



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110283888 B

(45) 授权公告日 2021.06.22

(21) 申请号 201910535414.7

(22) 申请日 2014.08.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110283888 A

(43) 申请公布日 2019.09.27

(30) 优先权数据
61/867,554 2013.08.19 US
61/867,559 2013.08.19 US

(62) 分案原申请数据
201480057266.8 2014.08.19

(73) 专利权人 卓异生物公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·N·费尔 P·J·柯林斯
J·L·赫斯罗布 H·B·琼斯

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6827 (2018.01)
C12Q 1/6837 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

审查员 周洋

权利要求书4页 说明书69页
序列表77页 附图61页

(54) 发明名称

用于单分子检测的测定及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于单分子检测的测定及其应用。具体来说,本发明涉及一种检测来自受试对象的遗传样品中的遗传变异的方法。更具体来说,本发明涉及使用经标记的探针并对所述探针中的标记数量进行计数来检测来自受试对象的遗传样品中的遗传变异的方法。

1. 包含第一探针组、第二探针组、第一正向引物、第一反向引物、第二正向引物和第二反向引物的组合产品在制备通过以下方法来检测怀孕的人类受试对象的胎儿中的染色体拷贝数的产品中的用途,所述方法包括

a) 提供来自所述怀孕的人类受试对象的DNA样品,所述DNA样品包含来自所述怀孕的人类受试对象和所述怀孕的人类受试对象的胎儿二者的DNA;

提供第一探针组和第二探针组,

所述第一探针组包含第一标记探针和第一标签探针,

所述第二探针组包含第二标记探针和第二标签探针,

所述第一标签探针和第二标签探针包含作为非天然序列的共同的标签核苷酸序列,

第一探针组和第二探针组的至少一部分分别与位于存在于所述DNA样品中的第一染色体和第二染色体中的核苷酸序列杂交,

将来自所述怀孕的人类受试对象的DNA样品和所述第一探针组和所述第二探针组接触;

接触后,连接所述第一标记探针和所述第一标签探针,以形成第一连接探针组,

连接所述第二标记探针和所述第二标签探针,以形成第二连接探针组,

b) 提供第一正向引物和第一反向引物,用于扩增(i) 第一连接探针组,其中第一正向引物包含第一标记且与第一连接探针组的第一标记探针杂交,

第二正向引物和第二反向引物,用于扩增(ii) 第二连接探针组,其中第二正向引物包含第二标记且与第二连接探针组的第二标记探针杂交,

扩增所述第一连接探针组和所述第二连接探针组以分别得到多个扩增的第一连接探针组和多个扩增的第二连接探针组,其中,

每个所述扩增的第一连接探针组和每个所述扩增的第二连接探针组包含(i) 分别的第一标记和第二标记且包含(ii) 共同标签核苷酸序列,其中所述第一标记和第二标记不同,

c) 使所述扩增的第一连接探针组和所述扩增的第二连接探针组的共同标签核苷酸序列与固定在基板上的亲和标签杂交,由此在基板上固定所述扩增的第一连接探针组和所述扩增的第二连接探针组,使得每一经扩增的第一连接探针组和第二连接探针组的每一第一标记和第二标记在固定后是光学上能够解析的密度,

d) 提供光学成像系统,用于

产生所述基板的一个或多个图像,其中所述扩增的第一连接探针组的每一第一标记和所述扩增的第二连接探针组的每一第二标记在所述一个或多个图像中是光学上能够解析的,

e) 提供数码定量元件,用于对(i) 固定至所述基板的扩增的第一连接探针组的第一标记的第一数量和(ii) 固定至所述基板的扩增的第二连接探针组的第二标记的第二数量进行计数;

和

f) 提供比较元件,用于对所述第一数量和第二数量进行比较以检测所述胎儿中的染色体拷贝数。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述方法还包含核酸外切酶用于所述扩增,其中,所述核酸外切酶在与在5' 末端不具有标记的经扩增的第一和第二连接探针组的至少一部分

接触时,从所述扩增的第一连接探针组和所述扩增的第二连接探针组的至少一部分的不具有标记的5'末端起进行消化。

3.如权利要求1所述的用途,其中

在5'末端包含标记的扩增的第一和第二连接探针组的至少一部分的5'末端被保护免受核酸外切酶消化。

4.如权利要求1所述的用途,其中,所述染色体拷贝数选自由三体性13、三体性18和三体性21组成的组。

5.如权利要求1所述的用途,其中

所述染色体拷贝数是三体,所述三体是三体性21,

第一染色体是染色体21,并且

第二染色体不是染色体21。

6.如权利要求1所述的用途,其中,所述比较元件的比较包括:获得第一数量与第二数量的比值以确定第一染色体相对于第二染色体的频率。

7.如权利要求1所述的用途,其中,所述第一标记和第二标记包含荧光染料。

8.如权利要求1所述的用途,其中

第一标记探针和第二标记探针分别与位于第一染色体和第二染色体中的核苷酸序列的至少一部分杂交;

第一标签探针和第二标签探针分别与位于第一染色体和第二染色体中的核苷酸序列的至少另一部分杂交;

第一标记探针杂交于第一染色体中的与第一标签探针所杂交之处相邻的区域;并且

第二标记探针杂交于第二染色体中的与第二标签探针所杂交之处相邻的区域。

9.如权利要求1所述的用途,其中,固定在所述基板上的第一标记和第二标记能够在单个图像中被同时计数。

10.如权利要求1所述的用途,其中,所述扩增的第一连接探针组和所述扩增的第二连接探针组的多个共同标签核苷酸序列固定至包含在所述基板上的多个预定位置的阵列上的预定位置。

11.如权利要求1所述的用途,其中,所述扩增的第一连接探针组和所述扩增的第二连接探针组的多个共同标签核苷酸序列固定在所述基板的同一阵列组件上。

12.如权利要求1所述的用途,其中,所述扩增的第一连接探针组和所述扩增的第二连接探针组的多个共同标签核苷酸序列固定在所述基板的不同阵列组件上。

13.如权利要求1所述的用途,其中

所述染色体拷贝数是三体,所述三体是三体性21,第一染色体是染色体21,并且第二染色体不是染色体21;

所述第一标记和所述第二标记是荧光染料;并且

经扩增的第一和第二连接探针组固定至包含在基板上的多个预定位置的阵列上的预定位置。

14.如权利要求1所述的用途,其中,所述方法还包括

a')提供来自所述怀孕的人类受试对象的DNA样品,所述DNA样品包含来自所述怀孕的人类受试对象和所述怀孕的人类受试对象的胎儿二者的DNA;

提供第一对照探针组和第二对照探针组，

所述第一对照探针组包含第一对照标记探针和第一对照标签探针，

所述第二对照探针组包含第二对照标记探针和第二对照标签探针，

所述第一对照标签探针和第二对照标签探针包含共同对照标签核苷酸序列，

第一对照探针组和第二对照探针组的至少一部分分别与位于存在于所述DNA样品中的第一对照染色体和第二对照染色体中的核苷酸序列杂交，

将来自所述怀孕的人类受试对象的DNA样品和所述第一对照探针组和所述第二对照探针组接触；

接触后，连接所述第一对照标记探针和所述第一对照标签探针，以形成第一对照连接探针组，

连接所述第二对照标记探针和所述第二对照标签探针，以形成第二对照连接探针组，

b') 提供第一对照正向引物和第一对照反向引物，用于扩增 (i) 第一对照连接探针组，其中第一对照正向引物包含第一对照标记且与第一对照连接探针组的第一对照标记探针杂交，

第二对照正向引物和第二对照反向引物，用于扩增 (ii) 第二对照连接探针组，其中第二对照正向引物包含第二对照标记且与第二对照连接探针组的第二对照标记探针杂交，

扩增所述第一对照连接探针组和所述第二对照连接探针组以分别得到多个扩增的第一对照连接探针组和多个扩增的第二对照连接探针组，其中，每个所述扩增的第一对照连接探针组和每个所述扩增的第二对照连接探针组包含 (a) 分别的第一对照标记和第二对照标记，且包含 (b) 所述共同对照标签核苷酸序列，其中所述第一对照标签和所述第二对照标签不同，

使所述扩增的第一对照连接探针组和所述第二对照连接探针组的所述共同对照标签核苷酸序列与固定在基板上的对照亲和标签杂交，由此在基板上固定所述扩增的第一对照连接探针组和所述第二对照连接探针组，使得每一经扩增的第一对照连接探针组和第二对照连接探针组的第一对照标记和第二对照标记在固定后是光学上能够解析的密度，

产生所述基板的一个或多个图像，其中所述扩增的第一对照连接探针组的每一第一对照标记和所述第二对照连接探针组的每一第二对照标记在所述一个或多个图像中是光学上能够解析的，

通过使用所述数码定量元件对 (i) 固定至所述基板的扩增的第一对照连接探针组中的第一对照标记的第一对照数量和 (ii) 固定至所述基板的扩增的第二对照连接探针组中的第二对照标记的第二对照数量进行计数，

其中，f) 的比较进一步包括通过所述比较元件比较第一对照数量与第二对照数量的第一比值和第一数量与第二数量的第二比值。

15. 如权利要求1所述的用途，其中，所述共同的标签核苷酸序列包含非基因组序列。

16. 如权利要求1所述的用途，其中，第一标记和第二标记不被猝灭。

17. 如权利要求1所述的用途，其中，

第一和第二反向引物不包含标记，并具有相同的核苷酸序列。

18. 如权利要求1所述的用途，所述方法还包括：校正元件，其通过区分来自所述第一标

记的第一光学信号和其余光学信号与背景并且区分来自所述第二标记的第二光学信号和其余光学信号与背景校正第一数量和第二数量。

19. 如权利要求14所述的用途, 其中, 第一标记和第二标记分别与第一对照标记和第二对照标记不同。

20. 如权利要求1所述的用途, 其中, 所述方法不包括对经扩增的第一和第二连接探针组进行测序的元件。

21. 如权利要求1所述的用途, 其中, 所述计数不包括对第一标记和/或第二标记进行整体阵列读取。

22. 如权利要求1所述的用途, 所述方法还包括计算元件, 用于

区分来自第一标记的第一光学信号和来自其余光学信号与背景, 所述区分通过以下方式进行: 计算所述第一光学信号相对于来自一第一标记的光学信号的强度的相对信号和/或信噪比强度, 并且确定所述第一光学信号是否来自单一第一标记, 和

区分来自第二标记的第二光学信号和来自其余光学信号与背景, 所述区分通过以下方式进行: 计算所述第二光学信号相对于来自一第二标记的光学信号的强度的相对信号和/或信噪比强度, 并且确定所述第二光学信号是否来自单一第二标记。

23. 如权利要求1所述的用途, 其中, 所述比较元件确定第一染色体的拷贝数是否大于第二染色体的拷贝数, 其中, 第一染色体的拷贝数大于第二染色体的拷贝数时表明在所述胎儿中存在第一染色体的三体性。

用于单分子检测的测定及其应用

[0001] 本申请是申请号为201480057266.8,申请日为2014年8月19日,申请名称为“用于单分子检测的测定及其应用”的专利申请的分案申请。

背景技术

[0002] 本发明涉及检测来自受试对象的遗传样品中的遗传变异的方法。检测遗传变异在人类生物学的许多方面是重要的。

发明内容

[0003] 本发明涉及检测来自受试对象的遗传样品中的遗传变异的方法。本发明还涉及使用经标记的探针并对所述探针中的标记数量进行计数来检测来自受试对象的遗传样品中的遗传变异的方法。

附图说明

[0004] 图1描绘了在基板上包含本文所述的结合伴侣、标签、亲和标签、标签探针、探针组和/或经连接的探针组的示例性阵列组件。

[0005] 图2描绘了从单标记样品和多标记抗体测量的信号强度的归一化柱状图。

[0006] 图3描绘了来自各种标记的平均漂白特性(bleaching profile)。

[0007] 图4~13显示了针对各种Alexa 488标记的随时间变化的累积标记强度图。

[0008] 图14描绘了当荧光团的激发是通过用与该物质的最大吸收一致的窄光谱带进行照射来实现时通过标准操作得到的激发(Ex)光谱和发射(Em)光谱。

[0009] 图15描绘了通过用与标准操作中不同的(或除其之外额外的)各种激发颜色和收集的发射带进行查询(interrogation)而得到的激发光谱和发射光谱。

[0010] 图16显示了当收集来自这些各种成像构造(例如各种发射滤光片)的光并将其与目标荧光团的校正值进行比较时得到的结果。

[0011] 图17显示了用各种参照物(包括具有单调(flat)发射谱(污染物1;三角形))或蓝色权重谱(污染物2;星形)的那些)收集的结果。

[0012] 图18描绘了两种荧光团的显著不同的激发带。

[0013] 图19描绘了示例性系统的流程图。

[0014] 图20描绘了包括各种数据分析方法的示例性系统流程图。

[0015] 图21~46描绘了本文所述的示例性探针组。

[0016] 图47和48显示了所得的荧光图案,其中,产物含有独特的亲和标签序列,并且下方的基板含有互补物,所述互补物与在所述基板的相同位置(例如作为相同组件)内的每种独特的亲和标签互补。

