

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 92110638.6

[45] 授权公告日 2001 年 12 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1076397C

[22] 申请日 1992.8.14

[21] 申请号 92110638.6

[30] 优先权

[32] 1991.8.15 [33] US [31] 746,704

[32] 1992.7.17 [33] US [31] 915,922

[73] 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 K·K·Y·杨

[56] 参考文献

EP0395292 1990.10.31 C12Q1/68

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY VOL. 28, NO. 8

1990. 8. 1 B. B DOING HAUS 等, DETECTION AND IDENTI-

- FICATION OF MYCOBACTERIA BY AMPLIFICATION OF

RRNA

JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY VOL. 136, NO. 9  
1990. 9. 1 T ROGALL 等, IDENTIFICATION OF MYCO-  
BACTERIUM SPECIES BY DIRECT SEQUENCING

审查员 贾书瑾

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪洋

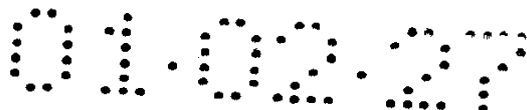
权利要求书 5 页 说明书 54 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 制备分支杆菌引物及探针的方法

[57] 摘要

可以用引物和探针来检测试样中分支杆菌的核酸, 以及确定产生该核酸的菌种。该引物将 16S 核糖体 RNA 基因的区域扩增并与菌种中保存的区域杂交。属特异性探针与分支杆菌菌种中扩增的保存区域中的序列杂交, 而种特异性探针与可变区域杂交, 从而将菌种特性单一地确定。本发明提供了用于检测分支杆菌核酸的同感探针, 该探针与任何分支杆菌菌种的序列均不相同。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



## 权 利 要 求 书

---

1. 一种制备寡核苷酸引物的方法, 所述寡核苷酸引物与 16S 核糖体 RNA 基因或分支杆菌菌种中相应的 RNA 的靶区域杂交, 所述方法包括合成一段寡核苷酸序列, 该序列含有序列 KY18 (SEQ ID No: 1) 或 KY75 (SEQ ID No: 2) 的至少 14 个核苷酸作为杂交序列。

2. 一种制备寡核苷酸引物对的方法, 所述寡核苷酸引物对能扩增 16S 核糖体 RNA 基因或分支杆菌菌种中相应的 RNA 的靶区域, 所述方法包括合成含有序列 KY18 (SEQ ID No: 1) 的第一引物和含有序列 KY75 (SEQ ID No: 2) 的第二引物作为杂交序列。

3. 一种制备寡核苷酸探针的方法, 所述寡核苷酸探针含有能够与经权利要求 2 所述引物对扩增的 16S 核糖体 RNA 基因或分支杆菌菌种中相应的 RNA 的靶区域杂交的核酸序列, 所述方法包括合成所述核酸序列。

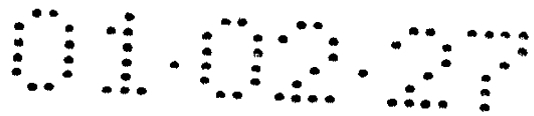
4. 权利要求 3 的制备寡核苷酸探针的方法, 其中所述的探针能够与靶区域中保守的区域进行杂交。

5. 权利要求 4 的制备寡核苷酸探针的方法, 其中所述的探针含有一段亚序列, 该亚序列包括序列 KY101 (SEQ ID No: 3) 或其互补物的至少 14 个核苷酸。

6. 权利要求 4 的制备寡核苷酸探针的方法, 其中所述的探针含有一段亚序列, 该亚序列包括序列 KY102 (SEQ ID No: 4) 或其互补物的至少 14 个核苷酸。

7. 权利要求 4 的制备寡核苷酸探针的方法, 其中所述的探针杂交序列与待检测的分支杆菌菌种的 16S 核糖体 RNA 基因序列不相同, 其中所述的杂交序列能够与所述的不同基因序列进行杂交。

8. 权利要求 7 的制备寡核苷酸探针的方法, 其中所述的探针杂交序列含有一段亚序列, 该亚序列包括序列 KY165 (SEQ ID No: 13) 或其互补物的至少 14 个核苷酸。



9. 权利要求 7 的制备寡核苷酸探针的方法，其中所述的探针杂交序列含有一段亚序列，该亚序列包括序列 KY166 (SEQ ID No: 14) 或其互补物的至少 14 个核苷酸。

10. 权利要求 3 的制备寡核苷酸探针的方法，其中所述的探针杂交序列能够与靶区域中易变的区域杂交。

11. 权利要求 10 的制备寡核苷酸探针的方法，其中所述的探针杂交序列含有一段亚序列，该亚序列包括选自 KY21 (SEQ ID No: 5)、KY25 (SEQ ID No: 6)、KY26 (SEQ ID No: 7)、KY63 (SEQ ID No: 8)、KY151 (SEQ ID No: 9)、KY106 (SEQ ID No: 10)、KY126 (SEQ ID No: 11)、KY139 (SEQ ID No: 12)、KY157 (SEQ ID No: 16)、KY167 (SEQ ID No: 17)、KY168 (SEQ ID No: 18)、KY169 (SEQ ID No: 19)、KY170 (SEQ ID No: 20)、KY171 (SEQ ID No: 21)、KY172 (SEQ ID No: 22)、KY173 (SEQ ID No: 23) 以及与它们互补的序列的至少 14 个核苷酸。

12. 制备一组寡核苷酸探针的方法，所述寡核苷酸探针组至少包括两种如权利要求 11 所述的寡核苷酸探针，所述方法包括合成所述寡核苷酸探针。

13. 用于检测试样中所含分支杆菌核酸的方法，它包括：

(a) 将来自 16S 核糖体 RNA 基因的所述的核酸区域扩增；

(b) 将在步骤(a)中扩增的所述核酸与至少一种对所述寡核苷酸探针特异的序列混合，其中所述探针杂交序列选自包括下列序列之一的至少 14 个核苷酸的亚序列：KY101 (SEQ ID No: 3)、KY102 (SEQ ID No: 4)、KY165 (SEQ ID No: 13)、KY166 (SEQ ID No: 14)、KY21 (SEQ ID No: 5)、KY25 (SEQ ID No: 6)、KY26 (SEQ ID No: 7)、KY63 (SEQ ID No: 8)、KY151 (SEQ ID No: 9)、KY106 (SEQ ID No: 10)、KY126 (SEQ ID No: 11)、KY139 (SEQ ID No: 12)、KY157 (SEQ ID No: 16)、KY167 (SEQ ID No: 17)、KY168 (SEQ ID No: 18)、KY169 (SEQ ID No: 19)、KY170 (SEQ ID No: 20)、KY171 (SEQ ID No: 21)、KY172 (SEQ ID No: 22)、KY173 (SEQ ID No: 23) 和与其互补的序列；

以及

(c) 对在所述核酸和所述探针之间形成的杂种进行检测。

14. 权利要求 13 的方法，该方法用于对分支杆菌进行分类，所述方法包括：

(a) 将来自所述分支杆菌的 16S 核糖体 RNA 基因中的核酸区域扩增，

(b) 将在步骤(a)中扩增的所述核酸与一组序列特异性寡核苷酸探针混合，其中各所述寡核苷酸探针的探针杂交序列含有一段亚序列，该亚序列包括选自下列的序列的至少 14 个核苷酸：KY21 (SEQ ID No: 5)、KY25 (SEQ ID No: 6)、KY26 (SEQ ID No: 7)、KY63 (SEQ ID No: 8)、KY151 (SEQ ID No: 9)、KY106 (SEQ ID No: 10)、KY126 (SEQ ID No: 11)、KY139 (SEQ ID No: 12)、KY157 (SEQ ID No: 16)、KY167 (SEQ ID No: 17)、KY168 (SEQ ID No: 18)、KY169 (SEQ ID No: 19)、KY170 (SEQ ID No: 20)、KY171 (SEQ ID No: 21)、KY172 (SEQ ID No: 22)、KY173 (SEQ ID No: 23) 和与其互补的序列；以及

(c) 对在所述核酸和所述探针之间形成的杂种进行检测。

15. 权利要求 13 所述的方法，其中所述的扩增过程是用聚合酶链反应完成的。

16. 权利要求 15 所述的方法，其中所述的聚合酶链反应是用包括 KY18 (SEQ ID No: 1) 和 KY75 (SEQ ID No: 2) 的引物对完成的。

17. 用于在试样中检测和任选地识别分支杆菌核酸的药盒，它包括一对引物，其中第一引物的杂交序列是包括 KY18 (SEQ ID No: 1) 的至少 14 个核苷酸的亚序列，而第二引物的杂交序列是包括 KY75 (SEQ ID No: 2) 的至少 14 个核苷酸的亚序列。

18. 权利要求 17 所述的药盒，它还包括一种寡核苷酸探针，所述寡核苷酸探针含有与经引物对 KY18 (SEQ ID No: 1) 和 KY75 (SEQ ID No: 2) 扩增的 16S 核糖体 RNA 基因区域进行杂交的核酸序列。

19. 权利要求 18 所述的药盒，其中所述的探针序列与待测的分支杆

菌菌种的任何序列均不相同。

20. 权利要求 19 所述的药盒，它还包括至少一种寡核苷酸探针，所述寡核苷酸探针选自包括下列序列的至少 14 个核苷酸的亚序列：KY101 (SEQ ID No: 3)、KY102 (SEQ ID No: 4)、KY165 (SEQ ID No: 13)、KY166 (SEQ ID No: 14)、KY21 (SEQ ID No: 5)、KY25 (SEQ ID No: 6)、KY26 (SEQ ID No: 7)、KY63 (SEQ ID No: 8)、KY151 (SEQ ID No: 9)、KY106 (SEQ ID No: 10)、KY126 (SEQ ID No: 11)、KY139 (SEQ ID No: 12)、KY157 (SEQ ID No: 16)、KY167 (SEQ ID No: 17)、KY168 (SEQ ID No: 18)、KY169 (SEQ ID No: 19)、KY170 (SEQ ID No: 20)、KY171 (SEQ ID No: 21)、KY172 (SEQ ID No: 22)、KY173 (SEQ ID No: 23) 和与其互补的序列。

21. 权利要求 19 所述的药盒，它还包括一组寡核苷酸探针，所述寡核苷酸探针组至少包括两种寡核苷酸探针，所述寡核苷酸探针选自包括下列序列的至少 14 个核苷酸的亚序列：KY21 (SEQ ID No: 5)、KY25 (SEQ ID No: 6)、KY26 (SEQ ID No: 7)、KY63 (SEQ ID No: 8)、KY151 (SEQ ID No: 9)、KY106 (SEQ ID No: 10)、KY126 (SEQ ID No: 11)、KY139 (SEQ ID No: 12)、KY157 (SEQ ID No: 16)、KY167 (SEQ ID No: 17)、KY168 (SEQ ID No: 18)、KY169 (SEQ ID No: 19)、KY170 (SEQ ID No: 20)、KY171 (SEQ ID No: 21)、KY172 (SEQ ID No: 22)、KY173 (SEQ ID No: 23) 和与其互补的序列。

22. 权利要求 20 所述的药盒，它还包括内部调控寡核苷酸序列，该序列两侧有上游和下游序列，它们与引物 KY18 (SEQ ID No: 1) 和 KY75 (SEQ ID No: 2) 互补。

23. 一种制备内部正调控寡核苷酸序列的方法，所述寡核苷酸序列包括一种非天然的寡核苷酸亚序列，该亚序列的两侧有选自 KY18 (SEQ ID No: 1) 或 KY75 (SEQ ID No: 2) 的核酸亚序列，所述方法包括通过克隆或通过克隆以及用引物扩增制备所述寡核苷酸序列，所述引物具有所述非天然寡核苷酸亚序列两侧的核酸亚序列的序列。

