(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106929573 B
(45)授权公告日 2020.06.09

(21)申请号 201710091774.3

(22)申请日 2017.02.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106929573 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(73)专利权人 南开大学
地址 300457 天津市塘沽区经济技术开发区宏达街23号南开大学泰达生物技术研究院

(72)发明人 王磊 任薇 杨双 席道义 曹博阳 冯露

(74)专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司 12207
代理人 朱红星

(51)Int.Cl.
C12Q 1/689(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件
WO 2011020926 A1,2011.02.24,
US 2013331285 A1,2013.12.12,
WO 2005049642 A3,2005.06.02,
CN 102424862 A,2012.04.25,
CN 102628042 A,2012.08.08,
CN 105008539 A,2015.10.28,
Boyang Cao et al..“Development of a DNA Microarray Method for Detection and Identification of All 15 Distinct O-Antigen Forms of Legionella pneumophila”.《Applied and Environmental Microbiology》.2013,第79卷(第21期),
姚芳芳.“嗜肺军团菌O血清型分子分型检测基因芯片的建立”.《中国硕士论文全文数据库》.2013,
吴冬雪等.“嗜肺军团菌15种血清型基因芯片检测方法的建立”.《食品研究与开发》.2014,第35卷(第14期),

审查员 卢文倩

权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

对嗜肺军团菌O12型的*wzm*和*wecA*基因特异的核苷酸序列及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种对嗜肺军团菌血清型O12型的*wzm*与*wecA*基因特异的核苷酸及其应用,所述核苷酸为:SEQ ID NO:1所示的核苷酸和/或SEQ ID NO:2所示的核苷酸;SEQ ID NO:3所示的核苷酸和/或SEQ ID NO:4所示的核苷酸;与上述的核苷酸互补的核苷酸。这些核苷酸可用于制备检测嗜肺军团菌血清型O12型的PCR试剂盒、基因芯片或微阵列。本发明对嗜肺军团菌血清型O12型的*wecA*与*wzm*基因特异的核苷酸及包含该核苷酸的PCR试剂盒、基因芯片或微阵列的实用性强,PCR试剂盒配制方法简便,检测周期短、速度快,可操作性强,易于商品化生产,而检测成本却相对较低;准确性高;灵敏度高。

CN 106929573 B

1.一种对嗜肺军团菌O12型的wzm与wecA基因特异的核苷酸序列,其特征在于所述的核苷酸序列为:

SEQ ID NO:1的核苷酸序列为嗜肺军团菌O12型的wzm的上游引物、SEQ ID NO: 2为嗜肺军团菌O12型的核苷酸序列下游引物;

SEQ ID NO:3的核苷酸序列为嗜肺军团菌O12型的wecA的上游引物、SEQ ID NO:4为嗜肺军团菌O12型的核苷酸序列下游引物。

2.一种PCR试剂盒,包括PCR引物、dNTP、缓冲液和DNA聚合酶,所述PCR引物包括上述的核苷酸序列;其中所述的PCR引物为如SEQ ID NO:1-2与SEQ ID NO:3-4所示的核苷酸序列;其中的SEQ ID NO:1 为特异扩增嗜肺军团菌血清型O12型的wzm基因上游引物;SEQ ID NO:2为特异扩增嗜肺军团菌血清型O12型的wzm基因下游引物;SEQ ID NO:3 为特异扩增嗜肺军团菌血清型O12型的wecA基因上游引物;SEQ IDNO:4 为特异扩增嗜肺军团菌血清型O12型的wecA基因下游引物。

3.权利要求2所述的试剂盒,其中还包括如下试剂: 10 mM dNTP 60μL;10×酶特异性反应缓冲液100μL;5 U/μL 耐热DNA聚合酶 10μL;SEQ ID NO:1与SEQ ID NO:2引物混合物,SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:4引物混合物各10μL;阳性对照品20μL,阴性对照品20μL;ddH_2O 5mL。