[0017] 图49和51显示了所得的荧光图案,其中,不同的产物含有相同的亲和标签序列,并且下方的基板含有所述亲和标签的互补物。

[0018] 图50和52分别显示了图49和51的放大位置。

[0019] 图53和54显示了所得的荧光图案,其中,产物含有独特的亲和标签序列,并且下方的基板具有:含有一种亲和标签互补物的互补物的一个位置(例如作为一个组件)和含有另一种亲和标签的互补物的另一位置(例如作为另一组件)。

[0020] 图55描绘了两种探针组;用于基因座1的一种探针组和用于基因座2的一种探针组——虽然如上所述,但也可以为每个基因组基因座设计多种探针组。

[0021] 图56描绘了将应用至探针组的集合的程序性工作流程。

[0022] 图57描绘了图56所示的程序性工作流程的修改版本。

[0023] 图58提供了用于基因座1和基因座2的探针产品如何可以用不同的标记分子标记的实例。

[0024] 图59提供了证据证明:代表针对一个基因座的多个基因组位置的探针产品可以使用杂交-连接法以连接酶特异性方式产生。

[0025] 图60提供了数据表明:探针组可用于检测拷贝数状态的相对变化。

[0026] 图61提供了证据证明:探针产品的混合物可用于产生定量微阵列数据。

[0027] 图62~64说明了图55~58中所述的通常步骤的变型。

[0028] 图65描绘了图62所述的变型步骤的另一实施方式。

[0029] 图66描绘了图65所述的步骤的另一实施方式。

[0030] 图67描绘了用于本文所述方法中的示例性探针组。

[0031] 图68描绘了当测定具有已知断点的易位时用于本文所述的方法中的示例性探针组。

[0032] 图69描绘了当靶向位于SNP处的突变时用于本文所述的方法中的示例性探针组。

具体实施方式

[0033] 除非另外指出,本文所述的方法可以采用分子生物学(包括重组技术)、细胞生物学、生物化学和微阵列及测序技术的常规技术和描述,其在本领域技术人员的技能内。此类常规技术包括聚合物阵列合成、寡核苷酸的杂交和连接、寡核苷酸的测序以及使用标记来检测杂交。合适技术的具体说明可以参考本文的实施例而获得。但是,当然也可以使用等效的常规程序。此类常规技术和描述可以例如在Kimmel和Oliver, DNA Microarrays (2006) Elsevier; Campbell, DNA Microarray, Synthesis and Synthetic DNA (2012) Nova Science; Bowtell和Sambrook, DNA Microarrays: Molecular Cloning Manual (2003) Cold Spring Harbor Laboratory Press中发现。在描述本文的组合物、研究工具和方法之前,应该理解的是本发明不限于所描述的具体方法、组合物、靶标和应用,因为这些当然可以变化。还应该理解的是,本文所用的术语的目的仅在于描述特定方面,并不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。

[0034] 本发明涉及检测来自受试对象的遗传样品中的遗传变异的方法。本文所述的遗传变异可以包括但不限于核苷酸序列(例如DNA和RNA)和蛋白质(例如肽和蛋白质)中的一个或多个取代、倒位、插入、缺失或突变,一种或多种罕见等位基因、多态性、单核苷酸多态性(SNP)、大规模遗传多态性,例如倒位和易位、一种或多种核苷酸分子(例如DNA)的丰度和/或拷贝数差异(例如拷贝数变体, CNV)、三体性、单体性和基因组重排。在一些实施方式中,遗传变异可以与疾病(例如癌)的转移、存在、不存在和/或风险、药代动力学变化性、药物毒

性、不良事件、复发和/或受试对象中器官移植排斥的存在、不存在或风险相关。例如,HER2基因的拷贝数变化影响乳腺癌患者是否会对赫赛汀治疗产生响应。类似地,检测怀孕妇女血液中的染色体21(或18、13或性染色体)的拷贝数的增加可用作未出生婴儿的唐氏综合征的非侵入性诊断。另外的实例是检测在受体基因组中不存在的来自移植器官的等位基因——监视这些等位基因的频率或拷贝数可以鉴定潜在的器官排斥的征兆。多种方法可用于检测此类变化(例如rtPCR、测序和微阵列)。所述方法之一是对单个的经标记的分子进行计数,以检测突变的存在(例如癌中的EGFR突变)或特定基因组序列或区域的过量(例如唐氏综合征中的染色体21)。对单一分子进行计数可以以许多方式完成,一种常见的读取方式是在表面上沉积分子并成像。

[0035] 另外,遗传变异可以是重新基因突变,例如单或多碱基突变、易位、亚染色体扩增和缺失以及非整倍性。在一些实施方式中,遗传变异可以表示在基因座处的替代性核苷酸序列,其可存在于个体群体中并且相对于该群体的其他成员包括核苷酸取代、插入和缺失。在另外的实施方式中,遗传变异可以是非整倍性。在其他实施方式中,遗传变异可以是三体性13、三体性18、三体性21、X的非整倍性(例如三体性XXX和三体性XXY)或Y的非整倍性(例如三体性XYY)。在进一步的实施方式中,遗传变异可以位于22q11.2、1q21.1、9q34、1p36、4p、5p、7q11.23、11q24.1、17p、11p15、18q或22q13区中。在进一步的实施方式中,遗传变异可以是微缺失或微扩增。

[0036] 在一些实施方式中,检测、发现、确定、测量、评价、计数和评估遗传变异可以相互替换地使用,并且包括定量和/或定性的确定,包括例如鉴定遗传变异、确定遗传变异的存在和/或不存在和定量遗传变异。在进一步的实施方式中,本说明书的方法可以检测多种遗传变异。本文使用的术语“和/或”定义成表示组分的任意组合。此外,单数形式的“一种”、“一个”和“所述”可以还包括复数的指代物,除非上下文明确地指出例外。因此,例如,提到“一个核苷酸区”是指一个该区、多于一个该区或该区的混合物,提到“一种测定”可以包括提到本领域技术人员已知的等效步骤和方法,等等。

[0037] “样品”是指来自生物、环境、医学或患者来源的一定量的材料,在所述材料中试图检测、测量或标记靶标核酸、肽和/或蛋白质。一方面,其是指包括试样或培养物(例如微生物培养物)。另一方面,其是指包括生物样品和环境样品。样品可以包括合成来源的试样。环境样品包括环境材料,例如表面物质、土壤、水和工业样品,以及获自食品和乳品处理仪器、设备、器械、器皿、一次性和非一次性物品的样品。“遗传样品”可以是具有在核酸的核苷酸序列中所编码的遗传性和/或非遗传性生物信息的任何液体或固体样品。样品可以获自来源,所述来源包括但不限于全血、血清、血浆、尿、唾液、汗液、粪便物、眼泪、肠液、粘膜样品、肺组织、肿瘤、移植器官、胎儿和/或其它来源。遗传样品可以来自动物(包括人)、流体、固体(例如粪便)或组织。遗传样品可以包括取自患者的材料,包括但不限于培养物、血液、唾液、脑脊髓液、胸膜液、乳、淋巴液、痰、精液和针抽吸物等。此外,遗传样品可以是来自母体血液样品的胎儿遗传材料。胎儿遗传材料可以分离自母体血液样品。遗传样品可以是胎儿和母体遗传材料的混合物。另外,遗传样品可以包括因肿瘤形成或转移而造成的异常基因序列,和/或存在于移植受体中的供体DNA特征物。在另外的实施方式中,当遗传样品是血浆时,所述方法可以包括从受试对象的血液样品中分离出所述血浆。在进一步的实施方式中,当遗传样品是血清时,所述方法可以包括从受试对象的血液样品中分离出所述血清。在其他实

施方式中,当遗传样品是无细胞DNA(cfDNA)样品时,所述方法还包括从获自本文所述的来源的样品中分离出无细胞DNA样品。本文的无细胞DNA样品是指在血流中在任何细胞或细胞器之外游离循环的DNA分子的群体。在妊娠的情况下,来自母亲的无细胞DNA携带母体DNA和胎儿DNA的混合物。这些实例不应解释为限制适用于本发明的样品类型。

[0038] 在一些实施方式中,本说明书的方法可以包括选择和/或分离目标基因座,并且对所存在的每种基因座的量(例如用于确定拷贝数)和/或不同基因座变体的相对量(例如给定DNA序列的两种等位基因)进行定量。提到本文使用的基因组或靶多核苷酸时,区域、目标区域、基因座或目标基因座是指基因组或靶多核苷酸的连续亚区域或区段。如本文所用,核苷酸分子中的区域、目标区域、基因座或目标基因座可以指核苷酸、基因或基因组中基因的一部分(包括线粒体DNA或其他非染色体DNA)的位置,或者其可以指基因组序列的任何连续部分,无论其是否在基因内或者与基因相关。核苷酸分子中的区域、目标区域、基因座、基因座或目标基因座可以是单一核苷酸至长度为几百或几千个核苷酸以上的区段。在一些实施方式中,目标区域或基因座可以具有与其相关的参照序列。本文使用的“参照序列”表示与核酸中的目标基因座比较的序列。在某些实施方式中,参照序列认为是目标基因座的“野生型”序列。含有序列不同于目标基因座的参照序列的目标基因座的核酸有时被称为“多态性”或“突变的”或“遗传变异”。含有序列并非不同于目标基因座的参照序列的目标基因座的核酸有时被称为“非多态性”或“野生型”或“非遗传变异”。在某些实施方式中,目标基因座可以具有多于一种与其有关的独特参照序列(例如,当目标基因座已知具有多态性时,认为其是正常或野生型)。在一些实施方式中,本说明书的方法还可以包括选择和/或分离目标肽,并对存在的每种肽的量和/或不同肽的相对量进行定量。

[0039] 在另外的实施方式中,本文所述的目标区域可以包括“共有基因变体序列”,其是指这样的核酸或蛋白序列:已知其核酸或氨基酸以高频率出现在携带编码功能不正常的蛋白的基因的个体群体中,或者其中核酸自身功能不正常。另外,本文所述的目标区域可以包括“共有正常基因序列”,其是指这样的核酸序列:已知其核酸在其相应位置以高频率出现在携带编码功能不正常的蛋白的基因的个体群体中,或者其自身功能不正常。在进一步的实施方式中,本文所述的对照区域(其非目标区域)或者参照序列可以包括“共有正常序列”,其是指这样的核酸或蛋白序列:已知其核酸或氨基酸以高频率出现在携带编码功能正常的蛋白质的基因的个体群体中,或者其中核酸自身具有正常功能。

[0040] 本文所述方法可以产生对遗传变异的高度准确的测量。本文所述的一种变异类型包括两个以上不同的基因组基因座的相对丰度。在该情况下,基因座可以尺寸较小(例如小至约300、250、200、150、100或50个核苷酸以下)、尺寸中等(例如约1,000、10,000、100,000或1000000个核苷酸)以及大至染色体臂的一部分或整个染色体或染色体组。该方法的结果可以确定一个基因座相对于另一个的丰度。本说明书的方法的精度和准确性可以使得能够检测非常小的拷贝数变化(低至约25、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05、0.02或0.01%以下),这使得能够鉴定非常稀的遗传变异特征。例如,胎儿非整倍性的特征物可以发现于母体血液样品中,在该样品中胎儿遗传异常被母体血液稀释,并且约2%的能够观察到的拷贝数变化表示胎儿三体性。

[0041] 如本文所用,术语“约”是指修饰例如核苷酸序列的长度、误差程度、维度、成分在组合物中的量、浓度、体积、处理温度、处理时间、产率、流速、压力等值及其范围,是指在数

值量上的变化,该数值量可以通过以下方式产生:例如用于制造化合物、组合物、浓缩物或应用配方的常见测量和处理步骤;在这些过程中的疏忽误差;用于执行所述方法的原料或成分的制造、来源或纯度上的差异;等等。术语“约”还包括由于例如具有特定起始浓度和混合物的组合物、制剂或细胞培养物的老化而导致不同的量,以及由于对具有特定起始浓度和混合物的组合物、制剂或细胞培养物进行混合或加工而导致不同的量。无论是否用术语“约”修饰,所附权利要求包括这些量的等效量。术语“约”还可以指与所述参考值类似的值的范围。在某些实施方式中,术语“约”是指落入所述参考值的50%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下范围内的值。

[0042] 在一些实施方式中,受试对象可以是怀孕受试对象、人类、具有高遗传疾病(例如癌)风险的受试对象、所有各科家畜动物以及未驯化或野生的动物。在一些实施方式中,遗传变异可以是怀孕受试对象的胎儿中的遗传变异(例如,胎儿中的拷贝数变体和非整倍性)。在一些实施方式中,受试对象可以是怀孕的受试对象,并且遗传变异是怀孕受试对象的胎儿中的变异,位于选自由下述组成的组的区域中:22q11.2、1q21.1、9q34、1p36、4p、5p、7q11.23、11q24.1、17p、11p15、18q、和22q13(例如22q11.2、1q21.1、9q34、1p36、4p、5p、7q11.23、11q24.1、17p、11p15、18q和22q13区域中任一个中的突变和/或拷贝数变化)。本文所述的胎儿是指人或其它动物的未出生的后代。在一些实施方式中,胎儿可以是受孕后超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20周的后代。在另外的实施方式中,胎儿可以通过植入受精、体外受精、多胎妊娠或孪生而受孕的后代。在另外的实施方式中,胎儿可以是一对双胞胎(同卵或异卵)或者一组三胞胎(同卵或异卵)的部分。