24. 权利要求 23 的制备寡核苷酸序列的方法，其中寡核苷酸序列还

包括一种核酸亚序列，该亚序列选自包括序列 KY101 (SEQ ID No: 3), KY102 (SEQ ID No: 4), KY165 (SEQ ID No: 13) 和 KY166 (SEQ ID No: 14) 的至少 14 个核苷酸的亚序列。

25. 权利要求 24 的制备寡核苷酸序列的方法，其中寡核苷酸还包括一种核酸亚序列，该亚序列选自包括序列 KY21 (SEQ ID No: 5)、KY25 (SEQ ID No: 6)、KY26 (SEQ ID No: 7)、KY63 (SEQ ID No: 8)、KY151 (SEQ ID No: 9)、KY106 (SEQ ID No: 10)、KY126 (SEQ ID No: 11)、KY139 (SEQ ID No: 12)、KY157 (SEQ ID No: 16)、KY167 (SEQ ID No: 17)、KY168 (SEQ ID No: 18)、KY169 (SEQ ID No: 19)、KY170 (SEQ ID No: 20)、KY171 (SEQ ID No: 21)、KY172 (SEQ ID No: 22)、KY173 (SEQ ID No: 23) 的至少 14 个核苷酸的亚序列。

# 说明书

## 制备分支杆菌引物及探针的方法

本发明涉及用于检测分支杆菌核酸的存在以及识别在试样中产生的分支杆菌核酸的分支杆菌菌种的试剂及方法。尤其是，本发明涉及一种与 16S 核糖体 RNA 基因中的靶区域杂交或与分支杆菌菌种中相应的 RNA 杂交的寡核苷酸引物，其中所述的引物含有序列 5' CACAT GCAAGTCGAACGG AAAGG 3' ( KY 18 ) 或 5' GCCCGTATCGCCCGCACGCTC ACA 3' ( KY 75 ) 作为杂交序列。更进一步说，本发明涉及一种能与 16S 核糖体 RNA 基因中的靶区域杂交或能够通过用一对引物进行扩增而获得的与分支杆菌菌种中的相应的 RNA 进行杂交的寡核苷酸序列，其中第一引物含有序列 KY 18，而第二引物含有序列 KY 75 作为杂交序列，更进一步说，本发明涉及检测或识别试样中分支杆菌核酸的方法，它包括将 16 S 核糖体 RNA 基因中的靶区域或分支杆菌菌种中的相应的 RNA 扩增、将扩增好的核酸与探针混合并检测或识别在所述的核酸和所述的探针之间形成的杂种，从而产生特异探针。此外，本发明还涉及实施该方法用的药盒。

分支杆菌是生长缓慢、耐酸、需氧的杆菌，至今人们已发现至少有 19 种分支杆菌与人类疾病有关，其中最突出的是结核分支杆菌，( *M.tuberculosis* ) 牛结核分支杆菌 ( *M.bovis* ) 以及麻风分支杆菌 ( *M.leprae* )。某些菌种，如鸟分支杆菌 ( *M.avium* )、胞内分支杆菌 ( *M.intracellulare* ) 以及堪萨斯分支杆菌 ( *M.kansacii* ) 尽管一般情况下不会使健康的个体致病，但对于免疫受损的个体，如那些感染爱滋病病毒的个体则倒导致疾病。此外，有几种菌种虽极少

使人生病，但它们以腐生菌形式存在于临床试样中。检测及识别分支杆菌菌种的方法有细菌培养、抗体检测以及最近的通过与一种经放射活性标志的核酸探针杂交对 rRNA 进行检测的方法。这些方法均存在相当的问题。

通过培养杆菌来进行检测速度慢，需要至到两个月时间，而且通常需要进行额外的生化测试以进行菌种识别。抗体检测缺乏特异性，这是因为分支杆菌菌种之间有交叉反应，另外该法亦缺乏灵敏性。此外，区别现在的和过去的感染是比较困难的。采用经放射活性标志的 DNA 片段作为与小尺寸的亚单位核糖体 RNA ( 16S RNA ) 杂交的探针进行检测也缺乏灵敏性而且需要至少 7 天培养期 ( 参见 PCT/WO 84/02721 )。

聚合酶链反应 ( PCR ) 的发明是一种扩增核酸特异序列的方法，该方法的发明使得人们能够对存在于细胞中的，含量低到在以前无法测定的核酸进行测试。利用 PCR 扩增，人们可以甚至检测到靶核酸的单个拷贝体。通过与扩增到可测水平的核酸序列的序列特异寡核苷酸探针杂交而进行直接检测使诊断测试成为可能，这种测试充分特异到可以检测序列中单个核苷酸的变化。但是并非所有引物对及探针均有用，因此引物的选样以及要扩增的区域还有探针的选择会大大影响所产生的特异性及灵敏性。

人们已将 PCR 扩增法用来对分支杆菌核酸进行排序、检测试样中的分支杆菌核酸以及识别分支杆菌菌种。该细菌基因组中的不同区域均已用于检测及识别试样中的分支杆菌核酸。大多数诊断测试均用来检测仅一种或少量菌种，以及进行特异性核对，如果需要，可以对非一分支杆菌 DNA 进行这类测试。

Chia 等人在 1990, *J. Clin. Microbiol.* 28 ( 9 ) : 1877 - 1880、Brisson - Noel 等人, 1989, *Lancet* 334 : 1069 - 1071、Hackel 等人, 1990, *Molecular and Cellular Probes* 4 : 205 - 210 ; Woods 和 Cole, 1989, *FEMS Microbiology Letters* 65 : 305 - 310 以及 Hance 等人, 1989, *Molecular Microbiology* 3 ( 7 ) : 843 - 849 中均描述了检测编码 65 千道尔顿抗原的基因中某个区域的方法, 但在任何一种以 65 千道尔顿抗原基因为基础的测试中都区分不到三组以上的分支杆菌菌种。

Thierry 等人, 在 1990, *J. Clin. Microbiol.* 28 ( 12 ) : 2668 - 2673 和 Eisenach 等人, 1990, *J. Infectious Disease* 161 : 977 - 981 中报导了重复性 DNA 部件 IS 6110 的扩增过程。尽管结核分支杆菌和牛结核分支杆菌可以通过拷贝数而区分开 ( PliKaytis 等人, 1991, *Molecular Cellular Probes* 5 : 215 - 219 ), 但 IS 6110 的扩增基本上仅能测试特殊分支杆菌菌种的存在。

Hartsbeerl 等人, 在 1989, *J. Gen. Microbiol.* 135 : 2357 - 2364 中用 36 千道尔顿麻风分支杆菌抗原进行诊断测试, 尽管该测试是对麻风分支杆菌特异的, 但结果证明它难以降低与其它分支杆菌 DNA 的杂交。

Sjöbring 等人, 在 1990, *J. Clin. Microbiol.* 28 ( 10 ) : 2200 - 2204 中, 用编码蛋白抗原 b 的基因序列根据是否存在扩增产物来测试结核分支杆菌/牛结核分支杆菌。

Shankar 等人, 在 1990, *Lancet* 335 : 423 中描述了根据编码 MPB 64 蛋白的基因序列, 仅测试结核分支杆菌存在的方法。

Patel 等人, 在1990, *J. Clin. Microbiol.* 28 ( 3 ) : 513 - 518 和 Fries 等人在 1990, *Molecular and Cellular Probes* 4 : 87 - 105 中描述了用克隆的 DNA 片段构建的探针。探针特异性通过选择工艺而不是在探针设计中的序列分析而获得。

已经分析并作靶用于诊断测试中的分支杆菌基因组中的一个区域是小尺寸的亚单位核糖体 RNA ( 16S rRNA ) 。在 Bottger, 1989, *FEMS Microbiology Letters* 65 : 171 - 176 中, 采用可以扩增来自宽范围的有机体的核酸的“通用”引物来扩增来自多种有机体的 16S rRNA 基因。然后将它直接排序。Rogall 等人在 1990, *J. Gen. Micro* 136 : 1915 - 1920 中通过比较 16S rRNA 基因序列对分支杆菌菌种的系统发育关系进行了研究。在 Boddinhaus 等人, 1990, *J. Clin. Microbiol.* 28 ( 8 ) 1751 - 1759 中, 已经有证据表明可以通过采用序列特异性寡核苷酸进行扩增并与 16S rRNA 序列的区域进行杂交, 以进行这类确定。针对三种分支杆菌菌种, 人们对 16S rRNA 序列中的高度易变区进行了研究, 采用属特异性引物, 对含有用作种特异性探针杂交。易变区的区域进行扩增。

人们已经对来自大量有机体 ( 包括与分支杆菌关系靠近的或疏远的 ) 的小尺寸亚单位 rRNA 进行了研究并排序。Neefs 等人, 在 1990, *Nuc. Acids Res. Supplement* 18 : 2237 - 2317 中提供了来自大量有机体的小尺寸亚单位 rRNA 序列的汇编。

人们仍需要有一种快速且灵敏的测试方法, 以识别分支杆菌 DNA 以及产自该 DNA 源的菌种的存在。

本发明提供了一种快速且灵敏的以 PCR 为基础的测试方法, 以对分支杆菌进行检测及菌种识别。提供了对 16 S 核糖体 RNA 基因

序列特异的引物及探针。它通过用属特异引物进行扩增然后在斑点印迹 ( dot blot ) 杂交分析中用属特异性探针进行筛选而实现对分支杆菌的检测。如果检测到了分支杆菌, 则通过在反向斑点印迹分析中采用种特异性探针由扩增的 DNA , ( 一般来自相同的扩增反应 ) 对菌种进行识别。

对编码 16 S 核糖体 RNA (RNA) 的序列进行扩增有几个优点, 本发明可用于检测并区分 30 种以上的分支杆菌菌种及若干种可能存在于临床试样中的其它生物体。本发明的探针和引物能提供尽可能最大的特异性, 从而使因具有相似序列的相似生物体的存在而引起的假阳性的可能性降至最小。16S RNA 基因含有高度保存区, 本发明的属特异性引物及探针可以与这类保存区杂交, 而且能够与来自该菌属中几乎全部的菌种的序列进行杂交; 该引物将来自所测试的 15 种分支杆菌菌种中 14 种的核酸扩增, 而且在这 14 种扩增的分支杆菌 DNA 序列中, 属特异性探针可以与其中的 12 种序列杂交。16S rRNA 在扩增区域中也含有高度易变区域。本发明的种特异性探针可以在易变区域中杂交, 在该易变区中每一种菌种含有特有的序列。

从 16S rRNA 中选择引物及探针的另一个优点是该 RNA 可以大量拷贝数 (  $10^3$  到  $10^4$  ) 形式存在于生长细胞中。因此在给定的临床试样中以 RNA 形式存在的基因序列的数目将比相应的 DNA 序列的数目大至  $10^4$  倍。如果需要额外的检测灵敏性, 则可以将该 RNA 本身作为扩增靶。

在本发明的另一方面, 采用了第二种扩增反应作为确定测试。此第二种扩增反应根据与第一种靶、即 16 S 核糖体 RNA 核酸不直接相关的靶序列的存在作基准。优选地将合适的靶序列保存在分支杆菌

菌种之中，并且不涉及到非一分支杆菌菌种。举例来说合适的靶基因可以是编码 65 KDa 蛋白基因的基因。Pao 等人，在 1989, FEMS Micro. Letters 65 : 305 - 310; Hartskeerl 等人, 1989, J. Gen. Micro. 135 : 2357 - 2364 ; 和 Hackel 等人, 1990, Mol. Cel. Probes 4 : 205 - 210. 第二种靶序列的扩增在可用于证实第一扩增反应结果的同时，它对于分辨在比较研究，典型地如 PCR 及培养方法的对比中可能产生的相互矛盾的结果具有特别的意义。

本发明的另一方面涉及新型组合物，该组合物可用作为检测分支杆菌时的正面对照物。本发明提供了一种新型组合物，它可用于证实利用属特异性探针以及种特异性分支杆菌探针进行分析的结果。

