



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112646902 A

(43) 申请公布日 2021. 04. 13

(21) 申请号 202011553226.6

(22) 申请日 2020.12.24

(71) 申请人 山西大学

地址 030006 山西省太原市小店区坞城路
92号

(72) 发明人 杨秀清 徐现

(74) 专利代理机构 太原申立德知识产权代理事
务所(特殊普通合伙) 14115

代理人 郭海燕

(51) Int. Cl.

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

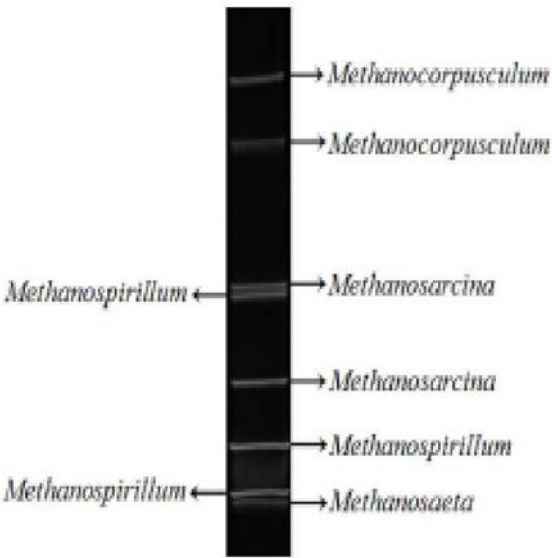
权利要求书2页 说明书7页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一种古菌快速检测的试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明属于微生物分子生态学检测领域,具体是一种古菌快速检测的试剂盒及方法。针对目前实时荧光定量PCR和高通量测序探究不同环境下古菌群落的丰度、多样性、组成和结构存在的问题,本发明一种用于古菌快速检测的试剂盒,包括引物组和DNA片段,PCR缓冲液和STE缓冲液。此外,本发明利用DGGE技术快速检测古菌,实验成本低,操作简便,同时具备特异性强,在实验室易普及,不依赖大型实验设备等优势。为一种高效、快速、经济、便捷的检测方法。



1. 一种用于古菌快速检测的引物组及DNA片段,其特征在于,所述引物组包括序列如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3所示的引物;所述DNA片段包括序列如SEQ ID NO:4-11所示的片段。

2. 根据权利要求1所述的一种用于古菌快速检测的引物组及DNA片段,其特征在于:所述引物组及DNA片段是通过化学合成的核苷酸片段。

3. 一种权利要求1所述的用于古菌快速检测的试剂盒,其特征在于,包括:权利要求1所述的引物组和DNA片段,PCR缓冲液,STE缓冲液。

4. 根据权利要求3所述的一种用于古菌快速检测的试剂盒,其特征在于:所述PCR缓冲液包括5 μ l 10 $\times$ Easy Taq Buffer,4 μ l 10mmol/L dNTPs,1 μ l上游引物,1 μ l下游引物,1 μ l Taq酶,1.5 μ l DNA片段,36.5 μ l ddH₂O。

5. 根据权利要求3所述的一种用于古菌快速检测的试剂盒,其特征在于:所述STE缓冲液是由0.584g的NaCl、0.12g的Tris和0.37g的EDTA溶解于100ml的双重蒸馏水配制而成的。

6. 一种权利要求1-5任一项所述的古菌快速检测的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1,提取样品微生物基因组总DNA;

步骤2,分别以超纯水、化学合成的DNA片段及样品微生物基因组总DNA为模板进行PCR扩增,超纯水扩增产物作为待测样品的阴性对照,DNA片段扩增产物作为待测样品的标准;样品PCR扩增产物作为DGGE检测的待测样品;

步骤3,对标准和待测样品进行DGGE检测;

步骤4,DGGE检测完毕后,将含有化学合成的DNA片段及待测样品的凝胶放入2.5 $\times$ 4S Red Plus染液中染色15分钟,拍照进行分析对比,当待测样品某一条带与标准条带在DGGE凝胶上处于同一水平位置时,说明待测样品中含有标准条带所示古菌;当待测样品没有条带或条带与标准条带在DGGE凝胶上不处于同一水平位置时,说明待测样品没有对应的古菌。

7. 根据权利要求6所述的一种古菌快速检测的方法,其特征在于,所述步骤1中样品微生物基因组总DNA提取的步骤如下:

