



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114277154 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 29

(21) 申请号 202210102556.6

(22) 申请日 2022.01.27

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114277154 A

(43) 申请公布日 2022.04.05

(73) 专利权人 武汉康录生物技术股份有限公司  
地址 430075 湖北省武汉市武汉东湖新技术开发区高科园三路9号武汉光谷精准医疗产业基地一期(全部自用)8号  
厂房1-4层(1)厂房号

(72) 发明人 魏照云 陈海燕 李雪梅 李倩

(74) 专利代理机构 武汉世跃专利代理事务所  
(普通合伙) 42273  
专利代理师 邬丽明

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 110964809 A, 2020.04.07

CN 111254199 A, 2020.06.09

CN 112094912 A, 2020.12.18

审查员 陈小燕

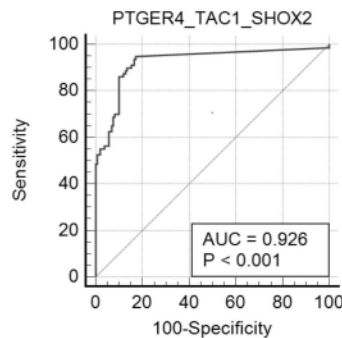
权利要求书2页 说明书13页  
序列表8页 附图5页

(54) 发明名称

一种用于肺癌诊断和早期肺癌无创筛查的检测试剂盒

(57) 摘要

本发明属于分子诊断技术领域,公开了一种用于肺癌诊断和早期肺癌无创筛查的检测试剂盒,包括用于检测人源生物样品中肺癌相关基因的靶区域的甲基化水平的引物对和荧光探针组合,所述肺癌相关基因为SHOX2、RASSF1A、PTGER4、TAC1、SOX17、CD01、HOXA9中的一种或多种;而且,采用多个肺癌相关基因、不同靶序列组合检测能够有效提升检测的灵敏度、特异性和准确性。该试剂盒采用甲基化特异性荧光定量PCR的方法,操作简单,易于推广,对于提升肺癌患者生存率具有重要意义,具备良好的临床应用前景。



1. 一种用于检测人源生物样品中肺癌相关基因的靶区域的甲基化水平的引物对和荧光探针组合物在制备辅助诊断肺癌检测试剂盒中的应用,其特征在於,

所述引物对和荧光探针组合物用于对亚硫酸盐处理后的肺癌相关基因的靶区域进行荧光定量PCR扩增;

所述肺癌相关基因为SHOX2、PTGER4和TAC1;

所述SHOX2基因的靶区域为GRCh38:3:158096298-158096648 和GRCh38:3:158098932-158099255;

所述PTGER4基因的靶区域为GRCh38:5:40679693-40679952 和GRCh38:5:40681355-40681679;

所述TAC1基因的靶区域为GRCh38:7:97732108-97732308 和GRCh38:7:97732777-97732976;

其中,用于扩增所述SHOX2基因的靶区域的引物对和荧光探针组合物为组合1和组合2,所述组合1的引物对序列如SEQ ID No.1~2所示,所述组合1的荧光探针序列如SEQ ID No.3所示,所述组合2的引物对序列如SEQ ID No.4~5所示,所述组合2的荧光探针序列如SEQ ID No.6所示;

用于扩增所述PTGER4基因的靶区域的引物对和荧光探针组合物为组合5和组合6,所述组合5的引物对序列如SEQ ID No.13~14所示,所述组合5的荧光探针序列如SEQ ID No.15所示,所述组合6的引物对序列如SEQ ID No.16~17所示,所述组合6的荧光探针序列如SEQ ID No.18所示;

用于扩增所述TAC1基因的靶区域的引物对和荧光探针组合物为组合7和组合8,所述组合7的引物对序列如SEQ ID No.19~20所示,所述组合7的荧光探针序列如SEQ ID No.21所示,所述组合8的引物对序列如SEQ ID No.22~23所示,所述组合8的荧光探针序列如SEQ ID No.24所示;

所述检测试剂盒还包括用于扩增所述人源生物样品中经亚硫酸盐处理后的ACTB基因保守序列的ACTB引物对和荧光探针组合物;

所述ACTB引物对和荧光探针组合物中的引物对序列如SEQ ID No.43~44所示,且其荧光探针序列如SEQ ID No.45所示;

所述人源生物样品为血清或血浆。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述荧光探针的5' 端标记有荧光报告基团,所述荧光探针的3' 端标记有荧光淬灭基团;

所述荧光报告基团为FAM、ROX、VIC、JOE、CY3、CY5、NED、TAMRA和TEXAS RED中的任意一种;

所述荧光淬灭基团为AMRA、DABCYL、ECLIPSE、BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3和MGB中的任意一种。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述检测试剂盒包括对人源生物样品进行DNA提取和纯化的试剂;所述提取和纯化的试剂包含将所述人源生物样品DNA中未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶的亚硫酸盐转化剂。

4. 权利要求3所述的应用,其特征在於,所述亚硫酸盐转化剂为亚硫酸氢钠、亚硫酸氢铵、偏重亚硫酸钠中的一种或两种以上。

5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述检测试剂盒包括阴性质控品和阳性质

控品，

所述阴性质控品为纯化水、检测靶区域甲基化阴性的细胞DNA经亚硫酸盐转化后的bisDNA或人工合成的检测靶区域甲基化阴性的质粒中的任意一种；

所述阳性质控品为检测靶区域序列甲基化阳性的细胞DNA经亚硫酸盐转化后的bisDNA或人工合成的检测靶甲基化阳性的质粒中的任意一种。

## 一种用于肺癌诊断和早期肺癌无创筛查的检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子诊断领域,具体地涉及一种用于肺癌诊断和早期肺癌无创筛查的检测试剂盒,所述试剂盒可以检测SHOX2、RASSF1A、PTGER4、TAC1、SOX17、CD01、HOXA9中一个或多个基因的靶区域的甲基化水平。

### 背景技术

[0002] 2018年全球癌症统计数据显示,全球范围内肺癌仍然是癌症发病率和死亡率的主要因素,当年估计新增210万肺癌病例和180万死亡病例,占癌症死亡人数的18.4%。尽管目前诊断和治疗的手段不断提升,但大部分肺癌病例都是在晚期确诊的,其五年生存率仅有16%,而吸烟、环境污染、职业暴露、呼吸性系统疾病和遗传因素等是肺癌发生的原因。

[0003] 根据肺癌细胞在显微镜下的形态特点,可以初步分为两种类型:小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)。绝大多数肺癌是非小细胞肺癌,约占85%。它又能进一步被分为三类,分别是:腺癌,鳞癌和大细胞癌。其中腺癌是最主要的类型,约占非小细胞肺癌中的50%。根据癌细胞的扩散程度,肺癌分为0期、I期、II期、III期或者IV期,其中0期和I期预后良好,IV期即为癌症晚期。早期诊断癌症是提高患者生存的主要因素,在I期确诊的非小细胞肺癌患者5年总生存率接近50%,而IV期确诊的肺癌患者五年生存率只有1%。要想解决肺癌防治的诸多问题,关键需要进一步推广和完善肺癌筛查及早诊早治策略。

[0004] 2019年肺癌筛查与管理中国专家共识中推荐的肺癌筛查手段有:LDCT检查、肿瘤标志物检测、支气管镜检查 and 痰液细胞学检查。痰液细胞学检查是一种特异性很高而灵敏度较弱的手段,不能作为常规肺癌筛查手段。支气管镜检查作为一种侵入性、创伤性检查手段,对临床医师技术操作技术要求高且不容易为患者接受,也不能作为常规肺癌筛查手段。常用的肿瘤标记物胃泌素释放肽前体、神经元特异性烯醇化酶、癌胚抗原、细胞角蛋白19片段等对肺癌诊断有参考价值,但这些蛋白标记物与肿瘤基因异常变化并无直接关联,且需要定量cutoff值来保证特异性而限制了灵敏度。LDCT检查对肺癌灵敏度高,是目前高危人群肺癌筛查的可靠手段,但LDCT误诊率高,较高的假阳性率会导致不必要的焦虑、不必要的辐射暴露和进一步的侵入性检查,如支气管镜检查,以明确排除肺癌。肺癌的早期发现、早期诊断、早期治疗是降低肺癌死亡人数的重要措施,然而当前肺癌的早期诊断技术存在诸多弊端。为了有效的提高肺癌高风险人群的早诊比例,急需一种灵敏性和特性高的且无创的方法来提高早期筛查的依从性,实现肺癌的早诊早治,提高患者生存率。

