



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106947822 B

(45)授权公告日 2020.04.10

(21)申请号 201710236243.9

(22)申请日 2017.04.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106947822 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(73)专利权人 广州市康立明生物科技有限责任公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城开源大道11号A2栋第六
层

(72)发明人 刘相林 邹鸿志

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 赵青朵

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

CN 105543378 A,2016.05.04,

CN 101353695 A,2009.01.28,

CN 105112529 A,2015.12.02,

CN 105543354 A,2016.05.04,

Christoph Ausch等.Comparative
Analysis of PCR-Based Biomarker Assay
Methods for Colorectal Polyp Detection
from Fecal DNA.《Clinical Chemistry》.2009,

审查员 魏应亮

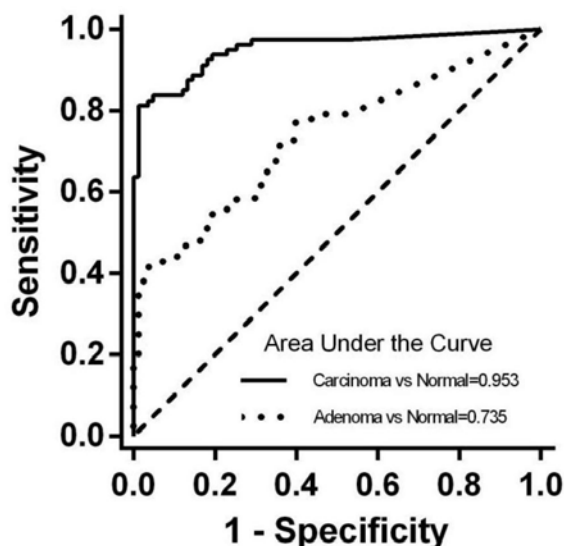
权利要求书1页 说明书7页
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

ITGA4基因甲基化检测试剂、试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明涉及基因检测技术领域,尤其涉及ITGA4基因甲基化检测试剂盒及检测方法。本发明提供的引物和探针配合,能够以粪便样品为对象进行检测,从而使检测更加简便、快速。本发明还可以对组织标本进行检测。而在对样品进行检测的过程中,检测的特异性和敏感性也得到了提高。实验表明,对粪便标本而言,在特异性为95.2%时,甲基化的ITGA4对肠癌和腺瘤的敏感性分别为83.8%和41.6%。对肠癌组织而言,当特异性为97.6%(40/41)时,结直肠癌和腺瘤的检出率分别是96.2%(101/105)和71.6%(78/109)。该效果优于其他引物或探针检测的效果。



1. 一种ITGA4基因甲基化定性检测试剂盒,其特征在于,以粪便、组织或细胞为待测样品,包括ITGA4基因捕获试剂和ITGA4基因甲基化定性检测试剂;所述ITGA4基因捕获试剂包括磁珠探针复合物,所述磁珠探针复合物中,探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述ITGA4基因甲基化定性检测试剂包括检测引物;所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2~3所示。

3. 一种ITGA4基因甲基化定量检测试剂盒,其特征在于,以粪便、组织或细胞为待测样品,包括ITGA4基因捕获试剂和ITGA4基因甲基化定量检测试剂;所述ITGA4基因捕获试剂包括磁珠探针复合物,所述磁珠探针复合物中,探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述ITGA4基因甲基化定量检测试剂包括检测引物和检测探针;所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:4~5所示,所述检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

5. 一种ITGA4基因甲基化检测试剂盒,其特征在于,以粪便、组织或细胞为待测样品,包括ITGA4基因捕获试剂、ITGA4基因甲基化定性检测试剂、ITGA4基因甲基化定量检测试剂;

所述ITGA4基因捕获试剂包括磁珠探针复合物,所述磁珠探针复合物中,探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,

所述ITGA4基因甲基化定性检测试剂包括检测引物;所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2~3所示;

所述ITGA4基因甲基化定量检测试剂包括检测引物和检测探针;所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:4~5所示,所述检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

ITGA4基因甲基化检测试剂、试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因检测技术领域,尤其涉及ITGA4基因甲基化检测试剂、试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 粪便DNA实验(FIT-DNA)在2016年被美国预防服务工作组(USPSTF)列入了结直肠癌的筛查方法之中。该实验的原理之一就是检测粪便中脱落细胞特定基因的甲基化水平。选择针对肠癌灵敏度和特异度都非常高的DNA甲基化标志物是该实验的基础。目前研究表明检测ITGA4基因甲基化在组织和粪便标本中对肠癌有很高的检测灵敏度和特异度。