(1) 用STE缓冲液浸泡样品后,再用0.22 μ m滤膜过滤样品,后将保留微生物的滤膜保存于-20 $^{\circ}$ C;

(2) 用STE缓冲液洗涤滤膜获得滤液,再12000rpm离心1min;

(3) 沉淀中加入STE缓冲液300 μ l、溶菌酶30 μ l,用移液器吹洗混匀,在37 $^{\circ}$ C下恒温水浴3.5h;

(4) 继续加入SDS35 μ l、Proteinase K5 μ l,在55 $^{\circ}$ C下恒温水浴2.5h,完成后取出,冷却至室温,加入NaCl170 μ l;

(5) 加入450 μ l DNA提取酚试剂,混匀,12000rpm离心10min,取上清液;

(6) 加入等体积的体积比为25:24:1的苯酚-氯仿-异戊醇抽提,12000rpm离心10min,取上清液,重复一次;

(7) 加入2倍体积的异丙醇使DNA沉淀,静置后弃掉上清液,取沉淀;

(8) 用75%乙醇溶液洗涤沉淀,吹洗,静置2分钟后吸出乙醇;

(9) 加入40 μ l ddH₂O、2 μ l RNA酶,在55 $^{\circ}$ C下水浴30min,放入4 $^{\circ}$ C恒温箱内保存过夜,待用。

8. 根据权利要求6所述的一种古菌快速检测的方法,其特征在于,所述步骤3中DEGG检

测为:选择8%的聚丙烯酰胺凝胶,胶变性范围为40%-60%,梯度混合制胶;电泳液温度上升至55℃时,先220V恒压预电泳5min,用50μL微量进样器快速上样,上样量为30μl;在55℃,85V条件下恒温恒压电泳8h。

一种古菌快速检测的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物分子生态学检测领域,涉及环境微生物群落检测相关的凝胶电泳(DGGE)技术,具体是一种古菌快速检测的试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 古菌是生命的第三种形式,蕴含着生命演化早期的信息。古菌广泛分布于地球上的各种环境(包括极端自然环境),遗传与代谢多样性极为丰富,是元素生物地球化学循环的重要驱动者。同时,古菌及其代谢产物也展现出了独特的生物技术开发潜能。

[0003] 产甲烷细菌是一种很特殊的生物类群,属于古细菌。这类细菌具有特殊的产能代谢功能,它可以利用有机或无机物作为底物,在厌氧条件下转化形成甲烷。产甲烷细菌也在自然界碳素物质循环动态平衡中具有重要意义。产甲烷细菌可以生活在各种厌氧环境中,甚至一些极端的环境中,这些适应性是长期进化的结果,它存在于有机废弃物的处理,沼气发酵的有机物中,沼泽,湖泊,海洋沉淀物,以及高浓度有机废水处理中等等。同时,古菌具有丰富的代谢多样性。因此,古菌被认为在驱动元素的生物地球化学循环中发挥着重要的作用。另一方面,由于多为极端微生物,古菌及其代谢产物具有潜在的生物技术开发价值。

[0004] 现在多采用实时荧光定量PCR和高通量测序探究不同环境下古菌群落的丰度、多样性、组成和结构,实时荧光定量PCR检测古菌受制于:所需试剂价格昂贵,实验使用次数少,无法做到批量检测鉴定古菌。基因测序虽然操作简便,但存在的问题是测序成本贵,测序错误率高,同时依赖大型科研仪器与专业的生物信息分析人员,并且检测周期也比较长。

发明内容

[0005] 针对上述问题本发明提供了一种古菌快速检测的试剂盒及方法。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用了下列技术方案:

[0007] 本发明提供一种用于古菌快速检测的引物组及DNA片段,所述引物组成员的序列如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3所示;所述DNA片段序列如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11所示。

[0008] 进一步,所述引物组及DNA片段是通过化学合成的核苷酸片段。

[0009] 本发明提供一种用于古菌快速检测的试剂盒,包括:上述引物组和DNA片段,PCR缓冲液,STE缓冲液。

[0010] 进一步,所述PCR缓冲液包括5 μ l 10 $\times$ Easy Taq Buffer,4 μ l 10mmol/L dNTPs,1 μ l上游引物,1 μ l下游引物,1 μ l Taq酶,1.5 μ l微生物基因组DNA,36.5 μ l dd H₂O。

[0011] 所述STE缓冲液是由0.584g的NaCl、0.12g的Tris和0.37g的EDTA溶解于100ml的双重蒸馏水配制而成的。

[0012] 本发明提供一种古菌快速检测的方法,包括以下步骤:

[0013] 步骤1,提取样品微生物基因组总DNA;

[0014] 步骤2,分别以超纯水、化学合成的DNA片段及样品微生物基因组总DNA为模板进行PCR扩增,超纯水扩增产物作为待测样品的阴性对照,DNA片段扩增产物作为待测样品的标准;样品PCR扩增产物作为DGGE分析检测的待测样品;

[0015] 步骤3,对标准和待测样品进行DGGE检测;

[0016] 步骤4,DGGE检测完毕后,将含有化学合成的DNA片段及待测样品的凝胶放入2.5×4S Red Plus染液中染色15分钟,拍照进行分析对比,当待测样品某一条带与标准条带在DGGE凝胶上处于同一水平位置时,说明待测样品中含有标准条带所示古菌;当待测样品没有条带或条带与标准条带在DGGE凝胶上不处于同一水平位置时,说明待测样品没有对应的古菌。

[0017] 进一步,所述步骤1中样品微生物基因组总DNA提取的步骤如下:

[0018] (1) 用STE缓冲液浸泡样品后,再用0.22μm滤膜过滤样品,后将保留微生物的滤膜保存于-20℃;

[0019] (2) 用STE缓冲液洗涤滤膜获得滤液,再12000rpm离心1min;

[0020] (3) 沉淀中加入STE缓冲液300μl、溶菌酶30μl,用移液器吹洗混匀,在37℃下恒温水浴3.5h;

[0021] (4) 继续加入SDS35μl、Proteinase K5μl,在55℃下恒温水浴2.5h,完成后取出,冷却至室温,加入NaCl70μl;

[0022] (5) 加入450μl DNA提取酚试剂,混匀,12000rpm离心10min,取上清液;

[0023] (6) 加入等体积的体积比为25:24:1的苯酚-氯仿-异戊醇抽提,12000rpm离心10min,取上清液,重复一次;

[0024] (7) 加入2倍体积的异丙醇使DNA沉淀,静置后弃掉上清液,取沉淀;

[0025] (8) 用75%乙醇溶液洗涤沉淀,吹洗,静置2分钟后吸出乙醇;

[0026] (9) 加入40μl ddH₂O、2μl RNA酶,在55℃下水浴30min,放入4℃恒温箱内保存过夜,待用。

[0027] 所述步骤3中DEGG检测为:选择8%的聚丙烯酰胺凝胶,胶变性范围为40%-60%,梯度混合制胶;电泳液温度上升至60℃时,先220V恒压预电泳5min,用50μL微量进样器快速上样,上样量为30μl;在60℃,85V条件下恒温恒压电泳8h。

[0028] 与现有技术相比本发明具有以下优点:

[0029] 本发明利用DGGE技术,实验成本低,操作简便,同时具备特异性强,在实验室易普及,不依赖大型实验设备等优势。为一种高效、快速、经济、便捷的检测方法。

附图说明

[0030] 图1为实施例1的检测结果图。

[0031] 图2为实施例2的检测结果图。

[0032] 图3为实施例3的检测结果图。

[0033] 图中M代表化学合成的古菌的DNA标准分子片段。

具体实施方式

[0034] 下面结合本发明实施例和附图,对本发明实施例中的技术方案进行具体、详细的说明。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干变型和改进,这些也应视为属于本发明的保护范围。

[0035] 实施例1

[0036] 1.通过化学合成用于古菌快速检测的引物组及DNA片段。

[0037] 其中,引物组成员序列为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3所示的序列;所有DNA片段序列为SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10所示的序列。

[0038] 2.对化学合成的DNA片段分别利用引物对SEQ ID NO:1(上游引物)/SEQ ID NO:3(下游引物)进行PCR扩增,扩增产物作为待测样品的标准。

[0039] PCR反应体系为:10*EasyTaq Buffer:5 μ L,dNTPs (2,5mM):4 μ L,上游引物(10 μ mol/L):1 μ L,下游引物(10 μ mol/L):1 μ L,EasyTaq DNA Polymerase:1 μ L,模板DNA(化学合成的DNA片段):1 μ L,ddH₂O:37 μ L;

[0040] PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,45 $\sim$ 55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10min,12 $^{\circ}$ C 保存。

[0041] 3.对作为标准的DNA片段进行DGGE检测及验证:

[0042] 选择浓度为8%聚丙烯酰胺凝胶,胶变性范围为40%~60%,取40%、60%胶各16ml,分别加入50 μ L的TEMED及40 μ L的10%过硫酸铵,梯度混合制胶,凝胶时间至少3h;加样前,将电泳液温度上升至55 $^{\circ}$ C时,后220V预电泳5min,PCR扩增产物上样量为30 μ L,后于55 $^{\circ}$ C、85V条件下电泳8h;电泳完毕后,将胶放入2.5 $\times$ 4S Red Plus染液中染色15分钟,拍照观察,进行分析,见图1。

[0043] 实施例2

[0044] 检测某污水处理厂曝气池活性污泥古菌的方法:包括以下步骤:

[0045] 1.提取曝气池活性污泥微生物基因组总DNA

[0046] (1)将活性污泥用超纯水稀释溶解,用0.22 μ m滤膜进行抽滤,将带有微生物的滤膜放入EP管中,用STE缓冲液洗涤两次,再在12000rpm下离心1分钟。

[0047] (2)加入STE缓冲液300 μ L、溶菌酶30 μ L,用移液器吹洗混匀,在37 $^{\circ}$ C下恒温水浴3.5小时。

[0048] (3)加入SDS35 μ L、Proteinase K5 μ L,在55 $^{\circ}$ C下恒温水浴2.5小时。

[0049] (4)完成后取出,冷却至室温,加入NaCl 70 μ L。

[0050] (5)加入450 μ L DNA提取酚试剂,混匀10分钟,在12000rpm下离心10分钟,取上清液。

[0051] (6)加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(体积比为25:24:1)抽提,在12000rpm下离心10分钟,取上清液。重复一次。

[0052] (7)加入2倍体积的异丙醇使DNA沉淀,静置后弃掉上清液,取沉淀。

[0053] (8)用75%乙醇溶液洗涤沉淀两次,吹洗,静置2分钟后吸出乙醇。

[0054] (9)加入40 μ L的ddH₂O、2 μ L的RNA酶,在55 $^{\circ}$ C下水浴30分钟。

[0055] (10)将(9)所得物质放入4 $^{\circ}$ C恒温箱内保存过夜,用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,检测所提取基因组DNA的大小及完整性,备用。

[0056] 2.对超纯水,化学合成的DNA片段及曝气池活性污泥微生物总基因组DNA分别进行PCR扩增

[0057] 2.1对曝气池活性污泥提取的总基因组待检测片段的一次扩增

[0058] 以上一步得到的曝气池活性污泥中微生物总基因组DNA为模板,用引物对SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2对不同古菌的16S rRNA片段进行PCR扩增。PCR反应体系为50μl反应体系,反应条件参照环境古菌16S rRNA基因片段的一次PCR扩增。

[0059] 2.2 PCR扩增产物的检测和回收

[0060] 将上述一次扩增得到的PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,在紫外灯照射下切取扩增产物检测胶的相应条带,按照胶回收试剂盒对PCR产物进行回收。

[0061] 2.3提取的曝气池活性污泥中总基因组待检测片段的二次扩增

[0062] 以上述胶回收产物为模板,用引物对SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:2进行16SrRNA基因的二次扩增,PCR扩增体系及反应条件参照上述一次PCR扩增的条件。同时以超纯水、化学合成的DNA片段作为模板分别进行PCR扩增,分别作为阴性对照和标准。

[0063] 3.DGGE分析

[0064] 选择8%聚丙烯酰胺凝胶,胶变性范围为40%-60%,取40%、60%胶各15ml,分别加入50μl的TEMED及40μl的10%APS,梯度混合制胶。灌完后,轻轻插入梳子,室温下凝固3小时。待完全凝固后,拔掉梳子,将整个板子安装在DGGE支架上,将安有板子的DGGE支架放入电泳槽中,待电泳液温度上升至55℃时,先220V恒压预电泳5min,用50μl微量进样器快速上样,上样样品为超纯水、化学合成的DNA片段和曝气池活性污泥的二次PCR扩增产物,上样量为30μl。在55℃,85V条件下恒温恒压电泳8小时。电泳完毕,将胶放入2.5×4S Red Plus染液中染色15分钟,然后用紫色托盘放入紫外分析仪中拍照,由图2结果可得在该污水处理厂中,曝气池活性污泥富含Methanocorpusculum、Methanospirillum、Methanosarcina和Methanospirillum这四类古菌。