[0005] CpG二核苷酸内胞嘧啶残基的甲基化在基本的细胞过程、人类疾病甚至癌症中起着重要作用。在癌症发生的早期即发生了DNA甲基化,同时DNA甲基化是一种非常稳定的标记,故DNA甲基化检测可以作为一种有效的癌症筛查手段,而且表观遗传癌症生物标志物独立于经典形态学,因此具有克服细胞学局限性的广泛潜力。大量研究表明,基因甲基化检测是一种理想的肺癌早期诊断方法。随着检测技术的不断进步,可以实现多种基因的甲基化检测。游离循环肿瘤DNA(ctDNA)是由肿瘤细胞坏死或者凋亡后释放到体液中的单链或者双链DNA,对ctDNA进行检测,可以对肿瘤进行实时监控、早期诊断与预后判断等。目前相关研

究报道中通过单一甲基化ctDNA在检出灵敏度上都不高,因此难以作为肺癌早期筛查的有效方法。而研究发现多基因甲基化联合检测在病变组织、支气管肺泡灌洗液、痰液、外周血等样本中均具有较高的检出率,并且较单一基因甲基化检测灵敏度及特异性更高,是一种理想的肺癌早期诊断方法。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于肺癌辅助诊断和早期肺癌无创筛查的检测试剂盒,以不同肺癌相关基因的不同检测区域作为甲基化检测的靶区域,显著提高了检测的灵敏度和特异性,实现了早期肺癌的快速、准确检测。

[0007] 为了实现上述目的,本发明的技术方案具体如下:

[0008] 一种用于肺癌诊断和早期肺癌无创筛查的检测试剂盒,包括用于检测人源生物样品中肺癌相关基因靶区域的甲基化水平的引物对和荧光探针组合;所述引物对和荧光探针组合用于对亚硫酸盐处理后的肺癌相关基因的靶区域进行荧光定量PCR扩增;所述肺癌相关基因为SHOX2、RASSF1A、PTGER4、TAC1、SOX17、CD01、HOXA9中的一种或多种。

[0009] 作为本发明的一种优选实施方式,所述肺癌相关基因为SHOX2、RASSF1A、PTGER4、TAC1、SOX17、CD01、HOXA9中的至少两种。

[0010] 更加优选地,所述肺癌相关基因为SHOX2、RASSF1A、PTGER4、TAC1、SOX17、CD01、HOXA9中的至少三种。

[0011] 最优选地,所述肺癌相关基因至少包括PTGER4和TAC1。

[0012] 具体的,在上述技术方案中,所述肺癌相关基因的靶区域位置如下所示:

[0013] 所述SHOX2基因检测靶区域选自GRCh38:3:158095904~158099559的全长区域或部分区域;

[0014] 所述RASSF1A基因检测靶区域选自GRCh38:3:50329537~50333792的全长区域或部分区域;

[0015] 所述PTGER4基因检测靶区域选自GRCh38:5:40679345~40681915的全长区域或部分区域;

[0016] 所述TAC1基因检测靶区域选自GRCh38:7:97731968~97733724的全长区域或部分区域;

[0017] 所述SOX17基因检测靶区域选自GRCh38:8:54457647~54460002的全长区域或部分区域;

[0018] 所述CD01基因检测靶区域选自GRCh38:5:115804332~115805732的全长区域或部分区域;

[0019] 所述HOXA9基因检测靶区域选自GRCh38:7:27163082~27164508的全长区域或部分区域。

[0020] 优选地,本发明为各上述肺癌相关基因分别提供两个靶区域,具体如下所示:

[0021] 所述SHOX2基因的靶区域为GRCh38:3:158096232~158097040的全长区域或部分区域,以及GRCh38:3:158098541~158099300的全长区域或部分区域;

[0022] 所述RASSF1A基因的靶区域为GRCh38:3:50329626~50330340的全长区域或部分区域,以及GRCh38:3:50332982~5033697的全长区域或部分区域;

[0023] 所述PTGER4基因的靶区域为GRCh38:5:40679563~40680228的全长区域或部分区域,以及GRCh38:5:40680965~40681833的全长区域或部分区域;

[0024] 所述TAC1基因的靶区域为GRCh38:7:97731978~97732326的全长区域或部分区域,以及GRCh38:7:97732777-97733338的全长区域或部分区域;

[0025] 所述SOX17基因的靶区域为GRCh38:8:54457679~54458470的全长区域或部分区域,以及GRCh38:8:54459030~54459859的全长区域或部分区域;

[0026] 所述CD01基因的靶区域为GRCh38:5:115804358~115804732的全长区域或部分区域,以及GRCh38:5:115804748~115805462的全长区域或部分区域;

[0027] 所述HOXA9基因的靶区域为GRCh38:7:27163398~27163804的全长区域或部分区域,以及GRCh38:7:27163836~27164255的全长区域或部分区域。

[0028] 更加优选地,所述肺癌相关基因的两个靶区域位置具体如下所示:

[0029] SHOX2基因的两个靶区域的序列分别为GRCh38:3:158096298-158096648和GRCh38:3:158098932-158099255;

[0030] RASSF1A基因的两个靶区域的序列分别为GRCh38:3:50329826-50330145和GRCh38:3:50333182-5033501;

[0031] PTGER4基因的两个靶区域的序列分别为GRCh38:5:40679693-40679952和GRCh38:5:40681355-40681679;

[0032] TAC1基因的两个靶区域的序列分别为GRCh38:7:97732108-97732308和GRCh38:7:97732777-97732976;

[0033] SOX17基因的两个靶区域的序列分别为GRCh38:8:54458199-54458429和GRCh38:8:54459095-54459355;

[0034] CD01基因的两个靶区域的序列分别为GRCh38:5:115804423-115804162和GRCh38:5:115805064-115805397;

[0035] HOXA9基因的两个靶区域的序列分别为GRCh38:7:27163478-27163677和GRCh38:7:27163961-27164160。

[0036] 针对不同肺癌相关基因的不同靶区域,采用不同的引物对和荧光探针组合进行检测。可以理解的是,所述引物对和荧光探针组合与对应的肺癌相关甲基化基因的经亚硫酸盐处理后的检测靶区域的序列互补。

[0037] 优选地,对于所述的7种肺癌相关基因的靶区域,本发明提供了14种引物对和荧光探针组合,具体情况如表1所示。可以理解的是,所述检测试剂盒中至少包括表1中的一种组合,更加优选地,所述检测试剂盒中至少包括表1中的二种组合。

[0038] 表1

[0039]

基因名称	序列名称		序列
SHOX2	组合 1	正向引物	SEQ ID No.1
		反向引物	SEQ ID No.2
		荧光探针	SEQ ID No.3
	组合 2	正向引物	SEQ ID No.4
		反向引物	SEQ ID No.5
		荧光探针	SEQ ID No.6
RASSF1A	组合 3	正向引物	SEQ ID No.7
		反向引物	SEQ ID No.8
		荧光探针	SEQ ID No.9
	组合 4	正向引物	SEQ ID No.10
		反向引物	SEQ ID No.11
		荧光探针	SEQ ID No.12
PTGER4	组合 5	正向引物	SEQ ID No.13
		反向引物	SEQ ID No.14
		荧光探针	SEQ ID No.15
	组合 6	正向引物	SEQ ID No.16
		反向引物	SEQ ID No.17
		荧光探针	SEQ ID No.18

[0040]	TAC1	组合 7	正向引物	SEQ ID No.19
			反向引物	SEQ ID No.20
			荧光探针	SEQ ID No.21
		组合 8	正向引物	SEQ ID No.22
			反向引物	SEQ ID No.23
			荧光探针	SEQ ID No.24
SOX17	组合 9	正向引物	SEQ ID No.25	
		反向引物	SEQ ID No.26	
		荧光探针	SEQ ID No.27	
	组合 10	正向引物	SEQ ID No.28	
		反向引物	SEQ ID No.29	
		荧光探针	SEQ ID No.30	
CDO1	组合 11	正向引物	SEQ ID No.31	
		反向引物	SEQ ID No.32	
		荧光探针	SEQ ID No.33	
	组合 12	正向引物	SEQ ID No.34	
		反向引物	SEQ ID No.35	
		荧光探针	SEQ ID No.36	
HOXA9	组合 13	正向引物	SEQ ID No.37	
		反向引物	SEQ ID No.38	
		荧光探针	SEQ ID No.39	
	组合 14	正向引物	SEQ ID No.40	
		反向引物	SEQ ID No.41	
		荧光探针	SEQ ID No.42	