本发明的一个方面涉及能检测分支杆菌核酸存在（属特异性探针）且确定产生该核酸的菌种的特性（种特异性探针）的探针。

本发明的另一方面涉及同感探针（consensus probes）在优选的方案中，本发明提供了用于扩增及检测分支杆菌分离物不同菌种的同感寡核苷酸。该同感寡核苷酸探针不会与和分支杆菌密切相关的非分支杆菌菌种杂交。

利用单个寡核苷酸探针同感探针适用于宽范围的靶特异性检测。本文中所用的一种同感探针是一种寡核苷酸探针，其序列与所检测的任何一种分支杆菌的核酸序列均不相同，该同感探针是由非天然核酸序列组成的杂种寡核苷酸组合物。本发明中所述的同感探针可用于排除及包括检测分析中选择过的菌种。在其一种方案中，本发明提供了由新型序列组成的寡核苷酸探针，虽然这些探针可以广泛地检测分支杆菌菌种，但它们不会对紧密相关的非分支杆菌菌种，如棒状杆菌进行检测。

本发明的另一方面涉及用于扩增分支杆菌核酸中特异区域的引物，该区域既含有分支杆菌菌种中保存的区域又含有在菌种中具有足分异源性的易变区域，从而使人们可以利用序列特异性寡核苷酸探针确定靶核酸的来源。

本发明的另一方面涉及检测及菌种识别方法。利用本发明的引物，用 PCR 法将靶核酸扩增可以使人们通过将扩增的核酸与属特异性探针混和并检测（如果发生杂交）从而检测分支杆菌核酸的存在，而菌种识别则通过确定与菌种特异性探针的杂交图案来实现。

本发明的另一方面还涉及药盒，这类药盒可以采用多种形式并由一种或多种探针组成，在其一种实施方案中，它由一组足以在菌种水平上确定感染性分支杆菌的特性的探针和使用该药盒组分的说明书组成。该药盒还含有一种或多种扩增试剂，如属特异性引物、聚合酶、缓冲液以及三磷酸核苷酯。

在进一步的实施方案中，该药盒还包括正面及反面对照物。优选的正面对照物如本文所述。

为了帮助理解本发明，现将几个术语限定如下。

术语“寡核苷酸”是指由两种或通常多种脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸组成的一种分子，如引物、探针、要检测的核酸片段以及核酸对照物。寡核苷酸的具体尺寸取决于多种因素以及该寡核苷酸的最终功能或用途。寡核苷酸可以通过任何一种合适的方法而制得，例如用合适的序列进行克隆及限制以及直接化学合成法，这些合成法例如为 Narang 等人，1979 Meth. Enzymol 68 : 90 - 99 中所述的磷酸三酯法、Brown 等人，1979, Meth. Enzymol. 68 : 109 - 151 中所述的磷酸二酯法、Beaucage 等人，1981, Tetrahedron Lett. 22 : 1859

- 1862 中所述的二乙基磷酰胺法以及美国专利号 US 4458066 中所述的固体基体法。

术语“引物”是指一种寡核苷酸，可以是天然的也可以是合成的，它可以作为在一定条件下诱发 DNA 合成的起始点，在上述条件下可以诱发与核酸链成互补的引物扩增产物的合成，即在四种不同的三磷酸脱氧糖核苷及一种聚合试剂（即 DNA 聚合酶或逆转录酶）存在下、在一种合适的缓冲液中并在合适的温度下进行上述合成。优选的引物是单股寡脱氧核糖核苷酸。引物的合适长度取决于该引物的设计用途，但一般在 15 到 25 核苷酸之间，较短的引物分子通常需要较冷的温度从而与模板形成充分稳定的杂种复合物。引物不必反映模板的准确序列，但必须充分互补，以便与模板杂交并用来引发 DNA 合成。

在本发明所述的实施方案中，提供了特异序列引物及探针。对于熟悉本领域的人员来说很显然，在提供这些具体实施方案的前提下，例如可以通过向 5' 或 3' 端添加与靶序列互补或与该靶序列不成互补的核苷酸的方法将特异序列引物及探针修饰。只要该引物组合物用作在靶序列上进行扩增的起始点并且该引物及探针是由至少 14 种包含在这些具体实施方案范围内的连续核苷酸组成的，那么这种组合物应属于本发明的范围内。

术语“引物”可以是指一种以上的引物，特别是当有关要扩增的靶区域的一端或两端的倍息指令存在某些模糊不清时。如果“保存”区在一定数量中显示出相当水平的多形性，则应制备引物的混合物，该混合物可以扩增这类序列，或者也可以（即使是失配的序列）将该引物设计成可以扩增。如果需要，可以通过引入一种可以用光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段进行检测的标志而将引物标

志。举例来说，适用的标志物包括  $^{32}\text{P}$ 、荧光染料、电子密集试剂、酶（如 ELISA 中常用的）、生物素、或半抗原以及可以获得抗血清或单克隆抗体的蛋白质。标志物还可用于“俘捉”引物，从而使该引物或引物扩增产物，如扩增的 DNA，在因体基体上更易制动。

术语“序列特异性寡核苷酸”及“SSO”是指具有被称为“杂交区”的序列的寡核苷酸，该序列与要检测的序列成互补，在“序列特异性、严格的杂交条件”下，它仅与那些和靶序列成准确互补的序列杂交。放松杂交条件的严格要求将使序列失配具有耐药性；有耐药性的失配程度可以通过适当调整杂交条件而受到控制。术语“探针”和“SSO 探针”与 SSO 相互互用。

术语“靶区域”是指要分析的核酸中的一个区域。

术语“热稳定性聚合酶”是指一种对热相当稳定，并且能催化三磷酸核苷的聚合过程从而形成与靶序列的核酸链之一成互补的引物扩增产物的酶。该酶能在引物的 3' 端引发合成并朝着模板的 5' 一端方向进行，直到合成终止。美国专利 US 4889818 中更全面地描述了提纯好的热稳定性聚合酶。

术语“逆转录酶”是指一种能催化三磷酸核苷的合成过程从而形成与核糖核酸模板成互补的引物扩增产物的酶。该酶在引物的 3' 端引发合成并朝着模板的 5' 端方向进行直到合成终止。合适的能将 RNA 靶序列转变成互补的复制 DNA (cDNA) 序列的聚合试剂的例子有禽类成髓细胞性白血病病毒逆转录酶及 *Thermus* 嗜热 DNA 聚合酶，后者是一种具有逆转录酶活性的热稳定性 DNA 聚合酶。

图 1 表示了采用本发明的属特异性及种特异性探针进行杂交测试的结果。用来自 13 种不同分支杆菌菌种的 DNA 测试该探针的特

异性。

本发明提供了一种快速且灵敏的以 PCR 为基础的测试手段用来检测并对分支杆菌进行菌种识别。它提供了对分支杆菌 16 S 核糖体 RNA 基因序列特异的引物及探针。通过在斑点印迹杂交分析中用属特异性引物进行扩增,然后用属特异性探针进行筛选实现对分支杆菌的检测。如果检测到分支杆菌,则通过在反向斑点印迹分析中采用种特异性探针从来自相同扩增反应的 DNA 中进行菌种识别。正向和反向斑点印迹分析均可以在微滴板中很方便地进行。

属特异性引物及探针与 16S rRNA 基因中的保存区域进行杂交,而种特异性探针与 16S rRNA 基因中的易变区域进行杂交。由于合成过程从该引物的 3' 端开始,故 3' 端的失配就更加紧要。胸苷比其它失配碱基更具有耐药性;因此设计时应使引物在 3' 端避免胸苷碱基。寡核苷酸的碱基量将影响变性温度。引物或探针接合的严格性及特异性将随温度的增加而增加,但是,由于在反向斑点印迹法中所有探针是同时进行杂交的,故最佳的探针杂交条件对于所有探针来说都是相似的。

本发明的引物对,对于来自所述的全部分支杆菌菌种的 16S rRNA 的序列的扩增均能有效地起作用,但对来自大多数其它种的相应的 DNA 则不进行扩增。此外,这些引物的扩增条件及效率对于所有菌种均很均匀,因此,几乎所有的分支杆菌菌种均可以用一个测试而检测出来,表 1 表示了本发明的引物的杂交序列。

表 1

<u>引物</u>	<u>序列表</u>	<u>杂交序列</u>
KY18	SEQ ID NO:1	5' CACATGCAAGTCGAACGGAAAGG 3'
KY75	SEQ ID NO:2	5' GCCCGTATCGCCCGCACGCTCACA 3'

采用大肠杆菌编码系统，上游引物 KY18 占据碱基 52 - 74 ，下游引物 KY75 占据 16S rRNA 基因中的碱基 624 - 647。合在一起，这些引物对长度大约为 583 碱基对的产物的合成具有特异性，精确的尺寸与菌种有关。

最初为确定分支杆菌 DNA 的存在而进行的筛选是用两种以混合物形式同时使用的属特异性探针进行的。

表 2

<u>探针</u>	<u>序列表</u>	<u>杂交序列</u>
KY101	SEQ ID NO: 3	5' TCGCGTTGTTTCGTG $\Delta$ AAATCTCAC <sub>g</sub> GCTTAA 3'
KY102	SEQ ID NO: 4	5' TCGCGTTGTTTCGTG $\Delta$ AAA <sub>2</sub> CTCACAGCTTAA 3'
KY165	SEQ ID NO. 13	5' TCGCGTTGTTTCGTG $\Delta$ AAATCTCACAGCTTAA 3'
KY166	SEQ ID NO. 14	5' TCGCGTTGTTTCGTG <sub>g</sub> AAATCTCACAGCTTAA 3'
M. xenopi	SEQ ID NO. 15	5' TCGCGTTGTTTCGTG <sub>g</sub> AAT <sub>gc</sub> CACAGCTTAA 3'

采用混合探针的原因在于多数分支杆菌菌种根据 KY 101 ( SEQ ID NO.3 ) 和 KY 102 ( SEQ ID NO.4 ) 区域中的序列而分成两组。这两种探针可以对来自 14 种所测试的分支杆菌属中的 12 种的 DNA 进行检测。

在另一种实施方案中，可以用 KY 165 ( SEQ ID NO.13 ) 代替探针 KY 101 ( SEQ ID NO.3 ) 和 KY 102 ( SEQ ID NO.4 )。表 2 中给出了探针 KY 101 ( SEQ ID NO.3 )、KY 102 ( SEQ ID NO.4 )、KY 165 ( SEQ ID NO. 13 ) 和 KY 166 ( SEQ ID NO. 14 ) 的序列。KY 165 ( SEQ ID NO. 13 ) 是一种同感探针，它包括了 KY 101 ( SEQ ID NO. 3 ) 和 KY 102 ( SEQ ID NO. 4 ) 两者的序列。KY 101 ( SEQ ID NO. 3 ) 和 KY 102 ( SEQ ID NO. 4 ) 之间有两个碱基相互不同。KY 165 ( SEQ ID NO.13 ) 即不同于 KY 101 ( SEQ ID NO.3 ) 也不同于 KY 102 ( SEQ ID NO.4 )，但它与这两者均只有一个碱基存在不同。这种同感是通过将 KY 101 ( SEQ ID NO.3 “推入”一个失配位置并将 KY 102 ( SEQ ID NO.4 ) “推入”其它的失配位置而实现的。KY 165 ( SEQ ID NO.13 ) 能够与所有 KY 101 - (SEQ ID NO.3 ) 和 KY 102 - 特异性 ( SEQ ID NO.4 ) 分支杆菌菌种充分地杂交。KY 165 ( SEQ ID NO.13 ) 由于存在另外的失配所以在高度严格的条件下不能与蟾分支杆菌 ( SEQ ID NO.15 ) 杂交。

KY 166 ( SEQ ID NO.14 ) 是一种广泛的同感探针，它可用于检测包括蟾分支杆菌 ( SEQ ID NO.15 ) 在内的分支杆菌菌种。KY 166 的序列 ( SEQ ID NO.14 ) 类似于 KY 165 的序列 ( SEQ ID NO.13 )，但它与任何一种非分支杆菌菌种均不相似。该探针被设计成与 KY 101 ( SEQ ID NO.3 )、KY 102 ( SEQ ID NO.4 ) 以及蟾分支杆菌中相应的序列 ( SEQ ID NO. 15 ) ( Gen BanK 收藏号 NO.X52929，通过 Intelligenetics 获得 ) 均同等不同。KY 166 ( SEQ ID NO.14 ) 与 KY 101 ( SEQ ID NO. 3 )、KY 102 ( SEQ ID NO.4 ) 及蟾分支杆菌 ( SEQ ID NO.15 ) 之间各有两个碱基存在不同。KY 166 ( SEQ ID NO.