[0003] 研究显示,甲基化的ITGA4在粪便标本中对腺瘤的检测灵敏度是69%(9/13),特异度是79%(22/28)。另有一项研究显示,在粪便标本中检测甲基化的ITGA4,当特异度为100%(31/31)时,对结直肠癌和结直肠腺瘤的检出率分别为36.7%(11/30)、16%(4/25)。这些研究结果提示该基因在粪便标本中对肠癌和腺瘤的检测灵敏度、特异度还有很大的提升空间。

[0004] 影响标志物检测灵敏性、特异性的关键因素在于引物的序列,因此,进一步涉及具有高灵敏性、特异性的ITGA4基因甲基化的检测引物具有十分重要的意义。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供ITGA4基因甲基化检测试剂盒及检测方法。本发明提供的定量、定性试剂盒皆能够实现对ITGA4基因甲基化的特异、灵敏检测。

[0006] 本发明提供了:

[0007] 一种ITGA4基因甲基化定性检测试剂盒,其以粪便、组织或细胞为待测样品,包括ITGA4基因捕获试剂和ITGA4基因甲基化定性检测试剂。

[0008] 本发明实施例中,所述ITGA4基因捕获试剂包括磁珠探针复合物。一些具体实施例中,所述探针的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0009] 所述ITGA4基因甲基化定性检测试剂包括检测引物,所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2~3所示。

[0010] 本发明还提供了一种ITGA4基因甲基化定量检测试剂盒,以粪便、组织或细胞为待测样品,包括ITGA4基因捕获试剂和ITGA4基因甲基化定量检测试剂。

[0011] 本发明实施例中,所述ITGA4基因捕获试剂包括磁珠探针复合物。一些具体实施例中,所述探针的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0012] 本发明实施例中,所述ITGA4基因甲基化定量检测试剂包括检测引物和检测探针,所述检测引物核苷酸序列如SEQ ID NO:4~5所示;所述检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0013] 本发明还提供了一种ITGA4基因甲基化检测试剂盒,以粪便、组织或细胞为待测样品,包括ITGA4基因捕获试剂、ITGA4基因甲基化定性检测试剂、ITGA4基因甲基化定量检测

试剂。

[0014] 所述ITGA4基因捕获试剂包括磁珠探针复合物;所述磁珠探针复合物中,探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

[0015] 所述ITGA4基因甲基化定性检测试剂包括检测引物;所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2~3所示;

[0016] 所述ITGA4基因甲基化定量检测试剂包括检测引物和检测探针;所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:4~5所示,所述检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0017] 采用SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的捕获序列在粪便标本中捕获出ITGA4基因,在240例粪便标本中(80例肠癌、77例大于等于1cm腺瘤、83例正常),检测ITGA4的甲基化水平,结果显示,在特异性为95.2%时,甲基化的ITGA4对肠癌和腺瘤的敏感性分别为83.8%和41.6%。

[0018] 采用述qMSP实验的引物和探针,在105对配对肠癌组织、109例 ≥ 1 cm腺瘤组织、和41例正常肠上皮组织中检测ITGA4的甲基化水平,当特异性为97.6%时,结直肠癌和腺瘤的检出率分别是96.2%和71.6%。

[0019] 采用MSP实验的引物在Widr、SW480、HCT15、HT29、Caco2和DLD1共六株结直肠癌细胞株检测ITGA4基因的甲基化水平,结果显示ITGA4在六株肠癌细胞中均发生甲基化。

[0020] 作为优选,本发明提供试剂盒的待测样品为粪便和/或组织;

[0021] 一些具体实施例中,待测样品为粪便。

[0022] 本发明还提供了一种ITGA4基因甲基化定性检测方法,以待测样品为模板,捕获试剂捕获ITGA4基因后,经重亚硫酸盐修饰,以定性检测试剂扩增,根据扩增产物判断ITGA4基因是否出现甲基化;

[0023] 所述待测样品为粪便、组织或细胞;

[0024] 所述捕获试剂包括磁珠探针复合物;所述磁珠探针复合物中,探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