[0043] 一些实施方式的发明包括至少两个主要组分:用于选择性鉴定基因组基因座的测定,和用于高准确度地定量这些基因座的技术。所述测定可以包括选择性地标记和/或分离一种或多种核酸序列的方法,其方式使得标记步骤自身足以产生含有对鉴定特定测定背景下的特定序列而言所必需的全部信息的分子(在本发明中定义为“探针产物”、“经连接的探针组”、“经缀合的探针组”、“经连接的探针”、“经缀合的探针”或“经标记的分子”)。例如,所述测定可以包括使探针与样品接触、结合和/或杂交,连接和/或缀合所述探针,可选地扩增经连接/缀合的探针,并且将所述探针固定至基板。在一些实施方式中,本文所述的测定和方法可以对单一输入样品平行地进行,作为本文所述的多重测定。

[0044] 探针产物、经连接的探针组、经缀合的探针组、经连接的探针、经缀合的探针和经标记的分子可以是因对探针组施加的酶促作用(例如测定)而产生的单一连续分子。在探针产物或经标记的分子中,可以对来自探针组的一个或多个单个探针进行共价修饰从而使它们形成与任一探针或探针组相比不同的单一分子物质。结果,探针产物或经标记的分子可以是化学上不同的,并且因此可从探针或探针组中被鉴定出、计数、分离或进一步操作。

[0045] 例如,探针产物可以含有一个或多个鉴定标记,或一个或多个亲和标签以用于分离和/或固定。在一些实施方式中,不必对探针产物进行额外的修饰(例如,DNA序列确定)。在一些实施方式中,不需要对DNA序列进行额外的查询(interrogation)。含有标签的探针产物可以直接计数,通常在固定至固相基板上的固定步骤之后直接计数。例如,使用有机荧光团标记来标记探针产物,并且所述探针产物通过将探针产物固定至玻璃基板并随后用荧光显微镜和数码相机成像来直接计数。在其他实施方式中,根据经标记的分子是否与其互补基因组基因座相互作用,可以选择性地猝灭或移除所述标记。在另外的实施方式中,位于

探针产物的相对部分的两个标记可以共同作用以根据经标记的分子是否与其互补基因组基因座相互作用来递送荧光共振能量传递 (FRET) 信号。对于给定的基因组基因座, 含有所述标记的标记探针可以设计用于在该基因座之内的任何序列区。具有相同或不同标记的一组多个标记探针也可以设计成用于单一基因组基因座。在该情况下, 探针可以选择性地分离和标记特定基因座内的不同区域或者基因座内的重叠区域。在一些实施方式中, 含有亲和和标签的探针产物可以经由亲和和标签被固定至基板上。例如, 使用亲和和标签来将探针产物固定至基板上, 并对含有亲和和标签的探针产物直接计数。对于给定的基因组基因座, 含有亲和和标签的标签探针可以设计成用于在该基因座之内的任何序列区。具有相同或不同亲和和标签的一组多个标签探针也可以设计成用于单一基因组基因座。在该情况下, 探针可以选择性地分离和加标特定基因座内的不同区域或者基因座内的重叠区域。

[0046] 在一个方面, 本说明书的方法可以包括使本文所述的探针组与本文所述的遗传样品接触。在一些实施方式中, 本说明书的方法可以包括使多个探针组 (例如第一探针组和第二探针组) 与遗传样品接触。在另外的实施方式中, 各探针组包含标记探针和标签探针。例如, 第一探针组包含第一标记探针和第一标签探针, 第二探针组包含第二标记探针和第二标签探针。

[0047] 使探针组与遗传样品接触可以同时进行, 或在将探针杂交、连接、扩增和/或固定之后进行。另外, 使探针组与遗传样品接触可以同时进行, 或在将探针杂交、连接、扩增和/或固定之前进行。

[0048] 对于在遗传样品中核苷酸分子的给定基因组基因座或区域, 该基因座内的单一核酸序列或该基因座内的多个核酸序列可以通过探针产物的形成而被查询 (interrogate) 和/或定量。基因组基因座内的经查询的序列可以不同和/或重叠, 并且可以含有或不含有遗传多态性。探针产物通过设计一种或多种被称为“探针组”的寡核苷酸而形成。例如, 探针产物可以通过连接所述探针组 (通过连接所述探针组中的探针) 而形成。探针组包含至少一种探针, 所述探针与靶分子杂交、缀合、结合或固定至靶分子, 所述靶分子包括核酸 (例如 DNA 和 RNA)、肽和蛋白质。在一些实施方式中, 探针可以包含经分离的、纯化的、天然存在的、非天然存在的和/或人工材料, 例如包括任何长度的寡核苷酸 (例如 5、10、20、30、40、50、100 或 150 个核苷酸以下), 其中所述寡核苷酸序列的至少一部分 (例如 50、60、70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100%) 与存在于一种或多种靶分子中的序列基序和/或杂交区域互补, 从事使所述探针构造成与一种或多种靶分子或目标核酸区域部分杂交或全部杂交 (或以类似的方式相互作用)。靶分子或目标核酸区域的与探针杂交的部分被称为探针的“杂交区域”, 其可以是本文所述的靶分子或目标核酸区域的一部分或全部。

[0049] 探针可以是单链或双链的。在一些实施方式中, 探针可以以经纯化的限制性消化产物制备或者以合成、重组或 PCR 扩增方式来产生。在另外的实施方式中, 探针可以包括与特定肽序列结合的材料。本文所述的探针组可以包含一种或多种探针的组, 其被设计成对应于单个基因组位置或蛋白质序列中的肽。

[0050] 本文所用的“核苷酸”是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或任何核苷酸类似物 (例如 DNA 和 RNA)。核苷酸类似物包括在碱基、糖和/或磷酸的化学结构中具有修饰的核苷酸, 包括但不限于 5'-位嘧啶修饰、8-位嘌呤修饰、胞嘧啶环外胺的修饰、5-溴-尿嘧啶的取代等; 和 2'-位糖修饰, 包括但不限于其中 2'-OH 被选自 H、OR、R、卤素、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂ 或 CN 的基

团置换的糖修饰型核糖核苷酸。shRNA也可以包含非天然元件,例如,诸如次黄嘌呤和黄嘌呤等非天然核苷酸,诸如2'-甲氧基核糖等非天然糖,或诸如甲基磷酸酯、硫代磷酸酯和肽等非天然磷酸二酯键。在一个实施方式中,shRNA还包含使shRNA对核酸酶消化具有抗性的元件或修饰。“多核苷酸”或“寡核苷酸”可相互替换地使用,并且各自表示核苷酸单体的线性聚合物。构成多核苷酸和寡核苷酸的单体能够借助于单体-单体相互作用的规律性模式(例如Watson-Crick型碱基配对、碱基堆叠、Hoogsteen型或反向Hoogsteen型碱基配对等)来与天然和/或人工多核苷酸特异性地结合。此类单体和其核苷间键可以是天然存在的,或者可以是其类似物,例如天然存在或非天然存在的类似物。非天然存在的类似物可以包括PNA、LNA、硫代磷酸酯核苷间键、含有允许标记(例如荧光团或半抗原等)附着的连接基团的核苷酸。无论何时寡核苷酸或多核苷酸的应用需要酶促加工(例如通过聚合酶来延伸、通过连接酶来连接,等等),本领域普通技术人员都会理解这些情况下的寡核苷酸或多核苷酸在任何或一些位置不会含有核苷间键、糖部分或核苷酸的某些类似物。多核苷酸的尺寸通常为几个单体单元(此时称其为“寡核苷酸”)至数千个单体单元。无论何时多核苷酸或寡核苷酸由字母(大写或小写)序列表示(例如“ATGCCTG”),都应理解核苷酸是从左至右5'→3'顺序。通常多核苷酸包含由磷酸二酯键连接的四种天然核苷酸(例如对于DNA而言为脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷,或者对于RNA而言为其核糖对应物);但是它们还可以包含非天然核苷酸类似物,例如包括经修饰的核苷酸、糖或核苷间键。对本领域技术人员显而易见的是,当酶的活性要求特定寡核苷酸或多核苷酸底物时,例如单链DNA、RNA或RNA/DNA双链体等时,则针对寡核苷酸或多核苷酸底物选择合适的组合物在本领域技术人员的知识内。

[0051] 在另一方面,本说明书的方法可以包括使第一探针组和第二探针组的至少一部分分别与遗传样品的核苷酸分子中的第一目标核酸区和第二目标核酸区杂交。探针与目标核酸区的杂交可以同时进行,或者在使探针与遗传样品接触、连接探针、扩增探针和/或固定探针之后进行。此外,探针与目标核酸区的杂交可以同时进行,或者在连接、扩增和/或固定探针之前进行。探针的一部分或全部可以与样品中的单链或双链核苷酸分子、蛋白质或抗体中的目标区域的一部分或全部杂交。与探针杂交的目标区域可以为1~50个核苷酸、50~1000个核苷酸、100~500个核苷酸、5、10、50、100、200个核苷酸以下,或者2、5、10、50、100、200、500、1000个核苷酸以上。探针可以设计或构造成与靶区域或分子完美地杂交,或者它们可以设计成单碱基错配(例如单核苷酸多态性或SNP位点)或少量此类错配不能产生探针和靶分子的杂交体。

[0052] 在另外的实施方式中,第一标记探针和/或第一标签探针与第一目标核酸区杂交,第二标记探针和/或第二标签探针与第二目标核酸区杂交。在另外的实施方式中,与目标核酸区杂交的探针组的多个或所有探针和/或其他成分(例如标记探针、标签探针和缺口探针(gap probes))彼此相邻。当与目标核酸区杂交的两种探针和/或成分是“相邻的”或“直接相邻的”时,在目标核酸区中,两个探针的杂交区域之间不存在核苷酸。在该实施方式中,探针组内的不同探针可以共价连接在一起,以形成较大的寡核苷酸分子。在另一实施方式中,探针组可以设计成与非连续但接近的目标核酸区部分杂交,从而在目标核酸区上存在未被探针占据的一个或多个核苷酸的“缺口”,其位于探针组的已杂交的探针之间。在该实施方式中,可以使用DNA聚合酶或其他酶来合成新多核苷酸序列,在一些情况下共价接合来自单

一探针组的两个探针。在探针组内,任何探针可以携带用于基因座鉴定或分离的一个或多个标记或亲和标签。在一个方面,第一标记探针和第二标记探针分别与遗传样品的核苷酸分子中的第一目标核酸区和第二目标核酸区杂交;第一标签探针和第二标签探针分别与遗传样品的核苷酸分子中的第一目标核酸区和第二目标核酸区杂交;第一标记探针与第一标签探针所杂交之处相邻的区域杂交;并且第二标记探针与第二标签探针所杂交之处相邻的区域杂交。

[0053] 发生杂交的方式使得可以修饰探针组内的探针以形成新的较大的分子实体(例如探针产物)。本文的探针可以在严格条件下与目标核酸区杂交。如本文所用,术语“严格”用来指温度、离子强度和其他化合物(例如有机溶剂)的存在等条件,在该条件下进行核酸杂交。“严格”通常出现在约 T_m ℃至低于 T_m 约20℃~25℃的范围内。可以使用严格杂交来分离和检测相同的多核苷酸序列或者分离和检测相似或相关的多核苷酸序列。在“严格条件”下,核苷酸序列会以其全部或部分与其完全互补序列和紧密相关序列杂交。低严格条件包括与下述条件等效的条件:当使用长度为约100~约1000个核苷酸的探针时,在68℃下,在由5×SSPE(43.8g/l NaCl、6.9g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和1.85g/l EDTA,pH用NaOH调整至7.4)、0.1% SDS、5×丹哈德试剂(Denhardt's reagent)(每500ml的50×丹哈德试剂含有5g Ficoll (Type 400),5g BSA)和100μg/ml变性鲑鱼精子DNA组成的溶液中进行结合或杂交,然后在包含2.0×SSPE、0.1% SDS的溶液于室温下洗涤。本领域公知的是,可以使用许多等效条件来构成低严格条件;可以改变以下因素来产生与上述条件不同但是等效的低严格杂交条件:例如探针的长度和性质(DNA、RNA、碱基组成)和靶标的性质(DNA、RNA、碱基组成,存在于溶液中或经固定,等等),盐及其它成分的浓度(例如甲酰胺、硫酸右旋糖、聚乙二醇的存在或不存在),以及杂交溶液的成分。另外,促进在高严格条件(例如提高杂交和/或洗涤步骤的温度,在杂交溶液中使用甲酰胺,等等)下杂交的条件是本领域公知的。在提及核酸杂交时使用的高严格条件包括与下述条件等效的条件:当使用长度为约100~约1000个核苷酸的探针时,在68℃下,在由5×SSPE、1% SDS、5×丹哈德试剂和100μg/ml变性鲑鱼精子DNA组成的溶液中进行结合或杂交,然后在包含0.1×SSPE和0.1% SDS的溶液于68℃洗涤。

[0054] 在一些实施方式中,只有在探针组内的探针正确杂交时才可以形成探针产物。因此,探针产物可以以高严格度和高准确度形成。同样地,探针产物可以含有足够的信息以鉴定设计探针产物所要查询的基因组序列。因此,产生并直接定量特定的探针产物(在该情况下,通过分子计数)可以反映出起始样品中特定基因序列的丰度。