14 ) 能与所有 KY 101 ( SEQ ID NO.3 ) 及 KY 102 ( SEQ ID NO.4 ) 特异性菌种以及蜡分支杆菌 ( SEQ ID NO. 15 ) 有效地杂交。另外, KY 166 ( SEQ ID NO. 14 ) 不会与假白喉棒状杆菌或白喉棒状杆菌 ( 与分支杆菌紧密相关的两种非分支杆菌菌种 ) 杂交。表 2 中包括了蜡分支杆菌 ( SEQ ID NO. 15 ) 的相应的序列。在该表中, 与 KY 166 ( SEQ ID NO.14 ) 相关的失配下面用线标出, 与 KY 165 ( SEQ ID NO.13 ) 相关的失配处于较低状态。

如果在试样中存在分支杆菌, 则通过与一组种特异性探针杂交可以确定产生该核酸的菌种。表 3 中表示了在该菌种识别步骤中所用的探针。

表 3

探针	序列表	特异性
KY21	SEQ ID NO: 5 5' ACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGC 3'	结核分支杆菌/牛结核/tb
KY25	SEQ ID NO: 6 5' ACTTGGCGCATGCCTTGTGGTGGAAAGCTT 3'	堪萨斯分支杆菌/胃/淋巴结结核
KY26	SEQ ID NO: 7 5' TTTAGGCGCATGTCTTTAGGTGGAAAGCTT	胞内分支杆菌
KY63	SEQ ID NO: 8 5' TCAAGACGCATGTCTTCTGGTGGAAAGCTTTTGC 3'	鸟结核分支杆菌/海属/田鼠
KY151	SEQ ID NO: 9 5' TCCCGAAGTGCAGGCCAGATTGCCACGTG 3'	海属分支杆菌/田鼠分支杆菌
KY106	SEQ ID NO: 10 5' GAAGGCTCACTTTGTGGGTTGACGGTAGGT 3'	淋巴结结核分支杆菌
KY126	SEQ ID NO: 11 5' GCAATCTGCCTGCACACCGGGATAAGCCTG 3'	堪萨斯分支杆菌/胃
KY139	SEQ ID NO: 12 5' GGGTCTAATACCGAATAGGACCACAGGACACATG 3'	戈氏分支杆菌
KY157	SEQ ID NO: 16 5' ATAGGACCAATTCTGCGCATGTGGTGTGGTG 3'	蟾分支杆菌
KY167	SEQ ID NO: 17 5' ACCTCAAGACGCATGTCTTCTGGT 3'	鸟结核分支杆菌/海属/田鼠
KY168	SEQ ID NO: 18 5' CCGAATAGGACCACAGGACACATG 3'	戈氏分支杆菌
KY169	SEQ ID NO: 19 5' ACCTTTAGGCGCATGTCTTTAGGT 3'	胞内分支杆菌
KY170	SEQ ID NO: 20 5' AACACTTGGCGCATGCCTTGTGGT 3'	堪萨斯分支杆菌/胃/淋巴结结核
KY171	SEQ ID NO: 21 5' GAAGGCTCACTTTGTGGGTTGACG 3'	淋巴结结核分支杆菌
KY172	SEQ ID NO: 22 5' TGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGT 3'	牛结核/tb
KY173	SEQ ID NO: 23 5' AGGACCATTCTGCGCATGTGGTGT 3'	蟾分支杆菌

临床中最常见的菌种是结核分支杆菌、堪萨斯分支杆菌、蟾分支杆菌 ( *M. xenopi* )、胞内分支杆菌 ( *M. intracellulare* ) 和鸟结核分支杆菌 ( *M. avium* ) 戈氏分支杆菌 ( *M. gordonae* ) 通常与疾病无关但它经常存在于人类试样中，因此由于临床上不重要的戈氏分支杆菌需要经常地用属特异性探针对分支杆菌核酸进行检测，例 6 中含有有关菌种特异性探针的特异性的附加信息。

本发明的一个重要方面在于扩增 16S rRNA 基因中的区域。尽管 PCR 是优选的扩增方法，但实施本发明的人应当注意可以通过任何一种已知的方法，对试样中的靶序列进行扩增，例如接合酶链反应 ( LCR )、转录扩增、自抑序列复制法，每一种方法均能提供足够的扩增，从而使该靶序列可以通过与 SSO 探针进行核酸杂交而获得检测。另外也可以使用将探针扩增到可测水平的方法，如 QB - 复制酶扩增法。术语“探针”包括在上述工艺中采用的序列特异性寡核苷酸，例如出于本发明的目的，LCR 中所用的“探针”可以是两种或更多种寡核苷酸，即使是 LCR 仅需要将探针接合在一起以表示存在该序列。

虽然 PCR 法是本领域所熟知的 ( 参见美国专利 US 4683195; 4683202 和 4965188 )，但为了使不熟悉 PCR 法的人清楚且全面地理解，本发明下文将给出 PCR 的几条总信息。

为了用 PCR 法将试样中的靶核酸序列扩增，该序列必须能为该扩增系统中的组分所接受。一般说来，这种可接收性可以通过从试样中分离出核酸而获得保证。本领域中已知有多种技术可以用来从生物试样中萃取出核酸。举例来说，可以参见 Higuchi 等人，1989, PCR Technology ( Erlich ed. Stockton Press, New York ) 此外，如果该试样十分易破碎，则在用 PCR 技术扩增之前不必将该核

酸提纯，也就是说，如果该试样由细胞，尤其是外周血淋巴细胞或 aminiocyte 组成，则可以仅通过将该细胞悬浮于低渗压缓冲液中而使胞内组分溶解并扩散。

每一次 PCR 循环均包括将由引物扩增形成的核酸双螺旋体分离。在优选的 PCR 实施方案中，股链分离可以通过将反应加热到足够高的温度并保持有效一段时间从而使该双螺旋体变性、但又不致使该聚合酶发生不可逆反的变性而实现（参见美国专利 US 4965188），典型的加热变性包括温度范围为约 80 °C 到 105 °C，保持时间为从数秒到数分钟。但是股链分离可以通过任何一种合适的变性方法实现，包括物理、化学或酶手段。例如，股链分离可以通过一种蜗牛酶，或一种具有蜗牛酶活性的酶而引发。例如，酶 RecA 在 ATP 存在时具有蜗牛酶活性。适合用蜗牛酶使股链分离的反应条件已为本领域所知（参见 Kuhn Hoffman - Berling, 1978, CSH - Quantitative Biology 43 : 63 - 67; 和 Radding, 1982, Ann. Rev. Genetics 16 : 405-436）。

然而，不管怎样得到股链分离，只要分离了股链，则在 PCR 中的下一步涉及分离的股链与引物在靶序列侧面杂交。该引物被扩增之后形成该股链靶的互补的拷贝品。为充分扩增 PCR，将该引物设计成使每个引物沿着双序列杂交的状态，就如，一种引物合成的扩增产品，从模板（互补）分离时，用作使其他引物扩增的模板。变性，杂交的循环以及扩增是根据需要多次重复，以得到核苷酸所需量。

PCR 中与模板有关的引物的扩增可以在适当数量的四种三磷酸脱氧核糖核苷（dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP；dUTP 在引入下文所述的 UNG 消毒系统时则用来替代 dTTP 或与 dTTP 一起使用）存在时通

过聚合试剂而催化，该扩增是在一种反应介质中进行的，该介质包括合适的盐类，金属阳离子和 pH 缓冲系统。合适的聚合试剂是人们已知的用来催化与模板有关的 DNA 合成酶类。适合与 DNA 模板一起使用的聚合酶的例子包括大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 或此酶的 Klenow 片段，T<sub>4</sub> DNA 聚合酶和 Taq 聚合酶，Taq 聚合酶是从 *Thermus* 水生生物中分离出来的一种热稳定性 DNA 聚合酶。该酶被广泛地用于核酸扩增及排序中。使用 Taq 聚合酶的反应条件是本领域内已知的并在 Gelfand, 1989, PCR Technology (上文) 中得到描述。适用于从 RNA 模板合成互补的、拷贝 DNA (cDNA) 序列的聚合试剂是逆转录酶 (RT)，例如禽类成髓细胞性白血病病毒 RT，或 *Thermus* 嗜热 DNA 聚合酶，后者是一种具有逆转录酶活性的热稳定性 DNA 聚合酶。典型地，该 RNA 模板在起始的逆转录步骤之后在最初的变性步骤中被加热降解，仅留下 DNA 模板供以后的扩增。

如果要扩增 16S rRNA，则需要进行起始的逆转录 (RT) 步骤以产生该 RNA 的 DNA 拷贝 (cDNA)。国际专利 PCT WO 91 / 09944 中描述了用热稳定性聚合酶进行的高温逆转录反应，该聚合酶还在 PCR 扩增过程中起作用。高温 RT 产生更高的引物特异性并且提高效率。逆转录过程和 PCR 扩增步骤均可以采用相同的引物及聚合酶，并且对反应条件进行优选，从而使这两种反应无需改变试剂就能发生。*Thermus* 嗜热 DNA 聚合酶是一种能起逆转录酶作用的热稳定性 DNA 聚合酶，它可以用于任何一种引物扩增步骤中而不管模板是什么。这两种工艺可以无需打开试管以改变或添加试剂而进行，只需在首次循环 (RNA 模板) 和剩余的扩增循环 (DNA 模板) 之间调节温度曲线即可。

PCR 法可以以一步灵活方式进行，此时在每一步骤之后加入新的试剂，或者以另一种方式进行，此时将所有的试剂同时加入，或者以局部灵活方式进行，此时在进行了一定数量的步骤之后加入新鲜的或不同的试剂。举例来说，如果股链分离是用热引发的且聚合酶是热敏感的，那么聚合酶必须在每一轮股链分离后加入。但是，如果用蜗牛酶进行变性，或者用一种热稳定性聚合酶进行扩增，那么可以在开始时将所有试剂加入其中，或者采用另一种替换方法，即当试剂的摩尔比是反应具有重要意义时，在试剂被合成反应消耗掉时定期地将试剂补充到里面去。

熟悉本领域的人知道最常见的 PCR 法是用热稳定性酶以自动工艺形式进行。在该工艺中，反应混合物的温度循环经过变性区、引物退火区、及反应区。从 Perkin Elmer 处可以买到特别适用于采用热稳定性酶的机器。

熟悉本领域的人还知道 PCR 法存在被来自在先反应的扩增核酸污染的问题。采用减轻此问题的方法可以使来自在先反应的扩增核酶发生酶催降解，PCR 扩增是在 dUTP 存在下进行，而不是在 dTTP 存在下进行的。用尿嘧啶 N - 糖基化酶 (UNG) 对所产生的含有尿嘧啶的双股产物进行降解，而正常的含有胸腺嘧啶的 DNA 则不会被 UNG 降解，在扩增开始之前将 UNG 加入扩增反应混合物中会使所有作靶用的含有尿嘧啶的 DNA 发生降解。由于含有尿嘧啶的 DNA 仅来自在先反应的扩增产物，故此方法可以有效地使反应混合物消毒，从而除去了在先反应的污染问题 (夹带)。UNG 能因变热而暂时失活，因此扩增工艺中的变性步骤还可以使 UNG 失活，结果，尽管引入了尿嘧啶，新的扩增产物仍会在无 UNG 环境中形成且不发生降解。