[0041] 进一步地,在上述技术方案中,所述荧光探针的5'端标记有荧光报告基团,所述荧光探针的3'端标记有荧光淬灭基团。

[0042] 优选地,所述荧光报告基团为FAM、ROX、VIC、JOE、CY3、CY5、NED、TAMRA和TEXAS RED中的任意一种,所述荧光淬灭基团为AMRA、DABCYL、ECLIPSE、BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3和结合分子沟的非荧光淬灭剂(MGB)中的任意一种。

[0043] 更加优选地,所述荧光报告基团为FAM、ROX、VIC、CY5中的至少两种,所述荧光淬灭基团为BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3、MGB中的至少一种。

[0044] 进一步地,在上述技术方案中,所述检测试剂盒还包括ACTB引物对和荧光探针组合,所述ACTB为内参基因,该组合用于扩增所述人源生物样品中经亚硫酸盐处理后的ACTB基因保守序列。

[0045] 优选地,所述ACTB基因的保守序列具体选自GRCh38:7:5561241~5561495区域。

[0046] 优选地,所述ACTB引物对和荧光探针组合的具体情况如表2所示:

[0047] 表2

基因名称	序列名称	序列	
[0048] ACTB	组合 15	正向引物	SEQ ID No.43
		反向引物	SEQ ID No.44
		荧光探针	SEQ ID No.45

[0049] 进一步地,在上述技术方案中,所述检测试剂盒的PCR反应体系可以为:共20 $\mu$ L, 1.2 $\times$ Taqman qPCR缓冲液、6mM的MgCl<sub>2</sub>溶液、250nM的脱氧核糖核苷三磷酸混合液、1.5个活性单位的DNA聚合酶、引物探针组合、纯化水。具体地,所述引物探针组合包括组合1~14中的至少一个以及组合15。

[0050] 进一步地,在上述技术方案中,所述人源生物样品包括但不限于组织、血液、血浆、血清、痰液、尿液、胸水和肺泡灌洗液等。

[0051] 优选地,所述人源生物样品为血液、血浆、血清或痰液。

[0052] 更加优选地,所述人源生物样品为血浆或血清。

[0053] 进一步地,在上述技术方案中,所述检测试剂盒中还包括有对人源生物样品进行DNA提取和纯化试剂。

[0054] 其中,所述提取和纯化试剂包含亚硫酸盐转化剂,所述亚硫酸盐转化剂可以将所述人源生物样品DNA中未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶残基保持不变。经亚硫酸盐转化剂转化后的模板序列在随后的PCR扩增反应中与试剂盒中的相对应的引物对和荧光探针组合互补结合,模板上甲基化的胞嘧啶残基位点作为胞嘧啶残基与引物的鸟嘌呤残基配对,而未甲基化的胞嘧啶残基位点作为尿嘧啶残基不能与试剂盒中引物配对结合。

[0055] 优选地,所述亚硫酸盐转化剂为亚硫酸氢钠、亚硫酸氢铵、偏重亚硫酸钠中的一种或两种。

[0056] 进一步地,在上述技术方案中,所述检测试剂盒中包含有阴性质控品和阳性质控品。

[0057] 优选地,所述阴性质控品为纯化水、检测靶区域甲基化阴性的细胞DNA经亚硫酸盐转化后的bisDNA或人工合成的检测靶区域甲基化阴性的质粒中的任意一种。

[0058] 优选地,所述阳性质控品为检测靶区域序列甲基化阳性的细胞DNA经亚硫酸盐转化后的bisDNA或人工合成的检测靶甲基化阳性的质粒中的任意一种。

[0059] 进一步地,在上述技术方案中,所述检测试剂盒中还可以包括说明书,所述说明书用于阐述所述检测试剂盒的使用方法,以及对检测结果进行判断说明的方法。

[0060] 优选地,所述说明书的内容包括:采用逻辑回归的统计方法,针对不同甲基化基因靶序列或组合构建诊断模型,设定不同的cutoff值;根据检测结果,对受试者罹患肺癌的风险进行预测和评估。

[0061] 优选地,所述检测试剂盒的使用方法可以参照以下步骤:

[0062] 对待测样品进行处理得到bisDNA溶液,取其中5~10 $\mu$ L用试剂盒中的引物对和荧

光探针组合进行甲基化检测,同时检测阳性质控品至阴性质控品;所述引物对和荧光探针组合包括组合1~14中的至少一个以及组合15;

[0063] 使用检测试剂盒中的说明书分析检测样品肺癌相关基因靶序列的甲基化情况。

[0064] 更加优选地,所述待测样品的处理过程可参考以下步骤:

[0065] (1) 样品收集:获取人源血浆或血清;

[0066] (2) 裂解:取2.0mL血浆或血清,向其中加入2.0mL裂解液、200 $\mu$ L蛋白酶K,室温孵育15min;所述裂解液包括蛋白变性剂、表面活性剂、pH缓冲剂和核酸酶抑制剂;

[0067] (3) 转化:向步骤(2)中的混合液中加入1.0mL转化液,分别于98 $^{\circ}$ C孵育10min,64 $^{\circ}$ C孵育60min;所述转化混合液包括亚硫酸盐转化剂、保护剂和pH调节剂;

[0068] (4) 离心:向步骤(3)中加入2.0mL异丙醇,涡旋混匀后16000g离心1min,用移液器小心吸取下层澄清液体于新的离心管中;

[0069] (5) 结合:向步骤(4)中的混合液加入2.0mL结合液和100 $\mu$ L磁珠,室温孵育2min后进行磁分离;所述结合液包括离液盐和NaCl;

[0070] (6) 漂洗:将步骤(5)中获得的磁珠用800 $\mu$ L漂洗液漂洗后进行磁分离;重复该步骤一次;

[0071] (7) 脱硫:向步骤(6)中漂洗后的磁珠中加入800 $\mu$ L脱硫剂,室温孵育15min后进行磁分离;

[0072] (8) 漂洗:将步骤(7)中获得的磁珠用800 $\mu$ L漂洗液漂洗两次后进行磁分离;

[0073] (9) 洗脱:向步骤(8)中获得的磁珠中加入40~100 $\mu$ L洗脱液,56 $^{\circ}$ C孵育5min后磁分离,获取bisDNA溶液。

[0074] 本发明的有益效果:本发明采用对肺癌相关基因SHOX2、RASSF1A、PTGER4、TAC1、SOX17、CD01、HOXA9中的一种或多种基因的甲基化水平进行检测的方法,实现了对肺癌的辅助诊断和早期肺癌无创筛查;通过定位肺癌相关甲基化基因的靶区域,以及采用不同肺癌相关甲基化基因的组合,有效避免了肺癌相关甲基化标志物的不确定性和ctDNA片段缺失所造成的局限性,并提高了检测的准确性和特异性。而且,本发明试剂盒可以检测通过无创手段获取的生物样品,提升了受试者的依从性。故,本发明提供的试剂盒可以实现肺癌的早诊早治,提高患者生存率,具有良好的临床应用前景。

## 附图说明

[0075] 图1为实施例1中血浆样本提取纯化后bisACTB检测结果示意图;

[0076] 图2为实施例2中的检测试剂盒检测 $1 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L DNA溶液中浓度梯度基因甲基化扩增结果示意图;

[0077] 图3为实施例3中的检测试剂盒检测结果与临床结果比对所得ROC曲线图;

[0078] 图4为实施例4中7个甲基化基因检测结果与临床结果比对所得ROC曲线图;

[0079] 图5为实施例4中较优选组合标志物检测结果与临床结果比对所得ROC曲线;

[0080] 图6为实施例4中对比组合标志物检测结果与临床结果比对所得ROC曲线图。

## 具体实施方式

[0081] 为进一步阐述本发明为达到预期目的所采取的技术方案和实施效果,以下通过具

体的实施例对本发明的具体实施方式、特点和效果进行详细说明。需要理解的是,以下实施例只是作为示例用来更加清楚地阐述本发明的技术方案,并非用来限制本发明。

[0082] 本发明选取了7种肺癌相关甲基化基因标志物,具体为SHOX2、RASSF1A、PTGER4、TAC1、SOX17、CD01和H0XA9,并为每个标志物都提供了两个靶区域。进一步地,针对不同标志物的不同靶序列,分别设计了14个引物对和荧光探针组合。本发明提供的检测试剂盒包括14个组合中的至少一个组合;优选地,检测试剂盒包括14个组合中的至少两个组合,且两个组合最好来自不同的标志物。

