



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104830842 B

(45)授权公告日 2018.06.22

(21)申请号 201310356707.1

CN 102421915 A, 2012.04.18,

(22)申请日 2013.08.15

Jurka J.等.U14568.1.《GenBank》.1994,第1页.

(65)同一申请的已公布的文献号

Benisio Ferreira da Silva Filho等.Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker of colorectal cancer.《Journal of clinical pathology》.2013,第66卷第776页左栏第1段至右栏第1段.

申请公布号 CN 104830842 A

(43)申请公布日 2015.08.12

(73)专利权人 侯彦强

地址 201620 上海市松江区南其昌路459弄35号301室

Naoyuki Umetani等.Prediction of Breast Tumor Progression by Integrity of Free Circulating DNA in Serum.《Journal of Clinical Oncology》.2006,第24卷(第26期),第4271页左栏第4段至右栏第3段.

(72)发明人 侯彦强 娄晓丽

陈建等.脑胶质瘤患者血清及脑脊液中游离DNA的检测.《中华实验外科杂志》.2012,第29卷(第7期),第1392页第2至5段.

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12Q 1/6844(2018.01)

审查员 程珂

(56)对比文件

CN 102732631 A, 2012.10.17,

US 5858658 A, 1999.01.12,

US 5858658 A, 1999.01.12,

US 7537889 B2, 2009.05.26,

权利要求书2页 说明书5页

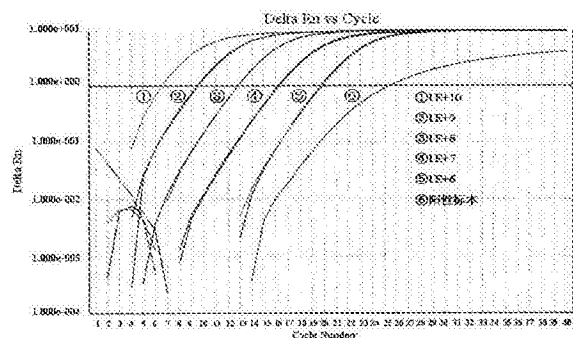
序列表5页 附图10页

(54)发明名称

人外周血循环DNA的引物组及定量检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及人外周血循环DNA的引物组及定量检测试剂盒,引物组由五组用于扩增Alu的特异性引物组成.引物组的配套标准品为含Alu保守基因序列的纯化质粒,标准品经过基因工程技术将Alu目的基因序列连接到质粒上,通过鉴定、扩增、提取和纯化获得,并通过260nm进行吸光度读取,进行浓度计算分析获得的DNA准确的拷贝数目,并通过稀释制备成不同浓度的标准品.本发明是一种基于定量核酸扩增的分子生物学方法,实时定量多聚酶链反应,通过使用特异性的引物扩增人外周血中循环DNA的保守基因Alu的不同片段,通过检测释放的荧光信号对人外周血中循环DNA进行定量检测。



CN 104830842 B

1. 人外周血循环DNA的引物组,其特征是,所述引物组由五对用于扩增Alu的特异性引物组成,分别针对Alu保守序列的不同长度片段;引物分别是:

- 第一对上游引物Alu1-F:5' -aga cca tcc tgg cta aca cg-3' ,
第一对下游引物Alu1-R:5' -aga cgg agt ctc gct ctg tc-3' ;
第二对上游引物Alu2-F:5' -cta aca cgg tga aac ccc g-3' ,
第二对下游引物Alu2-R:5' -cgc cca ggc tgg agt g-3' ;
第三对上游引物Alu3-F:5' -gtg aaa ccc cgt ctc tac taa aaa-3' ,
第三对下游引物Alu3-R:5' -gag tgc agt ggc gcg at-3' ;
第四对上游引物Alu4-F:5' -tac aaa aaa tta gcc ggg cg-3' ,
第四对下游引物Alu4-R:5' -gat ctc ggc tca ctg caa g-3' ;
第五对上游引物Alu5-F:5' -aaa att agc cgg gcg tg-3' ,
第五对下游引物Alu5-R:5' -gttcac gcc att ctc ctg c-3' .

2. 包含权利要求1所述引物组的定量检测人外周血循环DNA的试剂盒,其特征是包括以下试剂:

- 试剂A1:由5 μ M的第一对上游引物Alu1-F和5 μ M的第一对下游引物Alu1-R溶解于水;
试剂A2:由5 μ M的第二对上游引物Alu2-F和5 μ M的第二对下游引物Alu2-R溶解于水;
试剂A3:由5 μ M的第三对上游引物Alu3-F和5 μ M的第三对下游引物Alu3-R溶解于水;
试剂A4:由5 μ M的第四对上游引物Alu4-F和5 μ M的第四对下游引物Alu4-R溶解于水;
试剂A5:由5 μ M的第五对上游引物Alu5-F和5 μ M的第五对下游引物Alu5-R溶解于水;
试剂B:2 \times SYBR Green qPCR Mix,包含包括dATP、dCTP、dGTP和dTTP的400 μ M dNTPs、100mM KCl、4mM MgCl₂、0.2U/ μ l Taq DNA聚合酶和2 \times SYBR Green;
试剂C:ROX 50 \times 或者ROXII 50 \times ,避光保存;
试剂D:制备的标准品经过梯度稀释达到1 \times 10¹⁰、1 \times 10⁹、1 \times 10⁸、1 \times 10⁷和1 \times 10⁶拷贝/mL,用于标准曲线的制定;
试剂E:阴性对照,其为正常人血清;
试剂G:阳性对照,其为采用1 \times 10⁷拷贝/mL的标准品。

3. 根据权利要求2所述的定量检测人外周血循环DNA的试剂盒,其特征在于,所述标准品为

稀释成不同浓度的Alu基因片段SEQ ID NO.13的纯化质粒;所述纯化质粒的制备过程通过对Alu扩增后获得目的片段并连接PUC57载体;用SEQ ID NO.11和SEQ ID NO.12所释的引物对Alu进行扩增,获得Alu目的片段;其中,扩增程序为95 $^{\circ}$ C 2min;94 $^{\circ}$ C 20sec,55 $^{\circ}$ C 30sec,72 $^{\circ}$ C 30sec,共35个循环;扩增体系 包含400 μ M dATP、dCTP、dGTP、dTTP,100mM KCl,4mM MgCl₂,0.2U/ μ l Taq DNA聚合酶;Alu目的片段和PUC57质粒经过内切酶EcoRI和HindIII酶切,酶切反应体系如下:Alu PCR产物或者PUC57质粒10 μ L、10 \times R Buffer 2 μ L,EcoRI酶1 μ L,HindIII酶1 μ L,水6 μ L;将酶切反应体系在37 $^{\circ}$ C反应2小时以上,酶切产物经过PCR产物纯化柱纯化获得20 μ L纯化的酶切产物;纯化的酶切产物再经过T4连接酶22 $^{\circ}$ C反应12小时,连接反应体系:Alu酶切产物5 μ L、PUC57质粒酶切产物2 μ L、T4连接酶1 μ L、10 \times Buffer 1 μ L、水1 μ L;随后通过标准的基因工程技术,进行筛选、扩增和纯化,并通过对质粒进行DNA测序证实Alu已经被连接于质粒PUC57载体;对纯化质粒进行260nm的吸光度检测,

计算质粒的拷贝数。

人外周血循环DNA的引物组及定量检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术,是一种基于定量核酸扩增的分子生物学方法,特别涉及实时定量多聚酶链反应(real-time PCR),通过使用特异性的引物扩增人外周血中循环DNA的保守基因Alu的不同片段,通过检测释放的荧光信号对人外周血中循环DNA进行定量检测。

背景技术

[0002] 循环DNA(circulating DNA)又称游离DNA(cell-free DNA,cf-DNA)是一种存在于动植物和人的体液中的无细胞状态的胞外DNA。1977年,Leon等首先发现肿瘤患者血浆DNA含量明显增高,提出了监测外周血游离DNA水平在观察疗效、预测复发方面的作用(Leon SA,Shapino B,Skaaroff DM,et al.Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J].Cancer Res.1977,37(3):646)。“Suzuki N,Kamatagi A,Yamaki J,et al.Characterization of circulating DNA in healthy human plasma.Clin Chim Acta,2008,387(1-2):55-58”研究表明健康人循环DNA含量极微,约在5ug/L左右。文献“Mulcahy HE,Lyautey J,Lederrey C,et al.A prospective study of K-ras gene mutation in the plasma of pancreatic cancer patients[J].Clin Cancer Res,1998,4(2):271”、“Georg Göbel,Doris Auer,Inge Gaugg,et al.Prognostic significance of methylated RASSF1A and PITX2 genes in blood-and bone marrow plasma of breast cancer patients[J].Breast Cancer Res Treat,2011,130(8):109-117”和“Chan SL,Chan AK,Hui EP,et al.Quantitation of circulating methylated RASSF1A in prognostication and monitoring of treatment response in unresectable hepatocellular carcinoma fHCC).J Clin Oncol,2011,29(suppl):abstr 4058”记载,当机体处于肿瘤、自身免疫性疾病和炎症反应等情况下,体内循环DNA的含量会相应的增加,但其产生的机制至今仍不十分明确。目前循环DNA的血清学检测还不能直接用于疾病的早期诊断和疗效判断,但它与一些疾病的产生与发展有着密切的联系,因此检测循环DNA并对某些已知病种的特异性基因进行确定具有重要的临床意义,循环DNA将有可能成为颇具前景的疾病早期诊断和疗效判断的新型分子标志物。