[0055] 在另外的实施方式中,构造探针所要杂交的目标核酸区位于不同的染色体中。例如,第一目标核酸区位于染色体21,第二目标核酸区不位于染色体21(例如,位于染色体18)。

[0056] 在另一方面,本说明书的方法可以包括连接第一标记探针和第一标签探针,以及连接第二标记探针和第二标签探针。探针的连接可以同时进行,或在使探针与遗传样品接触、扩增探针和/或固定探针之后进行。此外,探针的连接可以同时进行,或在使探针与遗传样品接触、扩增探针和/或固定探针之前进行。本文的连接是指将两个探针连接在一起(例如连接两个核苷酸分子)的过程。例如,本文的连接可以包括形成连接两个核苷酸的3',5'-磷酸二酯键,作为能够引起连接的试剂的连接剂可以是酶或化学剂。

[0057] 在另一方面,本说明书的方法可以包括扩增经连接的探针和/或经连接的探针组。

经连接的探针的扩增可以同时进行,或在使探针与遗传样品接触、连接探针、杂交探针和/或固定探针之后进行。另外,经连接的探针的扩增可以同时进行,或在固定探针之前进行。本文的扩增的定义为产生探针和/或探针产物的额外的拷贝,并且可以使用本领域公知的聚合酶链反应技术进行。如本文所用,术语“聚合酶链反应”(PCR)是指用于增加靶序列(例如在与基因组DNA的混合物中)的区段的浓度而无需克隆或纯化的方法。通过两个寡核苷酸引物相对于彼此的相对位置来确定所需靶序列的扩增区段的长度,因此,该长度是可控的参数。借助于该过程的重复,将该方法称为“聚合酶链反应”(下文称为“PCR”)。由于靶序列的所需扩增区段在混合物中变为主导序列(在浓度方面),因此将它们称为“经PCR扩增的”。利用PCR,可以将基因组DNA中的单个拷贝的特定靶序列扩增至用数种不同方法(例如用经标记的探针杂交)能够检测到的水平。除了基因组DNA之外,可以用合适的引物分子组扩增任何寡核苷酸序列。具体而言,PCR过程自身所形成的扩增区段本身就是随后的PCR扩增的高效模板。如果可获得允许在扩增反应进行时测量反应产物的检测化学,例如Leone等, *Nucleic Acids Research*, 26:2150-2155 (1998) 中所述的“实时PCR”或“实时NASBA”,则扩增可以是“实时”扩增。

[0058] 引物通常是单链的以使扩增中的效率最大化,但是作为选择可以是双链的。如果是双链的,通常在用于制备延伸产物之前先处理引物以将其链分开。该变性步骤通常受热影响,但是作为选择可以使用碱然后中和来进行。因此,“引物”与模板互补,并通过氢键或杂交与模板复合而提供用于引发聚合酶合成的引物/模板复合体,其通过在DNA合成时添加与模板互补的连接在其3'末端处的共价键合的核苷酸而延伸。

[0059] 本文所用的“引物对”是指正向引物和相应的反向引物,具有适合于靶核酸的基于核酸的扩增的核酸序列。此类引物对通常包括序列与靶核酸的第一部分的序列相同或相似的第一引物,和序列与靶核酸的第二部分的序列互补的第二引物,从而提供靶核酸或其片段的扩增。除非另外指出,本文提到“第一”和“第二”是任意的。例如,第一引物可以设计为“正向引物”(其从靶核酸的5'-末端起引发核酸的合成)或设计为“反向引物”(其从延伸产物的5'-末端起引发核酸的合成,该延伸产物由正向引物所引发的合成产生)。同样地,第二引物可以设计为正向引物或反向引物。

[0060] 在一些实施方式中,本文的核苷酸分子中的目标核酸区可以通过本文所述的扩增方法进行扩增。样品中的核酸可以使用通用扩增方法(例如全基因组扩增和全基因组PCR)在分析之前进行扩增,或者不扩增。目标核酸区的扩增可以同时进行,或者在使探针与遗传样品接触、连接探针、扩增探针和/或固定探针之后进行。此外,经连接的探针的扩增可以同时进行,或在使探针与遗传样品接触、连接探针、固定探针和/或对标记进行计数之前进行。

[0061] 在另外的实施方式中,所述方法不包括在杂交或连接之后扩增遗传样品的核苷酸分子。在进一步的实施方式中,所述方法不包括在杂交和连接之后扩增遗传样品的核苷酸分子。

[0062] 在另一方面,本说明书的方法可以包括将标签探针固定至基板上的预定位置。将探针固定至基板可以同时进行,或者在使探针与遗传样品接触、使探针与目标核酸区杂交、连接探针和/或扩增探针之后进行。此外,将探针固定至基板可以同时进行,或者在使探针与遗传样品接触、使探针与目标核酸区杂交、连接探针、扩增探针和/或对探针进行计数之前进行。本文的固定是指通过物理或化学连接将标签探针直接或间接地结合至基板上的预

定位置。在一些实施方式中,本文的基板可以包含结合伴侣,该结合伴侣被构造成接触并结合至本文所述的标签探针中的部分或全部标签,并且将该标签固定,并由此固定包含所述标签的标签探针。标签探针的标签可以包含本文所述的基板上的结合伴侣的相应结合伴侣。

[0063] 固定可以通过将部分或全部标签探针杂交至基板上的部分或全部结合伴侣来进行。例如,固定步骤包括将标签或标签核苷酸序列的至少一部分杂交至基板上固定的相应核苷酸分子。此处,相应核苷酸分子是构造成与标签或标签核苷酸序列部分或全部杂交的标签或标签核苷酸序列的结合伴侣。在一些实施方式中,寡核苷酸或多核苷酸结合伴侣可以是单链的,并且可以通过例如5'末端或3'末端共价地附着至基板。固定还可以通过以下示例性结合伴侣和结合手段来进行:与抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素或中性抗生物素蛋白(Nutravidin)复合的生物素-寡核苷酸;经由二硫键共价连接至SH-表面的SH-寡核苷酸;共价连接至激活的羧酸基或醛基的胺-寡核苷酸;与水杨基氧肟酸(SHA)复合的苯基硼酸(PBA)-寡核苷酸;与硫醇或硅烷表面反应或与丙烯酰胺单体共聚形成聚丙烯酰胺的丙烯酰胺基(Acrydite)-寡核苷酸;或者用本领域已知的其它方法。对于优选使用带电表面的一些应用,表面层可以由如美国专利申请公开第2002/025529号所示的聚电解质多层(PEM)结构组成。在一些实施方式中,固定可以通过公知的方法进行,所述方法包括例如使探针与附着有结合伴侣的载体接触一段时间,在探针因延伸而耗尽后,可选地将具有经固定的延伸产物的载体用合适的液体冲洗。在另外的实施方式中,将探针产物固定至基板上可以允许进行剧烈的洗涤以从生物样品和测定中除去成分,由此减少背景噪音并提高准确度。

[0064] “固体载体”、“载体”、“基板”和“固相载体”可相互替换地使用,是指具有刚性或半刚性表面的材料或材料组。在一些实施方式中,基板的至少一个表面基本上是平的,但在其它实施方式中可以理想地用例如孔、升高区域、钉状物或蚀刻槽等物理地分开针对不同化合物的合成区域。在另外的实施方式中,基板可以包含至少一个平面固相载体(例如显微镜载玻片)。根据其它实施方式,基板可以采用珠、树脂、凝胶、微球或其它几何构型的形式。在一个方面,本说明书的一些实施方式的基板不包括珠、树脂、凝胶和/或微球。

[0065] 在一些实施方式中,如图1所示,本文所述的结合伴侣、标签、亲和标签、标记、探针(例如标签探针和标记探针)和/或探针组可以作为阵列(2)固定在基板(1)上。本文的阵列具有多个组件(3-10),其在组件之间可以具有或不具有重叠(6)。每个组件可以具有至少一个区域不与另一组件重叠(3-5和7-10)。在另外的实施方式中,各组件可以具有不同的形状(例如圆点(3-8)、三角形(9)和方形(10))和尺寸。阵列的组件的面积可以为约 $1\sim 10^7\mu\text{m}^2$, $100\sim 10^7\mu\text{m}^2$, $10^3\sim 10^8\mu\text{m}^2$, $10^4\sim 10^7\mu\text{m}^2$; $10^5\sim 10^7\mu\text{m}^2$; 约0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 $10^8\mu\text{m}^2$ 以上;和/或约0.001、0.01、0.1、1、10、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 $10^8\mu\text{m}^2$ 以下。本发明的一些实施方式的示例性组件(8)的图像以符号12显示。另外,包含相同类型的结合伴侣、标签、亲和标签、标记、探针(例如标签探针和标记探针)和/或探针组的两个以上组件可以具有相同的形状和尺寸。具体而言,根据本文所述的方法构造成或用于检测同一遗传变异或对照的包含结合伴侣、标签、亲和标签、标记、标签探针和/或探针组的阵列组件可以具有相同的形状和尺寸。此外,基板上的阵列的每一个组件都可以具有相同的形状和尺寸。在其它实施方式中,根据本文所述的方法构造成或用于检测不同遗传变异或对照的包含结合伴侣、标签、亲和标签、标记、探针和/或探针组的阵列组件可以具有相

同的形状和尺寸。另外,每一阵列组件可以包含不同的结合伴侣、标签、亲和标签、标记、探针和/或探针组。

[0066] 在一些实施方式中,阵列的两个组件可以通过下述方式来分隔:(i) 距离,在该距离内可以不存在或仅存在极少量的经固定的结合伴侣、标签、亲和标签、标记、探针(例如标签探针和标记探针)和/或探针组,和/或(ii) 将一个组件与其它组件区分开的任何分隔物(例如增高的基板,防止结合伴侣、标签、亲和标签、探针(例如标签探针)和/或探针组与基板结合的任何材料,以及组件之间的任何非探针材料)。在另外的实施方式中,阵列的组件可以至少仅通过其位置而彼此区分开。阵列的组件可以通过下述距离分隔开:约 $0\sim 10^4\mu\text{m}$ 、 $0\sim 10^3\mu\text{m}$ 、 $10^2\sim 10^4\mu\text{m}$ 或 $10^2\sim 10^3\mu\text{m}$;约0、0.001、0.1、1、2、3、4、5、10、50、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^3 、 10^7 或 $10^8\mu\text{m}$ 以上;和/或约0、0.001、0.1、1、2、3、4、5、10、50、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 或 $10^8\mu\text{m}$ 以下。此处,将阵列的两个组件分隔开的距离可以通过组件边缘之间的最短距离来确定。例如,在图1中,将阵列(2)的两个组件符号3和4分隔开的距离是由符号n表示的距离。另外,例如,将基板(1)上的阵列(2)的组件分隔开的最短距离是0,例如将阵列的两个组件符号10和11分隔开的距离。在其它实施方式中,阵列的两个组件可以不分隔开,并且可以具有重叠(6)。在此类实施方式中,各组件可以至少具有与另一组件不重叠的区域(7)。

[0067] 在进一步的实施方式中,本文所述的结合伴侣、标签、亲和标签、标记、探针和/或探针组的阵列或阵列组件可以位于基板上的预定位置上,并且在固定之前,可以预先确定阵列的各组件的形状和尺寸以及组件之间的距离。本文的预定位置是指在固定之前确定或鉴定的位置。例如,阵列的各组件的形状和尺寸在固定之前确定或鉴定。

[0068] 在另外的实施方式中,基板可以含有结合伴侣的阵列,该阵列的各组件包含结合伴侣,例如寡核苷酸或多核苷酸,其被固定(例如通过化学键来固定,该化学键在探针与本文所述的基板的结合伴侣杂交的过程中不会断裂)至空间限定的区域或位置;即,所述区域或位置通过基板上的限定区域或位置而在空间上离散或分隔开。在进一步的实施方式中,所述基板可以包含阵列,该阵列的各组件包含与空间上限定的区域或位置结合的结合伴侣。被构造成包含结合伴侣的每个空间上限定的位置可以额外地是“可寻址的”,因为其位置和其固定的结合伴侣的身份是已知的或预定的(例如在其使用、分析或附着至标签探针和/或探针组中的其结合伴侣之前)。针对固定至基板的探针组,术语“可寻址的”是指本文所述的探针组的末端附着部分(例如基板的结合伴侣的结合伴侣、标签、亲和标签和标签探针)的核苷酸序列或其它物理和/或化学特性可以由其地址确定,即,探针组的末端附着部分的序列或其它性质与固定有探针组的基板上的空间位置或该基板的特性之间一一对应。例如,探针组的末端附着部分的地址是空间位置,例如,固定探针组的末端附着部分的拷贝的特定区域的平面坐标。但是,探针组的末端附着部分也可以以其他方式寻址,例如通过颜色或微转发器的频率等,例如Chandler等,PCT公开W0 97/14028,本文通过援引将其全部内容并入以用于所有目的。在进一步的实施方式中,本文所述方法不包括“随机微阵列”,其是指基板的结合伴侣(例如寡核苷酸或多核苷酸)的空间离散区域和/或探针组的末端附着部分并未在空间上定址的微阵列。即,所附着的结合伴侣、标签、亲和标签、标签探针和/或探针组的身份不能从其位置(至少在开始时)辨别。在一个方面,本文所述的方法不包括作为微珠平面阵列的随机微阵列。