[0083] 针对上述检测试剂盒,本发明在某一具体的实施方式中采用逻辑回归分析方式构建多标志物联合诊断模型来检测肺癌。通过将样本分成病例组和对照组,用SPSS或Medcalc软件对检测数据和临床结果进行逻辑分析,得出每个标志物的回归系数和一个偏差常数,即得到相应的逻辑回归方程。再将每个标志物的检测Ct值代入逻辑回归方程中,根据逻辑分数公式计算相应的逻辑分数,用Medcalc软件对逻辑分数和临床结果进行ROC曲线分析,选择95%置信区间内最佳的cutoff值。

[0084] 下述实施例中,未注明仪器、耗材和试剂,均为可通过市售购买的常规产品。

[0085] 实施例1DNA提取纯化

[0086] DNA提取和纯化试剂由裂解液、蛋白酶K、转化液、结合液、漂洗液A、脱硫剂、漂洗液B和洗脱液组成。

[0087] 裂解液由蛋白变性剂、表面活性剂、pH缓冲剂和核酸酶抑制剂组成。

[0088] 转化液由亚硫酸盐转化剂、保护剂和pH调节剂组成,其中,亚硫酸盐转化剂为亚硫酸氢钠、亚硫酸氢铵、偏重亚硫酸钠中的一种或两种,保护剂为氢醌或Trolox,pH调节剂为NaOH。

[0089] 结合液由高浓度离液盐和NaCl组成。

[0090] 漂洗液A由高浓度离液盐、核酸酶抑制剂、pH缓冲剂和无水乙醇组成。

[0091] 脱硫剂由NaOH和无水乙醇组成。

[0092] 漂洗液B由核酸酶抑制剂、pH缓冲剂和无水乙醇组成。

[0093] 洗脱液由核酸酶抑制剂和pH缓冲剂组成。

[0094] 在本实施例中,所述蛋白变性剂为硫氰酸胍,所述表面活性剂为NP-40,所述pH缓冲剂为Tris-HCl,所述核酸酶抑制剂为EDTA,所述离液盐为盐酸胍。

[0095] 本实施例以肺癌患者血浆样本为例,经过提取纯化,获得血浆bisDNA。提取纯化方法包括如下步骤:

[0096] (1) 将新鲜采集的EDTA抗凝血样4℃、1600g离心10min,小心地吸出血浆上清液,并转移到新的离心管中;

[0097] (2) 继续4℃、16000g离心10min,进一步去除附着在细胞碎片上的细胞源核酸,小心地将上清液吸出并转移到新的离心管中;

[0098] (3) 取2.0mL血浆,向其中加入2.0mL裂解液、200μL蛋白酶K,涡旋振荡混匀,室温孵育15min,期间每3~5min上下颠倒混匀10sec;

[0099] (4) 继续加入1.0mL转化混合液,振荡混匀后简短离心,以去除管盖内壁的液滴,分别于98℃孵育10min,64℃孵育60min;

[0100] (5) 孵育完成后加入2.0mL异丙醇,涡旋混匀后16000g离心1min,用移液器小心吸

取下层澄清液体与新的离心管中；

[0101] (6) 向以上混合液中加入2.0mL结合液和100 $\mu$ L磁珠，室温孵育10min，期间每3min上下颠倒混匀10sec，孵育结束后用磁分离器吸附磁珠2min，然后弃去上清溶液；

[0102] (7) 加入800 $\mu$ L漂洗液A重悬磁珠，振荡清洗1min，用磁分离器吸附磁珠1min，然后弃去上清溶液；重复该步骤一次；

[0103] (8) 加入800 $\mu$ L脱硫剂重悬磁珠，室温孵育15min，期间每3~5min上下颠倒混匀10sec；用磁分离器吸附磁珠1min，然后弃去上清溶液。

[0104] (9) 加入800 $\mu$ L漂洗液B重悬磁珠，振荡清洗1min，用磁分离器吸附磁珠1min，然后弃去上清溶液；

[0105] (10) 重复步骤(9)一次，6000g快速离心30sec，用磁分离器吸附磁珠，去除残余上清溶液，室温静置5min，以去除残余乙醇；

[0106] (11) 加入100 $\mu$ L洗脱缓冲液重悬磁珠，振荡洗脱2min，用磁分离器吸附磁珠，吸取上清于新的离心管中，做好标记；

[0107] (12) 将标记好的DNA存放于4 $^{\circ}$ C冰箱待用，或者保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱长期保存。

[0108] 使用本实施例提供的DNA提取和纯化试剂以及制备方法，能够实现DNA提取转化一步完成。

[0109] 用以上方法提取6例肺癌患者血浆样本，通过荧光定量PCR检测内参基因bisACTB的Ct值见图1，其中用于扩增内参基因bisACTB的引物探针组合为组合15(bisACTB的制备检测具体过程可参考实施例2)。

[0110] 实施例2一种检测试剂盒

[0111] 本实施例提供的检测试剂盒选择TAC1、PTGER4和SHOX2三个基因标志物中各一个靶区域作为检测区域，具体为：

[0112] TAC1基因的靶区域为GRCh38:7:97732108~97732308；

[0113] PTGER4基因的靶区域为GRCh38:5:40681355~40681679；

[0114] SHOX2靶区域为GRCh38:3:158098932-158099255。

[0115] 针对以上检测区域的核酸序列，分别构建甲基化状态下和非甲基化状态下经亚硫酸盐转化之后的人工合成质粒作为阳性质控品和阴性质控品，分别命名为TAC1-M1、TAC1-UM1、PTGER4-M1、PTGER4-UM1、SHOX2-M1和SHOX2-UM1。

[0116] 为了监控模板DNA质量和PCR检测结果是否有效，以ACTB作为内参，ACTB基因的检测区域为GRCh38:7:5561241~5561495。根据ACTB检测区域经亚硫酸盐转化后的序列，构建对应的人工合成质粒bisACTB。

[0117] 用以上质粒分别配制不同浓度梯度的甲基化基因溶液，包括单个基因甲基化、两个基因甲基化和三个基因甲基化，每种甲基化组合均配制出 $1 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L DNA模板中含有100%基因甲基化，10%基因甲基化，1%基因甲基化，0.1%基因甲基化和0%基因甲基化的模板DNA溶液。以SHOX2为例，列出每种浓度甲基化DNA模板的配制方法如下：

[0118] (1) SHOX2 100%甲基化溶液配制：10%体积的 $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L的SHOX2-M1和10%体积的 $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L bisACTB以及80%体积的TE缓冲液充分混匀所得溶液；

[0119] (2) SHOX2 10%甲基化溶液配制：10%体积的 $1 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L的SHOX2-M1、9%体积的 $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L的SHOX2-UM1和10%体积的 $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L bisACTB以及71%体积

的TE缓冲液充分混匀所得溶液；

[0120] (3) SHOX2 1%甲基化溶液配制:10%体积的 $1 \times 10^3$ copies/ $\mu$ L的SHOX2-M1、9.9%体积的 $1 \times 10^5$ copies/ $\mu$ L的SHOX2-UM1和10%体积的 $1 \times 10^5$ copies/ $\mu$ LbisACTB以及70.1%体积的TE缓冲液充分混匀所得溶液；

[0121] (4) SHOX2 0.1%甲基化溶液配制:10%体积的 $1 \times 10^2$ copies/ $\mu$ L的SHOX2-M1、9.99%体积的 $1 \times 10^5$ copies/ $\mu$ L的SHOX2-UM1和10%体积的 $1 \times 10^5$ copies/ $\mu$ LbisACTB以及70.01%体积的TE缓冲液充分混匀所得溶液；

[0122] (5) SHOX2 0%甲基化溶液配制:10%体积的 $1 \times 10^5$ copies/ $\mu$ L的SHOX2-UM1和10%体积的 $1 \times 10^5$ copies/ $\mu$ L bisACTB以及80%体积的TE缓冲液充分混匀所得溶液。

[0123] 本实施例中检测以上甲基化基因组合的引物对和荧光探针组合包括检测SHOX2基因甲基化的组合2,检测TAC1甲基化的组合7,检测PTGER4甲基化的组合6,检测内参基因ACTB的组合15。

[0124] 其中,组合2中荧光探针5'端荧光报告基因为FAM,3'端荧光淬灭基因为MGB;组合7中荧光探针5'端荧光报告基因为ROX,3'端荧光淬灭基因为BHQ-2;组合6中荧光探针5'端荧光报告基因为Cy5,3'端荧光淬灭基因为BHQ-3;组合15中荧光探针5'端荧光报告基因为VIC,3'端荧光淬灭基因为MGB。