[0065] 实施例3

[0066] 检测农村沼气池沉淀物中古菌的方法:包括以下步骤:

[0067] 1.提取沼气池沉淀物中微生物基因组总DNA

[0068] 1.1 DNA提取

[0069] (1)将沼气池中固液样品用超纯水稀释,后用0.22μm滤膜进行抽滤,将带有古菌微生物的滤膜放入EP管中,用STE缓冲液洗涤两次,再在12000rpm下离心1分钟。

[0070] (2)加入STE缓冲液300μl、溶菌酶30μl,用移液器吹洗混匀,在37℃下恒温水浴3.5小时。

[0071] (3)加入SDS35μl、Proteinase K5μl,在55℃下恒温水浴2.5小时。

[0072] (4)完成后取出,冷却至室温,加入NaCl 70μl。

[0073] (5)加入450μlDNA提取酚试剂,混匀10分钟,在12000rpm下离心10分钟,取上清液。

[0074] (6)加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(体积比为25:24:1)抽提,在12000rpm下离心10分钟,取上清液。重复一次。

[0075] (7)加入2倍体积的异丙醇使DNA沉淀,静置后弃掉上清液,取沉淀。

[0076] (8)用75%乙醇溶液洗涤沉淀两次,吹洗,静置2分钟后吸出乙醇。

[0077] (9)加入40μl的ddH₂O、2μl的RNA酶,在55℃下水浴30分钟。

[0078] (10) 将(9)所得物质放入4℃恒温箱内保存过夜,用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,检测所提取基因组DNA的大小及完整性,备用。

[0079] 2.对超纯水,化学合成DNA片段及沼气池古菌微生物总基因组DNA分别进行PCR扩增

[0080] 2.1对沼气池沉淀物微生物总基因组待检测片段的一次扩增

[0081] 以上一步得到的微生物总基因组DNA为模板,用引物对SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2对不同古菌的16S rRNA片段进行PCR扩增。PCR反应体系为50μl反应体系,反应条件参照环境古菌16S rRNA基因片段的一次PCR扩增。

[0082] 2.2PCR扩增产物的检测和回收

[0083] 将上述一次扩增得到的PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,在紫外灯照射下切取扩增产物检测胶的相应条带,按照胶回收试剂盒对PCR产物进行回收。

[0084] 2.3沼气池沉淀物微生物中提取的总基因组待检测片段的二次扩增

[0085] 以上述胶回收产物为模板,用引物对SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:2进行不同古菌16SrRNA基因的二次扩增,PCR扩增体系及反应条件参照上述一次PCR扩增的条件。同时以超纯水、化学合成的DNA片段作为模板分别进行PCR扩增,分别作为阴性对照和标准。

[0086] 3.DGGE分析

[0087] 选择8%聚丙烯酰胺凝胶,胶变性范围为40%-60%,取40%、60%胶各15ml,分别加入50μl的TEMED及40μl的10%APS,梯度混合制胶。灌完后,轻轻插入梳子,室温下凝固3小时。待完全凝固后,拔掉梳子,将整个板子安装在DGGE支架上,将安有板子的DGGE支架放入电泳槽中,待电泳液温度上升至55℃时,先220V恒压预电泳5min,用50μl微量进样器快速上样,上样样品种为超纯水、化学合成的DNA片段和沼气池古菌微生物的二次PCR扩增产物,上样量为30μl。在55℃,85V条件下恒温恒压电泳8小时。电泳完毕,将胶放入2.5×4S Red Plus染液中染色15分钟,然后用紫色托盘放入紫外分析仪中拍照(如图3)。由结果可得在该沼气池沉淀物检测中富含Methanocorpusculum、Methanosarcina、Methanospirillum和Methanosarcina这四类古菌。

[0088] 序列表

[0089] SEQ ID NO:1

[0090] ccctacggggcgagcagcag

[0091] SEQ ID NO:2

[0092] ggattacaagattttcac

[0093] SEQ ID NO:3

[0094] cgccccgcgcgcggcgggcgggcgggggcacggggggggattacaagattttcac

[0095] SEQ ID NO:4

[0096] ccctacggggcgagcagcagcgcgcaaactttacaatgcgagcaatcgtgataaggaaaccctgagtgccgtgctgatgcaggctgttcatatatctaaatcatatgtgaagaaagggcagggaagaccgggtgccagccgcgcggtgtaataccggctgctcgagtgatggccactattactgggttttaagcgtagcttgactgttaggtctcttgggaaatcttcacgctcaacgtgaaggcgtctaagagataccggcagtccttggaactgggagaggtaaaccgtacttcgggggtaggagtgaaatcttgtaatcc