[0025] 所述定性检测试剂包括检测引物;所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2~3所示。

[0026] 具体的,以待测样品为模板,以SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的ITGA4基因捕获序列捕获ITGA4基因后,经重亚硫酸盐处理修饰后,以SEQ ID NO:2~3所示核苷酸序列的ITGA4基因甲基化定性检测引物扩增,根据扩增产物判断ITGA4基因是否出现甲基化;所述待测样品为粪便、组织或细胞。

[0027] 作为优选,待测样品为粪便、结直肠癌、结直肠腺瘤、正常肠上皮组织或细胞株。优选的,待测样品为粪便。

[0028] 磁珠捕获方法是采用磁珠作为固相吸附载体并使用特定设计的试剂体系及提取流程(Journal of China Medical University应用磁珠法检测并提取尿液游离甲基化DNA;2015, (10))。

[0029] 在本发明中,序列如SEQ ID NO.1所示。通过磁珠捕获的方式,可以对粪便中的ITGA4基因进行提取和富集。

[0030] 粪便的处理方式可选地为:将粪便在缓冲液中混匀、离心、取上清至另外一个试管中,加入带有特定互补寡核苷酸捕获序列的磁珠至上清液中,经过孵育杂交后,用磁铁将磁

珠吸附于管壁一侧,经过反复洗净后,用缓冲液将目标基因DNA洗脱。该法可以俘获到目的基因,富集的过程约为2个小时。

[0031] 被俘获的DNA经过重亚硫酸盐处理修饰后用于后续荧光定量PCR的检测。

[0032] 扩增体系:无核酸酶水10.5 μ l,2 $\times$ 酶反应液12.5 μ l,前向引物和反向引物(5 μ M浓度)各0.5 μ l,待测DNA 1 μ l,共计25 μ L。

[0033] 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 5min,(95 $^{\circ}$ C 30s,64 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s) $\times$ 34Cycles,72 $^{\circ}$ C 5min,37 $^{\circ}$ C 30s。

[0034] 根据扩增结果,出现扩增条带,则基因出现甲基化。

[0035] 本发明还提供了一种ITGA4基因甲基化定量检测方法,

[0036] 以待测样品为模板,以捕获试剂捕获ITGA4基因后,经重亚硫酸盐修饰后,以定量检测试剂进行定量检测,根据定量结果判断ITGA4基因甲基化水平;

[0037] 所述待测样品为粪便、组织或细胞;

[0038] 所述捕获试剂包括磁珠探针复合物;所述磁珠探针复合物中,探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

[0039] 所述定量检测试剂包括检测引物和检测探针;所述检测引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:4~5所示,所述检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0040] 具体的,以待测样品为模板,以SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的ITGA4基因捕获序列捕获ITGA4基因后,经重亚硫酸盐处理修饰后,以SEQ ID NO:4~5所示核苷酸序列的ITGA4基因甲基化定量检测引物和SEQ ID NO:6所示核苷酸序列的ITGA4基因甲基化定量检测探针进行定量检测,根据定量结果判断ITGA4基因甲基化水平;所述待测样品为粪便、组织或细胞。

[0041] 作为优选,待测样品为粪便、结直肠癌、结直肠腺瘤、正常肠上皮组织或细胞株。优选的,待测样品为粪便。

[0042] 磁珠捕获方法是采用磁珠作为固相吸附载体并使用特定设计的试剂体系及提取流程(Journal of China Medical University应用磁珠法检测并提取尿液游离甲基化DNA;2015,(10))。

[0043] 在本发明中,序列如SEQ ID NO.1所示。通过磁珠捕获的方式,可以对粪便中的ITGA4基因进行提取和富集。

[0044] 粪便的处理方式可选地为:将粪便在缓冲液中混匀、离心、取上清至另外一个试管中,加入带有特定互补寡核苷酸捕获序列的磁珠至上清液中,经过孵育杂交后,用磁铁将磁珠吸附于管壁一侧,经过反复洗净后,用缓冲液将目标基因DNA洗脱。该法可以俘获到目的基因,富集的过程约为2个小时。

[0045] 被俘获的DNA经过重亚硫酸盐处理修饰后用于后续荧光定量PCR的检测。

[0046] 所述扩增反应的体系为:无核酸酶水8.2 μ l,5 $\times$ 酶反应缓冲液5 μ l,MgCl₂(25mM) 5 μ l,dNTPs(10mM) 1 μ l,反应酶0.5 μ l,前向引物(100 μ M) 0.125 μ l,后向引物(100 μ M) 0.125 μ l,探针(100 μ M) 0.05 μ l,待测DNA 5 μ l,共计25 μ L。