[0069] 本说明书的一些实施方式的核酸阵列可以通过本领域公知的任何方法产生,包括

但不限于：美国专利申请公开第2013/0172216号中所述的方法，通过援引将其全部内容并入以用于所有目的；Schena, Microarrays: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 2000)。例如，可以使用DNA捕获阵列。DNA捕获阵列是表面上共价连接有经定位的寡核苷酸的固体基板（例如盖玻片）。这些寡核苷酸可以在表面上具有一种或多种类型，并且还可以在基板上地理上分开。在杂交条件下，与其它非特异性部分相比，DNA捕获阵列会优先结合互补性靶标，由此用于将靶标定位至表面并将其与不期望的物质分开。

[0070] 在一些实施方式中，连接至经固定的标签探针的第一标记探针和第二标记探针和/或其经扩增的标记探针分别包含第一标记和第二标记。

[0071] 本文的标记探针是指包含标记或被构造成与标记结合的探针。标记探针自身可以包含标记，或者可以经修饰以包含标记或者与标记结合。本文的经扩增的探针的定义为在将本文所述的起始探针扩增后产生的起始探针的额外拷贝。因此，经扩增的探针可以具有作为起始探针的核苷酸序列和/或起始探针的核苷酸序列的互补序列的序列。经扩增的探针可以含有与起始探针的核苷酸序列部分或完全匹配的序列。术语“互补”或“互补性”用来指通过碱基配对法则涉及的核苷酸序列。例如，序列“5' -CAGT-3'”与序列“5' -ACTG-3'”互补。互补性可以是“部分”或“全部”的。“部分”互补性是指探针中的一个或多个核酸核苷酸根据碱基配对法则不匹配，而其它核苷酸则匹配。核酸之间的“全部”或“完全”互补性是指探针中的每一个核酸碱基根据碱基配对法则都与另一碱基匹配。

[0072] 本文的经固定的探针的定义为通过物理或化学连接直接或间接结合至基板的探针。在一些实施方式中，标记探针可以通过与固定于本文所述的基板的标签探针连接而间接地固定至基板。

[0073] 本文的标记是指有机的、天然存在的、合成的、人工的或非天然存在的具有能够检测且可选地能够定量的性质或特性的分子、染料或部分。标记可以是能够直接检测的（例如，放射性同位素、荧光团、化学发光体、酶、胶体颗粒、荧光物质、量子点或其他纳米颗粒、纳米结构、金属化合物、有机金属标记和肽适体）；或标记可以是使用特定的结合伴侣而能够间接检测的。荧光物质的实例包括荧光染料，例如荧光素、磷光体、罗丹明和聚甲炔染料衍生物等。商业上可获得的荧光物质的实例包括荧光染料，例如BODIPYFL（商标，由Molecular Probes, Inc.制造）、FluorePrime（产品名，由Amersham Pharmacia Biotech, Inc.制造）、Fluoredate（产品名，由Millipore Corporation制造）、FAM（由ABI Inc.制造）、Cy 3和Cy 5（由Amersham Pharmacia制造）、TAMRA（由Molecular Probes, Inc.制造）、Pacific Blue、TAMRA、Alexa 488、Alexa 594、Alexa 647、Atto 488、Atto 590和Atto 647N等。“量子点”（QD）是指纳米级半导体晶体结构，通常由硒化镉制造，其吸收光然后在数纳秒后以特定颜色重新发射光。具有各种经缀合表面或反应性表面（例如氨基、羧基、抗生蛋白链菌素、蛋白质A、生物素和免疫球蛋白）的QD也包括在本说明书内。

[0074] 在另外的实施方式中，第一标记和第二标记不同，从而使标记可以能够彼此区分。在其他实施方式中，第一标记和第二标记在其物理、光学和/或化学性质方面不同。

[0075] 在一些实施方式中，经固定的标记是光学上能够解析的。本文的术语“光学上能够解析的标记”或“光学上能够单独解析的标记”是指（例如在本文所述的固定后）可以通过其光子发射或其他光学性质而相互区分的一组标记。在另外的实施方式中，即使标记可能具有相同的光学和/或光谱发射性质，经固定的标记也可以在空间上彼此区分开。在一些实施

方式中,相同类型的标记的定义为具有相同光学性质的标记,其被固定在基板上,例如作为本文所述的阵列的组件,其密度和/或间距使得个体探针产物能够如图1的符号12所示那样得到解析。在本说明书中,“相同的标记”的定义为具有相同的化学和物理组成的标记。本文的“不同的标记”是指具有不同的化学和物理组成的标记,包括具有不同的光学性质的“不同类型的标记”。本文的“相同类型的不同标记”是指具有不同的化学和/或物理组成但具有相同的光学性质的标记。

[0076] 图1的符号12描述了包含经固定的标记的阵列的示例性组件的图像。在这些实施方式中,标记是空间上能够寻址的,因为分子的位置指明了其身份(并且在空间组合合成中,身份是位置的结果)。在另外的实施方式中,基板上的阵列的一个组件可以具有固定至该组件的一个或多个带标记的探针。当多个带标记的探针固定至阵列的一个组件时,固定至基板上的阵列的这一个组件上的带标记的探针中相同类型的标记可以如图1的符号12所示那样彼此在空间上区分开。在一些实施方式中,相同类型的固定标记在所有维度上通过以下距离分隔开:约1~1000nm、5~100nm或10~100nm;约100、150、200、250、300、350或400nm以上;和/或约50、100、150、200、250、300、350或400nm以下。探针产物及其在基板上的标记的密度可以至多为每个基板上数百万(且至多为十亿以上)个待计数的探针产物。对含有标记的大量探针产物进行计数的能力允许准确地定量核酸序列。

[0077] 在一些实施方式中,经固定的第一标签探针和第二标签探针和/或其经扩增的标签探针分别包含第一标签和第二标签。本文的标签探针是指被构造成直接或间接与基板结合的探针。标签探针自身可以与基板结合,或者可以经修饰以与基板结合。本文的标签或亲和标签是指用于特异性分离、富集或固定探针产物的基序。标签或亲和标签的实例包括本文所述的结合伴侣、允许序列特异性捕获的独特DNA序列(包括天然基因组序列和/或人工非基因组序列)、生物素-抗生蛋白链菌素、His标签、FLAG八肽、点击化学(例如在温和的水性条件下快速地选择性地相互反应的官能团对)和抗体(例如叠氮化物-细胞周期蛋白)。例如,固定步骤包括将标签、亲和标签或标签核苷酸序列的至少一部分杂交至固定在基板上的相应核苷酸分子。将标签或亲和标签构造成与实体结合,所述实体包括但不限于珠、磁珠、显微镜载玻片、盖玻片、微阵列或分子。在一些实施方式中,固定步骤通过将标签固定至基板的预定位置而进行。

[0078] 在另一方面,对固定在基板上的不同标记的数量进行计数,并因此对包含所述标记的不同的固定探针产物的数量进行计数。例如,将来自每个基因座的探针产物分组在一起,对经固定的探针产物中的标记进行计数。在一些实施方式中,基因组基因座内的多个序列可以通过创建多个探针产物类型来查询。对于该实例,针对相同基因组基因座的不同探针产物可以组合(可以通过固定至基板的相同位置,例如作为本文所述阵列组件),并且这些探针产物中的标记可以直接计数。针对相同基因组基因座的不同探针产物也可以是分离的(可以通过固定至基板的不同位置,例如作为本文所述阵列的不同组件),并且这些探针产物中的标记可以直接计数。在另外的实施方式中,基板可以在基板上的每个位置(例如作为基地上的阵列组件)中具有一个或多个特异性亲和标签。因此,用于定量核酸序列的另一方法通过以下方式来实现:将针对单一基因组基因座的探针产物(这可以是一种探针产物类型,或可以是针对特定基因组基因座的多于一种探针产物的组)固定至基板上的与对应于第二基因组基因座的探针产物相同的位置(例如作为本文所述阵列的相同组件),其可以

充当或不充当参照或对照基因座。在该情况下,基于用于产生探针产物的不同的标记的存在,来自第一基因组基因座的探针产物将能够与来自第二基因组基因座的探针产物区分开。

[0079] 在一个实例中,为了通过检查母体血液样品来检测胎儿的三体性21(非整倍性),产生对应于染色体21的探针产物组(例如用红色荧光团标记产生),并对其进行计数。还从参照或对照基因座(例如染色体18)产生第二探针产物组,并对其进行计数。该第二探针产物组可以例如用绿色荧光团标记产生。

[0080] 在一些实施方式中,可以制备这些探针产物从而凭借基因座(在该情况下染色体21或染色体18)将其分组在一起,并在基板上单独进行计数。即,对应于染色体21的探针产物可以被分离并单独计数,对应于染色体18的探针产物可以被分离并单独计数。在另外的实施方式中,这些探针产物也可以以下述方式制备:在基板的同一位置(例如作为本文所述阵列的同一组件)将它们分组在一起。在该情况下,在基板的相同区域上,携带红色荧光团的探针产物将对应于染色体21,携带绿色荧光团的探针产物将对应于染色体18。例如,由于所有这些探针产物是能够单独解析的,并因此可以非常准确地计数,所以,染色体21探针产物相对于染色体18探针产物的频率增加(即使小至0.01%、0.1%、1%以上或以下)将表明在胎儿中存在三体性21。在该情况下,针对染色体18的探针产物可以充当对照。

[0081] 在另一方面,本说明书的方法可以包括对固定至基板的探针组的标记进行计数。在一些实施方式中,所述方法还包括对(i)固定至所述基板的第一标记的第一数量和(ii)固定至所述基板的第二标记的第二数量进行计数。所述计数步骤可以在将经连接的探针组固定至基板之后进行,并且可以将固定有经连接的探针组的基板保存在防止经连接的探针组降解的条件(例如在室温或在低于室温的温度)下,然后进行计数步骤。

[0082] 为了准确地定量不同的基因组序列的相对丰度,例如,为了定量DNA拷贝数或定量等位基因频率,可以对大量探针产物进行计数。例如,可以基于测量例如经固定的探针的物理化学、电磁学、电学、光电子学或电子化学性质或特性来检测和计数标记。

[0083] 在一些实施方式中,标记可以通过以下方式检测:扫描探针显微镜(SPM)、扫描隧道显微镜(STM)和原子力显微镜(AFM)、电子显微镜、光学查询/检测技术,包括但不限于近场扫描光学显微镜(NSOM)、共聚焦显微镜和隐失波激发。这些技术的更具体的版本包括远场共焦显微镜、双光子显微镜、广视野落射光照明(wide-field epi-illumination)和全内反射(TIR)显微镜。许多以上技术也可以以分光镜模式使用。实际检测通过电荷耦合装置(CCD)照相机和增强CCD、光二极管和/或光电倍增管进行。在一些实施方式中,计数步骤包括光学分析,以检测标记的光学性质。在另外的实施方式中,光学分析包括本文所述的图像分析。

[0084] 在另一方面,计数步骤包括在分别对应于第一标记和第二标记的第一成像通道和第二成像通道中读取基板,并且产生基板的一个或多个图像,其中第一标记探针和第二标记探针在一个或多个图像中是能够解析的。在一些实施方式中,计数步骤包括空间滤波以进行图像分割。在另外的实施方式中,计数步骤包括分水分析(watershedding analysis),或用于成像分割的杂交法。

[0085] 本文所述的方法还可以着眼于相同基因座处的不同的等位基因(例如给定单核苷酸多态性的两个等位基因)的频率。这些方法的准确度可以检测频率的非常小的变化(例如

低至约10、5、4、3、2、1、0.5、0.1或0.01%以下)。作为实例,在器官移植的情况下,血液样品会含有非常稀的来自供体器官的遗传特征。该特征可以是存在不在所捐献的器官的受体的基因组中的等位基因。本文所述的方法可以检测等位基因频率的非常小的偏差(例如,低至约10、5、4、3、2、1、0.5、0.1或0.01%以下),并且可以鉴定宿主样品(例如血液样品)中供体DNA的存在。不健康的移植器官可以导致宿主血液中供体DNA的水平升高——增加仅几个百分点(例如,低至约10、5、4、3、2、1、0.5、0.1或0.01%以下)。本文所述的方法可以足够灵敏,从而以所需的灵敏度鉴定等位基因频率的变化,因此可以准确确定宿主血液中供体DNA的存在和改变量。

[0086] 在另一方面,本说明书的方法可以包括比较第一数量和第二数量以确定遗传样品中的遗传变异。在一些实施方式中,比较步骤包括获得具有第一目标核酸区和第二目标核酸区的核苷酸分子的相对数量的估计值。

[0087] 在另一方面,本说明书的方法可以包括在接触步骤之前(例如在制造探针的过程中)用第一标记和第二标记来分别标记第一标记探针和第二标记探针。标记所述探针可以同时进行,或在使探针与遗传样品接触、杂交探针、连接探针、扩增探针和/或固定探针之后进行。另外,标记所述探针可以同时进行,或在使探针与遗传样品接触、杂交探针、连接探针、扩增探针和/或固定探针之前进行。对探针进行标记可以包括通过物理或化学连接将标记添加、固定或结合至探针。标记可以位于探针序列内的任何地方,包括在5'末端或3'末端。