[0003] 目前,国内外应用较多的定量检测方法可分为两大类:一是以聚合酶链反应(PCR)为基础的扩增方法,如甲基化特异性PCR法(methylation specific PCR,MSP)和实时荧光定量PCR法(real-time fluorescence quantitative PCR,RTFQ-PCR);二是信号放大技术检测方法,如支链DNA(branched DNA,bDNA)检测技术。过去几年中研究循环DNA浓度的研究者多采用基于定量PCR的分析方法,例如“Ellinger J,Müller DC,Müller SC,et al.Circulating mitochondrial DNA in serum:A universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies.Urol Oncol,2012,30(4):509-515”和“Huang Z,Hua D,Hu Y,etal.Quantitation of plasma circulating DNA using quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma.Pathol Oncol Res,2012,18(2):271-276”,高灵敏性的实时PCR方法为仅测量可被特异性扩增的DNA信号

提供了条件,可以检测皮克(pg)级的DNA。当然也有一些改进技术或联合应用技术可以更加精确地测定循环DNA的含量,但尚无统一的标准。

[0004] 随着分子生物学的飞速发展,分子检验技术已成为临床检验技术和病理诊断技术中最热门的技术方法,比如Real-time PCR技术在乙肝、丙肝和人乳头瘤病毒(HPV)以及乳腺癌、肺癌中的应用,为个体化诊治方案提供了坚实的理论基础。

发明内容

[0005] 本发明利用分子生物学Real-time PCR技术,基于Alu的可以作为人类DNA片段的特异性标记的基因序列特点(Alu是人类基因组中的一种中等重复序列,长约300bp,大约平均每隔6kb左右就有1个Alu序列,在哺乳动物内含量最丰富,同源性最高,因此其可以作为人类DNA片段的特异性标记),设计了Alu基因不同长度产物的引物,从中选取特异性高的5对上下游Real-time PCR的引物,采用荧光定量PCR的方法扩增了不同长度的Alu片段,同时建立了Alu的标准品,可以定量检测不同Alu片段的拷贝数,从而反映人体循环DNA的数量,本方法具有高特异性、高敏感性,能够建立良好的、统一的分子质控标准,能够弥补不同检测结果之间缺乏可比性等缺点,是一个很好的循环DNA检测方法。

[0006] 本发明的第一个目的是克服现有检测方法的标准化和质控手段不完善等缺点。

[0007] 本发明的第二个目的是提供Alu的保守序列作为检测人外周血循环DNA。

[0008] 本发明的第三个目的是提供5对不同长度PCR产物的Alu高特异性引物和Alu标准品。

[0009] 本发明的第四个目的是提供一种简便的人外周血循环DNA定量检测的试剂盒。

[0010] 本发明的技术方案如下:

[0011] 一组用于扩增Alu的特异性引物,分别针对Alu保守序列的不同长度片段。5对引物分别是Alu1-F(上游)、R(下游),Alu2-F(上游)、R(下游),Alu3-F(上游)、R(下游),Alu4-F(上游)、R(下游),Alu5-F(上游)、R(下游)。提供Alu的基因序列,作为检测的靶DNA片段,具有高度的保守性,同时提供5对引物的核酸序列。

[0012] 人外周血循环DNA的引物组,由五对用于扩增Alu的特异性引物组成,分别针对Alu保守序列的不同长度片段;引物分别是:

[0013] 第一对上游引物Alu1-F:5'-aga cca tcc tgg cta aca cg-3',

[0014] 第一对下游引物Alu1-R:5'-aga cgg agt ctc gct ctg tc-3';

[0015] 第二对上游引物Alu2-F:5'-cta aca cgg tga aac ccc g-3',

[0016] 第二对下游引物Alu2-R:5'-cgc cca ggc tgg agt g-3';

[0017] 第三对上游引物Alu3-F:5'-gtg aaa ccc cgt ctc tac taa aaa-3',

[0018] 第三对下游引物Alu3-R:5'-gag tgc agt ggc gcg at-3';

[0019] 第四对上游引物Alu4-F:5'-tac aaa aaa tta gcc ggg cg-3',

[0020] 第四对下游引物Alu4-R:5'-gat ctc ggc tca ctg caa g-3';

[0021] 第五对上游引物Alu5-F:5'-aaa att agc cgg gcg tg-3',

[0022] 第五对下游引物Alu5-R:5'-ggtt cac gcc att ctc ctg c-3'。

[0023] 一种检测人外周血循环DNA的试剂盒:

[0024] 试剂A1-A5:由5对针对Alu不同长度PCR产物的引物组成的5种溶液。

- [0025] A1-A5溶液分别包含5uM Alu1-F(上游)、5uM Alu1-R(下游),
- [0026] 5uM Alu2-F(上游)、5uM Alu2-R(下游),5uM Alu3-F(上游)、
- [0027] 5uM Alu3-R(下游),5uM Alu4-F(上游)、5uM Alu4-R(下游),
- [0028] 5uM Alu5-F(上游)、5uM Alu5-R(下游);
- [0029] 其中,
- [0030] 试剂A1:由第一对上游引物Alu1-F(5μM)、第一对下游引物Alu1-R(5μM),溶解于水;
- [0031] 试剂A2:由第二对上游引物Alu2-F(5μM)、第二对下游引物Alu2-R(5μM),溶解于水;
- [0032] 试剂A3:由第三对上游引物Alu3-F(5μM)、第三对下游引物Alu3-R(5μM),溶解于水;
- [0033] 试剂A4:由第四对上游引物Alu4-F(5μM)、第四对下游引物Alu4-R(5μM),溶解于水;
- [0034] 试剂A5:由第五对上游引物Alu5-F(5μM)、第五对下游引物Alu5-R(5μM),溶解于水;
- [0035] 试剂B:2×SYBR Green qPCR Mix,包含包括dATP、dCTP、dGTP和dTTP的400μM dNTPs、100mM KCl、4mM MgCl₂、0.2U/μl Taq DNA聚合酶和2×SYBR Green;
- [0036] 试剂C:ROX(50×)或者ROXII(50×),避光保存;
- [0037] 试剂D:制备的标准品经过梯度稀释达到 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 和 1×10^6 拷贝/mL,用于标准曲线的制定;
- [0038] 试剂E:阴性对照(正常人血清);
- [0039] 试剂G:阳性对照(采用 1×10^7 的标准品)。
- [0040] 一种配套5对引物的标准品,其为含Alu保守基因序列的纯化质粒,标准品经过基因工程技术将Alu目的基因序列连接到质粒上,通过鉴定、扩增、提取和纯化获得,并通过260nm进行吸光度读取,进行浓度计算分析获得的DNA准确的拷贝数目,并通过稀释制备成不同浓度的标准品。
- [0041] 具体为:
- [0042] 含有Alu基因片段SEQ ID NO.13的纯化质粒;制备过程通过对Alu扩增后获得目的片段并连接PUC57载体;用SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2引物对Alu进行扩增,程序为95℃ 2min;94℃ 20sec,55℃ 30sec,72℃ 30sec共35个循环,条件为包含400μM dNTPs(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、100mM KCl、4mM MgCl₂、0.2U/μl Taq DNA聚合酶,通过以上方法获得Alu目的片段;Alu目的片段和PUC57质粒经过内切酶EcoRI和HindIII在37℃,2小时以上(Alu PCR产物或者PUC57质粒10uL、10×R Buffer 2uL,EcoRI酶1uL,HindIII酶1uL,水6uL),酶切产物经过PCR产物纯化柱纯化获得20uL酶切产物;酶切产物再经过T4连接酶22℃反应12小时(Alu酶切产物5uL、PUC57质粒2uL、T4连接酶1uL、10×Buffer 1uL、水1uL),随后通过标准的基因工程技术,进行筛选、扩增和纯化,并通过对质粒进行DNA测序证实Alu已经被连接于质粒PUC57载体;对纯化质粒进行260nm的吸光度检测,计算质粒的拷贝数。
- [0043] 有益效果
- [0044] 本发明利用Alu基因序列的保守和稳定性,设计5对高特异性的引物,检测人外周

血循环DNA。通过优化实验反应条件和反应体系,组成简单、快速、灵敏、特异的检测试剂盒,可用于人外周血循环DNA拷贝数的跟踪和动态分析。

附图说明

- [0045] 图1A1u1检测标准曲线 ($R1=0.997771$)
- [0046] 图2A1u2检测标准曲线 ($R2=0.998359$)
- [0047] 图3A1u3检测标准曲线 ($R3=0.998340$)
- [0048] 图4A1u4检测标准曲线 ($R4=0.998747$)
- [0049] 图5A1u5检测标准曲线 ($R5=0.999025$)
- [0050] 图6A1u1检测标准品和阳性标本的扩增曲线
- [0051] 图7A1u2检测标准品和阳性标本的扩增曲线
- [0052] 图8A1u3检测标准品和阳性标本的扩增曲线
- [0053] 图9A1u4检测标准品和阳性标本的扩增曲线
- [0054] 图10A1u5检测标准品和阳性标本的扩增曲线
- [0055] 图11A1u1扩增时的溶解曲线
- [0056] 图12A1u2扩增时的溶解曲线
- [0057] 图13A1u3扩增时的溶解曲线
- [0058] 图14A1u4扩增时的溶解曲线
- [0059] 图15A1u5扩增时的溶解曲线