[0125] 本实施例中PCR反应体系除包括以上4个组合外,还包括 $1.2 \times$  Taqman qPCR缓冲液、6mM的 $MgCl_2$ 溶液、250nM的脱氧核糖核苷三磷酸混合液、1.5个活性单位的DNA聚合酶以及纯化水,共20 $\mu$ L。

[0126] 向以上20 $\mu$ L混合反应液中分别加入5 $\mu$ L不同浓度梯度的甲基化基因溶液,每种溶液重复检测3次,进行荧光定量PCR反应。

[0127] 荧光定量PCR反应程序包括三个阶段:95 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 15s,62 $^{\circ}$ C 30s,10个循环;95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 30s,35个循环;在第三阶段收集FAM/ROX/Cy5/VIC荧光信号。以FAM/ROX/Cy5/VIC荧光信号达到设定的阈值所需的循环数Ct值为标准,出现扩增曲线的基因则为甲基化阳性,否则为阴性。

[0128] 检测结果显示,不论是单个基因甲基化、两个基因甲基化,还是三个基因甲基化的不同浓度梯度甲基化溶液,每个甲基化基因均能稳定检出,且甲基化阴性模板无扩增。其中 $1 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L DNA溶液中三个基因浓度梯度甲基化检测结果如图2所示。

[0129] 由本实施例可知,本发明提供的肺癌辅助诊断和/或早期肺癌无创筛查的多基因甲基化检测试剂盒,能够检出 $1 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L DNA溶液中0.1%的基因甲基化。

[0130] 实施例3逻辑回归分析和cutoff值设置

[0131] 本实施例采用实施例2中提供的试剂盒和检测方法,说明对样本进行逻辑回归分析和cutoff值设置的方法。

[0132] 本实施例通过检测20例正常人血浆样本、25例肺部良性疾病病人血浆样本、51例肺癌病人血浆样本中SHOX2、TAC1和PTGER4的甲基化情况,用SPSS或Medcalc软件对检测数据和临床结果进行逻辑分析,得到相应的逻辑回归方程: $y = k_1 \times x_1 + k_2 \times x_2 + k_3 \times x_3 + b$ 。其中 $x_1/x_2/x_3$ 分别为SHOX2、TAC1、PTGER4基因扩增Ct值, $k_1/k_2/k_3$ 分别为SHOX2、TAC1、PTGER4基因的临床系数,b为常数,具体数值见表3:

[0133] 表3

[0134]	基因	SHOX2	TAC1	PTGER4	常数
	数值	-0.2749 ( $k_1$ )	-0.42624 ( $k_2$ )	-0.70429 ( $k_3$ )	44.96082 (b)

[0135] 根据公式  $S = \text{EXP}(y) / [\text{EXP}(y) + 1] \times 100$  计算得出相应的逻辑分数。用 Medcalc 软件对逻辑分数和临床结果进行 ROC 曲线分析, 选择最佳 cutoff 值。

[0136] 本实施例中 ROC 曲线如图 3 所示, 获得的 cutoff 值见表 4:

[0137] 表 4

	临床截断值	cutoff=46.26	
[0138]	参考区间	阴性 < 46.26	阳性 $\geq$ 46.26
	灵敏度	88.24	
	特异性	93.33	

[0139] 根据以上表格, 在检测临床样本时, 当逻辑分数  $\geq 46.26$  时, 即为罹患肺癌高风险, 建议受试者接受进一步临床检查; 当逻辑分数  $< 46.26$  时, 即为罹患肺癌低风险, 建议受试者每年一次甲基化检测。

[0140] 实施例 4 标志物的 ROC 曲线分析

[0141] 本实施例提供了本发明中提供的 7 种甲基化基因标志物及多标志物联合检测模型 ROC 曲线分析结果。

[0142] 收集 237 例临床血浆样本, 其中包括 83 例正常病人样本, 74 例肺部结节病人样本 (其中良性结节 45 例, 炎性结节 29 例), 80 例非小细胞肺癌病人样本 (其中 0 期 2 例, I 期 9 例, II 期 18 例, III 期 26 例, IV 期 25 例)。

[0143] 按照实施例 1 中的方法, 获得 237 例对应的 bis-cfDNA 模板。然后使用本发明提供的各个标志物的引物对和荧光探针组合进行荧光定量 PCR 检测, 获得每个标志物的甲基化水平检测数据。使用 MedCalc 软件, 选择 95% 置信区间, 产生 ROC 曲线及其曲线下面积 (AUC) 值。表 5 展示了本发明 7 个甲基化基因两个靶序列 ROC 曲线的曲线下面积 (AUC), 各个基因的 ROC 曲线见图 4。

[0144] 表 5

Target	Target SEQ1			Target SEQ2			
	Gene	AUC	SE	95%CI	AUC	SE	95%CI
[0145]	SHOX2	0.766	0.0302	0.707 to 0.819	0.721	0.0359	0.659 to 0.777
	RASSF1A	0.728	0.0298	0.667 to 0.784	0.731	0.0367	0.670 to 0.787
	PTGER4	0.802	0.0301	0.745 to 0.850	0.795	0.0336	0.738 to 0.845
	TAC1	0.857	0.0264	0.806 to 0.899	0.836	0.0301	0.783 to 0.881
	SOX17	0.794	0.0305	0.737 to 0.843	0.775	0.0344	0.717 to 0.827
	CDO1	0.745	0.0343	0.685 to 0.799	0.741	0.0362	0.680 to 0.795
	HOXA9	0.699	0.0349	0.636 to 0.756	0.703	0.0351	0.640 to 0.760

[0146] 根据 ROC 曲线分析可知: 7 个甲基化基因的两个靶区域的曲线下面积结果较为一致, 但也存在一定差异, 可同时选择一个基因的两个靶区域或者任意一个进行检测; 7 个基因的曲线下面积中 TAC1 和 PTGER4 的面积最大且差异面积最大, 优先选择二者组合。

[0147] 同时检测标志物的两个靶区域或同时检测更多的标志物,可以获得更好的灵敏度和特异性,但会增加使用成本。采用荧光定量PCR的方法,同时检测3个标志物,无疑是兼顾灵敏度和特异性的较优方案。

[0148] 本实施例采用至少包括TAC1和PTGER4的3个标志物的组合,用实施例2中的逻辑回归方法,不同组合的ROC曲线下面积(AUC)、cutoff值及对应的灵敏度和特异性,具体结果见表6,ROC曲线见图5。

[0149] 表6

标志物组合	灵敏度%	特异性%	Cutoff	AUC	95%CI
PTGER4/TAC1/SHOX2	86.25	89.81	>27.25	0.926	0.885to 0.956
PTGER4/TAC1/RASSF1A	86.25	88.54	>30.02	0.937	0.898to 0.964
PTGER4/TAC1/SOX17	81.25	89.81	>33.33	0.946	0.909to 0.971
PTGER4/TAC1/CDO1	80	89.81	>37.88	0.941	0.903to 0.967
PTGER4/TAC1/HOXA9	83.75	89.17	>31.85	0.936	0.897to 0.964

[0151] 为了更好地说明表6中组合标志物的有益效果,本实施例中同时分析了一些不同时包括TAC1和PTGER4的标志物组合的ROC曲线下面积(AUC)、cutoff值及对应的灵敏度和特异性,具体结果见表7,ROC曲线见图6。

[0152] 表7

标志物组合	灵敏度%	特异性%	Cutoff	AUC	95%CI
SHOX2/RASSF1A/PTGER4	75	91.12	>32.6	0.842	0.789to 0.886
SHOX2/RASSF1A/TAC1	80	89.17	>32.78	0.873	0.823to 0.912
SHOX2/RASSF1A/SOX17	68.75	89.17	>38.22	0.895	0.849to 0.931
SHOX2/PTGER4/SOX17	72.5	89.81	>38.53	0.910	0.867to 0.944
SHOX2/PTGER4/HOXA9	70	89.17	>35.73	0.874	0.825to 0.913
SHOX2/SOX17/HOXA9	70	89.17	>42.61	0.886	0.838to 0.923

[0154] 对比表6和表7结果,可以看出至少包括TAC1和PTGER4的三标志物联合检测模型与不同时包括TAC1和PTGER4的三标志物联合检测模型相比,ROC曲线下面积(AUC)明显更大,且在保持90%附近的特异性时,具有更好的灵敏度。说明至少包括TAC1和PTGER4的三标志物联合检测模型可以作为较优的组合标志物应用于肺癌临床检测。