[0088] 在另一方面,本说明书的方法还包括在接触步骤之前(例如在制造探针的过程中)用第一标签和第二标签分别对第一标签探针和第二标签探针加标签。对探针加标签可以同时进行,或在使探针与遗传样品接触、杂交探针、连接探针、扩增探针和/或标记探针之后进行。另外,对探针加标签可以同时进行,或在使探针与遗传样品接触、杂交探针、连接探针、扩增探针、固定探针和/或标记探针之前进行。对探针加标签可以包括通过物理或化学连接将标签添加、固定或结合至探针。标签可以位于探针序列内的任何地方,包括在5'末端或3'末端。

[0089] 在另一方面,本文的探针组可以设计成根据将要固定标签的预定位置来具有标签。在一些实施方式中,构造成检测遗传变异的所有探针组中的标签是相同的,并被构造成直接或间接地固定在基板上的相同位置。在另外的实施方式中,第一标签和第二标签是相同的,并且其余标签的每一种都与第一或第二标签不同。在进一步的实施方式中,基板上的多个预定位置的阵列的每个组件或一组组件都可以具有待固定的独特标签。

[0090] 在另一方面,可以扩增一些实施方式的探针组,并且可以在扩增过程中产生经标记的探针组。在另一方面,各标记探针可以包含正向或反向引发序列(priming sequence),各标签探针包含相应的反向或正向引发序列和作为标签的标签核苷酸序列。正向或反向引发序列是被构造成分别与相应的正向或反向引物杂交的序列。在一些实施方式中,扩增步骤包括扩增:(i)具有分别与正向引发序列和反向引发序列杂交的第一正向和反向引物的已连接的第一标记和标签探针,其中杂交至第一标记探针的第一正向或反向引物包含第一标签,和(ii)具有分别与反向和正向引发序列杂交的第二正向和反向引物的已连接的第二标记和标签探针,其中杂交至第二标记探针的第二正向或反向引物包含第二标签。在另外的实施方式中,将标签探针的经扩增的标签核苷酸序列固定至基板上的预定位置,其中第

一标签探针和第二标签探针的经扩增的标签核苷酸序列是第一标签和第二标签。在一些实施方式中,第一标签和第二标签是相同的,且/或被构造成结合至基板上的相同位置。在另一实施方式中,第一标签和第二标签是不同的,且/或被构造成结合至基板上的不同位置。在其他实施方式中,当扩增了探针时,所述方法包括对固定至基板上的经扩增的探针和/或探针组中的标记的数量计数。例如,第一数量是固定至基板的经扩增的第一探针组中的第一标记的数量,第二数量是固定至基板的经扩增的第二探针组中的第二标记的数量。

[0091] 在另一方面,可以扩增一些实施方式的探针组,并且可以使用经标记的反向引物而不使用正向引物来产生经标记的探针组。在另一方面,各标记探针可以包括反向引发序列,并且各标签探针可以包含作为标签的标签核苷酸序列。在一些实施方式中,扩增步骤可以包括扩增:(i) 具有与第一标记探针的第一反向引发序列杂交的第一反向引物的已连接的第一标记和标签探针,其中所述第一反向引物包含第一标记,和(ii) 具有与第二标记探针的第二反向引发序列杂交的第二反向引物的已连接的第二标记和标签探针,其中所述第二反向引物包含第二标记。在另外的实施方式中,将标签探针的经扩增的标签核苷酸序列固定至基板上的预定位置,其中第一标签探针和第二标签探针的经扩增的标签核苷酸序列是第一标签和第二标签。在其他实施方式中,第一数量是在固定至基板的经扩增的第一探针组中的第一标记的数量,第二数量是在固定至基板的经扩增的第二探针组中的第二标记的数量。

[0092] 在另一方面,一些实施方式的经连接的探针组可以使用连接酶链反应产生。在另一方面,本文所述的方法包括使第三探针组和第四探针组与遗传样品接触,其中第三探针组包含第三标记探针和第三标签探针,第四探针组包含第四标记探针和第四标签探针。所述方法还可以包括:使第一探针组和第二探针组分别与来自遗传样品的双链核苷酸分子的单链核苷酸分子中的第一目标正义核酸链和第二目标正义核酸链杂交;并使第三探针组和第四探针组分别与第一目标正义核酸链和第二目标正义核酸链的反义核酸链杂交。所述方法还可以包括至少通过连接以下(i)至(iv)来产生经连接的第一、第二、第三和第四探针组:(i) 第一标记探针和第一标签探针,(ii) 第二标记探针和第二标签探针,(iii) 第三标记探针和第三标签探针,和(iv) 第四标记探针和第四标签探针。所述方法可以还包括执行本领域已知的连接酶链反应来扩增经连接的探针和/或经连接的探针组。在一些实施方式中,连接酶链反应可以包括使未连接的第一探针组、第二探针组、第三探针组和第四探针组分别与经连接的第三探针组、第四探针组、第一探针组和第二探针组杂交,并且连接未连接探针组的至少(i) 第一标记探针和第一标签探针、(ii) 第二标记探针和第二标签探针、(iii) 第三标记探针和第三标签探针和(iv) 第四标记探针和第四标签探针。所述方法还可以包括将标签探针固定至基板上的预定位置,其中分别连接至经固定的第一标签探针、第二标签探针、第三标签探针和第四标签探针的第一标记探针、第二标记探针、第三标记探针和第四标记探针分别包含第一标记、第二标记、第三标记和第四标记;经固定的标记是光学上能够解析的;经固定的第一标签探针、第二标签探针、第三标签探针和第四标签探针分别包含第一标签、第二标签、第三标签和第四标签,并且固定步骤通过将所述标签固定至所述预定位置来进行。所述方法还可以包括对(i) 固定至基板的第一和第三标记的第一总和和(ii) 固定至基板的第二和第四标记的第二总和进行计数,并比较所述第一总和和第二总和以确定遗传样品中的遗传变异。在另外的实施方式中,所述方法还包括在接触步骤之前分别用第

一标记、第二标记、第三标记和第四标记标记第一标记探针、第二标记探针、第三标记探针和第四标记探针。在其他实施方式中,第一标记和第三标记是相同的,第二标记和第四标记是相同的。

[0093] 在另一方面,本文所述的方法包括使第三探针组和第四探针组与遗传样品接触,其中第三探针组包含第三标记探针和第三标签探针,第四探针组包含第四标记探针和第四标签探针,第一标记探针和第三标记探针包含第一反向引发序列,第二标记探针和第四标记探针包含第二反向引发序列,并且各标签探针包含作为标签的标签核苷酸序列。所述方法还包括使第一探针组和第二探针组分别与来自遗传样品的双链核苷酸分子的单链核苷酸分子中的第一目标正义核酸链和第二目标正义核酸链杂交;并使第三探针组和第四探针组的至少一部分分别与第一目标正义核酸链和第二目标正义核酸链的反义核酸链杂交;通过连接(i)第一标记探针和第一标签探针、(ii)第二标记探针和第二标签探针、(iii)第三标记探针和第三标签探针和(iv)第四标记探针和第四标签探针来产生经连接的第一、第二、第三和第四探针组。所述方法还可以包括执行连接酶链反应。在一些实施方式中,连接酶链反应包括使未连接的第一探针组、第二探针组、第三探针组和第四探针组的至少一部分分别与经连接的第三探针组、第四探针组、第一探针组和第二探针组杂交,并连接未经连接探针组的(i)第一标记探针和第一标签探针、(ii)第二标记探针和第二标签探针、(iii)第三标记探针和第三标签探针和(iv)第四标记探针和第四标签探针。所述方法还可以包括扩增:(i)具有与第一反向引发序列杂交的第一反向引物的经连接的第一和第三探针组,其中所述第一反向引物包含第一标记,和(ii)具有与第二反向引发序列杂交的第二反向引物的经连接第二和第四探针组,其中所述第二反向引物包含第二标记,将标签探针的经扩增的标签核苷酸序列固定至基板上的预定位置,其中第一标签探针、第二标签探针、第三标签探针和第四标签探针的经扩增的标签核苷酸序列是第一标签、第二标签、第三标签和第四标签,第一数量是固定至基板的经扩增的第一和第三探针组中的第一标记的数量,第二数量是固定至基板的经扩增的第二和第四探针组中的第二标记的数量。

[0094] 在另一方面,经连接的第一标记探针和第二标记探针位于第一和第二经连接的探针组的3'末端,并且包含分别与第一和第二反向引物杂交的第一和第二反向引发序列。在一些实施方式中,第一和第二反向引物包含第一标记和第二标记。在另外的实施方式中,经连接的第一标签探针和第二标签探针位于第一和第二经连接的探针组的5'末端。在其他实施方式中,经连接的第一标签探针和第二标签探针位于第一和第二经连接的探针组的5'末端,并且包含分别与第一和第二正向引物杂交的相应的第一和第二正向引发序列。

[0095] 在另一方面,本文的方法包括消化样品中的双链分子以产生单链分子。在一些实施方式中,扩增步骤包括使核酸外切酶与经扩增的探针和/或探针组接触,并且从双链的经扩增的探针和/或探针组的一条链的5'末端开始消化经扩增的探针和/或探针组。例如,扩增步骤包括使核酸外切酶与探针组中的经扩增的探针接触,并且从双链的经扩增的探针组的一条链的5'末端开始消化经扩增的探针组。在另外的实施方式中,接触核酸外切酶的经扩增的探针和探针组的一条链在5'末端不具有任何标记。核酸外切酶与未标记的双链探针的接触可以从5'末端消化未标记的链,产生单链探针。在另一方面,在5'末端包含标记的经扩增的探针组的5'末端可以得到保护而免受核酸外切酶消化。

[0096] 在另一方面,所述方法可以检测1~100,1~50,2~40或5~10个遗传变异;2、3、4、

5、6、7、8、9、10个以上遗传变异；和100、50、30、20、10个以下遗传变异。在一些实施方式中，本文所述的方法可以使用至少 $(x+1)$ 数量的不同探针组来检测 x 数量的遗传变异。在这些实施方式中，可以将来自一种类型的探针组的标记的数量与来自其余不同类型的探针组的标记的一个或多个数量比较。在一些实施方式中，本文所述的方法可以以各种解析度（例如以300,000个碱基的解析度）以连续方式在整个基因组上检测遗传变异，从而使得可以单独查询和定量在所有染色体上分布的100个变异。在另外的实施方式中，碱基解析度为1或10~100000个核苷酸，至多至1000000、10000000或1亿个以上核苷酸。

[0097] 在另一方面，一些实施方式的方法可以检测至少两种遗传变异。在一些实施方式中，本文所述的方法还包括使第五探针组与遗传样品接触，其中第五探针组包含第五标记探针和第五标签探针。所述方法还可以包括使第五探针组的至少一部分与遗传样品的核苷酸分子中的第三目标核酸区杂交，其中第三目标核酸区不同于第一目标核酸区和第二目标核酸区。所述方法还可以包括至少通过连接第五标记探针和第五标签探针来连接第五探针组。所述方法还可以包括扩增经连接的探针组。所述方法还可以包括将各标签探针固定在基板上的预定位置，其中连接至经固定的标签探针的第五标记探针和/或其经扩增的标记探针包含第五标记，所述第五标记不同于第一标记和第二标记，经固定的标记是光学上能够解析的，经固定的第五标签探针和/或其经扩增的标签探针包含第五标签，并且固定步骤通过将标签固定至预定位置来进行。所述方法可以包括对固定至基板的第五标记的第三数量进行计数，并比较第三数量与第一和/或第二数量以确定遗传样品中的第二遗传变异。在一些实施方式中，受试对象可以是怀孕的受试对象，第一遗传变异是所述怀孕的受试对象的胎儿中的三体性21，第二遗传变异选自由所述怀孕的受试对象的胎儿中的三体性13、三体性18、X非整倍性和Y非整倍性组成的组。

[0098] 在另一方面，一些实施方式的方法可以检测至少三种遗传变异。在一些实施方式中，本文所述的方法还包括使第六探针组与遗传样品接触，其中第六探针组包含第六标记探针和第六标签探针。所述方法还可以包括使第六探针组的至少一部分与遗传样品的核苷酸分子中的第四目标核酸区杂交，其中所述第四目标核酸区不同于第一目标核酸区、第二目标核酸区和第三目标核酸区。所述方法还可以包括至少通过连接第六标记探针和第六标签探针而连接第六探针组。所述方法还可以包括扩增经连接的探针组。所述方法还可以包括将各标签探针固定在基板上的预定位置，其中连接至经固定的标签探针的第六标记探针和/或其经扩增的标记探针包含第六标记，所述第六标记不同于第一标记和第二标记，经固定的标记是光学上能够解析的，经固定的第六标签探针和/或其经扩增的标签探针包含第六标签，并且固定步骤通过将标签固定至预定位置来进行。所述方法还可以包括对固定至基板的第六标记的第四数量进行计数，并比较第四数量与第一、第二和/或第三数量以确定遗传样品中的第三遗传变异。