具体实施方式

[0060] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0061] 实施例1

[0062] 5对A1u引物,主要包括A1u1-F(上游)、R(下游),A1u2-F(上游)、R(下游),A1u3-F(上游)、R(下游),A1u4-F(上游)、R(下游),A1u5-F(上游)、R(下游)。

[0063] 实施例2

[0064] 一种检测人外周血循环DNA的试剂盒:

[0065] 试剂A1-A5:由5对引物组成的5种溶液。A1-A5溶液分别包含5uM A1u1-F(上游)、5uM A1u1-R(下游),5uM A1u2-F(上游)、5uM A1u2-R(下游),5uM A1u3-F(上游)、5uM A1u3-R(下游),5uM A1u4-F(上游)、5uM A1u4-R(下游),5uM A1u5-F(上游)、5uM A1u5-R(下游)。

[0066] 试剂B:2×SYBR Green qPCR Mix,包含包括dATP、dCTP、dGTP和dTTP的400μM dNTPs、100mM KCl、4mM MgCl₂、0.2U/μl Taq DNA聚合酶和2×SYBR Green。

[0067] 试剂C:ROX (50×) 或者ROXII (50×),避光保存。

[0068] 试剂D:制备的标准品经过梯度稀释达到 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 和 1×10^6 拷贝/mL,用于标准曲线的制定;

[0069] 试剂E:阴性对照(正常人血清);

[0070] 试剂G:阳性对照(采用 1×10^7 的标准品)。

[0071] 该标准品,含有Alu基因片段SEQ ID3的纯化质粒。制备过程通过对Alu扩增后获得目的片段并连接PUC57载体。用SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2引物对Alu进行扩增,程序为 95°C 2min; 94°C 20sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec共35个循环,条件为包含 $400\mu\text{M}$ dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、 100mM KCl、 4mM MgCl₂、 $0.2\text{U}/\mu\text{l}$ Taq DNA聚合酶,通过以上方法获得Alu目的片段。Alu目的片段和PUC57质粒经过内切酶EcoRI和HindIII在 37°C ,2小时以上(Alu PCR产物或者PUC57质粒 $10\mu\text{L}$ 、 $10 \times \text{R Buffer}$ 2uL,EcoRI酶1uL,HindIII酶1uL,水6uL),酶切产物经过PCR产物纯化柱纯化获得 $20\mu\text{L}$ 酶切产物。酶切产物再经过T4连接酶 22°C 反应12小时(Alu酶切产物 $5\mu\text{L}$ 、PUC57质粒 $2\mu\text{L}$ 、T4连接酶1uL、 $10 \times \text{Buffer}$ 1uL、水1uL),随后通过标准的基因工程技术,进行筛选、扩增和纯化,并通过对质粒进行DNA测序证实Alu已经被连接于质粒PUC57载体。对纯化质粒进行 260nm 的吸光度检测,计算质粒的拷贝数。

[0072] 实施例3

[0073] 用本发明试剂盒进行实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测。首先,按照实验的标本个数计算各试剂的需要量,实验步骤如下:

[0074] 1.需要进行5个标准品和标本的复孔检测外,还需要检测阴性对照和阳性对照。

[0075] 2.按照如顺序和数量配制5管反应液(Alu-Alu5):加入水 $340\mu\text{L}$,试剂A $40\mu\text{L}$,试剂B $500\mu\text{L}$,试剂C $20\mu\text{L}$,每管反应液可进行20个反应孔的实验。

[0076] 3.混匀上述反应液,每次吸取 $45\mu\text{L}$ 分别加入20孔的PCR反应管。

[0077] 4.各管按照顺序加入 $5\mu\text{L}$ 的标准品、标本、阴性和阳性对照(如下)。

PCR 反应板	1	2	3
A	1E+6	1E+10	样品 4
B	1E+6	1E+10	样品 4
C	1E+7	样品 1	阳性对照
[0078] D	1E+7	样品 1	阴性对照
E	1E+8	样品 2	
F	1E+8	样品 2	
G	1E+9	样品 3	
H	1E+9	样品 3	

[0079] 5.盖好盖子后放入荧光定量PCR仪器进行检测。程序设计为 95°C 30s, 95°C 5s, 60°C 34s,共40个循环,荧光信号值在 60°C 时检测,扩增曲线如图6-10所示。溶解曲线收集程序设计为 95°C 15s, 60°C 60s, 95°C 15s,1个循环,Alu1-Alu5的融解曲线如图11-15所示。

[0080] 6.结果计算:通过荧光定量PCR仪的分析软件,记录不同标准品的Ct值并绘制标准曲线(如图1-5所示),通过计算标准曲线计算各样本的Alu1-Alu5的拷贝数。通过阴性对照和阳性对照对实验过程进行质量控制。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 侯彦强

<120> 人外周血循环 DNA 的引物序列及定量检测试剂盒

<130> 2013

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

agaccatcct ggctaacacg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

agacggagtc tcgctctgtc

20

	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 3	
	ctaacacggg gaaaccccg	19
	<210> 4	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 4	
[0002]	cgcccaggct ggagtg	16
	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 5	
	gtgaaacccc gtcttacta aaaa	24
	<210> 6	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人	

[0003]

<400> 6

gagtgcagtg gcgcgat

17

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人

<400> 7

tacaaaaaat tagccgggcg

20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> 人

<400> 8

gatctcggct cactgcaag

19

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> 人

<400> 9

aaaattagcc gggcgtg

17

	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 10	
	gttcacgcca ttctcctgc	19
	<210> 11	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人	
[0004]	<400> 11	
	gaattcagac catcctggct aacacg	26
	<210> 12	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 12	
	aagcttagac ggagtctcgc tctgtc	26
	<210> 13	
	<211> 201	
	<212> DNA	

[0005]