[0097] SEQ ID NO:5

[0098] ccctacggggcgccagcaggcgcgcaaaactttacaatgcgagcaatcgtgataaggaaaccctgagtgc
ctgtcgatgcaggctgttcatatatctaaatcatatgtgaagaaagggcagggaagaccggtgccagccgcccgcg
gtaataccggctgctcgagtgatggccactattactgggtttaaagcgccgtagcttgactgttaggtctcttgg
gaaatcttcacgctcaacgtgaaggcgtctaagagataccggcagtccttggaaactgggagaggtaaaccgtacttc
gggggtaggagtgaaatcttgtaatcc

[0099] SEQ ID NO:6

[0100] ccctacggggcgccagcaggcgcgaaaactttacaatgcgggaaaccgtgataaggggacaccgagtgc
cagcatcatatgctggctgtccgggtgtgtaaaatacacctgttagcaagggccgggcaagaccggtgccagccgc
cgcggtaacaccggcgcccgagtggtgatcgatgattattgggtctaaagggccgtagccggtttgggtcagtcct
ccgggaaatctgatagctcaactattaggctttcgggggatactgccagacttggaaccgggagaggttaagaggta
ctacaggggtaggagtgaaatcttgtaatcc

[0101] SEQ ID NO:7

[0102] ccctacggggcgccagcaggcgcgaaaactttaccatgcgggcaaccgtgataaggaaaccccgagtgc
cagcacaggctggctgtccaccagtgtaaataactgggtgaagaaagggccgggcaagaccggtgccagccgcccgcg
gtaataccggcggtcgagtgggtggccgctattactgggtctaaagggccgtagctggatatacaagtccttga
gaaatccgccggttaaccggtgggcgttcaggggaaactgtatttctagggaccgggagaggtgagaggtactgc
cggggtaggagtgaaatcttgtaatcc

[0103] SEQ ID NO:8

[0104] ccctacggggcgccagcaggcgcgaaaactttacaatgcgggaaaccgtgataaggggacaccgagtgc
cagcatcatatgctggctgtccgggtgtgtaaaatacacctgttagcaagggccgggcaagaccggtgccagccgc
cgcggtaacaccggcgcccgagtggtgatcgatgattattgggtctaaagggccgtagccggtttgggtcagtcct
ccgggaaatctgatagctcaactattaggctttcgggggatactgccagacttggaaccgggagaggttaagaggta
ctacaggggtaggagtgaaatcttgtaatcc

[0105] SEQ ID NO:9

[0106] gcctacggggcgccagcaggcgcgaaaactttaacatgcgggcaaccgtgataaggaaaccccgagtgc
cagcacaggctggctgtccaccagtgtaaataactgggtgaagaaagggccgggcaagaccggtgccagccgcccgcg
gtaataccggcggtcgagtgggtggccactattactgggtctaaagggccgtagcttgatgcaagtcctttga
gaaatccgccggttaactgggtgggcgttcaggggaaactgcatttctagggaccgggagaggtgagaggtactgc
cggggtaggagtgaaatcttgtaatcc

[0107] SEQ ID NO:10

[0108] gcctacggggcgccagcaggcgcgaaaactttaacatgcgggcaaccgtgataaggaaaccccgagtgc
cagcacaggctggctgtccaccagtgtaaataactgggtgaagaaagggccgggcaagaccggtgccagccgcccgcg
gtaataccggcggtcgagtgggtggccactattactgggtctaaagggccgtagcttgatgcaagtcctttga
gaaatccgccggttaactgggtgggcgttcaggggaaactgcatttctagggaccgggagaggtgagaggtactgc
cggggtaggagtgaaatcttgtaatcc

[0109] SEQ ID NO:11

[0110] ccctacgggggtgcagcaggcgcgaaacctttacaatacgggaaaccgtgataagggaatctcgagtgc
cagcatacaatgttggctgtccagatgcctaaaaagcatctgttagcaagggccgggcaagaccggtgccagccgc
cgcggtaacaccggcgcccgagtggttaaccgctattattgggtctaaagggctctgtagccggccaagtaagtccc

ttgggaaatctggcagcttaactgtcaggctgccaggggatactgtttggcttgggaccgggagaggtgagaggtta
cctcaagggtagggtgaaatcttgtgatcc