[0047] 程序为95 $^{\circ}$ C 4min,(95 $^{\circ}$ C 20s,56 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s) $\times$ 45Cycles,37 $^{\circ}$ C 30s。

[0048] 根据定量结果,以ACTB基因作为内参基因,计算获得ITGA4基因的相对甲基化水平。

[0049] 本发明提供的引物和探针配合,能够对粪便样品进行检测,从而使检测更加简便、快速。本发明还可以对组织标本进行检测。而在对样品进行检测的过程中,检测的特异性和敏感性也得到了提高。实验表明,对粪便标本而言,在特异性为95.2%时,甲基化的ITGA4对肠癌和腺瘤的敏感性分别为83.8%和41.6%。对肠癌组织而言,当特异性为97.6% (40/41) 时,结直肠癌和腺瘤的检出率分别是96.2% (101/105) 和71.6% (78/109)。该效果优于其他引物或探针检测的效果。

附图说明

[0050] 图1示ITGA4基因在癌、腺瘤、正常组中甲基化水平的点图,****表示 $P < 0.0001$;

[0051] 图2示ROC曲线图,其中 $AUC(\text{癌vs正常}) = 0.953$ (95%CI:0.920-0.985); $AUC(\text{腺瘤vs正常}) = 0.735$ (95%CI:0.657-0.814);

[0052] 图3示梯度稀释的S1-S6的扩增曲线和其构建的标准曲线,其中NTC表示无模板对照,WT表示用野生型的DNA作对照,每个样本均作了3个复孔;

[0053] 图4示标准曲线,其线性度 $R^2 = 0.995$,扩增效率=97.96%;

[0054] 图5示不同引物、探针的扩增曲线。

具体实施方式

[0055] 本发明提供了ITGA4基因甲基化检测试剂、试剂盒及检测方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0056] 本发明采用的试材、试剂、仪器皆为普通市售品,皆可于市场购得。

[0057] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0058] 实施例1定性检测

[0059] 选择Widr、SW480、HCT15、HT29、Caco2和DLD1共6株结直肠癌细胞株,另设健康细胞CCD-18CO为对照。采用MSP实验检测ITGA4基因在这些细胞中是否发生了甲基化;每个细胞株重复检测10次。

[0060] 方法步骤为:

[0061] 1、收集细胞沉淀,转移到事先装有3ml细胞裂解液的新的15ml离心管中。

[0062] 向离心管中加入100ul捕获磁珠,其含有捕获序列SEQ ID NO:1所示序列的捕获序列(5'-TGCTTCTCCGGGTACGGGCCGCTGGGTGGGGTC-3)。水浴锅92℃孵育10min。室温摇床100rpm孵育1h,简短离心后置于磁力架5min,丢弃上清。

[0063] 向15ml离心管中加入500ul洗涤液,振荡摇匀,使管壁磁珠完全悬下来,简短离心后转移到新的2ml离心管中。室温干浴器900rpm孵育1min,置于磁力架上1min,弃上清。重复4次。

[0064] 加入55ul洗脱液,简短离心,干浴器92℃900rpm孵育10min。简短离心,置于磁力架上,3min以内转移50ul洗脱液到新的EP管中。

[0065] 2、重亚硫酸盐转化,采用EZ DNAmethylation Kit (ZYMO RESEARCH)

[0066] 3、扩增：引物为

[0067] 上游引物序列：5'-TCGGAGAAGTAGCGGAGTATTC-3' (SEQ ID NO:2)

[0068] 下游引物序列：5'-AAATCGACCCACCGGAACG-3' (SEQ ID NO:3)

[0069] 体系：25 μ l (1 $\times$ 体系：无核酸酶水10.5 μ l, GoTaq Hot Start Colorless Master Mix 12.5 μ l, Forward primer和Reverse primer (浓度5uM) 各0.5 μ l, 待测DNA 1 μ l)

[0070] 程序：95 $^{\circ}$ C 5min, (95 $^{\circ}$ C 30s, 64 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s) $\times$ 34Cycles, 72 $^{\circ}$ C 5min, 37 $^{\circ}$ C 30s。