[0155] 需要说明的是,本实施例从使用成本上考虑只对包括TAC1和PTGER4在内的三个标志物单个检测区域联合检测模型进行展开分析,且只展开部分组合模型,不代表本发明的所有实施例。使用者可根据实际需要,如需要更好的有益效果,可以选择三个以及三个以上的标志物单个检测区域或两个检测区域进行联合检测。

[0156] 同时,本实施例中不同组合模型cutoff值设定是在保持90%附近的特异性所设定的cutoff值,不代表本发明仅能使用该cutoff值,根据不同的使用目的,可在本发明提供的ROC曲线中选择合适的cutoff值。

[0157] 实施例5多标志物联合检测模型在肺癌检测临床应用的效果

[0158] 本实施例提供了实施例4中多标志物联合检测模型在肺癌检测临床应用的实际效果。

[0159] 选择PTGER4/TAC1/SHOX2组合的临床检测结果进行分析,检测实际效果与临床诊

断结果比对结果见表8所示。

[0160] 表8

PTGER4/TAC1/ SHOX2	临床诊断								合 计
	阴性			阳性					
	正常 病人	肺结节		肺癌					
		良性	炎性	0期	I期	II期	III期	IV期	
阳性	7	5	3	1	9	14	21	24	84
阴性	76	40	26	1	0	4	5	1	153
合计	83	45	29	2	9	18	26	25	237
符合率	91.57	88.8	89.66	50.0	100	77.7	80.77	96.00	/
	90.45%			82.76%			88.24%		
总体灵敏度	86.25%								
总体特异度	90.45%								
阳性预测值	82.14%								
阴性预测值	92.81%								
准确度	89.03%								

[0162] 上表检测结果显示本发明提供PTGER4/TAC1/SHOX2标志物组合检测该批237例临床样本的检测肺癌的总体灵敏度为86.25%，特异度为90.45%，准确度为89.03%，其中，肺癌0期-II期的灵敏度为82.76%。故本申请提供的试剂盒可以用于肺癌的辅助诊断或者用于一般风险人群的肺癌早期筛查。

[0163] 本实施例只是用PTGER4/TAC1/SHOX2组合展现多标志物联合检测肺癌的临床使用效果，使用者可根据实际使用预期用途选择合适的组合模型进行临床应用。

[0164] 以上所述实施例为本发明的部分实施例，并非全部实施例。本领域技术人员可以对上述各实施例的技术方案进行修改或对部分技术特征进行等同替换，这些修改和替换均在本发明保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 武汉康录生物技术股份有限公司
- [0003] <120> 一种用于肺癌诊断和早期肺癌无创筛查的检测试剂盒
- [0004] <160> 45
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 21
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] tatcgggagg tgttgagag c 21
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 23
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] gcccgaaacta ccgaactact acg 23
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 17
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] ccgcctcgat acaaccg 17
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 21
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] tttcgtttcg tttgttcgat c 21
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 24
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] ctaccttcta acccgactta aacg 24
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 19
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0040] <400> 6  
[0041] tcgtacgagt ataggcggtt 19  
[0042] <210> 7  
[0043] <211> 18  
[0044] <212> DNA  
[0045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0046] <400> 7  
[0047] tggtttcggtt cggttcgc 18  
[0048] <210> 8  
[0049] <211> 20  
[0050] <212> DNA  
[0051] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0052] <400> 8  
[0053] atacgcaacg cgттаacacg 20  
[0054] <210> 9  
[0055] <211> 23  
[0056] <212> DNA  
[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0058] <400> 9  
[0059] cgggagttgg tattcgttgg gcg 23  
[0060] <210> 10  
[0061] <211> 18  
[0062] <212> DNA  
[0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0064] <400> 10  
[0065] cgaagcgtgc gtgttttc 18  
[0066] <210> 11  
[0067] <211> 22  
[0068] <212> DNA  
[0069] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0070] <400> 11  
[0071] cgatcgcgta cgtacgtata cg 22  
[0072] <210> 12  
[0073] <211> 18  
[0074] <212> DNA  
[0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0076] <400> 12  
[0077] aaaaccgcgc cgcaaccg 18

- [0078] <210> 13  
[0079] <211> 23  
[0080] <212> DNA  
[0081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0082] <400> 13  
[0083] ttttatttcg cgcgtttagt ttc 23  
[0084] <210> 14  
[0085] <211> 22  
[0086] <212> DNA  
[0087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0088] <400> 14  
[0089] gaacgcccat taaccgaatt aa 22  
[0090] <210> 15  
[0091] <211> 22  
[0092] <212> DNA  
[0093] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0094] <400> 15  
[0095] aacgcgtcct ccctaaacgc cg 22  
[0096] <210> 16  
[0097] <211> 19  
[0098] <212> DNA  
[0099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0100] <400> 16  
[0101] agcgattggc gggttttac 19  
[0102] <210> 17  
[0103] <211> 21  
[0104] <212> DNA  
[0105] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0106] <400> 17  
[0107] tactacaacc gcgaactacc g 21  
[0108] <210> 18  
[0109] <211> 22  
[0110] <212> DNA  
[0111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0112] <400> 18  
[0113] ttgtagttta tgcgtttaac gt 22  
[0114] <210> 19  
[0115] <211> 19  
[0116] <212> DNA

- [0117] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0118] <400> 19  
[0119] gagcgattag cgtgcgttc 19  
[0120] <210> 20  
[0121] <211> 20  
[0122] <212> DNA  
[0123] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0124] <400> 20  
[0125] cgaaataacc cgaacaaccg 20  
[0126] <210> 21  
[0127] <211> 17  
[0128] <212> DNA  
[0129] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0130] <400> 21  
[0131] cgcgaacact tactacg 17  
[0132] <210> 22  
[0133] <211> 24  
[0134] <212> DNA  
[0135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0136] <400> 22  
[0137] acgtggtacg tatcgttatt acgg 24  
[0138] <210> 23  
[0139] <211> 21  
[0140] <212> DNA  
[0141] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0142] <400> 23  
[0143] caaaatcccg taaaaaaccc g 21  
[0144] <210> 24  
[0145] <211> 23  
[0146] <212> DNA  
[0147] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0148] <400> 24  
[0149] acccctttcc atcctctcgc acg 23  
[0150] <210> 25  
[0151] <211> 23  
[0152] <212> DNA  
[0153] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0154] <400> 25  
[0155] gtttgattt tgttgcgtta gtc 23

- [0156] <210> 26  
[0157] <211> 18  
[0158] <212> DNA  
[0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0160] <400> 26  
[0161] aaacaccgac cgaaaccg 18  
[0162] <210> 27  
[0163] <211> 19  
[0164] <212> DNA  
[0165] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0166] <400> 27  
[0167] aaagcgttta tcggtcgtc 19  
[0168] <210> 28  
[0169] <211> 22  
[0170] <212> DNA  
[0171] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0172] <400> 28  
[0173] tttgtacggt ttggttgagt cg 22  
[0174] <210> 29  
[0175] <211> 21  
[0176] <212> DNA  
[0177] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0178] <400> 29  
[0179] ccgacgaaaa aaccctactc g 21  
[0180] <210> 30  
[0181] <211> 21  
[0182] <212> DNA  
[0183] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0184] <400> 30  
[0185] ataaccacgc gaccgccctc g 21  
[0186] <210> 31  
[0187] <211> 20  
[0188] <212> DNA  
[0189] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0190] <400> 31  
[0191] tacgcgattt ttgggacgtc 20  
[0192] <210> 32  
[0193] <211> 20  
[0194] <212> DNA

- [0195] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0196] <400> 32  
[0197] ctacgaacac gactcacgcg 20  
[0198] <210> 33  
[0199] <211> 21  
[0200] <212> DNA  
[0201] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0202] <400> 33  
[0203] ccccgacttc cccgaactcc g 21  
[0204] <210> 34  
[0205] <211> 25  
[0206] <212> DNA  
[0207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0208] <400> 34  
[0209] cgagtgggta atgtacgtta agttc 25  
[0210] <210> 35  
[0211] <211> 21  
[0212] <212> DNA  
[0213] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0214] <400> 35  
[0215] cattcctcct caaacgaaac g 21  
[0216] <210> 36  
[0217] <211> 28  
[0218] <212> DNA  
[0219] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0220] <400> 36  
[0221] cgccgcctaa cattaact acaacgcg 28  
[0222] <210> 37  
[0223] <211> 22  
[0224] <212> DNA  
[0225] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0226] <400> 37  
[0227] ggtttatttg tcgttcgctc tc 22  
[0228] <210> 38  
[0229] <211> 18  
[0230] <212> DNA  
[0231] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0232] <400> 38  
[0233] ccaccgctac cgcacgac 18