序列表

<110> 山西大学

<120> 一种古菌快速检测的试剂盒及方法

<160> 11

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

ccctacgggg cgcagcag 18

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

ggattacaag atttcac 17

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

cgccccccgc gcgcggcggg cggggcgggg gcacgggggg ggattacaag atttcac 57

<210> 4

<211> 323

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

ccctacgggg cgcagcaggc gcgcaaactt tacaatgcga gcaatcgtga taaggaaacc 60

ctgagtgcct gtcgatgcag gctgttcata tatctaaatc atatgtgaag aaagggcagg 120

gcaagaccgg tgccagccgc cgcggtaata ccggctgctc gaggatggc cactattact 180

gggttttaaag cgtccgtagc ttgactgtta ggtctcttgg gaaatcttca cgctcaacgt 240

gaaggcgtct aagagatacc ggcagtcttg gaactgggag aggtaaaccg tacttcgggg 300

gtaggagtga aatcttgtaa tcc 323

<210> 5

<211> 323

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

ccctacgggg cgcagcaggc gcgcaaactt tacaatgcga gcaatcgtga taaggaaacc 60
ctgagtgcct gtcgatgcag gctgttcata tatctaaatc atatgtgaag aaagggcagg 120
gcaagaccgg tgccagccgc cgcggtaata ccggctgctc gagtgatggc cactattact 180
gggtttaaag cgtccgtagc ttgactgtta ggtctcttgg gaaatcttca cgctcaacgt 240
gaaggcgtct aagagatacc ggcagtcttg gaactgggag aggtaaaccg tacttcgggg 300
gtaggagtga aatcttgtaa tcc 323

<210> 6

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

ccctacgggg cgcagcaggc gcgaaaactt tacaatgcgg gaaaccgtga taaggggaca 60
ccgagtgcc aatcatatg ctggctgtcc ggggtgtgta aatacacctg ttagcaagg 120
ccgggcaaga ccggtgccag ccgccgcggt aacaccggcg gcccgagtgg tgatcgtgat 180
tattgggtct aaaggggccg tagccggttt ggtcagtcct ccgggaaatc tgatagctca 240
actattaggc tttcggggga tactgccaga cttggaaccg ggagaggtaa gaggtactac 300
aggggtagga gtgaaatctt gtaatcc 327

<210> 7

<211> 323

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

ccctacgggg cgcagcaggc gcgaaaactt taccatgcgg gaaaccgtga taaggaaacc 60
ccgagtgcc gcacaggctg gctgtccacc agtgtaaata actggtgaag aaagggccgg 120
gcaagaccgg tgccagccgc cgcggtaata ccggcggctc gagtggtggc cgctattact 180
gggcttaaag ggtccgtagc tggatataca agtcccttga gaaatccgcc ggcttaaccg 240
gtgggcgttc aggggaaact gtatttctag ggaccgggag aggtgagagg tactgccggg 300
gtaggagtga aatcctgtaa tcc 323

<210> 8

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

ccctacgggg cgcagcaggc gcgaaaactt tacaatgcgg gaaaccgtga taaggggaca 60
ccgagtgcc gcatcatatg ctggctgtcc ggggtgtgta aatacacctg ttagcaagg 120
ccgggcaaga ccggtgccag ccgccgcggt aacaccggcg gcccgagtgg tgatcgtgat 180
tattgggtct aaaggggccg tagccggttt ggtcagtcct ccgggaaatc tgatagctca 240
actattaggc tttcggggga tactgccaga cttggaaccg ggagaggtaa gaggtactac 300

aggggtagga gtgaaatctt gtaatcc 327

<210> 9

<211> 323

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

gcctacgggg cgcagcaggc gcgaaaactt taacatgcgg gcaaccgtga taaggaaacc 60
ccgagtgccca gcacaggctg gctgtccacc agtgtaaata actggtgaag aaagggccgg 120
gcaagaccgg tgccagccgc cgcggtaata ccggcggctc gagtgggtggc cactattact 180
gggcttaaaag ggtccgtagc ttgatatgca agtcctttga gaaatccgcc ggcttaactg 240
gtgggcgttc aggggaaaact gcatttctag ggaccgggag aggtgagagg tactgccggg 300
gtaggagtga aatcctgtaa tcc 323