[0071] 4、扩增结果观察。

[0072] 根据扩增结果, 对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 有条带出现即为出现甲基化。

[0073] 实验结果：ITGA4在六株肠癌细胞中均检测到发生甲基化, 10次重复检测准确率可达100%。而健康细胞中则未检测到甲基化现象。

[0074] 实施例2定量检测

[0075] 1、以粪便为样品

[0076] 选择240例粪便标本, 其中经肠镜检查80例为肠癌、77例为大于等于1cm腺瘤、83例为正常, 定量检测ITGA4基因的甲基化水平。

[0077] 实验过程：在粪便标本中采用捕获序列 (SEQ ID NO:1) 捕获出ITGA4基因；捕获条件和过程同实施例1), 以ACTB为内参基因, 通过qMSP实验定量检测标本中ITGA4基因的甲基化水平。

[0078] 定量检测引物和探针：

[0079] 上游引物序列：5'-ACGCGAGTTTTCGCTAGTC-3' (SEQ ID NO:4)

[0080] 下游引物序列：5'-TCCGAATACGAACCGCTAA-3' (SEQ ID NO:5)

[0081] 检测探针序列：5'-ACGGAGTTTCGGTTTTCGCTTTTC-3' (SEQ ID NO:6)

[0082] 体系：25 μ l (1 $\times$ 体系：无核酸酶水8.2 μ l, 5 $\times$ Colorless GoTaq Flexi Buffer 5 μ l, MgCl₂ (25mM) 5 μ l, dNTPs (10mM) 1 μ l, GoTaq Hot Start polymerase 0.5 μ l, Forward primer (100uM) 0.125 μ l, Reverse primer (100uM) 0.125 μ l, Probe (100uM) 0.05 μ l, DNA 5 μ l)

[0083] 程序：95 $^{\circ}$ C 4min, (95 $^{\circ}$ C 20s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s) $\times$ 45Cycles, 37 $^{\circ}$ C 30s。

[0084] 在240例粪便标本中 (80例肠癌、77例大于等于1cm腺瘤、83例正常), 检测ITGA4的甲基化水平, 结果显示, 在特异性为95.2%时, 甲基化的ITGA4对肠癌和腺瘤的敏感性分别为83.8%和41.6% (图1~2)。

[0085] 2、以组织为样品

[0086] 选择手术或肠镜切除的结直肠癌、结直肠腺瘤和正常肠上皮组织标本, 并定量检测ITGA4基因的甲基化水平。标本为：105对肠癌和癌旁配对的组织, 109例 $\geq$ 1cm腺瘤组织, 41例正常肠上皮组织。

[0087] 分别提取各组织的DNA并进行重亚硫酸盐处理修饰, 然后通过qMSP实验定量检测标本中ITGA4基因的甲基化水平。

[0088] 根据定量结果绘制ROC曲线 (图2), 实验结果表明：当特异性为97.6% (40/41) 时, 结直肠癌和腺瘤的检出率分别是96.2% (101/105) 和71.6% (78/109)。曲线下面积分别为：0.958 (95%CI: 0.909-1) 和0.832 (95%CI: 0.761-0.902), (P均 $<$ 0.001)。

[0089] 实施例3检测限

[0090] 采用CpGenomeUniversal Methylated DNA (购自Millipore) 经重亚硫酸盐转化后

得到20ng/ μ l的模板DNA,按5倍梯度稀释分别得到S1、S2、S3、S4、S5、S6,浓度分别为20ng/ μ l、4ng/ μ l、0.8ng/ μ l、0.16ng/ μ l、0.032ng/ μ l、0.0064ng/ μ l。

[0091] 按5 μ l上样模板量进行qPCR(方法、引物同实施例2)。可知S1-S6的实际DNA投入量分别是:100ng、20ng、4ng、0.8ng、0.16ng、0.032ng。qPCR结果显示,该基因引物探针可检测的DNA量为0.032ng~100ng(图3)。

[0092] 对比例1

[0093] 采用CpGenomeUniversal Methylated DNA(购自Millipore)进行重亚硫酸盐转化;以ACTB为内参基因,然后采用不同的引物和探针进行定量检测,考察各组探针和引物的扩增效果。

[0094] 采用的引物和探针如表1:

[0095] 表1引物和探针

名称	类型	序列	序号	Ct 值
Set1	上游引物	ACGCGAGTTTTGCGTAGTC	SEQ ID NO:4	31.5
	下游引物	TCCGAATACGAACCGCTAA	SEQ ID NO:5	
	探针	ACGGAGTTCGGTTTTGCGTTTC	SEQ ID NO:6	
Set2	上游引物	GTTTTCGTATTACGTTCTGGG	SEQ ID NO:7	31.7
	下游引物	TCGAACCGACCTAAAATACC	SEQ ID NO:8	
	探针	AATCGGGAGTGGGGTCGGGCGA	SEQ ID NO:9	
Set3	上游引物	TATCGAGAGCGTATGGTTTG	SEQ ID NO:10	31.6
	下游引物	CCACGTTATAAAAACGACCG	SEQ ID NO:11	
	探针	AGGGTCGTCGTTTCGGGAGACGGT	SEQ ID NO:12	
Set4	上游引物	AGAGTTATTTTCGCGTTTTGC	SEQ ID NO:13	31.7
	下游引物	ATCCCGAACGTAATACGAAA	SEQ ID NO:14	
	探针	TGGGAGGTTTCGGGTTAGGACGCGA	SEQ ID NO:15	
Set5	上游引物	TGCGTTTTTCGTATTACGTTC	SEQ ID NO:16	33.3
	下游引物	CCAACCGAAAACCTTCGAATA	SEQ ID NO:17	
	探针	GCGGTTCGTATTCGGAGAAGTAGCGCG	SEQ ID NO:18	
Set6	上游引物	GCGGTTCGTATTCGGAGAAG	SEQ ID NO:19	35.8
	下游引物	TCTACCGCCAACCGAAAACCT	SEQ ID NO:20	
	探针	AGCGCGAGTATTC	SEQ ID NO:21	
Set7	上游引物	TGCGGAGGCGTAGGGTC	SEQ ID NO:22	32.8
	下游引物	CAACCGAAATCCCCAACG	SEQ ID NO:23	
	探针	CCTACAACCGCGCGTAAACAAAAACG	SEQ ID NO:24	

[0098] 各组探针和引物的扩增结果如图5,Set1的扩增结果参考实施例3检测限实验结果

(检测限中S3的检测模板与本对比例中的检测模板相同)。由表中数据可见,针对目的基因的特异性扩增过程中,Set1组的扩增结果Ct最小,表现出最好的扩增效果,优于其他组别的探针。

[0099] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 广州市康立明生物科技有限责任公司
- [0003] <120> ITGA4基因甲基化检测试剂、试剂盒及检测方法
- [0004] <130> MP1625708
- [0005] <160> 24
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 33
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] tgcttctccg ggtacgggcc gctgggtggg gtc 33
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 23
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <400> 2
- [0018] tcggagaagt agcgcgagta ttc 23
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 20
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <400> 3
- [0024] aaatcgaccc accgcgaacg 20
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 19
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <400> 4
- [0030] acgcgagttt tgcgtagtc 19
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 19
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <400> 5
- [0036] tccgaatacg aaccgctaa 19
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 23

[0039]	<212> DNA
[0040]	<213> 人工序列
[0041]	<400> 6
[0042]	acggagttcg gttttgcggtt ttc 23
[0043]	<210> 7
[0044]	<211> 20
[0045]	<212> DNA
[0046]	<213> 人工序列
[0047]	<400> 7
[0048]	gttttcgtat tacgttcggg 20
[0049]	<210> 8
[0050]	<211> 20
[0051]	<212> DNA
[0052]	<213> 人工序列
[0053]	<400> 8
[0054]	tcgaaccgac ctaaaatacc 20
[0055]	<210> 9
[0056]	<211> 22
[0057]	<212> DNA
[0058]	<213> 人工序列
[0059]	<400> 9
[0060]	aatcgggagt ggggtcgggc ga 22
[0061]	<210> 10
[0062]	<211> 20
[0063]	<212> DNA
[0064]	<213> 人工序列
[0065]	<400> 10
[0066]	tatcgagagc gtatggtttg 20
[0067]	<210> 11
[0068]	<211> 20
[0069]	<212> DNA
[0070]	<213> 人工序列
[0071]	<400> 11
[0072]	ccacgttata aaaacgaccg 20
[0073]	<210> 12
[0074]	<211> 23
[0075]	<212> DNA
[0076]	<213> 人工序列
[0077]	<400> 12