[0099] 在另一方面，一些实施方式的方法可以检测至少四种遗传变异。在一些实施方式中，本文所述的方法还包括使第七探针组与遗传样品接触，其中第七探针组包含第七标记探针和第七标签探针。所述方法还可以包括使第七探针组的至少一部分与遗传样品的核苷酸分子中的第五目标核酸区杂交，其中所述第五目标核酸区不同于第一目标核酸区、第二目标核酸区、第三目标核酸区和第四目标核酸区。所述方法还可以包括至少通过连接第七标记探针和第七标签探针而连接第七探针组。所述方法还可以包括可选地扩增经连接的探

针组。所述方法还可以包括将各标签探针固定在基板上的预定位置,其中连接至经固定的标签探针的第七标记探针和/或其经扩增的标记探针包含第七标记,所述第七标记不同于第一标记和第二标记,经固定的标记是光学上能够解析的,经固定的第七标签探针和/或其经扩增的标签探针包含第七标签,并且固定步骤通过将标签固定至预定位置来进行。所述方法还可以包括对固定至基板的第七标记的第五数量进行计数,并比较第五数量与第一、第二、第三和/或第四数量以确定遗传样品中的第四遗传变异。

[0100] 在另一方面,一些实施方式的方法可以检测至少五种遗传变异。在一些实施方式中,本文所述的方法还包括使第八探针组与遗传样品接触,其中第八探针组包含第八标记探针和第八标签探针。所述方法还可以包括使第八探针组的至少一部分与遗传样品的核苷酸分子中的第六目标核酸区杂交,其中所述第六目标核酸区不同于第一目标核酸区、第二目标核酸区、第三目标核酸区、第四目标核酸区和第五目标核酸区。所述方法还可以包括至少通过连接第八标记探针和第八标签探针而连接第八探针组。所述方法还可以包括扩增经连接的探针组。所述方法还可以包括将各标签探针固定在基板上的预定位置,其中连接至经固定的标签探针的第八标记探针和/或其经扩增的标记探针包含第八标记,所述第八标记不同于第一标记和第二标记,经固定的标记是光学上能够解析的,经固定的第八标签探针和/或其经扩增的标签探针包含第八标签,并且固定步骤通过将标签固定至预定位置来进行。所述方法还可以包括对固定至基板的第八标记的第六数量进行计数,并比较第六数量与第一、第二、第三、第四和/或第五数量以确定遗传样品中的第五遗传变异。在一些实施方式中,受试对象是怀孕的受试对象,并且第一遗传变异、第二遗传变异、第三遗传变异、第四遗传变异和第五遗传变异是所述怀孕的受试对象的胎儿中的三体性13、三体性18、三体性21、非整倍性X和非整倍性Y。

[0101] 在另一方面,受试对象是怀孕的受试对象,遗传变异是所述怀孕的受试对象的胎儿中的三体性21,第一目标核酸区位于染色体21中,第二目标核酸区不位于染色体21中。

[0102] 在另一方面,受试对象是怀孕的受试对象,遗传变异是所述怀孕的受试对象的胎儿中的三体性21,第一目标核酸区位于染色体21中,第二目标核酸区位于染色体18中。

[0103] 在一个方面,本文的探针组可以包含2、3、4、5个以上的标记探针,和/或2、3、4、5个以上的标记。在一些实施方式中,本文所述的方法还包括:第一探针组和第二探针组还分别包含第三标记探针和第四标记探针;经固定的第一探针组和/或经扩增的第一探针组还包括在第三标记探针和/或其经扩增的产物中的第九标记;并且经固定的第二探针组和/或经扩增的第二探针组还包括在第四标记探针和/或其经扩增的产物中的第十标记。在这些实施方式中,如果第九标记和第十标记与第一标记和第二标记不同,则该方法可用于确认针对第一标记和第二标记计数的数量。如果第九标记和第十标记分别与第一标记和第二标记相同,则该方法可用于提高固定至各目标核酸区的检测标记的准确度。例如,使用多个标记会比使用一个标记更亮,因此多个标记可以比一个标记更容易检测。

[0104] 在另外的实施方式中,(i)经固定的第一探针组和/或经扩增的第一探针组还包括在标记探针中的第十一标记,和(ii)经固定第二探针组和/或经扩增的第二探针组还包括在标记探针中的与第十一标记不同的第十二标记。在其他实施方式中,其中第一标记、第二标记、第十一标记和第十二标记彼此不同,并且计数步骤还包括对固定在基板上的第十一标记和第十二标记的数量进行计数。

[0105] 在另一方面,本文所述的方法还可以用对照样品来进行。在一些实施方式中,所述方法还可以包括用与来自受试对象的遗传样品不同的对照样品重复所述步骤。所述方法还可以包括对固定至基板的标记的对照数量进行计数,并比较所述对照数量与第一、第二、第三、第四、第五和/或第六数量以确定遗传样品中的遗传变异。

[0106] 在另一方面,受试对象可以是怀孕的受试对象,且遗传变异是所述怀孕的受试对象的胎儿中的遗传变异。在此类实施方式中,所述方法可以使用单核苷酸多态性(SNP)位点来确定所述胎儿材料(例如胎儿组分)的比例(例如浓度和基于样品中核苷酸分子的数量百分比)是否足以使胎儿的遗传变异可以在来自怀孕受试对象的样品中以合理的统计学显著性被检测出。在另外的实施方式中,所述方法还可以包括使母体探针组和父体探针组与遗传样品接触,其中母体探针组包含母体标记探针和母体标签探针,父体探针组包含父体标记探针和父体标签探针。所述方法还可以包括使母体探针组和父体探针组各自的至少一部分与遗传样品的核苷酸分子中的目标核酸区杂交,所述目标核酸区包含预定的SNP位点,其中母体探针组的至少一部分与位于所述SNP位点处的第一等位基因杂交,父体探针组的至少一部分与位于所述SNP位点处的第二等位基因杂交,并且所述第一和第二等位基因彼此不同。所述方法还可以包括至少通过连接(i)母体标记探针和母体标签探针和(ii)父体标记探针和父体标签探针来连接母体探针组和父体探针组。所述方法还可以包括扩增经连接的探针。所述方法还可以包括将标签探针固定在基板上的预定位置,其中连接至经固定的标签探针的母体和父体标记探针和/或其经扩增的标记探针分别包含母体标记和父体标记;所述母体标记和父体标记是不同的,并且经固定的标记是光学上能够解析的。所述方法还可以包括对母体和父体标记的数量进行计数,并确定遗传样品中的胎儿材料的比例是否足以基于所述母体和父体标记的数量来检测所述胎儿中的遗传变异。所述方法还可以包括确定遗传样品中胎儿材料的比例。

[0107] 在一些实施方式中,当受试对象是怀孕的受试对象且遗传变异是所述怀孕的受试对象的胎儿中的遗传变异时,所述方法还可以包括:使具有等位基因特异性的等位基因A探针组和等位基因B探针组与遗传样品接触,其中等位基因A探针组包含等位基因A标记探针和等位基因A标签探针,等位基因B探针组包含等位基因B标记探针和等位基因B标签探针。所述方法还可以包括使等位基因A探针组和等位基因B探针组各自的至少一部分与遗传样品的核苷酸分子中的目标核酸区杂交,所述目标核酸区包含预定的单核苷酸多态性(SNP)位点,在所述SNP位点处母体等位基因图谱(即基因型)与胎儿等位基因图谱不同(例如,母体等位基因组成可以是AA,而胎儿等位基因组成可以是AB或BB。在另一实例中,母体等位基因组成可以是AB,而胎儿等位基因组成可以是AA或BB),其中等位基因A探针组的所述至少一部分与位于所述SNP位点处的第一等位基因杂交,等位基因B探针组的所述至少一部分与位于所述SNP位点处的第二等位基因杂交,并且所述第一等位基因和第二等位基因彼此不同。所述方法还可以包括至少通过连接(i)等位基因A标记探针和标签探针和(ii)等位基因B标记探针和标签探针来连接等位基因A探针组和等位基因B探针组。所述方法还可以包括扩增经连接的探针组。所述方法还可以包括将标签探针固定在基板的预定位置上,其中连接至经固定的标签探针的等位基因A和等位基因B标记探针和/或其经扩增的标记探针分别包含等位基因A标记和等位基因B标记,所述等位基因A标记和等位基因B不同,并且经固定的标记是光学上能够解析的。所述方法还可以包括对等位基因A标记和等位基因B标记的数

量进行计数,并确定遗传样品中的胎儿材料的比例是否足以基于等位基因A标记和等位基因B标记的数量来检测所述胎儿中的遗传变异。所述方法还可以包括确定遗传样品中胎儿材料的比例。

[0108] 在一些实施方式中,当受试对象是怀孕的受试对象、遗传变异是所述怀孕的受试对象的胎儿中的遗传变异且遗传样品包含Y染色体时,所述方法还可以包括使母体探针组和父体探针组与所述遗传样品接触,其中母体探针组包含母体标记探针和母体标签探针,父体探针组包含父体标记探针和父体标签探针。所述方法还可以包括使母体探针组和父体探针组的至少一部分分别与遗传样品的核苷酸分子中的母体和父体目标核酸区杂交,其中父体目标核酸区位于所述Y染色体中,母体目标核酸区不位于所述Y染色体中。所述方法还可以包括至少通过连接(i)母体标记探针和标签探针和(ii)父体标记探针和标签探针来连接母体探针组和父体探针组。所述方法还可以包括扩增经连接的探针组。所述方法还可以包括包含预定的单核苷酸多态性(SNP)位点的目标核酸区,该位点含有多于一个SNP,例如两个或三个SNP。此外,SNP位点可以含有具有高连锁不平衡的SNP,从而将标记探针和标签探针构造成相对于仅一个SNP匹配或错配具有改善的多个SNP匹配或错配的能量学的优势。所述方法还可以包括将标签探针固定在基板的预定位置上,其中连接至经固定的标签探针的母体和父体标记探针和/或其经扩增的标记探针分别包含母体标记和父体标记,所述母体标记和父体标记不同,并且经固定的标记是光学上能够解析的。所述方法还可以包括对母体标记和父体标记的数量进行计数,并确定遗传样品中的胎儿材料的比例是否足以基于母体标记和父体标记的数量来检测所述胎儿中的遗传变异。所述方法还可以包括确定遗传样品中的胎儿材料的比例。

[0109] 在另外的实施方式中,可以使用其它遗传变异(例如单碱基缺失、微卫星和小插入)来代替本文所述的SNP位点处的遗传变异。

[0110] 在一方面,本文所述的探针组可以包含三个以上探针,包括位于标记探针和标签探针之间的至少一个探针。在一些实施方式中,第一探针组和第二探针组还分别包含第一缺口探针和第二缺口探针,第一缺口探针与第一标记探针和第一标签探针所杂交的区域之间的区域杂交,第二缺口探针与第二标记探针和第二标签探针所杂交的区域之间的区域杂交。所述方法还可以包括连接步骤,所述连接步骤包括连接至少(i)第一标记探针、第一标签探针和第一缺口探针以及(ii)第二标记探针、第二标签探针和第二缺口探针。在另外的实施方式中,缺口探针可以包含标记。例如,将第一和第二缺口探针和/或其扩增产物用标记(例如第十三和第十四标记)标记,并且这些标记各自可以与其余的标记(例如第一标记和第二标记)不同。缺口探针中的标记(例如第十三和第十四标记)可以彼此相同或不同。在另一方面,第一标记探针和第二标记探针分别与遗传样品的核苷酸分子中的第一目标核酸区和第二目标核酸区杂交;第一标签探针和第二标签探针分别与遗传样品的核苷酸分子中的第一目标核酸区和第二目标核酸区杂交;第一和第二缺口探针分别与遗传样品的核苷酸分子中的第一目标核酸区和第二目标核酸区杂交。在一些实施方式中,在第一标记探针和标签探针所杂交的区域之间,存在0~100个核苷酸,1~100个核苷酸,2~50个核苷酸,3~30个核苷酸,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、150或200个以上核苷酸,或者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、25、35、45、55、110、160或300个以下核苷酸;在第二标记探针和标签探针所杂交的区域之间,存在0~100个核苷酸,1~100个核苷酸,2~50个核苷酸,3~30

个核苷酸,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、150或200个以上核苷酸;或者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、25、35、45、55、110、160或300个以下核苷酸。在另外的实施方式中,位于标记探针和标签探针之间的缺口探针的长度可以为0~100个核苷酸,1~100个核苷酸,2~50个核苷酸,3~30个核苷酸,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、150或200个以上核苷酸;或者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、25、35、45、55、110、160或300个以下核苷酸。

[0111] 在另一方面,本文所述的探针组可以包含与标记探针和标签探针连接和/或缀合的间隔物。所述间隔物可以包含或不包含寡核苷酸。间隔物可以包含分离的、纯化的、天然存在的或非天然存在的材料,包括任何长度的寡核苷酸(例如5、10、20、30、40、50、100或150个核苷酸以下)。在一些实施方式中,探针可以是纯化的限制性消化物形式,或通过合成、重组或PCR扩增来产生。例如,第一标记探针和标签探针通过第一间隔物缀合,第二标记探针和标签探针通过第二间隔物缀合,所述第一和第二间隔物不与遗传样品的核苷酸分子杂交。在一些实施方式中,所述方法还包括用酶消化经杂交的遗传样品,并在消化之后使第一和第二间隔物中的键断裂。