序列特异性探针杂交是成功实施本发明的一个重要步骤，本发明的序列特异性寡核苷酸探针专门与分支杆菌基因组中的特定片段杂交而且对于属特异性探针来说它与来自其它有机体的序列具有不稳定的失配，而对于种特异性探针来说它与来自其它分支杆菌菌种的序列具有不稳定的失配。可以选择严格的杂交条件从而使该探针仅与准确互补的序列专门杂交。对扩增产物进行检测时采用该序列特异性杂交以确保只有正确扩增的靶才能检测到，从而降低了因存在来自相似生物体的同源序列而发生假阳性的可能性。

用来检测在 SSO 探针与核酸序列之间形成的杂种的分析方法需要该探针除了杂交区以外还含有其它一些附加特征。例如，在斑点印迹法 (dot blot format) 中，典型地要对探针进行标志。如果该探针首先被制动，就象在下文中所述的“反向”斑点印迹法中所述的那样，则该探针还含有较长的聚 - dT 延伸部分，该延伸部分可以通过辐射而固定在尼龙基体上，世界专利 PCT 89 / 11548 中详细地描述了这项技术。

本发明的探针可以采用前面对合成寡核苷酸中说的技术而合成得到并进行标志，举例来说，可以通过用  $^{32}\text{P}$  - ATP 及激酶将该探针培养而在 5' 端用  $^{32}\text{P}$  标志该探针。适合于 SSO 探针的非放射活性标志物是辣根过氧化酶 (HRP)。美国专利 US 4914210 和 US 496202 中描述了制备和检测含有这种标志的探针的方法。有关这类标志探针使用的一些其它信息参见美国专利 US 4789630、Saiki 等人，1988, N. Eng. J. Med. 319 : 537 - 541 和 Bugawan 等人，1988, Bio / Technology 6 : 943 - 947。适用的色原包括红白染料和 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB)。Helmuth, PCR Protocols, San

Diego, California, Academic Press, Inc., 1990, PP.119 - 128 中描述了非同位素检测 PCR 产物的方法。

本发明的探针可用于通过确定该探针是否与试样中所存在的序列结合而确定试样中是否存在核酸序列。用于本发明所述目的的、适用于检测在探针和试样中核酸序列之间形成的杂种的分析方法，在本领域中是已知的。举例来说，可以采用如例 4 中所述的斑点印迹法完成这项检测。在斑点印迹法中，将未标志的扩增试样连接到一种固体基体，如一种膜上，在适当的杂交条件下用标志过的探针培养该膜，通过冲洗除去未杂交的探针，并对滤物进行监测看是否有结合探针存在。当用少量探针对多重试样进行分析时，例如当用属特异性探针对试样进行筛选看是否存在分支杆菌核酸时，斑点印迹法十分有用。

当采用大量不同的探针时，另一种可替换的方法也十分有用。该方法为“反向”斑点印迹法，在该方法中，扩增的序列中含有一种标志物而且该探针与固体基体连接在一起。在这种方法中，未标志的探针与膜相连并在合适的严格的杂交条件下向标志的试样暴露。通过在适当严格的条件下进行冲洗除去未杂交的标志试样，然后对滤物进行监测看是否存在结合序列。由于菌种确定需要对每一种扩增试样使用多种特异性探针，故反向斑点印迹法是该步骤优选的测试方法。

作为替换，也可以采用一种具有多个探针杂交位置或井的检测方法。举例来说，固体基体如微滴板特别适用于大规模临床使用本发明所述的方法。人们已经知道了多种用来杂交 / 俘获经 PCR 扩增的 DNA 或固体基体。在这些方法的一个具体实施方案中，扩增的靶 DNA 在 PCR 反应中扩增期间获得了标志（如用生物素）。通过将 PCR 产物与已经和微量滴定板小井连接起来的靶特异性寡核苷酸俘获探针

杂交而将标志过的 DNA 专门俘获。根据所用的标志类型可以将结合产物适当地检测出来。举例来说，如果采用生物素作标志，则加入抗生物素蛋白 HRP 复合物并使之与 ( a ) 过氧化氢基质及 O - 苯二胺 ( OPD ) 色原或 ( b ) 过氧化氢基质及四甲基联苯胺色原 ( TMB ) 起反应。结果产生一种颜色测量信号，从而可以对经 PCR 扩增的 DNA 进行定量检测。

正如在临床生物医学实验室中实践的那样，对于广范围的靶可以将采用微量滴定板分析的检测方法标准化。优选地是使检测探针的长度小于 25 核苷酸。短探针则使交叉反应的机会降至最少而且在大规模筛选过程中特别有用。因此，例 8 描述了用于在微量滴定板分析法中检测分支杆菌菌种的优选方法。熟悉本领域的人将会认识到长度在 25 核苷酸以上的探针同样适用于微量滴定板检测法，但它必须单个地确定合适的杂交并约束条件以确保最高特异性。

在另一种适用的分析系统中，在 PCR 扩增工艺过程期间加入一种标志好的探针。由于用来催化引物扩增的聚合酶具有的 5' 到 3' 核酸外的酶活性，在每一合成步骤期间与靶 DNA 杂交的任何一种探针均发生降解。随后对由该探针产生的降解产物进行检测。因此，存在降解产物则表明在探针和靶 DNA 之间发生了杂交。

本发明还涉及药盒，它是由本发明的引物及探针组成的多容器单元。适用的药盒可以含有用于检测分支杆菌核酸的 SSO 探针。有些时候，可以将 SSO 探针固定在合适的基体膜上。该药盒中还可以含有 PCR 扩增用引物。该药盒中所含的其它任选的组分有如逆转录酶或聚合酶、基质三磷酸核苷、用于标志的物品（如当标志为生物素时用的抗生物素蛋白 - 酶结合物和酶基及色原）或检测标志用物品，

以及用于 PCR、逆转录或杂交反应的合适的缓冲液。除了上述组分以外，该药盒还含有使用本发明所述扩增及检测方法的说明书。

在本发明优选的实施方案中，用于检测分支杆菌的药盒中还含有正面及反面对照物，优选地，正面对照物包括一种核酸序列，该序列可以用与用来扩增测试试样中分支杆菌核酸的引物对相同的引物对扩增。使用正面对照物的方法是已知的，此时存在的或不存在的靶与该正面对照物均采用相同的引物对。优选地应将该正面对照物设计成能使产物 DNA 具有独特的尺寸，从而易与靶的尺寸区分开。

在另一方面，本发明提供了一种正面对照物，该对照物能够与用来检测属特异性分支杆菌探针以及种特异性分支杆菌探针的探针进行杂交。例 9 描述了正面对照核酸的构建过程。

如本文中所述，还可以利用第二种扩增靶，特别是用它来分辨相互矛盾的 PCR 及培养数据。根据本发明所述的有关提供内部正面对比物载体的教导，熟悉本领域的人将很容易明白还可以构建出其它一些内部正面对照物。举例来说，正面对照物可以向初级（16S rRNA）和次级靶（如 65 kDa 蛋白基因）两者引入引物位置，从而杂交而后扩增正面对照物 DNA 的独特片段。

下文所述的本发明的实例仅用来描述本发明而不是为了限制本发明的范围。

### 例 1

#### 试样制备

采用由 MicroProbe 买到的 Iso Quick™ 系统从痰样中分离出核酸，将约 10 ml 痰样液化 / 消毒，离心造粒，并悬浮于约 1

升含有 BSA 的缓冲液中。从该试样中，取出 200 到 500  $\mu\text{l}$  并离心使该细菌成粒。将该颗粒悬浮于 100  $\mu\text{l}$  试样缓冲液 A 中，然后用 100  $\mu\text{l}$  溶解试剂 1 溶解，将溶解物用 7 体积的试剂 2 和 4 体积的试剂 3 萃取（试剂 1, 2 和 3 以及试样缓冲液 A 由 Iso-Quick™ 系统提供），然后将试样离心而后向其水相中加入 1 / 3 体积的 10 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ，并用等体积的异丙醇将其 DNA 沉积，用 70 % EtOH 冲洗粒化的 DNA，并将它再次悬浮于 100  $\mu\text{l}$  TE, pH 8.0 中，每一种 DNA 制剂用 50  $\mu\text{l}$  体积进行扩增反应。

## 例 2

### 分支杆菌 DNA 的扩增

制备一种主试剂混合物，从而使每种反应含有下列试剂：25 pmol 每种引物、10 nmol 每种 dNTP、2X PCR 缓冲液（10 X 缓冲液 = 500 mM KCl、500 mM Tris - HCl, pH 8.9, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ ），3 单位 Taq 聚合酶，2 单位 UNG，以及水，使每次反应具有 50  $\mu\text{l}$  反应混合物。在这种主混合物上覆盖 50  $\mu\text{l}$  矿物油，并将 DNA 试样加入到油层下面的反应混合物中，如有必要，向其中加入水使反应总体积达到 100  $\mu\text{l}$ 。

将 DNA 在 Perkin Elmer Thermal Cycler 中扩增，设计程序使该 Thermal Cycler 经过 37 次变性、引物退火和引物扩增循环、2 次 98  $^\circ\text{C}$ 、62  $^\circ\text{C}$  和 72  $^\circ\text{C}$  且每个温度保持 1 分钟循环、而后经过 35 次 94  $^\circ\text{C}$ 、62  $^\circ\text{C}$  和 72  $^\circ\text{C}$  且每个温度保持 1 分钟循环。如果采用 3 UNG 消毒系统，则应设计程序使该 Perkin Elmer Thermal Cycler 在最后一次循环之后将试样在 72  $^\circ\text{C}$  下浸泡一段不确定时间，

以保护最后的扩增进行完全，并使 UNG 酶保持失活。然后采用凝胶电泳和 / 或斑点印迹杂交对扩增产物进行分析，如果采用凝胶电泳，则需加入大约 10  $\mu$ l 10 X 试样缓冲液（0.25 % 二甲苯蓝、0.25% 溴苯蓝、25 % Ficoll）并用 100  $\mu$ l 氯仿将矿物油萃取出来并使 Taq 聚合酶失活。

### 例 3

#### 斑点印迹法

对扩增过的试样进行初步筛选以检测是否存在分支杆菌核酸。在斑点印迹法中，将小部分扩增 DNA 变性、施加到尼龙过滤器上，并将其按下述方法制动。然后将滤物浸没在探针溶液中，以使其与标志过的探针中的一个杂交。每一种探针均可以给放射活性标志，但与辣根过氧化酶（HRP）共价结合的探针在色原或化学发光基质的存在下还可以提供一种进行非同位素检测的手段。制动的靶 DNA 与两种属特异性探针 KY 101 和 KY 102 的混合物杂交。由于所检查的试样的数目将大大超过探针（两种探针的混合物）的数量，因此，对于该初步筛选来说斑点印迹法是最方便的方法。可以将大量不同的试样杂交到一块固体基体上的单个位置中，并通过将该基体浸没在探针溶液中而将其同时向标志过的探针暴露。扩增过程如例 2 中所述。然后通过用碱进行处理，将 PCR 产物变性。向 5  $\mu$ l PCR 产物中加入 5  $\mu$ l、0.5 M EDTA、pH 8.0、8  $\mu$ l 5 N NaOH 和 82  $\mu$ l H<sub>2</sub>O。将该混合物在室温下放置 10 分钟以使变性完全。

在斑点印迹拷贝（Bio - Dot™，来自 BioRad，Richmond，CA）建立之后，通过在水中浸没 5 到 10 分钟然后用 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

冲洗制备得到 BioDyne™ B 尼龙过滤器 ( Pall Corp., Glen Cove, NY )。变性之后, 利用斑点印迹装置将 100  $\mu$ l 试样混合物在真空下施加到尼龙膜上。用 200  $\mu$ l、0.4 N NaOH 冲洗每个小井, 然后再用 2X SSC 简单冲洗一下并吹干直到没有液体留在其中。用 Stratalinker™ ( Stratagene, La Jolla, CA ) 紫外光盒 ( 位于“自动交联”定位 ) 以 1200 mJ / cm<sup>2</sup> 流量进行紫外线照射, 从而使 DNA 制动并交联到尼龙过滤器上。