[0078]	agggtcgtcg ttcgggagac ggt 23
[0079]	<210> 13
[0080]	<211> 20
[0081]	<212> DNA
[0082]	<213> 人工序列
[0083]	<400> 13
[0084]	agagttatatt cgcgttttgc 20
[0085]	<210> 14
[0086]	<211> 20
[0087]	<212> DNA
[0088]	<213> 人工序列
[0089]	<400> 14
[0090]	atcccgaacg taatacgaaa 20
[0091]	<210> 15
[0092]	<211> 24
[0093]	<212> DNA
[0094]	<213> 人工序列
[0095]	<400> 15
[0096]	tgggaggttc gggtaggac gcga 24
[0097]	<210> 16
[0098]	<211> 20
[0099]	<212> DNA
[0100]	<213> 人工序列
[0101]	<400> 16
[0102]	tgcgttttcg tattacgttc 20
[0103]	<210> 17
[0104]	<211> 20
[0105]	<212> DNA
[0106]	<213> 人工序列
[0107]	<400> 17
[0108]	ccaaccgaaa acttcgaata 20
[0109]	<210> 18
[0110]	<211> 27
[0111]	<212> DNA
[0112]	<213> 人工序列
[0113]	<400> 18
[0114]	gcggttcgta ttcggagaag tagcgcg 27
[0115]	<210> 19
[0116]	<211> 20

[0117]	<212> DNA
[0118]	<213> 人工序列
[0119]	<400> 19
[0120]	gcggttcgta ttcggagaag 20
[0121]	<210> 20
[0122]	<211> 20
[0123]	<212> DNA
[0124]	<213> 人工序列
[0125]	<400> 20
[0126]	tctaccgccca accgaaaact 20
[0127]	<210> 21
[0128]	<211> 13
[0129]	<212> DNA
[0130]	<213> 人工序列
[0131]	<400> 21
[0132]	agcgcgagta ttc 13
[0133]	<210> 22
[0134]	<211> 17
[0135]	<212> DNA
[0136]	<213> 人工序列
[0137]	<400> 22
[0138]	tgcgaggcg tagggtc 17
[0139]	<210> 23
[0140]	<211> 19
[0141]	<212> DNA
[0142]	<213> 人工序列
[0143]	<400> 23
[0144]	caaccgaaat tccccaacg 19
[0145]	<210> 24
[0146]	<211> 26
[0147]	<212> DNA
[0148]	<213> 人工序列
[0149]	<400> 24
[0150]	cctacaaccg cgcgtaaaca aaaacg 26