4.权利要求2所述PCR试剂盒在检测嗜肺军团菌血清型O12型方面的应用;所述的应用为非诊断治疗目的用途。

5.权利要求4所述的应用,其中用于检测嗜肺军团菌血清型O12型指的是准确灵敏的检测血清型并将其与O15血清型区分开。

对嗜肺军团菌012型的*wzm*和*wecA*基因特异的核苷酸序列及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种核苷酸序列及其应用，特别是一种对嗜肺军团菌血清型012型(Legionella pneumophila serogroup 12)的*wzm*基因(LPS O-抗原的ABC转运子，ABC transporter of LPS O-antigen，以下简称*wzm*基因)和*wecA*基因(UDP-GleNAe:Und-PGleNAe-l- P转移酶，参与O抗原的生物合成)特异的核苷酸序列及其应用，通过这些特异的核苷酸序列可以准确的将嗜肺军团菌012型与嗜肺军团菌的其他血清型相鉴别。

背景技术

[0002] 军团菌得名于1976七月爆发的“神秘疾病”，这场疾病感染了221人，造成34人死亡。第一次爆发被发现于参加了在费城举办的美国200周年庆祝活动的美国退伍军人协会会议的人群中。六个月后，病原体被确定为一个以前未知的细菌，随后因为这个明显的理由被命名为军团菌。军团菌是一种无芽胞革兰氏阴性杆菌，对自然环境因素抵抗力较强，主要是引起呼吸道传染疾病，可通过气溶胶的方式在空气中散布，人类会因为吸入含菌的气溶胶而感染，引起军团病(Legionnaires disease，LD)在嗜肺军团菌被鉴定后的不长的一段时间中，超过50种军团菌已被隔离出，其中至少有24种是与人类疾病相关的。常见的有嗜肺军团菌(Legionella pneumophila，LP)、米氏军团菌(Legionella micdadei)、博氏军团菌(Legionella bozemanii)、菲氏军团菌(Legionella feeleii)、杜莫夫军团菌(Legionella dumoffii)和 长滩军团菌(Legionella longbeachae)等。免疫功能低下的人可能通过任何种类的军团菌被感染。

[0003] 在这些被发现的军团菌中，嗜肺军团菌与人类疾病关系最为密切。根据O抗原的不同，嗜肺军团菌可分为15个血清型。大多数(约90%)的军团病病例，是由嗜肺军团菌引起的。嗜肺军团菌的01血清型是引起世界范围内超过84%的军团病病例的元凶。

[0004] 嗜肺军团菌为需氧革兰阴性杆菌，兼性胞内寄生菌，无荚膜 ，不产酸，不产气， 有一根至数根侧鞭毛或端鞭毛，可运动，菌体长 2-50μm，宽0.5-1μm。该菌生长营养要求较高，生长时需要半胱氨酸，甲硫氨酸和铁离子等，在活性炭 - 酵母浸出液琼脂(BCYE) 培养基上可生长，在GVPC 平板上呈灰白色，边缘有紫蓝色光泽，挑起有拉丝；在含 2.5 % - 5.0 % 的 CO_2环境中生长很好， 厌氧条件下不生长。最适温度为 35 ℃ - 36℃， 具有一定的耐酸性和耐热性菌落颜色一般呈灰白色、紫色、蓝色或绿色， 但在普通血平板、普通琼脂或巧克力琼脂上不生长。嗜肺军团菌在普通自来水中可存活400天以上，在60℃ 左右甚至在火山口附近的水塘里都能发现军团菌的踪迹。我国报告的病例多是嗜肺军团菌血清 01 型、05型、06型。在欧美各国嗜肺军团菌肺炎占肺炎病例中的2.4 %-8.4 %。

[0005] 随着分子技术特别是PCR技术的发展，许多分子生物学方法被用于军团菌分子分型和流行病学研究。目前已用于军团菌分型的4种常用分子分型技术为：随机扩增多态性DNA (Random Amplified Polymorphic DNA，RAPD)、脉冲场凝胶电泳(Pulsed-Field Gel Electrophoresis，PFGE)、扩增片段长度多态性(Amplified fragment length

polymorphism,AFLP)、核酸测序分型(Sequence-based typing,SBT)。由于其一次即可分离出大量DNA片段,且具有操作简便,重复率好等优势,先后用于军团菌分子分型和流行病学调查。