- [0234] <210> 39  
[0235] <211> 27  
[0236] <212> DNA  
[0237] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0238] <400> 39  
[0239] ctacctcatt acgcttaccg cccaacg 27  
[0240] <210> 40  
[0241] <211> 22  
[0242] <212> DNA  
[0243] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0244] <400> 40  
[0245] cgtagtaatt cggggttggt tc 22  
[0246] <210> 41  
[0247] <211> 18  
[0248] <212> DNA  
[0249] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0250] <400> 41  
[0251] cttccgaacc gcatcgac 18  
[0252] <210> 42  
[0253] <211> 23  
[0254] <212> DNA  
[0255] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0256] <400> 42  
[0257] cgcggtttcg atttttcgtt cgc 23  
[0258] <210> 43  
[0259] <211> 25  
[0260] <212> DNA  
[0261] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0262] <400> 43  
[0263] ggtgtttggt tttttgatta ggtgt 25  
[0264] <210> 44  
[0265] <211> 25  
[0266] <212> DNA  
[0267] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0268] <400> 44  
[0269] acctcataac cttatcacac aaacc 25  
[0270] <210> 45  
[0271] <211> 18  
[0272] <212> DNA

- 
- [0273] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0274] <400> 45  
[0275] tacctacacc cacaacac 18