<213> 人

<400> 13

agaccatcct ggctaacacg gtgaaacccc gtcttacta aaaatacaaa aaattagccg 60

ggcgtggtgg cgggcgcctg tagtcccagc tactcgggag gctgaggcag gagaatggcg 120

tgaacccggg aggcggagct tgcagtgagc cgagatcgcg ccaactgcact ccagcctggg 180

cgacagagcg agactccgtc t 201

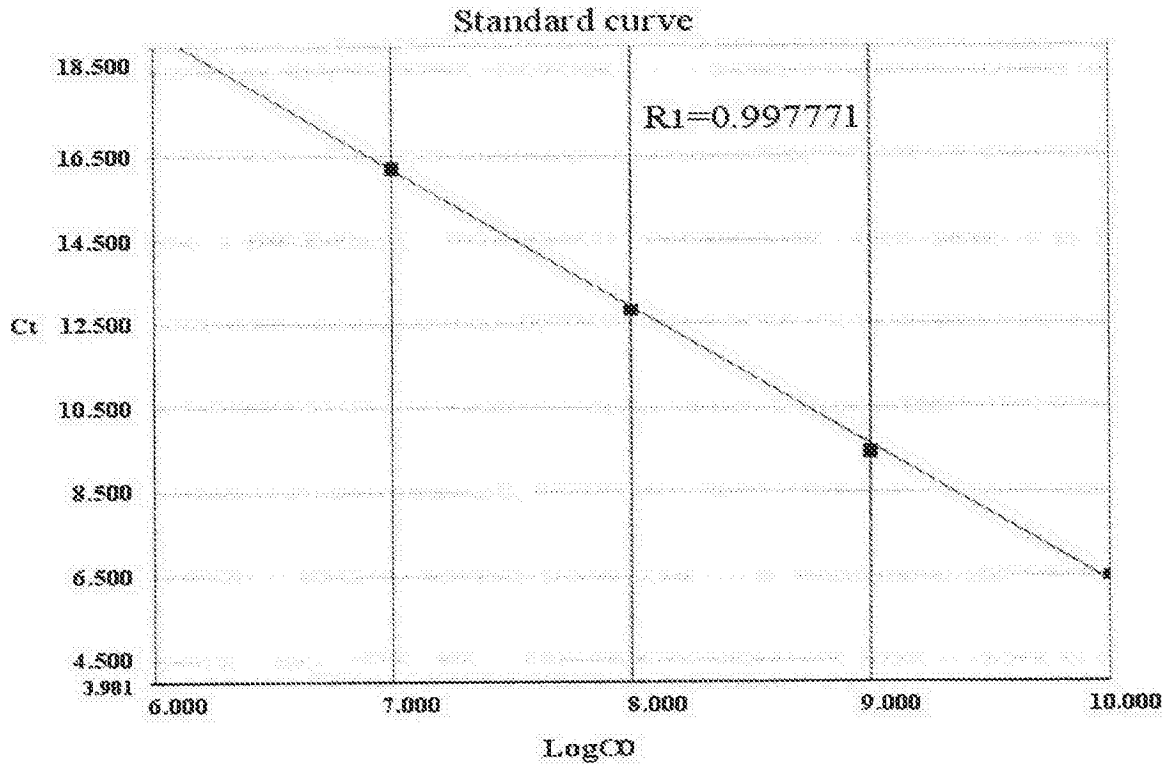


图1

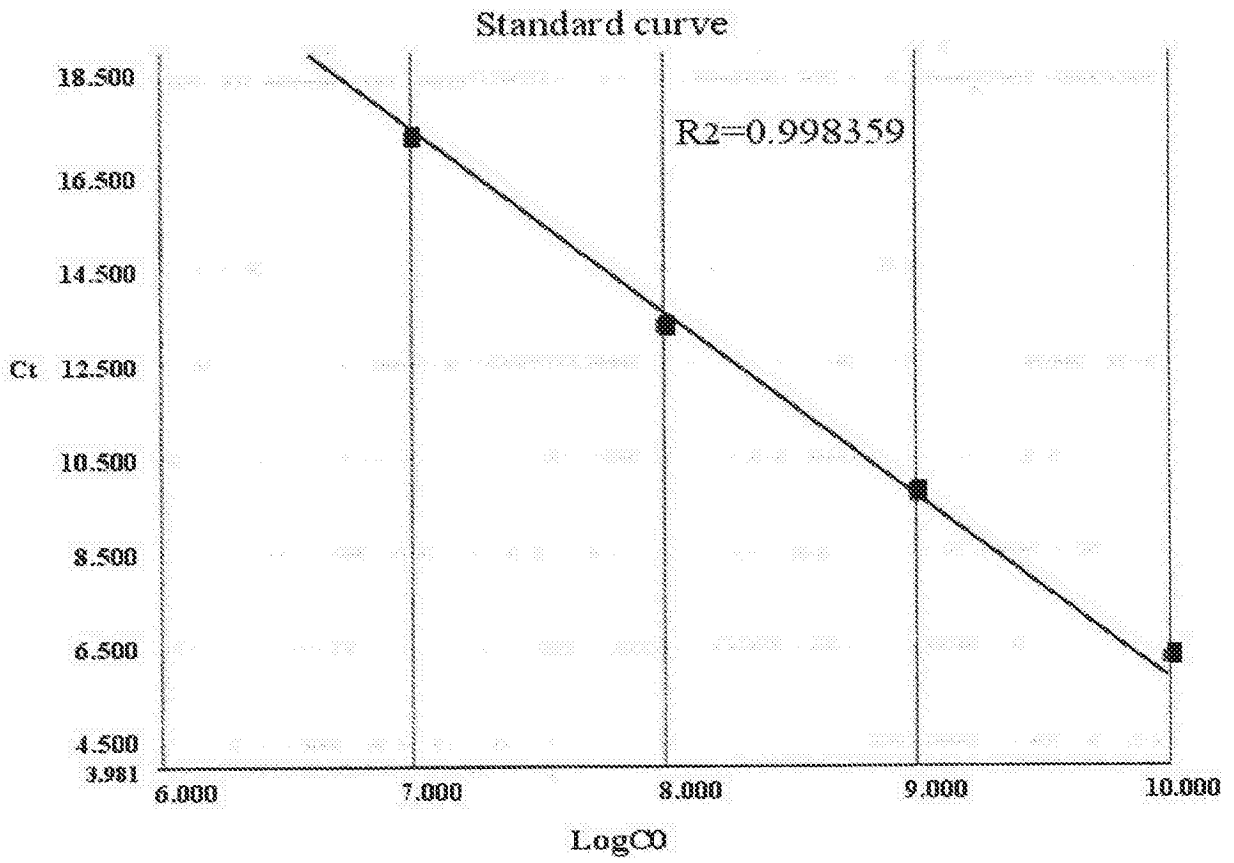


图2

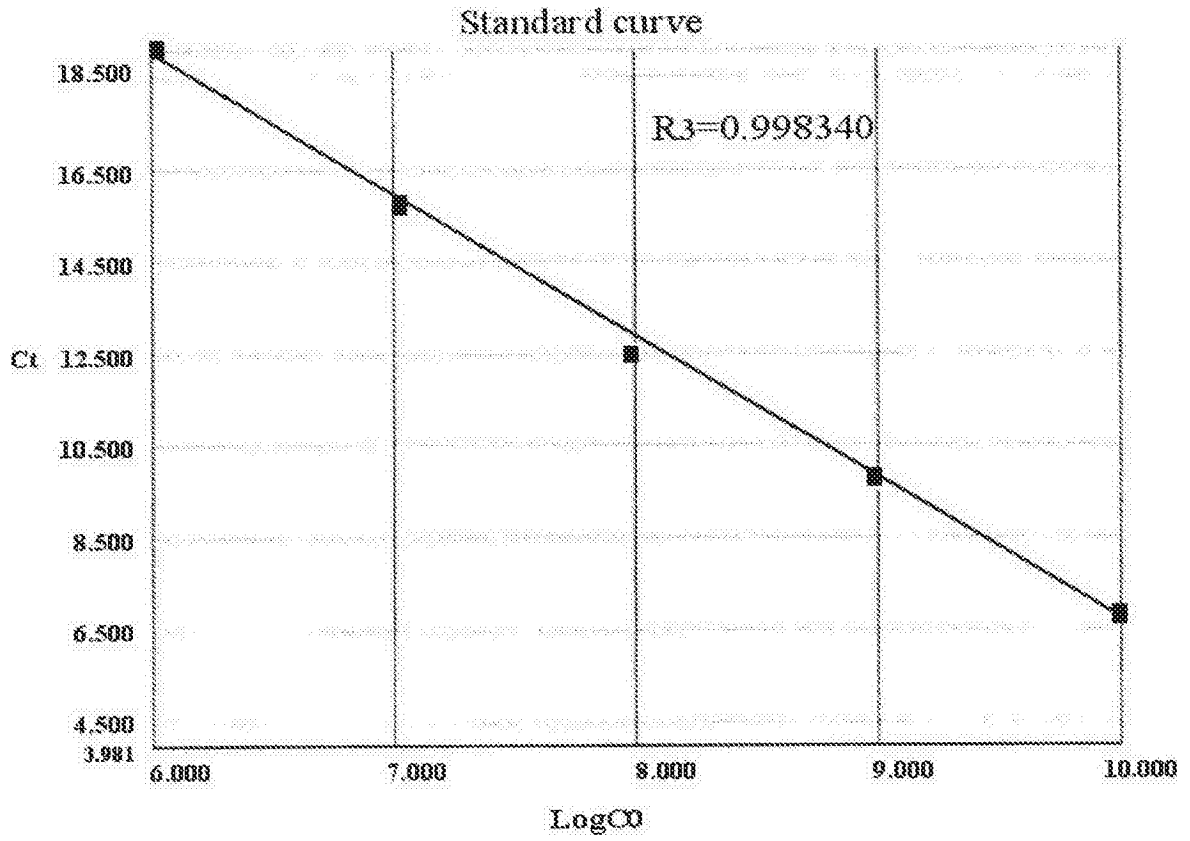