通过在 60 °C 下 ( 空气振动器 ) 在热密闭的袋中在杂交缓冲液 ( 0.5 X SSC, 5 X Denhardt 代溶液, 0.1 % SDS, 50  $\mu$ g / ml 青鱼精液 DNA ) 中浸没至少 30 分钟, 将滤物“预杂交”。如果采用了经放射活性标志的探针, 则用等量的含有  $1 \times 10^6$  cpm 探针的相同溶液取代该缓冲液, 并使滤物在 60 °C 下杂交 2 小时到一整夜。

杂交后, 在 2 X SSC / 0.1% SDS 中将滤物冲洗三次, 在室温下冲洗 20 分钟, 然后在振动水浴中在 71 °C 高度严格的温度下冲洗 20 分钟一次。将滤物吸干、包在塑料包裹纸中并用一层或两层强化屏在 - 70 °C 下将其向 X - 射线胶片暴露。

另一种观察方法是与和辣根过氧化酶结合的寡核苷酸探针进行杂交。该探针的制备方法如 Levenson 和 Chang, 1989, 在 PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, ( Innis 等人, Academic Press . San Diego ) 第 92 - 112 页和 Saiki 等人, 1988, 在 N. Eng . J. Med. 319 : 537 - 541 中所述。用每 5 ml 杂交溶液 2 pmole HRP SSO 探针进行杂交。

冲洗之后, 将要用色原染料基质培养的滤物在 100 mM 柠檬酸钠溶液中冲洗, 然后放在 100 mM 柠檬酸钠溶液中, 上述柠檬酸钠

溶液 pH 为 5.0, 其中含有 0.1 mg / ml 3,3', 5,5' 四甲基联苯胺 / ml ( Fluka ) 以及 0.0015 % 过氧化氢, 将上述滤物在室温下轻轻搅拌培养 10 - 30 分钟。将培养过的滤物在水中冲洗并随即照相。制备 TMB 检测系统并基本按照 Ampli Type<sup>®</sup> DQ $\alpha$  - DNA 定型盒中所述使用它, 上述定型盒是由 Hoffmann - La Roche 开发并制备的, 并且可以从 Perkin Elmer 处获得。在另一实施方案中, 用化学发光检测系统对滤物进行培养 ( ECL ; Amersham, Arlington Heights, IL )。将滤物在 PBS 中冲洗 5 分钟并放在 ECL 溶液中达 1 分钟, 同时轻轻搅拌。然后在室温下将滤物向 X - 射线胶片暴露 1 到 5 分钟。

#### 例 4

#### 反向斑点印迹法

菌种识别要求使每一种试样都要向许多种特异性探针暴露; 其特征是由与试样 DNA 接合的探针的特征表示的。由于每一种试样均要向多种探针暴露, 故反向斑点印迹法则更方便。将探针固定到膜上的各个位置上, 然后将整个膜浸没在含有扩增过的靶 DNA 的溶液中, 从而使其与和膜相连的探针发生杂交。在未决的系列申请 197,000 和 347495 中, 在 Saiki 等人, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 6230 - 6234 中以及在 Ampli Type<sup>®</sup> DQ $\alpha$  - DNA 定型盒中描述了这种反向斑点印迹过程。上述定型盒是由 Hoffmann - La Roche 开发并制成的, 并且可以从 Perkin Elmer 处获得。将扩增引物如前面 Levenson 和 Chang, 1989 中所述生物素化, 从而可以很容易地测出与和膜相连的探针杂交的任何一种扩增 DNA。

在一种具体实施方案中，通过将链抗生物素蛋白相连的辣根过氧化物酶（SA - HRP）与任何一种与膜结合的探针杂交的生物素化的（通过引物）、扩增过的 DNA 反应而进行检测。结果，该 HRP 通过 SA - 生物素相互作用而与扩增 DNA 结合在一起并且可以用来通过一些已知的手段而产生信号，例如产生有颜色的化合物，例如通过四甲基联苯胺的氧化（参见美国专利 US 4789630）。

虽然可以制用任何一种手段将该探针固定到膜上，但优选的方法包括将寡核苷酸探针的杂交区的尾部与聚 - dT 的长序列联接在一起，所产生的聚 - dT “尾巴”可以与尼龙膜上的胺基基团反应从而将该探针共价联接到膜上。可以利用紫外照射促进该反应。

尽管人们可以在能买到的 DNA 合成器上合成带尾的探针，但也可以用末端脱氧核糖核苷酸转化酶（TdT, Ratliff Biochemicals; 对于下面的反应假定其浓度为约 120 单位 /  $\mu$ l, 即 100 pmol /  $\mu$ l），来在探针上产生聚 - dT 尾巴。但是，当采用 DNA 合成器制备带尾探针时，此时应将该尾巴放在探针的 5' 端，这样可以使不需要的早熟链终止主要发生在尾部区域。

TdT 反应应在约 100  $\mu$ l 体积含有 1 X TdT 盐、200 pmol 寡核苷酸、800  $\mu$ m DTT 和 60 单位 TdT 的溶液中进行。10 X TdT 盐是 1000 mM 二甲胍酸钾、10 mM  $\text{CoCl}_2$ 、2 mM 二硫苏糖醇，250 mM Tris - Cl, pH 7.6, 其制备方法如 Roychoudhury 和 Wu, Meth. Enzymol. 65 : 43 - 62, 中所述，该文献作为参考而引入本文，可以制备 8 mM dTTP 的 10 X 贮存溶液（用 NaOH 中和至 pH 7）以便后用。

TdT 反应应在 37 °C 下进行 2 小时并通过向其中加入 100  $\mu$ l

10 mM EDTA, pH 8 而使反应终止。带尾的寡核苷酸的终浓度为  $1 \mu\text{M}$  ( $1 \text{ pmol} / \mu\text{l}$ ) , 而该同源聚合物尾巴的长度为约 400 残基。通过调整 dTTP 与寡核苷酸的摩尔比可以改变尾巴的长度。可以将带尾的探针贮存在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  下直到使用。

反向斑点印迹法所优选的尼龙膜是 Biodyne™ B 尼龙膜, 其孔径为 0.45 微米, 由 Pall 制造, 并由 ICN 以 BioTrans™ 尼龙膜出售。利用由 BioRad 制造的 Bio-Dot™ 斑点印迹装置可以很方便地将探针点滴到膜上。将每一种探针点滴到膜上独有的单个位置上。在施加到斑点印迹装置上之前, 将大约 2 到 10 微微摩尔的每种带尾探针与 50 到 100  $\mu\text{l}$  TE 缓冲液预先混合。斑点印迹之后, 将膜简单地放在吸附纸上以吸去过量的液体。然后将膜放在紫外光盒, 如由 Stratagene 制造的 Stratalinker™ 光盒中, 并将它暴露在 50 - 60 毫焦耳 /  $\text{cm}^2$  流量的 254 nm 长的光线下, 从而将该带尾探针固定到尼龙膜上。在简单冲洗 (在杂交溶液中冲洗约 15 分钟) 以除去未结合的探针之后, 该膜就可以用于与生物素化的 PCR 产物进行杂交。

通过加热到  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  并保持 3 到 10 分钟, 使扩增的 PCR 产物变性, 并将 40  $\mu\text{l}$  变性的 PCR 产物加入到每组探针组中使之杂交。以震动水浴, 在杂交缓冲液中, 在  $57 \text{ }^\circ\text{C}$  下进行 20 分钟杂交, 所述的杂交缓冲液由 0.5 X SSC, 0.25% SDS 和 5 X Denhardt 氏溶液组成。用 3 ml 由 25  $\mu\text{l}$  SA - HRP (由 Perkin Elmer 处购买) 在 3.1 ml 杂交溶液中制成的溶液取代原先的杂交缓冲液, 并以震动水浴在  $57 \text{ }^\circ\text{C}$  下培养 20 分钟。

在由 2 X SSC 和 0.1% SDS 组成的冲洗缓冲液中进行冲洗。在

10 ml 冲洗缓冲液中将膜简单漂洗后，再在 57 °C 下在 10 ml 缓冲液中进行 12 分钟严格冲洗，然后在室温下进行 5 分钟冲洗，再在 10 ml、0.1 M 柠檬酸钠溶液，pH 5.0 中冲洗 5 分钟。

在室温下，在 5 ml 色原溶液中进行 25 - 30 分钟色原结合，所述的色原溶液由 5 ml 0.1 M 柠檬酸钠、5  $\mu$ l, 3% 过氧化氢和 0.25 ml 色原 (TMB, 来自 Pevkin Elmer) 组成。在室温下、在蒸馏水中进行三次 10 分钟冲洗。随后在室温下用 1 X PBS 冲洗 30 分钟则可以提高信号质量。在色原呈现的步骤中，应该用铝箔盖将膜遮挡住以避免光线。对所产生的膜应照相以作永久记录。

### 例 5

#### 分支杆菌 DNA 检测

通过采用前面例 2 中所述的工艺用生物素化的属特异性引物 KY18 (SEQ ID NO:1) 和 KY75 (SEQ ID NO:2) 进行扩增，随后采用前面例 3 中所述的斑点印迹分析法与属特异性探针 KY 101 (SEQ ID NO:3) 和 KY 102 (SEQ ID NO:4) 进行杂交而实现对分支杆菌 DNA 的检测。前面表 1 中给出了上游引物 KY 18 (SEQ ID NO:1) 和下游引物 KY 75 (SEQ ID NO:2) 的杂交区域的序列，前面表 2 中给出了属特异性探针 KY 101 (SEQ ID NO:3) 和 KY 102 (SEQ ID NO:4) 之杂交区域的序列。

在聚合酶链反应 (PCR) 扩增过程中采用属特异性引物 KY 18 (SEQ ID NO:1) 和 KY 75 (SEQ ID NO:2) 以扩增来自 15 种分支杆菌菌种的核酸。其结果示于表 4 中。正如我们所希望的，KY 18 (SEQ ID NO:1) / KY 75 (SEQ ID NO:2) 扩增 来自除猿属分支

杆菌之外的全部分支杆菌菌种的 DNA 。由于 KY 75 ( SEQ ID NO:2) 与猿属分支杆菌在 5 个 3' 末端碱基上有 4 个存在差异, 而与 Chitae 分支杆菌有 2 个 3' 末端碱基存在差异, 因此猿属分支杆菌或 Chitae 分支杆菌 DNA 的扩增不是我们所期望的。但是, 由于猿属分支杆菌与人类疾病之间的联系极少有报导, 故其检测在临床上不重要。除了来自蟾分支杆菌和地分支杆菌的 DNA 之外, 所有扩增的分支杆菌 DNA ( 杂交过的) 均可以通过与属特异性探针 KY 101 (SEQ ID NO:3 ) 和 KY 102 ( SEQ ID NO:4 ) 杂交而检测出来。

表 4

来自不同分支杆菌菌种的 DNA 的  
扩增以及与属特异性探针的杂交

<u>分支杆菌</u>	<u>扩增</u>	<u>杂交</u>
结核分支杆菌	+	+
淋巴结结核分支杆菌	+	+
偶发分支杆菌	+	+
鸟属分支杆菌	+	+
堪萨斯分支杆菌	+	+
细胞内分支杆菌	+	+
草属分支杆菌	+	+
耻垢分支杆菌	+	+
海分支杆菌	+	+

转黄分支杆菌	+	+
蜡分支杆菌	+	-
猿分支杆菌	-	-
色分支杆菌	+	+
戈氏分支杆菌	+	+
地分支杆菌	+	-

通过尝试扩增来自 22 种不同的非分支杆菌菌种的 DNA，对这些引物的特异性进行测试。扩增产物仅来自白喉棒状杆菌和干燥棒状杆菌，*Nisseria sicca* 和痤疮丙酸杆菌，但是，这些扩增产物不能与属特异性探针杂交，因此不会产生假阳性。所测试的生物体示于下表 5 中。