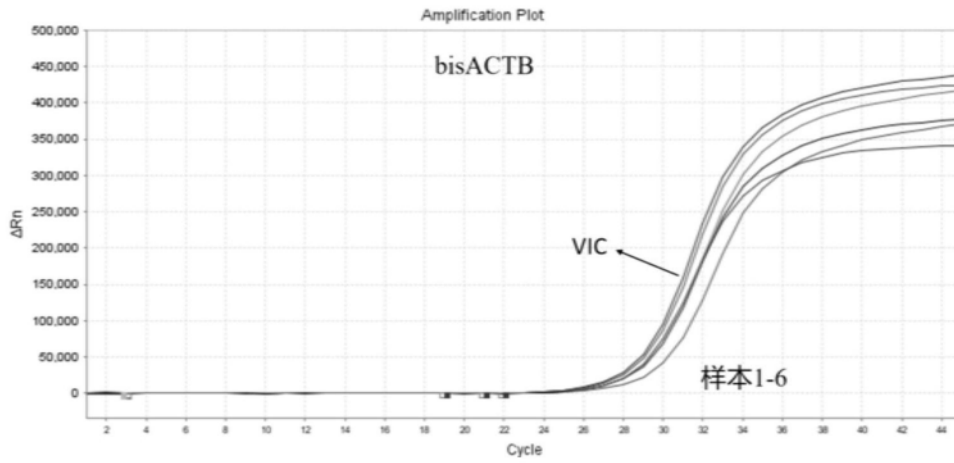


图1

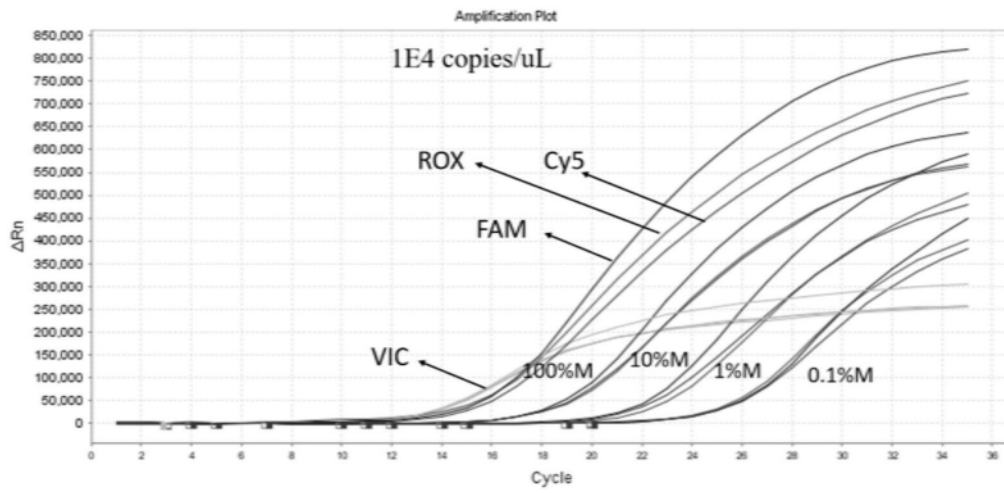


图2

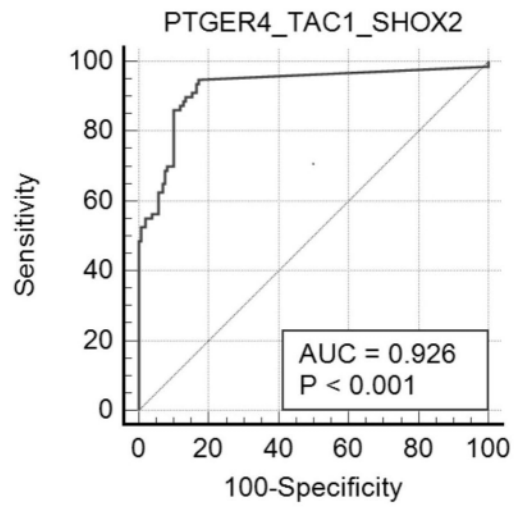


图3

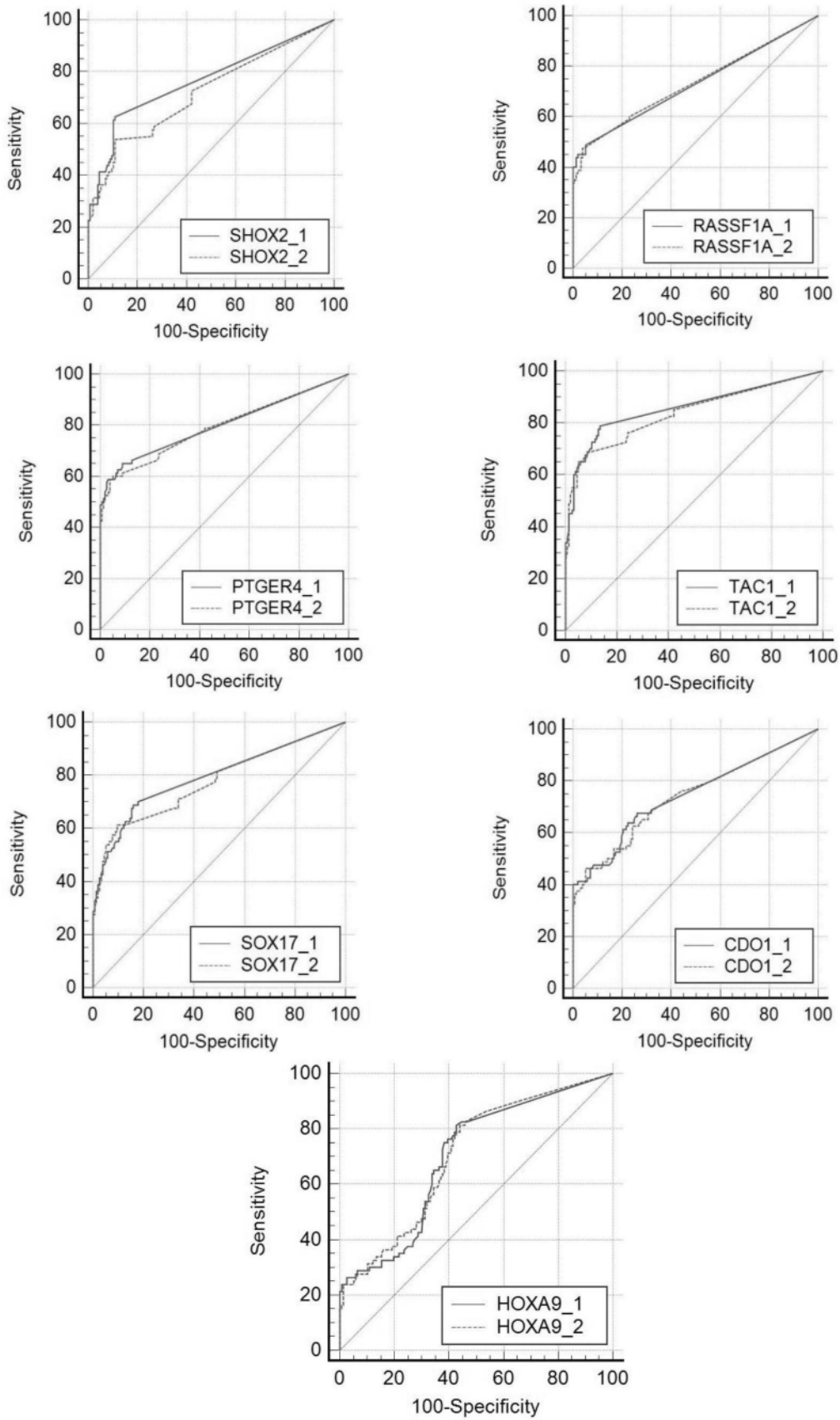


图4

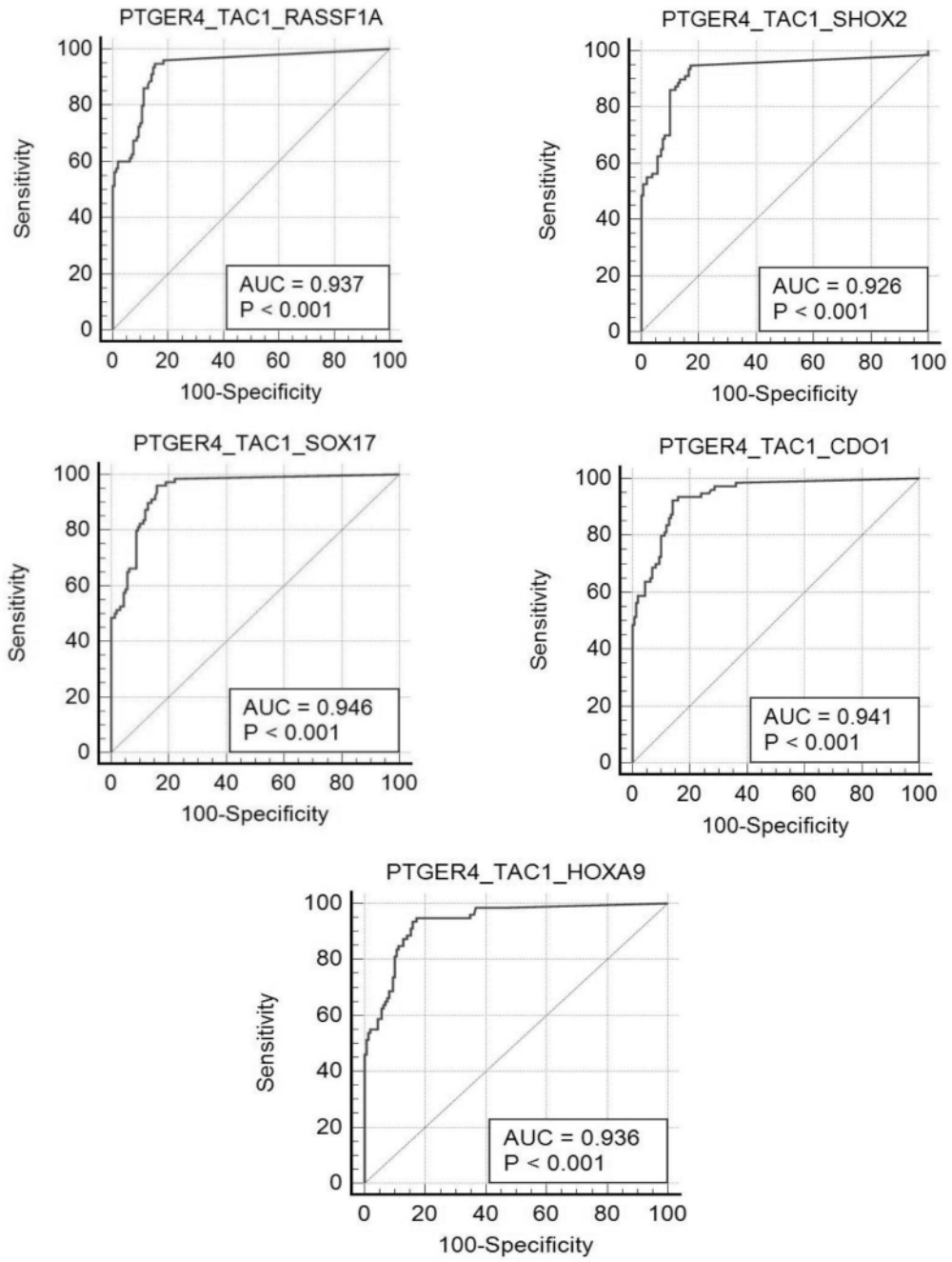


图5

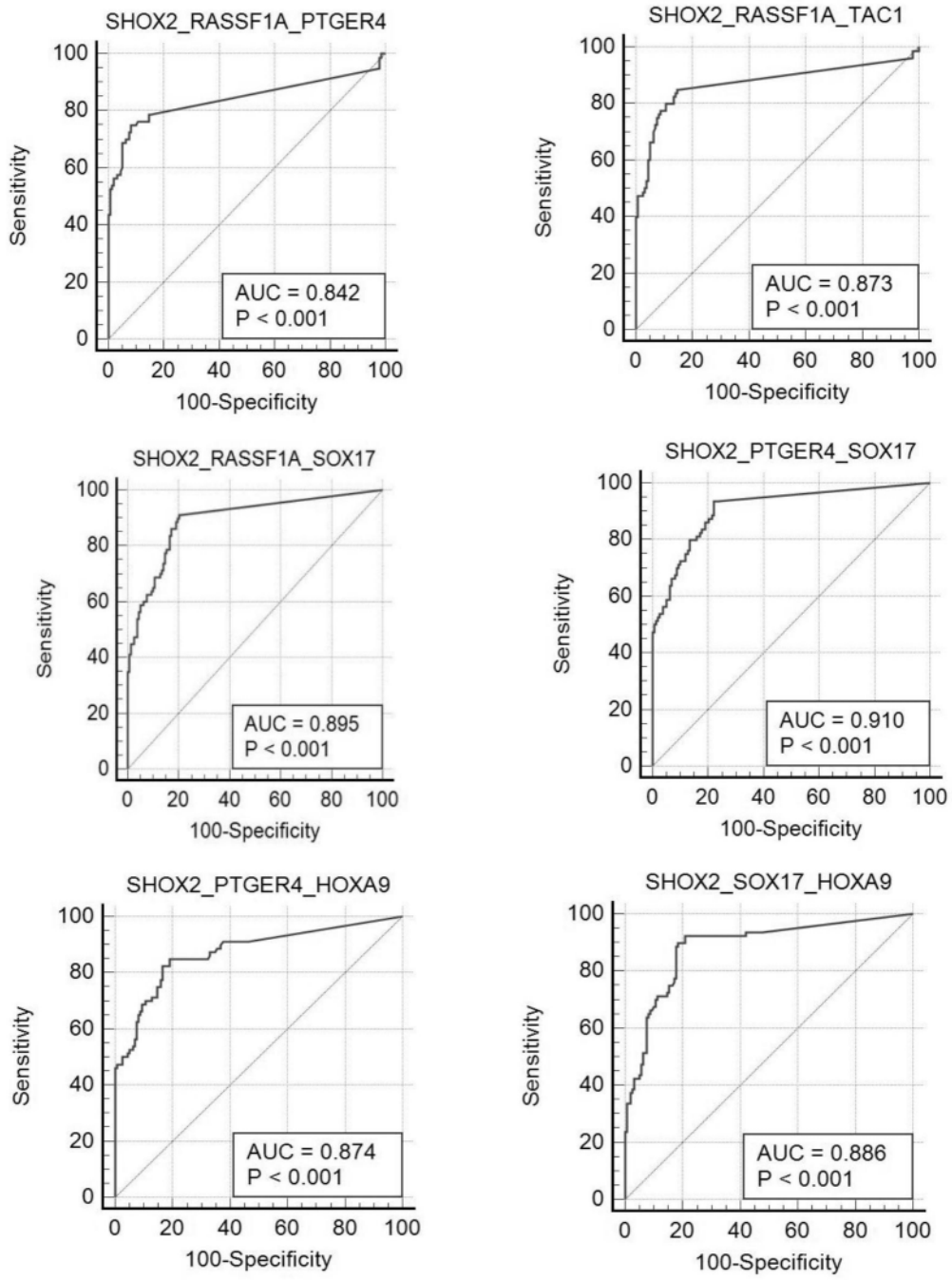


图6