图3

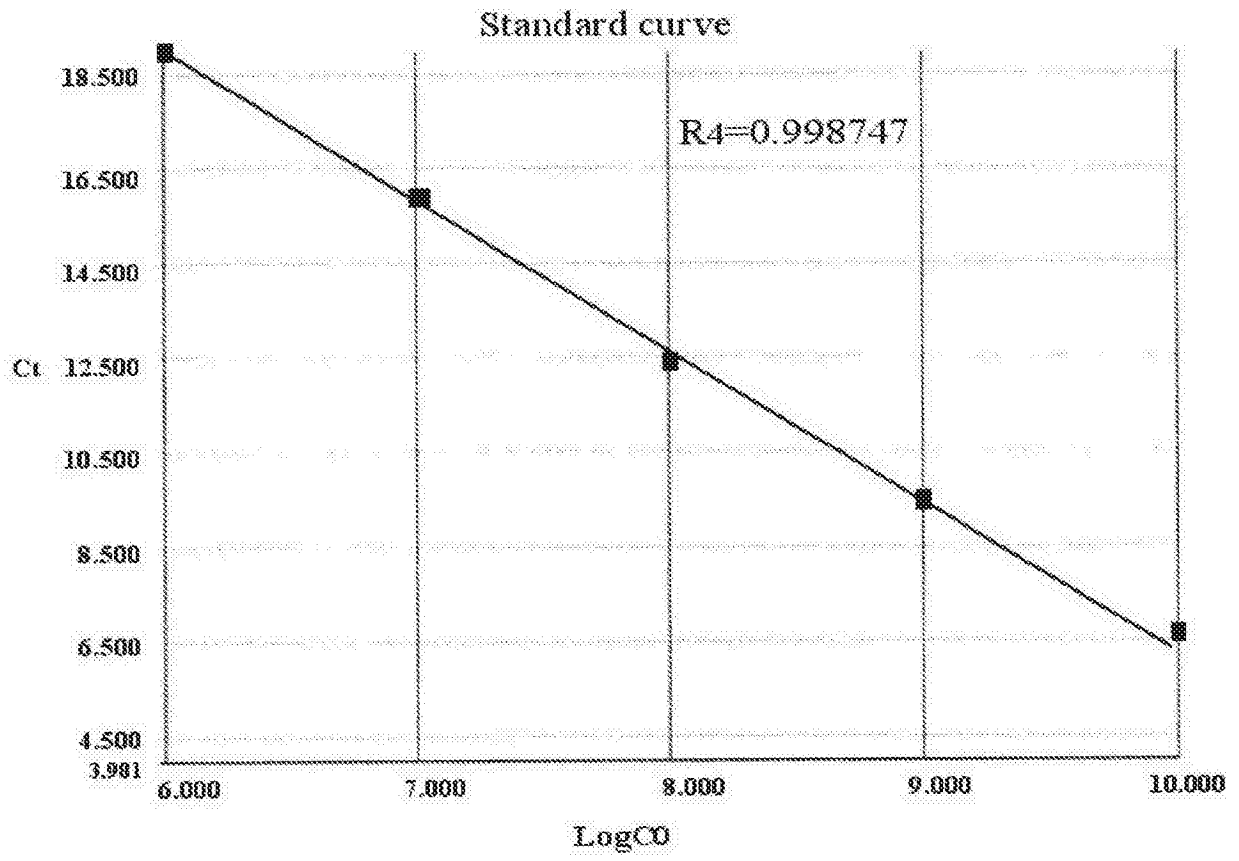


图4

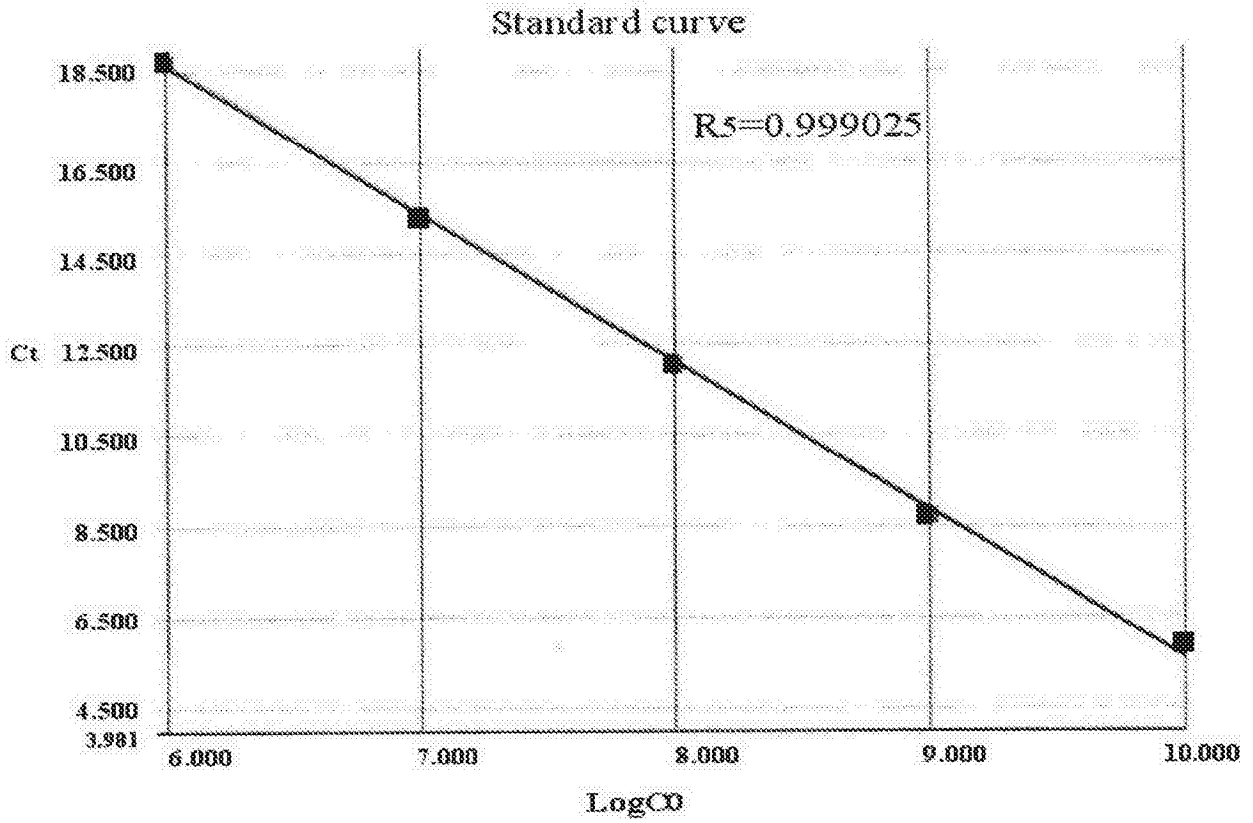


图5

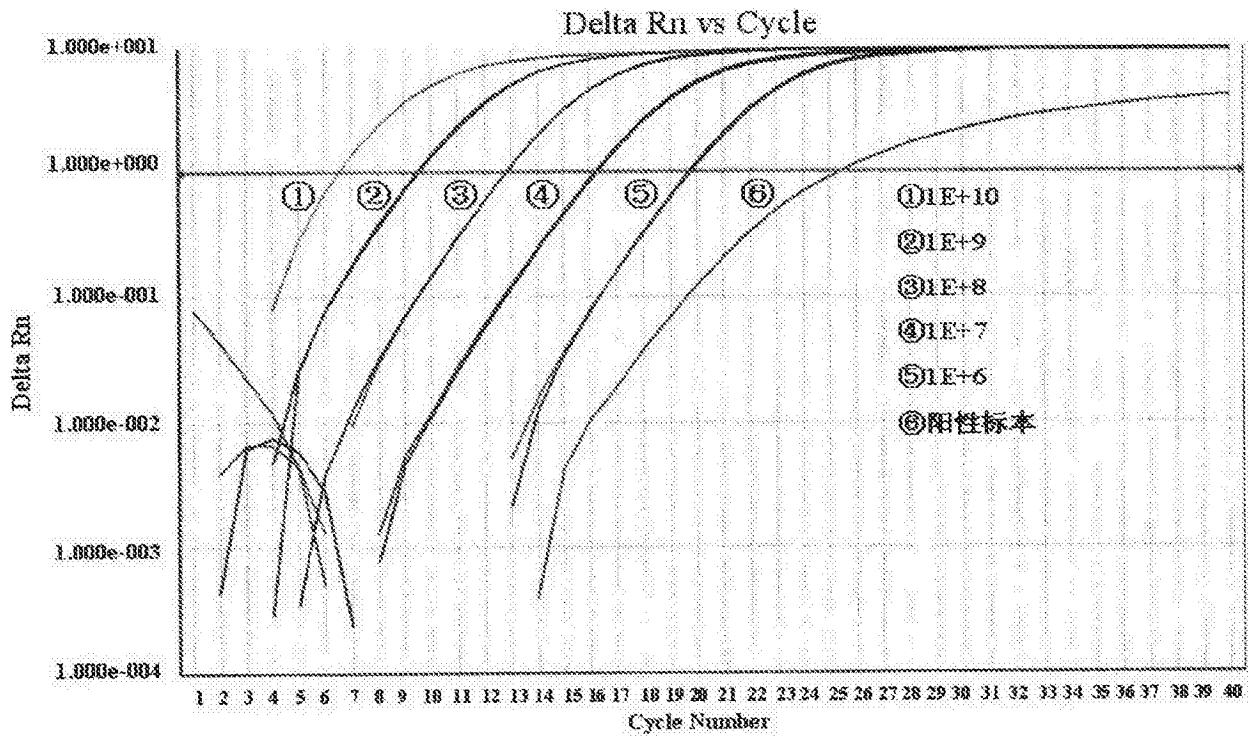


图6

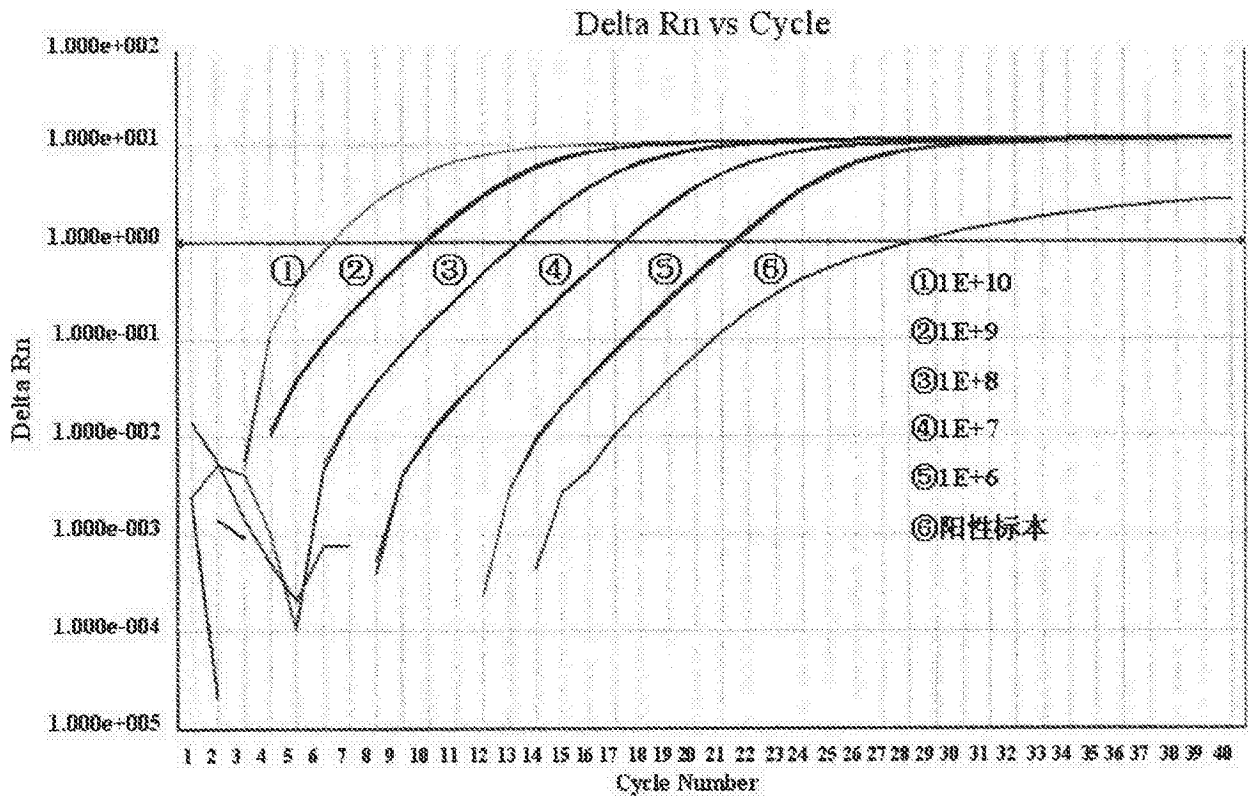