[0006] 聚合酶链式反应技术(Polymerase chain reaction,简称PCR技术)作为微生物检测的技术目前正在得到认同和推广,该技术相对于传统的方法有高通量、检测速度快、特异性强、灵敏度高等优点,只需对样品进行简单的预增菌或增菌过程,再通过离心及裂解制备细菌DNA模板,就可以在高特异性引物介导下的PCR过程中扩增目标序列,达到检测样品中是否含有待测的致病性微生物的目的。每一步的PCR扩增过程仅需2个小时。这对检验检疫部门和临床检验无疑极大提高了工作速度和降低了工作成本。

[0007] 系统的分析显示出*wzm*基因是O抗原基因所独有的特征基因,可以被用来作为分子分型的目标基因。*wecA*基因参与脂多糖的O-抗原的合成,也可以作为目标基因鉴别不同的血清型。

[0008] 本申请人南开大学2012年申请的嗜肺军团菌的基因分型及检测用试剂盒这一项专利中,提供了几种可用于嗜肺军团菌的11个血清型进行分型的寡核苷酸探针序列。但是应用此项专利提供的探针和方法不能区分鉴别出亲缘性较近的嗜肺军团菌O12与O15血清型。本发明针对O12型的*wecA*与*wzm*基因为靶基因,设计了两对特异的核苷酸序列引物,可以准确、灵敏的检测出嗜肺军团菌的O12血清型,并将其与O15血清型很好的区分开。在嗜肺军团菌的15个已知的血清型的基因分型中O12血清型与O15血清型较之其他血清型相比较难鉴别,目前,还没有能够快速区分出O12与O15血清型鉴别方法的报道。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种对嗜肺军团菌血清型O12型的*wzm*基因和*wecA*基因特异的核苷酸序列,可以通过技术手段借此区分出O12型与嗜肺军团菌其他血清型。所述核苷酸序列为:

[0010] 1)SEQ ID NO:1所示的核苷酸和/或SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;SEQ ID NO:3所示的核苷酸和/或SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列

[0011] 2)与1)所示的核苷酸互补的核苷酸序列。

[0012] 上述核苷酸序列可以用于制备检测嗜肺军团菌血清型O12型的*wzm*基因和*wecA*基因的PCR试剂盒;所述嗜肺军团菌血清型O12型可以取样于自来水、矿泉水、空调冷却水的培养物的粗提液,或是嗜肺军团菌血清型O12型的纯培养物的粗提液等,均采用常规的酚氯仿法制备。

[0013] 本发明还提供一种两步法PCR试剂盒,包括PCR引物、dNTP、缓冲液和DNA聚合酶,所述PCR引物包括上述的核苷酸序列;其中所述的PCR引物优选为如SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列与SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列。

[0014] SEQ NO:1 GGGGATATTCAACCGTTA 特异扩增嗜肺军团菌血清型O12型的*wzm*基因上游引物

[0015] SEQ NO:2 TAAATCCTATTACAAATATAGC 特异扩增嗜肺军团菌血清型O12型的*wzm*基因下游引物

[0016] SEQ NO:3 ATTATATCATCATCCCTTTT 特异扩增嗜肺军团菌血清型O12型的*wecA*基因

上游引物

[0017] SEQ NO:4 CTGTGTCCAACTCAATAAT 特异扩增嗜肺军团菌血清型O12型的*wecA*基因下游引物

[0018] 上述两步PCR检测试剂盒可以包括如下试剂：10 mM dNTP 60μL;10×酶特异性反应缓冲液100μL;5 U/μL 耐热DNA聚合酶 10μL;两步PCR中引物混合物各10μL;阳性对照品20μL,阴性对照品20μL;ddH_2O 5mL。

[0019] 上述针对嗜肺军团菌血清型O12型的PCR试剂盒,整个检测需要进行两步PCR扩增。步骤包括样品预处理—扩增—电泳检测结果。两步PCR所需要的引物和PCR反应体系中的试剂已预先加入扩增管中,使用者只需分别将将预处理后的样本加入到两个扩增管启动扩增反应,简单快速的完成检测工作。