<210> 10

<211> 323

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

gcctacgggg cgcagcaggc gcgaaaactt taacatgcgg gcaaccgtga taaggaaacc 60
ccgagtgccca gcacaggctg gctgtccacc agtgtaaata actggtgaag aaagggccgg 120
gcaagaccgg tgccagccgc cgcggtaata ccggcggctc gagtgggtggc cactattact 180
gggcttaaaag ggtccgtagc ttgatatgca agtcctttga gaaatccgcc ggcttaactg 240
gtgggcgttc aggggaaaact gcatttctag ggaccgggag aggtgagagg tactgccggg 300
gtaggagtga aatcctgtaa tcc 323

<210> 11

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

ccctacgggg tgcagcaggc gcgaaacctt tacaatacgg gaaaccgtga taagggaatc 60
tcgagtgccca gcatacaatg ttggctgtcc agatgcctaa aaagcatctg ttagcaaggg 120
ccgggcaaga ccggtgccag ccgccgcggt aacaccggcg gcccgagtgg taaccgctat 180
tattgggtct aaagggtctg tagccggcca agtaagtccc ttgggaaatc tggcagctta 240
actgtcaggc tgccagggga tactgttttg cttgggaccg ggagaggtga gaggtacctc 300
aagggtaggg gtgaaatctt gtgatcc 327

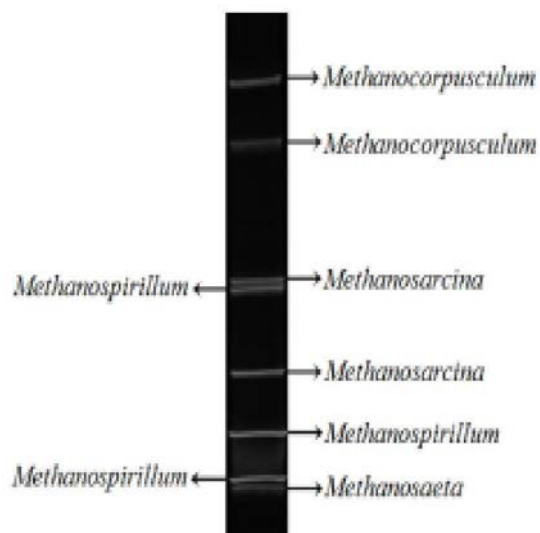


图1

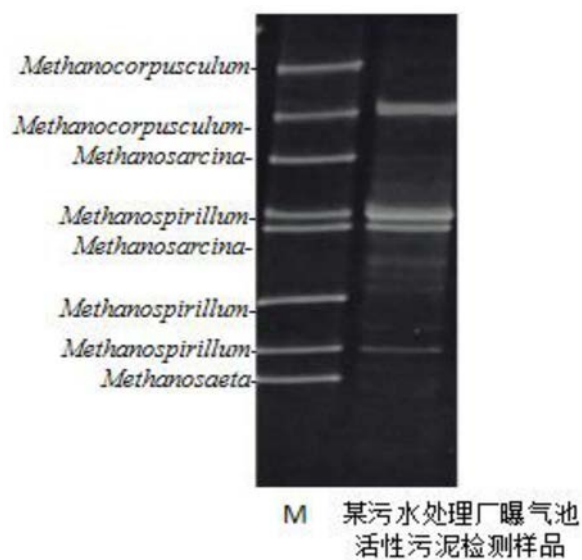


图2

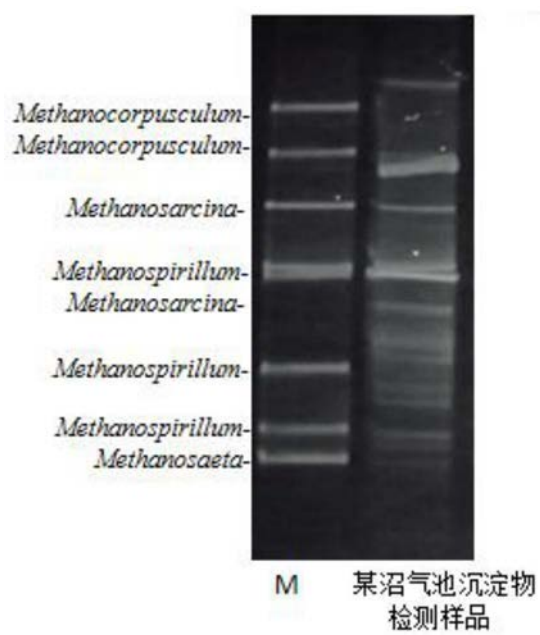


图3