图7

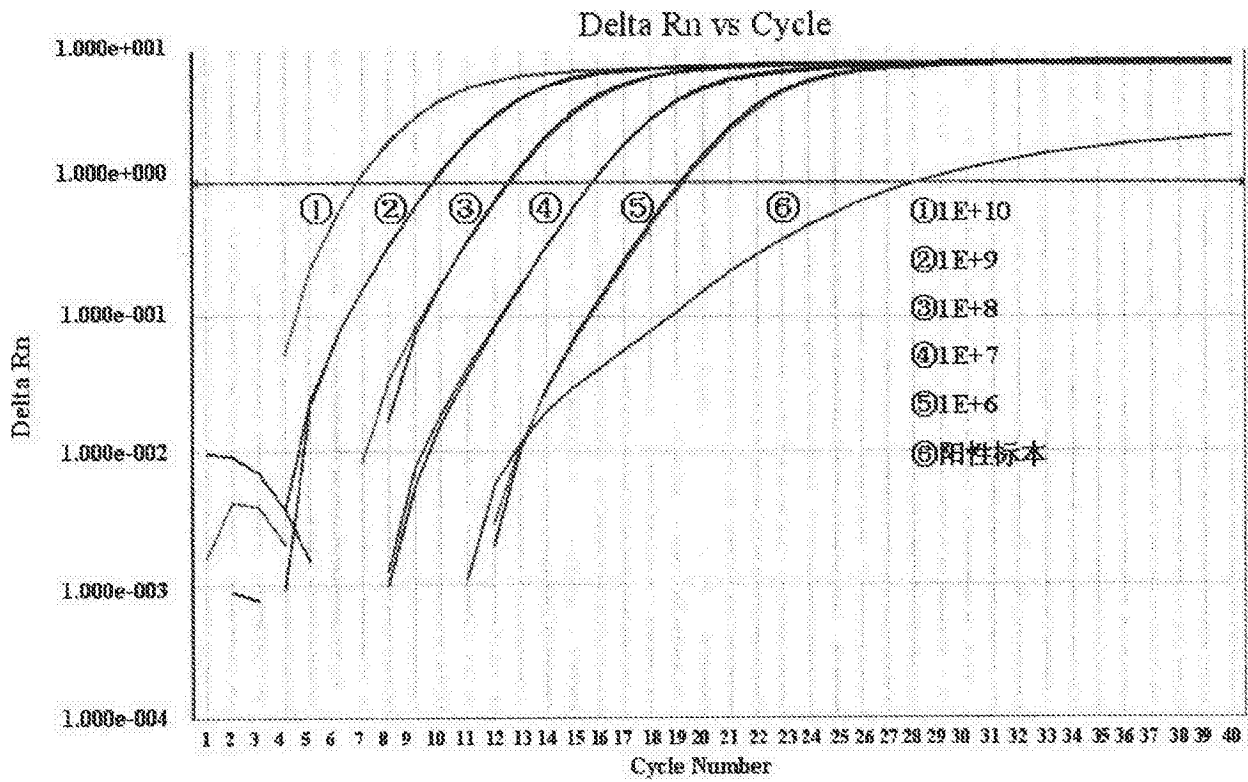


图8

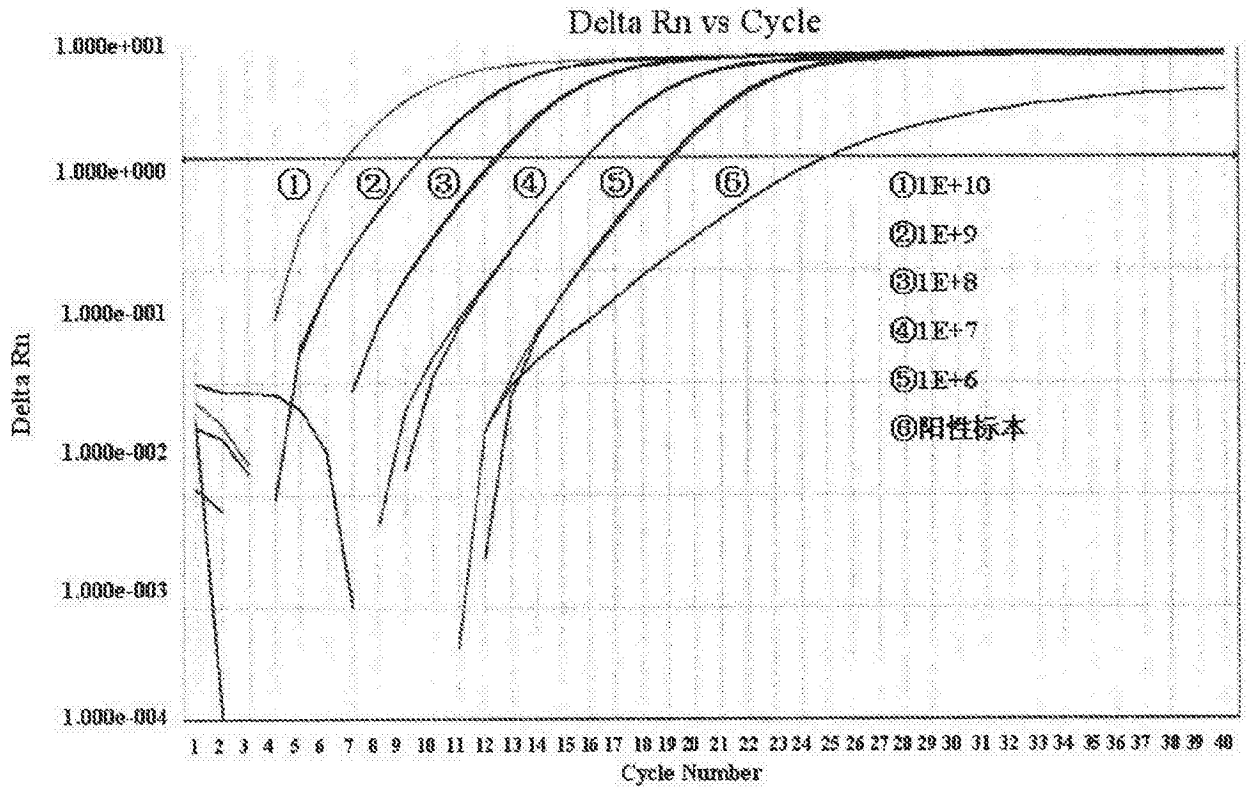


图9

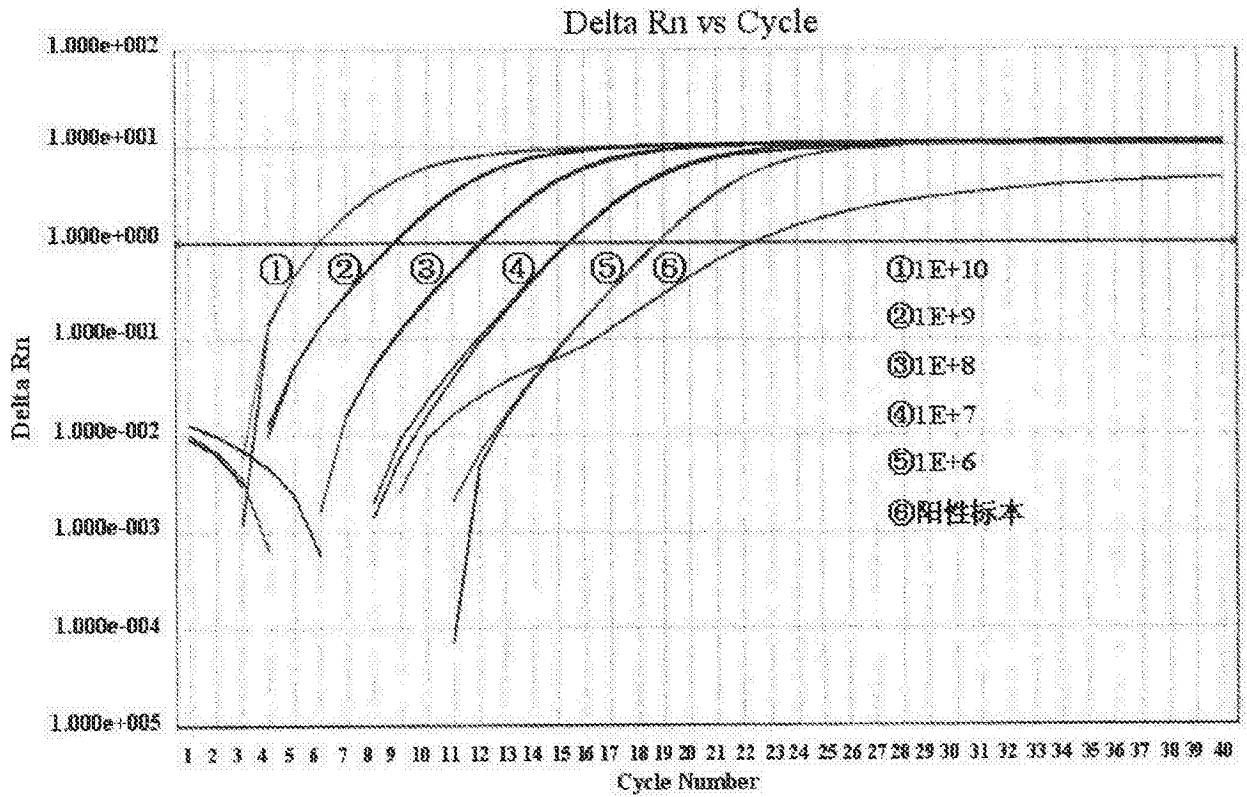


图10

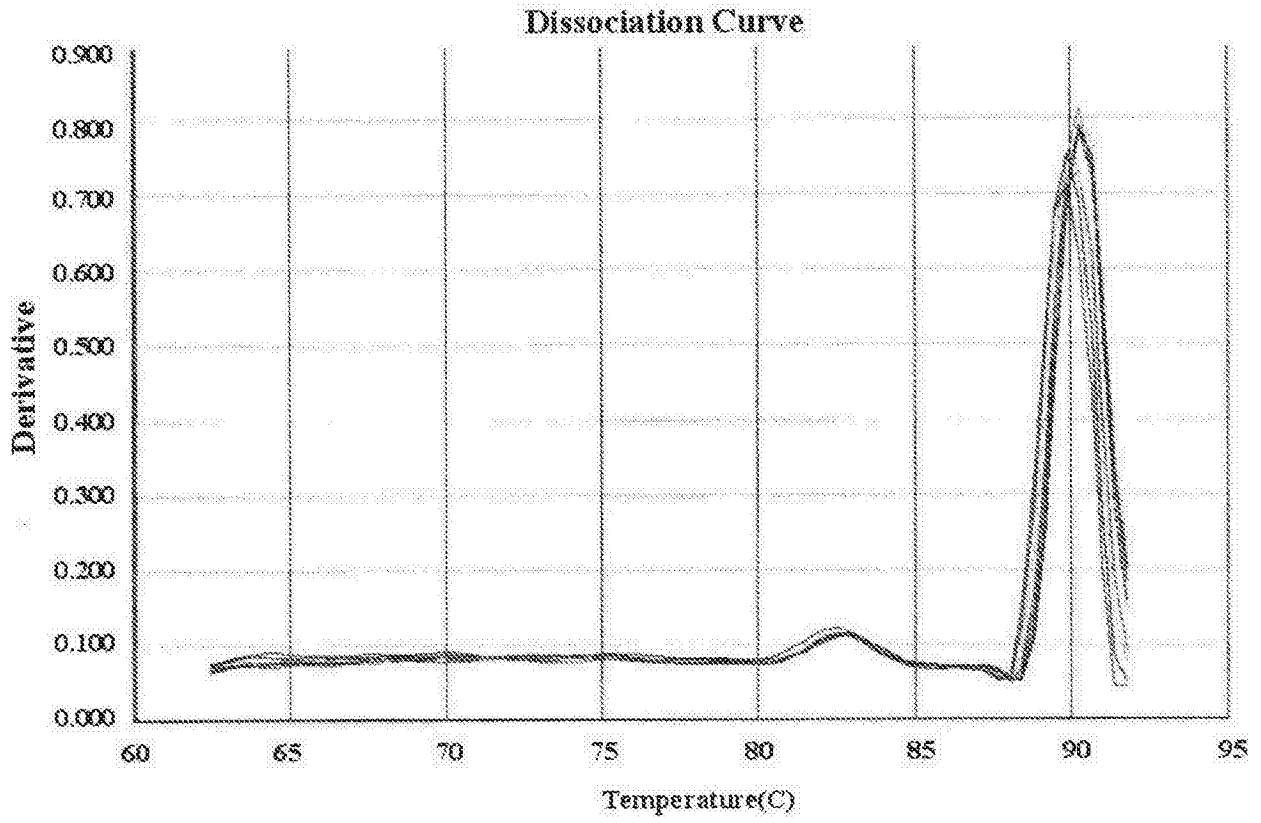