[0020] 由上述的技术方案可见,本发明建立的一种PCR反应体系,可检测嗜肺军团菌血清型O12型,该试剂盒有如下优点：

[0021] (1)方法简便,周期短、可操作性强: 本发明所配制的PCR试剂盒配制方法简便,检测周期短,可操作性强,易于产业化生产,而检测成本却较低,市场应用前景广。本发明PCR试剂盒若用嗜肺军团菌的菌悬液进行PCR扩增,与经提取得到的DNA作为模板扩增所得结果一致,且敏感度和特异性无差别,可省去模板DNA的提取步骤,简化操作过程。同时,相比常规生化检测方法而言,本方法所采用的待测样品可以直接是临床样品培养液,或者对检测样品进行简单分离培养就可进行检测,节省了物力人力。

[0022] (2)检测灵敏度高:本发明提供的PCR检测试剂盒及其检测方法敏感性高,检测精度高,可以检测到1ng/μL的DNA模板。对常见致病菌可以进行全面、系统、准确的检测与鉴定。

[0023] (3)检测成本相对较低:可以推广应用于食品卫生监督、环境监测、商品检验检疫等领域,并为其他不同致病菌检测组合提供技术模式。

[0024] (4)准确性高:本发明根据嗜肺军团菌O12型的*wzm*基因和*wecA*基因的特异核苷酸序列,设计出引物。从而利用引物组成复合PCR检测体系,能够快速准确的将嗜肺军团菌O12血清型和其他嗜肺军团菌血清型分开。

附图说明

[0025] 图1 为本发明试剂盒检测嗜肺军团菌15个血清型标准菌株的第一步PCR产物(以SEQ NO:1和/或SEQ NO:2为引物进行扩增)电泳结果图,其中:1,嗜肺军团菌O1型G2756;2,嗜肺军团菌O2型 G2773;3,嗜肺军团菌O3型 G2772;4,嗜肺军团菌O4型G2781;5,嗜肺军团菌O5型 G3408;6,嗜肺军团菌O6型G2771;7,嗜肺军团菌O7 型G3410;,8,嗜肺军团菌O8型G2820;9,嗜肺军团菌O9型 G2774;10,嗜肺军团菌O10型 G2818;11,嗜肺军团菌O11型G2824;12,嗜肺军团菌O12型 G2822;13,嗜肺军团菌O13型 G2819;14,嗜肺军团菌O14型G2817;15,嗜肺军团菌O15型 G2829;M,DL2000 DNA marker;

[0026] 图2为本发明试剂盒检测嗜肺军团菌15个血清型标准菌株的第二步PCR产物(以SEQ NO:3和/或SEQ NO:4为引物进行扩征)电泳结果图其中：1,嗜肺军团菌O12型 G2822;2,嗜肺军团菌O15型 G2829;M,DL50 DNA marker。

具体实施方式

[0027] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。除非特别说明，本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外，实施方案应理解为说明性的，而非限制本发明的范围，本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言，在不背离本发明实质和范围的前提下，对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。本发明所用原料及试剂均有市售。为保证本发明的上述和其它目的特征和优点更明白易懂，下面特举较佳实施例，同时结合说明书附图及具体实例对本发明进一步详细描述；

[0028] 实施例1

[0029] 基因组的提取

[0030] (1)在超净工作台中，从标准菌株(见表2)的保藏管中吸取少量菌液，划线接种到军团菌BCYE(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)生长平板上，37°C，5.0% CO_2培养5-7天。

[0031] (2)向BCYE生长平板中加入2mL无菌水，用无菌圆头玻璃棒轻轻刮起菌苔，然后将菌悬液吸到1.5 mL离心管中，8000 rpm离心5分钟，弃上清，重复洗一次。

[0032] (3)加入250 μL 50 mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)重悬，12000 rpm离心5分钟，弃上清。

[0033] (4)加入250 μL 50 mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)重悬，再加10 μL 0.45M EDTA(pH 8.0)，充分悬浮，37℃温浴20分钟。

