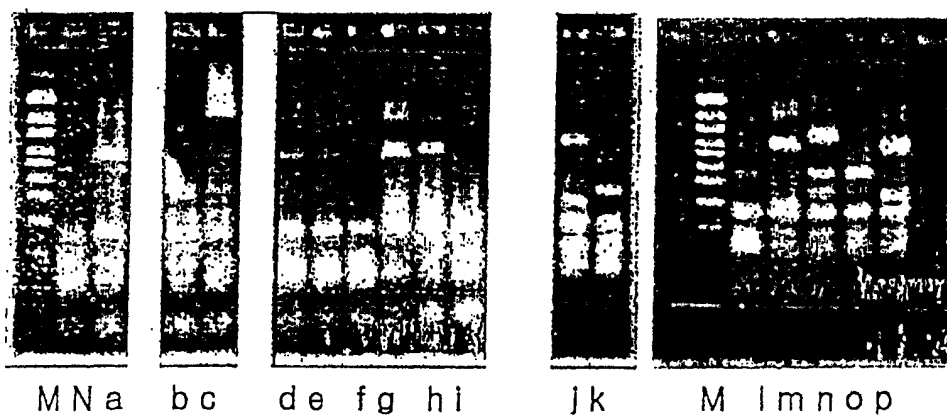


图 9a

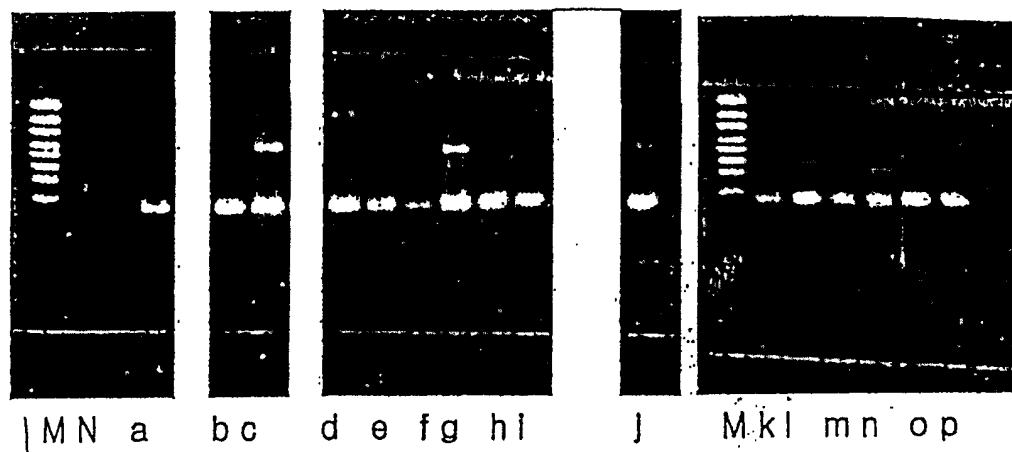
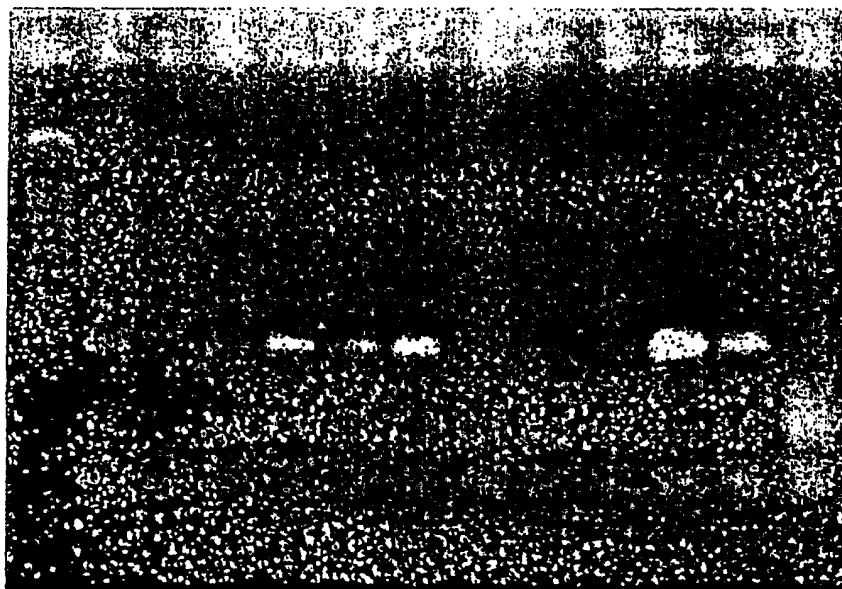


图 9b

M 6 16 20 26 27 29 36 38 41 49 57 N



M: 标记, N: 阴性对照
编号: 临床样品编号

图 10

#27(wt)

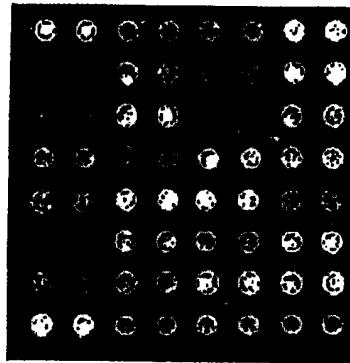


图 11a

#57(mt509,513)

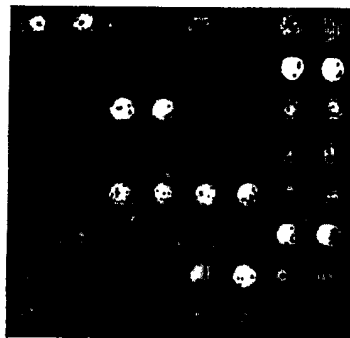


图 11b