图11

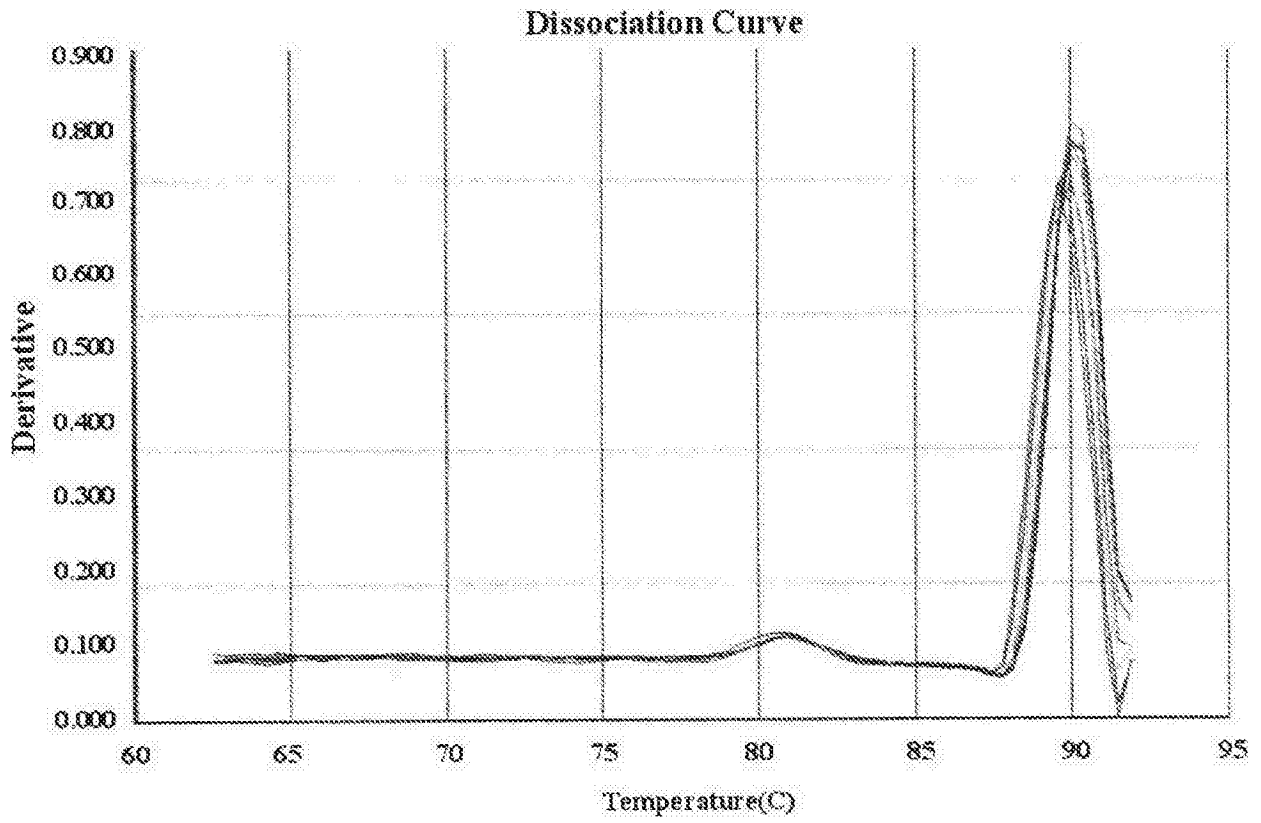


图12

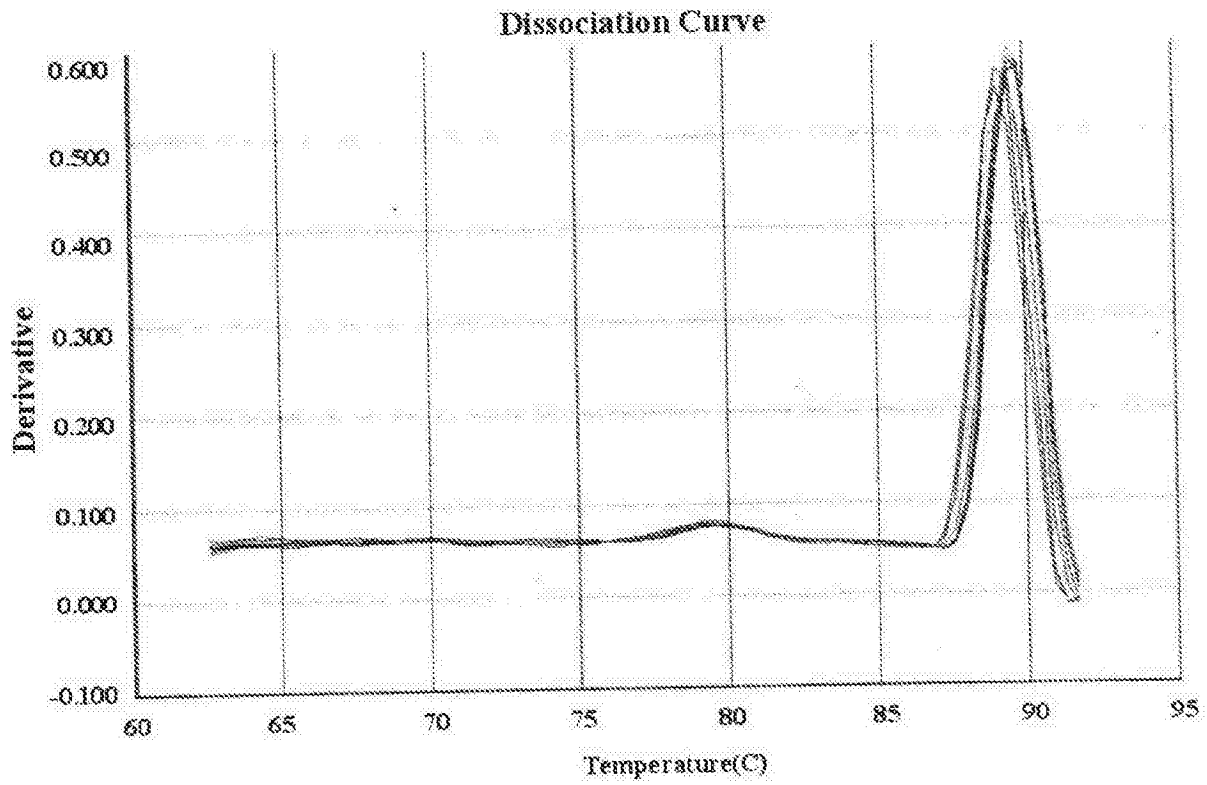


图13

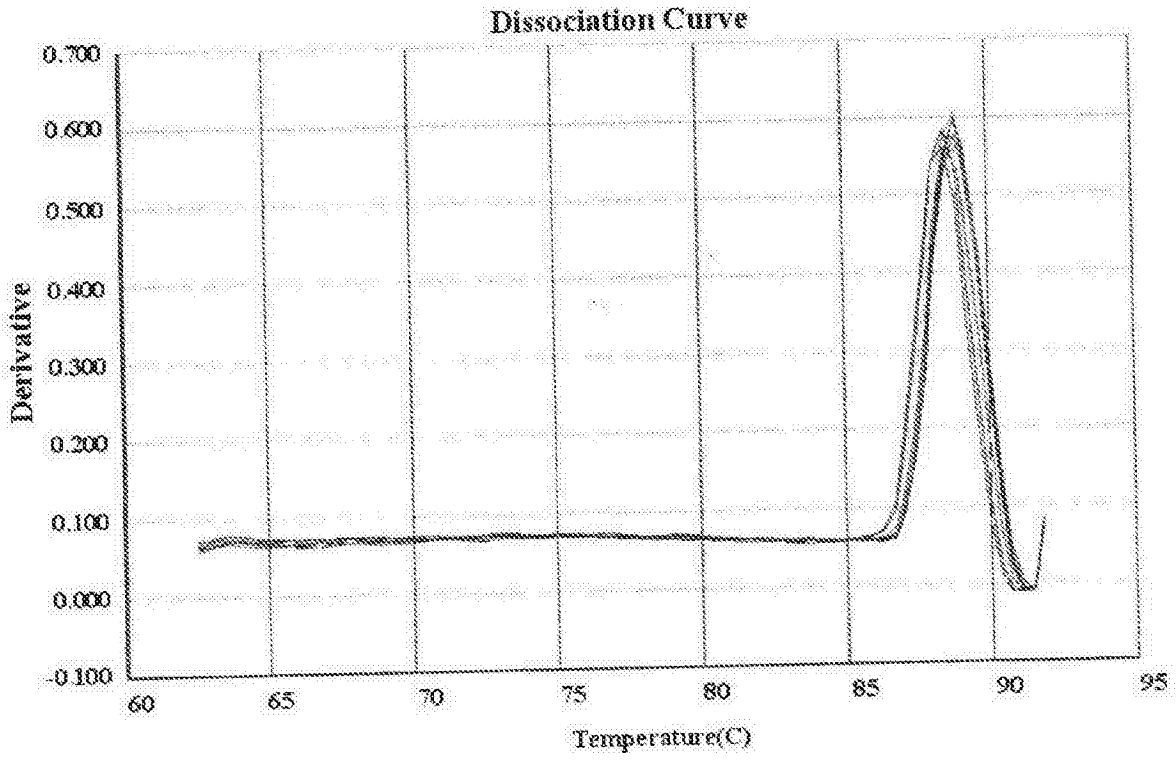


图14

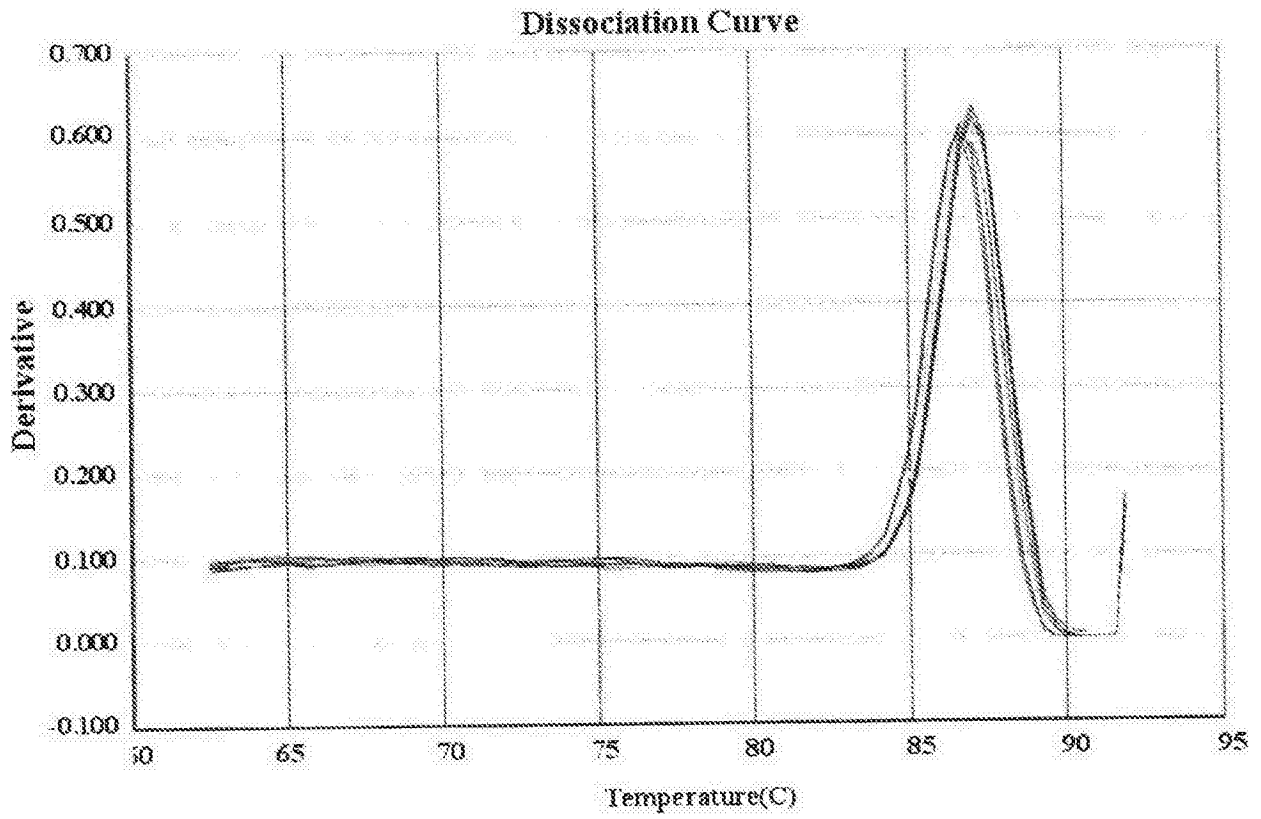


图15