[0034] (5)加入10 μL 20 mg/mL溶菌酶，37℃温浴20分钟。

[0035] (6)加入1.5 μL 20 mg/mL蛋白酶K，轻柔混匀。

[0036] (7)加入15 μL 10%SDS，50℃水浴2小时至溶液澄清，期间轻轻颠倒混匀若干次。

[0037] (8)加2 μL 20 mg/mL RNAse，65℃水浴30分钟。

[0038] (9)用剪去尖头的枪头将上述溶液移到新的洁净离心管中。

[0039] (10)在通风橱中加入250 μL苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)，充分混匀，12000 rpm，4℃离心10分钟，上清液转移到新的离心管，重复一次。

[0040] (11)在通风橱中加入250 μL氯仿:异戊醇(24:1)，充分混匀，12000 rpm，4℃离心10分钟，上清液转移到新的离心管。

[0041] (12)加入2.5倍体积的提前预冷的无水乙醇，轻摇，于-80℃沉淀DNA。12000 rpm ，4℃离心15 min。

[0042] (13)用1 mL 70%冰乙醇洗涤DNA沉淀，然后在65℃，10 min烘干。

[0043] (14)用30 μL TE溶解，并于-20 °C冰箱备用。

[0044] 用1.0 %的琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取效果，同时用NanoDrop2000 OD仪测量DNA的纯度和浓度。

[0045] 实施例2

[0046] 引物的设计

[0047] 引物设计是本发明的关键。嗜肺军团菌血清型012型的O-抗原基因簇序列是本实验室自测的，通过比对分析，选取*wzm*和*wecA*基因作为该菌的特异靶基因，针对嗜肺军团菌012型的*wzm*和*wecA*基因的特异区设计引物；如表1所示：

[0048] *wzm*基因的上游引物是5'- GGGGATATTCAACCGTTA -3',见序列SEQ ID NO:1;下游引物是5'- TAAATCCTATTACAAATATAGC -3',见序列SEQ ID NO:2。

[0049] *wecA*基因的上游引物是5'-ATTATATCATCATCCCTTTT-3',见序列SEQID NO:3;下游引物是5'-CTGTGTCCAACTCAATAAT-3',见序列SEQID NO:4;

[0050] 表1 嗜肺军团菌血清型09型的特异引物序列

[0051]

菌株名称	引物编号	SEQ ID	引物序列 (5'—3')
嗜肺军团菌O12型	P-1	NO:1	GGGGATATTCAACCGTTA
	P-2	NO:2	TAAATCCTATTACAAATATAGC
	P-3	NO:3	ATTATATCATCATCCCTTTT
	P-4	NO:4	CTGTGTCCAACTCAATAAT

[0052] 实施例3

[0053] 特异引物的筛选

[0054] 收集了1株嗜肺军团菌O12型标准菌株,14株嗜肺军团菌其它血清型的标准菌株,菌株编号和来源见下表2。

[0055] 表2 供试的标准菌株

[0056]

细菌名称	菌株株数	菌株名称	原始编号	来源
L.pneumophila	15	G2756(O1)	7170	CCM（捷克微生物保藏所）
		G2771(O6)	NCTC 11406	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2772(O3)	NCTC 11232	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G3408(O5)	33216	CDC（中国疾病预防控制中心）
		G3410(O7)	33823	CDC（中国疾病预防控制中心）
		G2773(O2)	NCTC 11230	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2774(O9)	NCTC 11986	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2781(O4)	DSM7514	DSMZ（德国微生物菌种保藏中心）
		G2817(O14)	12174	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2818(O10)	12000	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2820(O8)	11985	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2824(O11)	12179	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2822(O12)	12180	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2819(O13)	12181	NCTC（英国全国菌种保藏中心）
		G2829(O15)	35251	ATCC（美国菌种保藏中心）

[0057] PCR体系分为两部分，每一部分的PCR体系为10 μM引物0.4μL、10×buffer 2.5 μL、10 mM dNTP 0.25 μL、5 U/μL Taq 聚合酶0.2 μL及3 μL的待测样品模板到0.2 mL的薄壁PCR管中，最后用ddH_2O补足至25 μL。