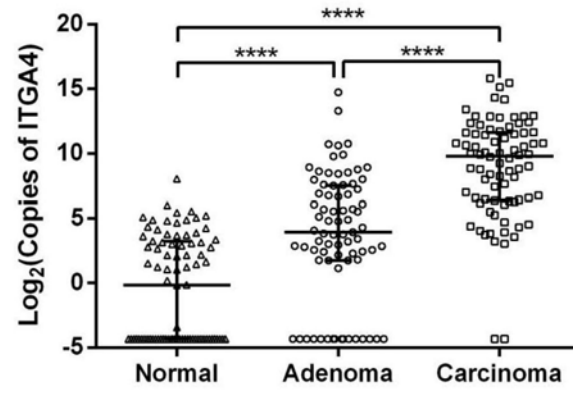


图1

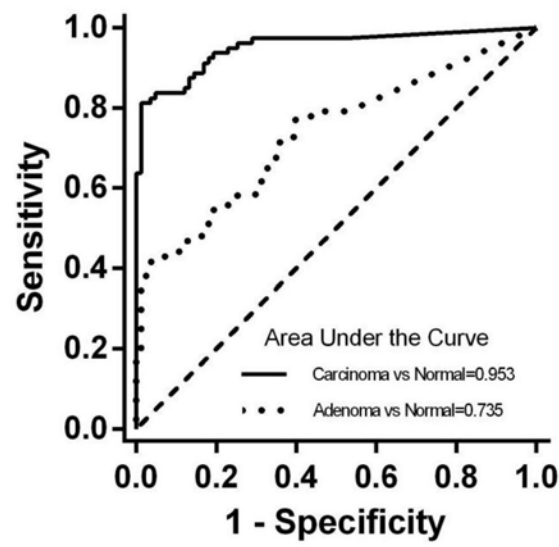


图2

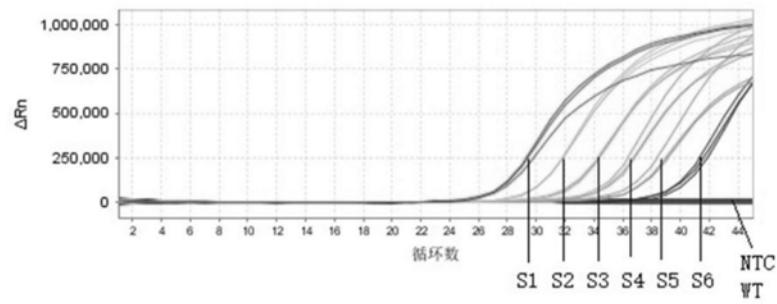


图3

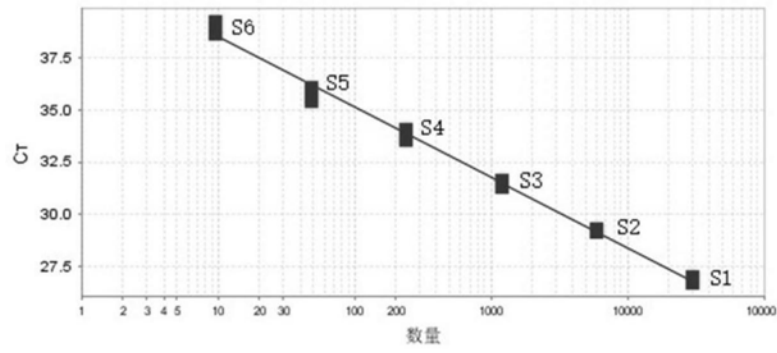


图4

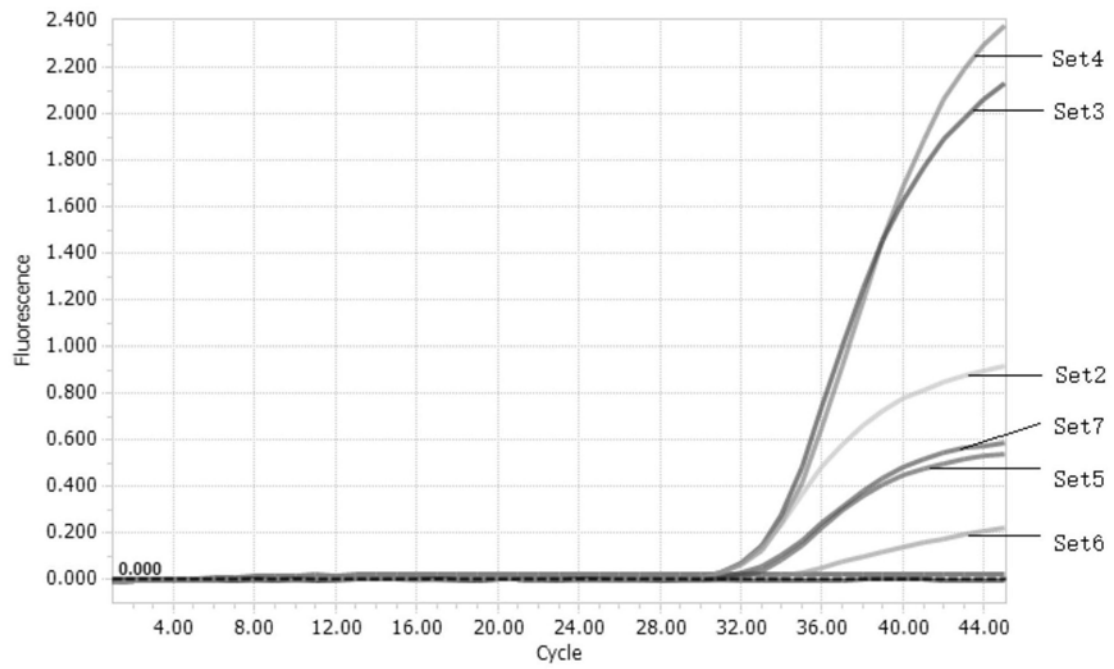


图5