表 5

对来自非分支杆菌生物体  
的 DNA 的扩增

<u>生物体</u>	<u>扩增</u>	<u>杂交</u>
百日咳博代氏杆菌	-	-
博氏疏螺旋体	-	-
类白喉棒状杆菌	+	-
干燥棒状杆菌	-	-
产气肠杆菌	-	-

大肠杆菌	-	-
流感嗜血杆菌	-	-
肺炎杆菌	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	-
淋病奈瑟球菌	-	-
脑膜炎奈瑟球菌	-	-
干燥奈瑟球菌	+	-
痤疮丙酸杆菌	+	-
铜绿假单胞菌	-	-
鼠伤寒沙门氏菌	-	-
粘质沙霉菌	-	-
金黄色葡萄球菌	-	-
无聚链球菌	-	-
酿脓链球菌	-	-
吸水链霉菌	-	-
锈赤链霉菌	-	-
苍白球螺旋体	-	-

### 例 6

#### 菌种识别

一旦在临床试样中测出了分支杆菌核酸，则通过采用例 4 中所述的反向斑点印迹法、根据与种特异性探针的杂交图案就可以确定产生该核酸的菌种。用本系统进行检测的临床菌种有鸟分支杆菌、胞内

分支杆菌、堪萨斯分支杆菌和结核分支杆菌。此外对戈氏分支杆菌的检测也是需要的，因为该生物体经常在临床试样中被人发现。

图 1 表示对从表 3 所列探针中选出的种特异性探针的特异性进行测试的结果。前面表 3 中示出了每种探针的杂交区域的序列以及所期望的特异性。采用来自十三种不同分支杆菌菌种提取的 DNA 的扩增产物对属特异性和种特异性探针的特异性进行测试。对于每一种菌种，采用生物素化的引物如例 2 中所述将由培养介质中提纯的 1 pg DNA（与约 300 细菌基因组等量）扩增。采用例 4 所述的反向斑点印迹法对探针杂交过程进行检测。作为检测扩增 DNA 存在用的正面对照物，属特异性探针与种特异性探针一起被包括在测试板条上。

### 例 7

#### 分支杆菌 16S rRNA 的扩增

通过首先用逆转录反应产生 cDNA 而后再扩增该 cDNA，可以将 16S rRNA 扩增。采用和前面例 2 中相同的引物。在该例子中，高温逆转录过程和 PCR 扩增过程均采用热稳定性 Tth 聚合酶进行。

逆转录反应在 20  $\mu$ l 含有下列成分的溶液中进行：8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O、2  $\mu$ l 10 X RT 反应缓冲液（100 mM Tris - HCl, pH 8.3, 和 900 mM KCl）、2  $\mu$ l 10 mM MnCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ l dNTP 溶液（2 mM 每种 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 在 H<sub>2</sub>O 中的溶液, pH 7.0），2  $\mu$ l “下游”引物（7.5 mM 在水中的溶液），2  $\mu$ l 0.18  $\mu$ m Tth 聚合酶在 1 X 贮存缓冲液（20 mM Tris - Hcl, pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2% Tween 20 (Pierce Surfactants)），

50% ( v / v ) 甘油 ) 中的溶液, 以及 2  $\mu$ l 模板 RNA 溶液 ( 低于 250 ng, 在 10 mM Tris - HCl 和 1 mM EDTA 中 ) 。用焦碳酸二乙酯 ( DEPC ) 处理所有不含 Tris 的溶液, 以除去任何一种污染核糖核酸酶 ( 如 Maniatus 等人, 1982, Molecular Cloning, a Laboratory Manual ( Cold Springs Harbor Laboratory, New York ), 第 190 页中所述 ) 。在热循环器中在 72  $^{\circ}$ C 下将该逆转录反应进行 5 分钟, 通过用冰将其冷却至 4  $^{\circ}$ C 而使反应终止。

通过添加下列成分进行 PCR 扩增: 2  $\mu$ l 剩余的引物 ( 7.5 mM, 在 H<sub>2</sub>O 中 ), 2  $\mu$ l dTTP 溶液 ( 10 mM 每种 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 在 H<sub>2</sub>O 中的溶液, pH 7.0 ), 8  $\mu$ l 10 X PCR 反应缓冲液 ( 100 mM Tris - HCl, pH 8.3, 1 mM KCl, 18.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 7.5 mM EGTA, 和 50 % ( v / v ) 甘油 ), 以及 68  $\mu$ l 用 DEPC 处理过的 H<sub>2</sub>O。采用和例 2 中相同的热曲线, 在 Perkin Elmer Thermal Cycler 中将该核酸扩增, 象以前的实施例一样对扩增产物进行分析。

## 例 8

### 微量滴定板分析用于检测分子杆菌

在本发明的这个实施方案中, 将探针固定到微量滴定板的小井中。如前所述, 将扩增的靶 DNA 与结合探针杂交。正如在前面实施例中所述的那样, 将扩增引物生物素化, 从而可以检测与结合板杂交的扩增 DNA。

首先使与 BSA 结合的所需探针与单个小井的塑料表面吸附, 然后用蛋白, 如牛血清蛋白填充这些小井。优选地采用由 Corning 获

得的 96 小井板。

一旦扩增过程完成，将 PCR 管从热循环器（Perkin Elmer）中除去，向每根 PCR 管中加入 100 微升变性溶液。对每根管采用一个新型滴管头。在一种实施方案中，可以不立即进行检测。在此情况下，将 PCR 管在 2 °C 到 8 °C 下贮存一整夜。变性的扩增反应在 2 °C 到 8 °C 下贮存时变得粘滞，在开管前将试管简单地加温到 25 °C 到 30 °C 以使滴液容易。

取下适当数量的 8 井微量滴定板条（至少 2 条）并将其放入微量滴定板架中，向微量滴定板的每个小井中滴入 100  $\mu$ l 杂交缓冲液。

变性溶液中含有 0.4 M NaOH, 80 mM EDTA 和 0.005 % Thymol 蓝。杂交 / 中和缓冲液中含有 3 M NaSCN, 80 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  以及 0.125 % Tween 20。使用前，将 pH 核定在  $5.0 \pm 0.2$ 。

利用带有多通道滴管的插塞头，从盘中每根 PCR 管中将 25  $\mu$ l 变性的扩增反应物滴到微量滴定板中相应的小井位中。用微量滴定板盖盖住该板并在其侧面轻轻敲击 10 到 15 次。已滴入适当试剂的小井中将呈现淡黄色，如果其中没有一个变成兰色或仅有一个变成兰色，则加入了过量的扩增物。当正 OD 值增加而负 OD 值不受影响时，继续进行该测试。将板在 37 °C 下培养 60 分钟。在 37 °C 下进行起始杂交 1 小时以后，除去杂交 / 中和缓冲液而代之以相同的缓冲液，并将板在 37 °C 下再保温 15 分钟。

保温后，用冲洗溶液将该板冲洗 5 次。板的冲洗可以用人工进行，也可以由程序控制的自动微量滴定板冲洗器进行。冲洗时，可以

采用 1 X PCR 缓冲液。按下列方式制备 10 X PCR 冲洗缓冲液浓缩物：9.94 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  , 4.41 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( 单基 ), 3.722 g/l EDTA, 87.66 g/l NaCl, 13.7 g/l Tween 20, 以及 10 g/l Pro Clin 300 ( Rohm 和 Haas, Philadelphia, PA )。用磷酸调节该溶液的 pH 值 ( pH 6.5 - 7.1 优先 )。

对于手工冲洗而言, 需将板中所含物倒空并放干。向所测试的板中的每个小井中加入 300  $\mu\text{l}$  冲洗溶液, 并将该板干燥 15 - 30 秒。再次将板倒空并放干, 将这种冲洗过程再重复四次。

对于自动微量滴定板冲洗器来说, 采用下列程序。将小井中所含物抽出, 设计程序使该冲洗器向所测试的板中的每个小井中加入 350  $\mu\text{l}$  工作冲洗液, 并浸泡 30 秒并抽气。将该步骤再重复四次, 然后将板放干。

向所测试的板中的每个小井中加入 100  $\mu\text{l}$  结合物。该抗生物素蛋白 HRP 结合物的制备过程如下: 稀释液含有 0.1 mol/l, 0.25 % Emulsit 25 ( DKS International. Inc., Tokyo, Japan ), 1.0 % Kathon CG ( Rohm 和 Haas, Philadelphia, PA ); 0.1 % 苯酚; 1.0% 牛  $\gamma$ - 球蛋白, 用浓 HCl 将该溶液的 pH 调节到 7.3。向该稀释液中加入 10 mM 结合抗生物素蛋白 ( Vector Labs, Burlingame, CA )。然后, 如前所述, 将板盖住, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下保温 50 分钟并再次冲洗。对于两条 8 井微量滴定板条 (16 次测试) 中的每一条, 通过混合 2.0 ml 基质 (Substrate) A 和 0.5 ml 基质 (Substrate) B 而制得工作基质。基质 (Substrate) A 含有 3 mM 过氧化氢, 6.5 mM 柠檬酸盐和 0.1 % Kathon CG。基质 (Substrate) B 含有 4.2 mM 3,3', 5,5' 四甲基联苯胺和 40 % 二甲基甲酰胺。该工

作基质应在使用前不到三小时制成，并将其贮存以光线直射。

向所测试的板中的每只小井中加入 100  $\mu$ l 工作基质（基质（Substrate）A 和 B 混合物）。然后将板盖住并在室温下（20  $^{\circ}$ C 到 25  $^{\circ}$ C）在黑暗中将其保温 10 分钟。向所测试的每只小井中加入 100  $\mu$ l Stop Reagent（5%  $H_2SO_4$ ）。在加入该 Stop Reagent 1 小时以内测定每只 450 mM 小井的吸附量。将试样及对照物的吸附值记录下来。

### 例 9

#### 用于扩增及检测分支杆菌核酸的方法 中的正面对照物载体的构建过程

将含有种特异性探针结合序列及其互补物的寡核苷酸（KY 178: [ SEQ ID NO: 24 ] - KY 181 [ SEQ ID NO: 27 ] 见下文）合成出来。（这些寡聚物在两端均含有限制性酶的识别位置以便于进行克隆）。将每种 KY 178 (SEQ ID NO: 24) 和 KY 179 (SEQ ID NO: 25) 各 1  $\mu$ g 或每种 KY 180 (SEQ ID NO: 26) 和 KY 181 (SEQ ID NO: 27) 各 1  $\mu$ g 混合在一起，并在 98  $^{\circ}$ C 下加热 5 分钟，然后在 75  $^{\circ}$ C 保温 1 小时，以使互补的股链退火。通过在 3% Nusieve (FMC 产品) / 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳以将退火过的产物从残余的单股寡聚物中分离出来。将双股产物的带切断并将 DNA 洗脱。然后用合适的限制性酶将 DNA 片段切断，并相互联接。如前所述，将结合产物与 Nusieve / 琼脂糖凝胶分离。

制备受体载体。该受体载体是一种质粒。在该质粒中已插入了含

有引物和探针结合位点的结核分支杆菌 16S rRNA 基因的片段并按下列方式制备。

在总反应体积 100  $\mu$ l 中，在 50 pmol CRO1 ( SEQ ID NO.29 )，80 pmol KY 70 ( SEQ ID NO. 28 )，各种 dNTP 20 nmol，2.5 单位 Taq 聚合酶和 1 X PCR 缓冲液 ( 50 mM Tris - HCl, pH 8.9; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ) 存在的情况下，用引物 KY 70 (SEQ ID NO.28) 和 CRO1 (SEQ ID NO.29) 将 50 微微克结核分支杆菌 DNA 扩增。热循环条件如例 2 中所述。用 100  $\mu$ l 氯仿萃取扩增产物。