[0058] 所用引物SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2在嗜肺军团菌O12型和O15型的模板中得到阳性结果，在其它组中没有得到任何PCR产物带；SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4 在O15型中没有PCR产物带，而O12型中得到阳性结果。所以这些寡核苷酸片段是高度特异的。

[0059] 实施例4

[0060] PCR检测试剂盒

[0061] 一、检测实验所需材料及设备的准备

[0062] 1. 试剂盒组成：

[0063] dNTP(10mM) 60μl；

[0064] 10×Buffer(10×酶特异性反应缓冲液) 100μl；

[0065] Taq聚合酶(5U/μl耐热DNA聚合酶) 10μl；

[0066] PCR引物混合物(5μM) 20μl；

[0067] 阳性对照品(KP) 20μl；

[0068] 阴性对照品(KN) 20μl；

[0069] ddH_2O 5ml；

[0070] 每个试剂盒可用于检测10个样品。

[0071] 其中10×buffer 、dNTP、Taq 聚合酶由宝生物工程(大连)有限公司提供；引物混合物为自行设计的序列提供给上海英骏生物技术公司合成；阳性对照品(含有嗜肺军团菌O12型的样品)、阴性对照品(将模板换成ddH_2O)和ddH_2O由我们自行制备。

[0072] 使用上述PCR检测试剂盒进行嗜肺军团菌O12型检测的方法分为两部分的PCR反应包括以下步骤：

[0073] (2)第一步PCR：在PCR薄壁管中加入dNTP、10×酶特异性反应缓冲液、Taq聚合酶、P1-P2引物、待测样品模板和ddH_2O，混匀，将反应管放入PCR仪(Biometra)中，设定的循环参数如下：

94℃ 5分钟

94℃ 30秒

[0074] 57℃ 40秒

72℃ 50秒 回到第二步，共35个循环

72℃ 5分钟

[0075] (3)第二步PCR：在PCR薄壁管中加入dNTP、10×酶特异性反应缓冲液、Taq聚合酶、P3-P4引物、待测样品模板和ddH_2O，混匀，将反应管放入PCR仪(Biometra)中，设定的循环参数如下：

94℃ 5分钟

94℃ 30秒

[0076] 50℃ 40秒

72℃ 50秒 回到第二步，共35个循环

72℃ 5分钟

[0077] (4)分别将两次PCR的产物在电泳设备中进行电泳，记录结果

[0078] 1)取3μL扩增产物与10×溴酚蓝上样缓冲液以9:1的体积比混合；

[0079] 2)将混合液上样于2%的琼脂糖凝胶上；

[0080] 3)将琼脂糖凝胶电泳120V稳压电泳约15分钟，用DL2000 Marker和/或DL50marker进行对照；

[0081] 4)观察并记录结果。

[0082] (5)分析并进行结果判断。

[0083] 电泳结果显示，只有在两步PCR产物中皆有产物条带产生的待测样品被鉴定为嗜肺军团菌O12血清型，如没有产物条带或只有一步PCR有产物条带则判定待测样品的血清型不为O12型。

[0084] 本发明通过配制一种可检测嗜肺军团菌血清型O12型，可商品化生产的PCR试剂盒，将PCR检测方法需要使用的成分组合在一起，使用时，提取待测样品，进行两步PCR的操作程序就能进行灵敏、快速、简便的检测，检测试剂盒中各组分的用量和浓度均为试验所得，用该试剂盒检测嗜肺军团菌O12型所使用的试验设备简单，检测成本低。

[0085] 使用阳性和阴性对照品的目的是用于质控整个操作过程，以便得出准确的判断。

[0086] 本发明一次检测试验所使用的试剂盒中的试剂量见下表4所示，DNA模板量为0.5μL。

[0087] 表3 一次检测试验第一步PCR所使用的试剂盒中的试剂量

[0088]

成分	浓度	加样量（μl）
ddH_2O		18.65
10×PCR缓冲液	10×	2.5
10mM dNTP	10mM	0.25
引物混合物	5mM	0.4
Taq酶	5U/μl	0.2
总体积		25

[0089] 表4一次检测试验第二步PCR所使用的试剂盒中的试剂量

[0090]

成分	浓度	加样量（μl）
ddH_2O		18.65
10×PCR 缓冲液	10×	2.5
10mM dNTP	10mM	0.25
引物混合物	5mM	0.4
Taq 酶	5U/μl	0.2
总体积		25

[0091] 本发明中的耐热DNA聚合酶为Taq聚合酶。

[0092] 上述的阳性对照品为已确定是含有嗜肺军团菌O12型的样品，阴性对照品则为ddH_2O。

[0093] 2.仪器设备

[0094] SANYO高压灭菌锅(SANYO公司)；T Gradient PCR仪(Biometra公司)；

[0095] 各种型号移液器(Eppendorf公司)；Sigma1-13K离心机(Sigma公司)；5804R高速冷冻离心机(Eppendorf公司)；ND-2000 NanoDrop OD仪器(NanoDrop公司)；SIM-F124制冰机(日本SANYO)；超纯水净化系统(Milli-Q)；凝胶成像仪(UVP公司)和0.2mL PCR薄壁管。

[0096] 3.待测样品的提供：本发明所用实验菌株如表2所示。

[0097] 二、检测实施的具体操作：将上述标准菌株在同样条件下采用本发明所提供的PCR检测试剂盒进行PCR方法的检测。

[0098] 1. 待测样品模板的提取

[0099] A.针对标准菌株

[0100] 1)20μL接菌量，无菌操作，划线接种于BCYE培养基中， 37℃、5%CO_2培养2-3天；

[0101] 2)用50mM Tris-HCl(pH8.0)刮取菌落，12000rpm离心5分钟，去上清。

[0102] 3)用500μL ddH_2O重悬沉淀，12000rpm离心5分钟，去上清，尽量空干。

[0103] 4)用100μL ddH_2O重悬沉淀，混匀，100℃沸水浴10分钟，

[0104] 5)置冰上10分钟后，12000rpm离心2分钟。

[0105] 6)取5μL中层上清做为PCR反应的模板。

[0106] 2. 依据如下条件进行结果判断，嗜肺军团菌的15个血清型中只有O12型与O15型在第一步PCR，P1-P2引物对条件下应在750bp处有一条带；在第二步PCR中O12与O15血清型为待测样品，P3-P4引物对条件下应只有O12型在526bp处有一条带。

[0107] 标准菌株电泳结果记录见图1，图2所示：所有标准菌株除嗜肺军团菌O12型与O15型有750bp片段外，其他菌株均无扩增产物，取O12型与O15型基因组做模板进行第二步PCR，只有O12型在526bp处有条带，O15型无扩增产物。这说明采用PCR检测方法可排除假阳性反应，根据有无以上片段进行的嗜肺军团菌O12型的检测鉴定，检测准确度提高了，避免了因检测失误而导致的损失。

[0108] 利用上述实验步骤得到的PCR试剂盒，可用于检测嗜肺军团菌的血清型O12型。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 南开大学