用限制性核酸内切酶 Pst I 将扩增产物和载体 pBS ( + ) ( Stratagene ) 两者消化，然后用苯酚 / 氯仿萃取一次，然后用乙醇使其沉析。( CRO1 在 5' 一端含有一个 Pst I 位点，而扩增产物含有一个内 Pst I 位点，该位点位于分支杆菌特异性引物及探针的结合位点的下游。)，通过用小牛肠磷酸酶 (Maniatis) 进行处理使 Pst I 切割载体脱去磷酸，用苯酚 / 氯仿萃取，并用乙醇将其沉析。在标准条件 (Maniatis) 下将制成的扩增产物与载体连接。

将结合好的 DNA 转移到感受态大肠杆菌中。通过按下文所述的与结核 - 特异性探针 KY 21 ( SEQ ID NO.5 ) 进行菌落印迹杂交，识别出携带含有所需嵌段的质粒的菌落。使细菌在硝基纤维过滤盘上形成条纹并生长一整夜并将该过滤盘放在营养琼脂板上。将滤物取下并依次用 10% SDS ( 3 分钟 )，0.5 M NaOH / 1.5 M NaCl ( 5 分钟 ) 0.5 M Tris - HCl, pH 8 / 1.5 M NaCl ( 5 分钟 ) 以及 2 X SSC ( 5 分钟 ) 放在浸泡过的 3 MM 过滤纸上 ( 细菌朝上 )。将滤物吹干。通过紫外照射将该 DNA 交联到该滤物上，然后与 KY 21 (SEQ ID NO:5) 杂交并按例 3 中所述进行冲洗。

寡核苷酸序列：

KY 70 - SEQ ID NO.28

5' GCGGTACCTG CACACAGGCC ACAAGGGAA

CRO1 - SEQ ID NO.29

5' CGCCTGCAGT TAACACATGC AAGTCGAACGG

用限制性酶 Sty I 和 Xho I, 切断这种载体 ( 用 pKY 5 表示), 从而除去含有种特异性探针结合位点的 174 bp 片段而不触动该引物及属特异性探针结合位点。通过在 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶上进行电泳切割质粒与 174 bp 片段分离。将含有载体的带, 从凝胶上割开, 并通过在 NACS 柱 ( Bethesda Research Lab ) 上进行色谱法提取, 并在乙醇中沉析而将其提纯。将含有种特异性探针识别终点的嵌入片段与所制成的载体相连。将结合产物转移到感受态宿主细菌中。

通过 PCR 扩增识别出含有适当嵌段的转化体。将转化细菌菌落悬浮在 0.5 ml TE 缓冲溶液中。将 50  $\mu$ l 的细菌悬浮液放在含有分支杆菌 DNA 扩增所必需的组分的 PCR 反应管中, 并按前面所述方法进行扩增过程。利用引物对 KY 18 ( SEQ ID NO.1 ) 和 KY 75 ( SEQ ID NO.2 ), 将使携带质粒 ( 其中含有所需的嵌段 ) 的细菌产生 640 bp PCR 产物。含有原始 pKY 5 质粒的细菌的扩增将产生 584 bp PCR 产物。

通过前面例 4 中所述的反向斑点印迹杂交工艺, 可以将由此产生的扩增体与分支杆菌属一特异性及种特异性探针杂交, 从而证实存在本实施例中所述的属特异性及种特异性探针的杂交位点。采用类似方法可以制得正面对照质粒, 从而供与属探针及一精选组的种特异性

探针的杂交使用。在药盒中，例如除了应包括含有序列 KY 178 - KY 181 ( SEQ ID NOS. 24 - 27 ) 的正面对照质粒以外，它还可以包括用于区别结核病菌与其它菌种的正面对照质粒。

寡核苷酸序列：

KY178 - SEQ. ID NO.24

5'	CCATCGATAG	GACCATTCTG	CGCATGTGGT
	TAGGACCACA	GGACACATGA	AGGCTCACTT
	CACTTGGCGC	ATGCCTTGTG	GTGGAAAGCT

KY179 - SEQ. ID NO.25

5'	TGCCTTGGAA	GCTTTCCACC	ACAAGGCATG
	CAACCCACAA	AGTGAGCCTT	CATGTGTCCT
	ACCCACCACA	CCACATGCGC	AGAATGGTCC

KY180 - SEQ. ID NO.26

5'	CCGCTCGAGA	CGGGATGCAT	GTCTTGTGGT
	CTTTAGGCGC	ATGTCTTTAG	GTGGAAAGCT
	CTGGTGGAAA	GCTTTTGCAT	CGATGG3'

KY181 - SEQ. ID NO.27

5'	CCATCGATGC	AAAAGCTTTC	CACCAGAAGA
	TTCCACCTAA	AGACATGCGC	CTAAAGTTAC
	CAAGACATGC	ATCCCGTCTC	GAGCGG3'

### 例 10

#### 正面对照质粒的用途

正面对照质粒的一种用途是用来监测任何特异实验中的扩增效率。在这类使用中，制备该正面对照质粒的一系列稀释液。可以用已知拷贝数的质粒作为扩增反应中的模板，可以扩增的质粒 DNA 分子的最低数将作为该扩增反应的效率的测定结果。该正面对照质粒的另一种用途是用来产生一种产物，该产物可用来监测属和种特异性探针检测分支杆菌 DNA 的效果。上面所产生的扩增产物可以作为杂交反应中的基质。适当的杂交信号的产生可以使我们对该探针检测分支杆菌 DNA 的水平进行评价。

#### 序列表

##### — 对 SEQ ID NO:1: 的信息

###### (i) 序列特征:

- (A) 长度: 23 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单股
- (D) 拓扑学: 线性的

###### (ii) 分子类型: DNA ( 基因的 )

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

CACATGCAAG TCGAACGGAA AGG 23

— SEQ ID NO:2 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性的

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

GCCCGTATCG CCCGCACGCT CACA 24

— SEQ ID NO:3: 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性的

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

TCGCGTTGTT CGTGAAATCT CACGGCTTAA 30

(2) SEQ ID NO:4: 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性的

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

TCGCGTTGTT CGTGAAAAC T CACAGCTTAA 30

— SEQ ID NO:5: 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 36 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性的

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

ACGGGATGCA TGTCTTGTGG TGGAAAGCGC TTTAGC 36

— SEQ ID NO:6: 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学：线性的

(ii) 分子类型：DNA (基因的)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:6:

ACTTGGCGCA TGCCTTGTGG TGGAAAGCTT 30

(2) SEQ ID NO:7: 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度：30 碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单股

(D) 拓扑学：线性的

(ii) 分子类型：DNA (基因的)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:7:

TTTAGGCGCA TGTCTTAGG TGGAAAGCTT 30

— SEQ ID NO:8: 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度：34 碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单股

(D) 拓扑学：线性的

(ii) 分子类型：DNA (基因的)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:8:

TCAAGACGCA TGTCTTCTGG TGGAAAGCTTTTGC 34

— SEQ ID NO:9: 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 30 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单股
- (D) 拓扑学: 线性的

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

TCCCGAAGTG CAGGCCAGAT TGCCCACGTG 30

(2) SEQ ID NO:10: 的信息

(i) 序列特征

- (A) 长度: 30 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单股
- (D) 拓扑学: 线性的

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

GAAGGCTCAC TTTGTGGGTT GACGGTAGGT 30

SEQ ID NO:11: 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 30 碱基对
- (B) 类型: 核酸

- (C) 链型：单股
- (D) 拓扑学：线性的
- (ii) 分子类型：DNA (基因的)
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO:11:

GCAATCTGCC TGCACACCGG GATAAGCCTG 30

SEQ ID NO:12: 的信息

- (i) 序列特征
  - (A) 长度：34 碱基对
  - (B) 类型：核酸
  - (C) 链型：单股
  - (D) 拓扑学：线性的
- (ii) 分子类型：DNA (基因的)
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO:12:

GGGTCTAATA CCGAATAGGA CCACAGGACA CATG 34

(2) SEQ ID NO:13: 的信息

- (i) 序列特征：
  - (A) 长度：30 碱基对
  - (B) 类型：核酸
  - (C) 链型：单股
  - (D) 拓扑学：线性
- (ii) 分子类型：DNA (基因的)
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO:13

TCGCGTTGTT CGTGAAATCT CACAGCTTAA 30

— SEQ ID NO:14:的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

TCGCGTTGTT CGTGGAATCT CACAGCTTAA 30

— SEQ ID NO:15: 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:15:

TCGCGTTGTT CGTGGAATGC CACAGCTTAA 30

— SEQ ID NO:16: 信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:16:

ATAGGACCAT TCTGCCATG TGGTGTGGTG 30

— SEQ ID NO:17: 信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:17:

ACCTCAAGAC GCATGTCTTC TGGT 24

— SEQ ID NO:18: 资料

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:18:

CCGAATAGGA CCACAGGACA CATG 24

— SEQ ID NO:19: 信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:19:

ACCTTTAGGC GCATGTCTTT AGGT

— SEQ ID NO:20: 信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:20:

AACACTTGGC GCATGCCTTG TGGT 24

— SEQ ID NO:21: 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:21:

GAAGGCTCAC TTTGTGGGTT GACG 24

— SEQ ID NO:22: 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:22:

TGTGGTGGAA AGCGCTTTAG CGGT 24

— SEQ ID NO:23: 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 碱基对

(B) 类型: 核酸

- (C) 链型：单股
- (D) 拓扑学：线性
- (ii) 分子类型：DNA (基因的)
- (xi) 序列描述：SEQ ID NO:23:  
AGGACCATTC TGCGCATGTG GTGT 24

— SEQ ID NO:24: 的信息

- (i) 序列特征：
  - (A) 长度：139 碱基对
  - (B) 类型：核酸
  - (C) 链型：单股
  - (D) 拓扑学：线性
- (ii) 分子类型：DNA (基因的)
- (xi) 序列特征：SEQ ID NO:24:  
CCATCGATAG GACCATTCTG CGCATGTGGT GTGGTGGGTC  
TAATACCGAA TAGGACCACA 60  
GGACACATGA AGGCTCACTT TGTGGGTTGA CGGTAGGTAA  
CACTTGGCGC ATGCCTTGTG 120  
GTGGAAAGCT TCCAAGGCA 139

— SEQ ID NO:25: 信息

- (i) 序列特征：
  - (A) 长度：139 碱基对
  - (B) 类型：核酸

(C) 链型：单股

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：DNA (基因的)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:25:

```
TGCCTTGGA  GCTTCCACC  ACAAGGCATG  CGCCAAGTGT  TACCTACCGT  CAACCCACAA  60
AGTGAGCCTT  CATGTGTCCT  GTGGTCCTAT  TCGGTATTAG  ACCCACCACA  CCACATGCGC  120
AGAATGGTCC  TATCGATGG                                     139
```

— SEQ ID NO:26: 信息

(i) 序列特征:

(A) 长度：126 碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单股

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：DNA (基因的)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:26:

```
CCGCTCGAGA  CGGGATGCAT  GTCTTGTTGGT  GGAAAGCGCT  TTAGCGGTAA  CTTTAGGCGC  60
ATGTCTTTAG  GTGGAAAGCT  TAACTCAAGA  CGCATGTCTT  CTGGTGGAAA  GCTTTTGCAT  120
CGATGG                                             126
```

— SEQ ID NO:27: 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度：126 碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单股

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：DNA (基因的)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:27:

CCATCGATGC AAAAGCTTTC CACCAGAAGA CATGCGTCTT GAGTTAAGCT TTCCACCTAA 60  
AGACATGCGC CTAAAGTTAC CGCTAAAGCG CTTTCCACCA CAAGACATGC ATCCCGTCTC 120

GAGCGG 126

—SEQ ID NO:28: 的信息

(i) 序列特征：

(A) 长度：29 碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单股

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型：DNA (基因的)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:28:

GCGGTACCTG CACACAGGCC ACAAGGGAA 29

—SEQ ID NO:29: 的信息

(i) 序列特征：

(A) 长度：31 碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单股

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子类型: DNA (基因的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:29:

CGCCTGCAGTTAACACATGC AAGTCGAACGG 31

# 说 明 书 附 图

图 1