[0003] <120> 对嗜肺军团菌O12型的wzm和wecA基因特异的核苷酸及其应用

[0004] <160> 4

[0005] <170> PatentIn version 3.5

[0006] <210> 1

[0007] <211> 18

[0008] <212> DNA

[0009] <213> 人工序列

[0010] <400> 1

[0011] ggggatattc aaccgtta 18

[0012] <210> 2

[0013] <211> 22

[0014] <212> DNA

[0015] <213> 人工序列

[0016] <400> 2

[0017] taaatcctat tacaaatata gc 22

[0018] <210> 3

[0019] <211> 20

[0020] <212> DNA

[0021] <213> 人工序列

[0022] <400> 3

[0023] attatatcat catccctttt 20

[0024] <210> 4

[0025] <211> 19

[0026] <212> DNA

[0027] <213> 人工序列

[0028] <400> 4

[0029] ctgtgtccaa ctcaataat 19

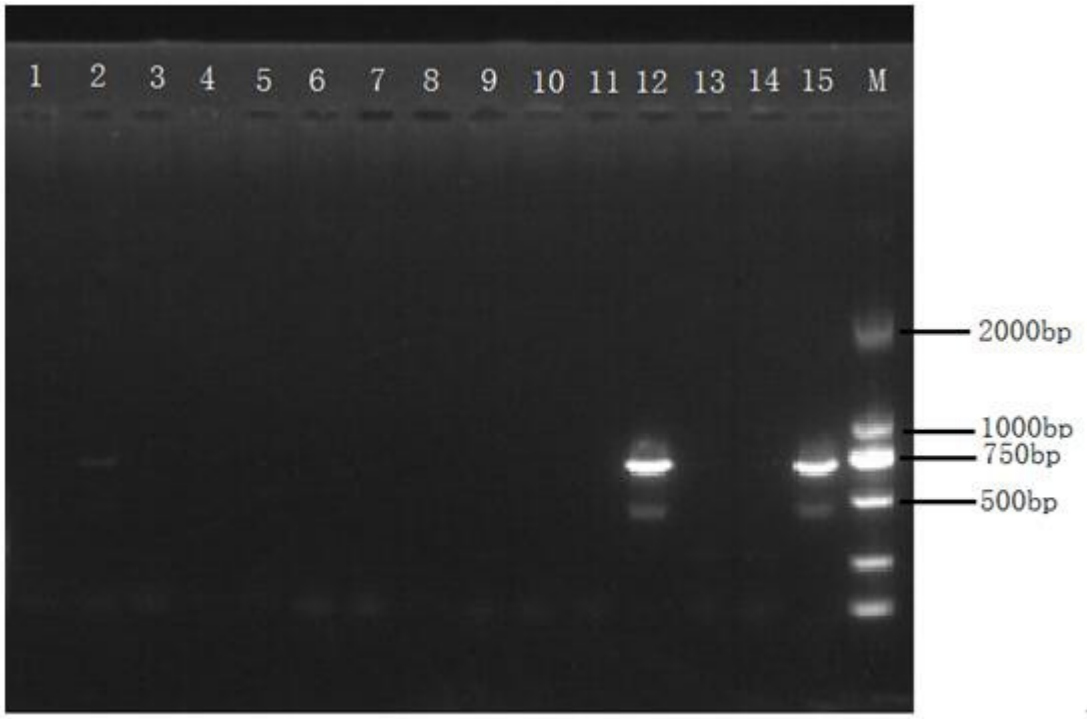


图1

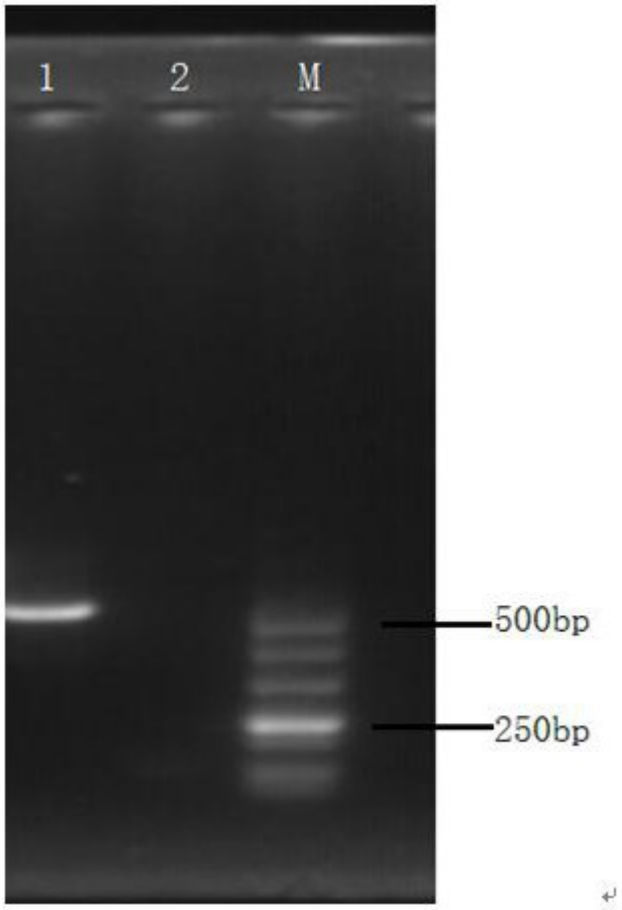


图2