[0112] 在另一方面,本文所述的方法不包括鉴定遗传样品的核苷酸分子中的序列和/或对目标核酸区和/或探针进行测序。在一些实施方式中,不包括对探针进行测序的方法包括不对标签探针中的条码和/或亲和标签进行测序。在另外的实施方式中,用于检测不同的遗传变异、目标核苷酸区和/或目标肽的经固定的探针组不需要单独检测或扫描,因为在此处描述的方法中不需要测序。在另外的实施方式中,固定至基板的不同标记的数量同时计数(例如通过单次扫描和/或成像),因此不同标记的数量不单独计数。在另一方面,本文所述的方法不包括整体阵列读取或模拟(analog)定量。本文所述的整体阵列读取是指测量来自单一类型的多个标记的累积合并信号的单次测量,其可选地与来自第二类型的多个标记的累积合并信号第二测量组合,而无需解析来自每个标记的信号。从一个以上此类测量(其中未解析单个的标记)的组合得出结果。在另一方面,本文所述的方法可以包括测量相同的标记、相同类型的不同标记和/或相同类型的标记的单次测量,其中未解析单个的标记。本文所述的方法可以不包括模拟定量,而是可以使用数码定量,其中仅确定标记的数量(通过测量个体标记的强度和形状来确定)而不是标记的累积或合并的光学强度。

[0113] 在另一方面,本文所述探针组可以包含结合剂。结合剂是与本文所述的标签或亲和标签相同的材料。在一些实施方式中,所述方法还包括在连接步骤之后将结合剂固定至固相。所述方法还可以包括从未连接的探针中分离出经连接的探针组。在另外的实施方式中,结合剂包括生物素,所述固相包含磁珠。

[0114] 在另一方面,本文所述的计数步骤还可以包括校正、验证和/或确认所计数的数量。此处所述的校正是指检查和/或调整所计数的数量的准确度。此处所述的验证和确认是指确定所计数的数量是否准确,和/或如果存在误差,误差是多少。

[0115] 在另一方面,使用强度和/或信噪比作为鉴定单一标记的方法。当染料分子或其它光学标记紧密相邻时,它们常常不可能用基于荧光的成像区分开,这是因为光散射的固有限制。即,接近在一起的两个标记将不能区分,因为它们之间无可见的空隙。用于确定给定位置的标记数量的一个示例性方法是检查相对于已知具有单一荧光的位置的相对信号和/或信噪比。两个以上标记会通常发射比单一荧光更亮的信号(和一种能够更清楚地与背景

区分的信号)。图2显示了由单一标记样品和多标记抗体(都是Alexa 546;通过漂白特性验证)测得的信号强度的归一化柱状图。两种群体是能够清楚地分开的,并且多个标记可以清楚地与单一标记区分开。

[0116] 在一些实施方式中,计数步骤可以包括测量来自经固定的标记的光学信号,并通过将来自单一标记的光学信号与来自背景和/或多个标记的其余光学信号区分开来校正所计数的数量。在一些实施方式中,所述区分包括计算所述光学信号与来自单一标记的光学信号强度相比的相对信号和/或信噪比强度。所述区分还可以包括确定所述光学信号是否来自单一标记。在另外的实施方式中,如果光学信号的相对信号和/或信噪比强度与来自单一标记的光学信号强度相差预定的量以下,则所述光学信号来自单一标记。在其他实施方式中,所述预定的量为来自单一标记的光学信号强度的0%~100%,0%~150%,10%~200%,0、1、2、3、4、5、10、20、30或40%以上,和/或300、200、100、50、30、10或5%以下。

[0117] 在另一方面,不同的标记可以具有不同的闪光(blinking)和漂白性质。它们还可以具有不同的激发性质。为了比较用于两种不同的标记的染料分子的数量,需要确保这两种染料以相似的方式作用,并且具有相似的发射特性。例如,如果一种染料比另一种暗淡的多,在该通道中分子的数量可能少计。可以逐步增加数种因素以给出染料之间的最优等价性(equivalence)。例如,计数步骤和/或校正步骤可以包括:优化(i)用于激发标记的光源的功率、(ii)光源的类型、(iii)标记的曝光时间和/或(iv)使标记与来自标记的光学信号匹配的滤光器组,并测量来自标记的光学信号。这些因素可以单独地或组合地而变化。另外,所优化的度量可以不同。例如,其可以是整体强度、信噪比、最小背景、强度的最低方差或任何其它特征。

[0118] 漂白特性是标记特异性的,并且可以用于添加用于区分标记类型的信息。图3显示了来自不同标记的平均漂白特性。该图显示了每种标记类型的归一化计数作为以60秒间隔收集的连续图像的函数。符号c1是Cy3荧光剂,符号c2是Atto647荧光剂,符号c3是Alexa488荧光剂。

[0119] 在另一方面,闪光行为可用作鉴定单一标记的方法。已知许多染料分子暂时地进入暗状态(例如Burnette等.,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011) 108:21081-21086)。这产生闪光效应,其中标记会经历一个或多个亮-暗-亮步骤。这些暗周期的长度和数量可以变化。本发明使用该闪光行为来将在衍射受限的成像中可能看上去类似的一种标记与两种以上标记区分开。如果存在多种标记,在闪光期间信号完全消失是不太可能的。更可能的是强度会降低,因为一种标记变暗,但是其它不变暗。所有标记同时闪光的概率(并因此看起来像单一荧光剂)可以基于染料的特定闪光特性来计算。

[0120] 在一些实施方式中,来自标记的光学信号在至少两个时间点测量,并且如果光学信号的强度通过单阶梯函数(single step function)减少,则该光学信号来自单一标记。在一些实施方式中,这两个时间点可以间隔0.1分钟~30分钟,1秒~20分钟,10秒~10分钟;0.01、0.1、1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60秒以上;和/或1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60秒以下。在另外的实施方式中,来自单一标记的光学信号的强度随时间具有单阶梯降低,来自两个以上标记的光学信号的强度随时间具有多阶梯降低。在其他实施方式中,来自标记的光学信号在至少两个时间点测量,并且被归一化至标记的漂白特性。在另一方面,本文所述的方法和/或计数步骤还可以包括在至少两个时间点测量来自对照标记的光学信号,

并且将来自对照标记的光学信号与来自所述标记的光学信号比较,以确定来自所述标记的光学信号的增加或减少。

[0121] 在另一方面,计数步骤还包括通过使用对照分子来确认所述计数。可以使用对照分子来确定分子类型的频率变化。实验目标经常在于确定两种以上类型的分子的丰度,所述丰度为绝对值或相对于彼此的。考虑用两种不同的染料标记的两种分子的实例。如果无效假设是它们为相等频率,则可以在单分子阵列上对它们进行计量,并且可以将计数比率与无效假设进行比较。本文的“单分子阵列”的定义为被构造成检测单个分子的阵列,包括例如美国专利申请公开第2013/0172216号中所述的阵列。如果比率从1:1起开始变化,这暗示了这两种分子为不同频率。但是,据推测可能并不清楚是否一个具有增加的丰度或者另一个具有减少的丰度。如果使用第三染料作为也应该处于相同频率的对照分子,其应该与其它两种染料具有1:1的比率。考虑到用染料A和B标记的两种分子的实例,目标在于查明用染料B标记的分子与用染料A标记的分子相比频率增加还是降低。在实验中包括用染料C标记的第三分子,且应当使其与其它两种分子处于相同的丰度。如果分别标记有A和B的分子之比是1:2,则第一分子具有降低的频率,或者第二分子具有增加的频率。如果标记有A和C的分子之比是1:1,并且标记有B和C的分子之比是1:2,则很可能用染料B标记的分子与用染料A标记的分子相比频率增加。这种情况的实例会出现在确定二倍体基因组中的DNA拷贝数变化时。重要的是知道一条序列是否被扩增或者另一条是否缺失,且使用对照分子可实现这种确定。注意对照可以是基因组的另一区域或人工对照序列。

[0122] 在一些实施方式中,本文所述的方法的结果(例如标记的计数数量)可以通过使用不同的标记但使用与起始方法中所用的相同标签来确认。此类确认可以与起始方法同时进行,或者在进行起始方法之后进行。在另外的实施方式中,此处所述的确认包括使第一和第二对照探针组与遗传样品接触,其中第一对照探针组包含第一对照标记探针和第一标签探针(其与本文所述的第一探针组的标签相同),第二对照探针组包含第二对照标记探针和第二标签探针(其与本文所述的第二探针组的标签相同)。所述确认还可以包括使第一和第二对照探针组的至少一部分分别与遗传样品的核苷酸分子中的第一目标核酸区和第二目标核酸区杂交。所述确认还可以包括至少通过连接第一对照标记探针和第一标签探针来连接第一对照探针组。所述确认还可以包括至少通过连接第二对照标记探针和第二标签探针来连接第二对照探针组。所述确认还可以包括扩增所连接的探针组。所述确认还可以包括:将各标签探针固定在基板上的预定位置,其中连接至经固定的标签探针的第一和第二对照标记探针和/或其经扩增的标记探针分别包含第一和第二对照标记,所述第一和第二对照标记是不同的,并且经固定的标记是光学上能够解析的。所述确认还可以包括:测量来自固定至基板的对照标记的光学信号。所述确认还可以包括:将来自经固定的第一对照标记和第二对照标记的光学信号与来自经固定的第一标记和第二标记的光学信号进行比较,以确定是否存在基于标记的误差。本文所用的“基于标记的误差”是指由标记引起的任何误差,如果在所述方法中使用不同标记,其可能不会出现。在一些实施方式中,第一标记和第二对照标记是相同的,第二标记和第一对照标记是相同的。

[0123] 漂白可以用作鉴定单一标记的方法。读取的关键因素在于个体标记是“能够解析的”,即独特的。这在表面密度低时是无关紧要的,此时紧密相邻的标记的可能性非常低。对于较高的密度,假设标记位于随机位置(即泊松分布),紧密相邻的机会增加至以下程度:显

著数量的标记自身的荧光发射与其相邻标记的发射部分(或全部)重叠。此时,标记不再是“能够解析的”,并且处于过渡方案,其介于单一标记检测(即数码检测)和测量来自许多分子的平均信号的经典的多标记阵列型检测(例如模拟检测)之间。换言之,个体分子的数码计数方案切换至来自许多分子的平均荧光强度的模拟方案。

[0124] 增加加载范围同时保持个体解析性的一个方案是利用荧光团漂白。长期暴露至光可以引起标记漂白,即,失去其荧光性质。换言之,随着时间流逝,标记可能熄灭。这通常作为阶梯函数出现,标记看上去发生“关闭”。本发明可以使用该漂白行为来将在衍射受限的成像中可能看上去类似的一种标记与两种以上标记区分开。对于多种标记,通过信号强度的一系列的逐步降低,预期会发生消光。例如,图4~13显示了累积标记强度相对于时间(显示了随着强度变化的漂白事件)的图,其用各种Alexa 488标记获得。可以容易地区分单个标记物质与多个标记物质(例如根据光学信号强度是否如图中所示以单阶和多阶减少)。

[0125] 在另一方面,本文所述的方法可以包括通过标记对换或染料对换来校正和/或确认所计数的数量。在分别用标记1和2标记探针产物1和2的一些实施方式时,各种误差模式可以模仿探针产物的差异性频率。例如,如果观察到标记1和标记2的比例为1:2,这可能归因于频率的真实差异(探针产物2是探针产物1的2倍)、杂交效率的差异(探针产物为相同的丰度,但是探针产物2比探针产物1更高效地杂交)或标记的性质差异(例如,如果标记是荧光染料,标记1可能比标记2更快地漂白、更频繁地闪光、给出较低的信号或较低的信噪比)。如果用调换的标记重复相同的实验,所述比例应当反转,如果其是分子的不同频率的真实观察结果的话,此时标记1是标记2的2倍。但是,如果这归因于差异性的杂交效率,则所述比例会是 $\leq 2:1$ 。如果1:2的比例归因于标记的性质,则所述比例会变成标记1:标记2为2:1,如果它们确实为相同的频率的话。该方法可以扩展到任何数量的经标记的探针组。

[0126] 在一些实施方式中,第一目标核酸区位于第一染色体中,第二目标核酸区位于与第一染色体不同的第二染色体中。计数步骤还可以包括确认所述计数,其中所述确认步骤包括使第一和第二对照探针组与遗传样品接触,其中第一对照探针组包含第一对照标记探针和第一对照标签探针,第二对照探针组包含第二对照标记探针和第二对照标签探针。所述确认步骤还可以包括将第一和第二对照探针组的至少一部分分别与位于第一和第二染色体中的第一和第二对照区杂交,其中第一和第二对照区与所述第一和第二目标核酸区不同。该确认步骤还可以包括至少通过连接(i)第一对照标记和标签探针和(ii)第二对照标记和标签探针来连接第一和第二对照探针组。所述确认步骤还可以包括扩增所连接的探针组。所述确认步骤还可以包括将(i)第一探针组和第二对照探针组固定至第一预定位置,和(ii)将第二探针组和第一对照探针组固定至第二预定位置。在一些实施方式中,连接至经固定的标签探针的第一和第二对照标记探针和/或其经扩增的标记探针分别包含第一和第二对照标记,所述第一标记和第二对照标记是不同的,所述第二标记和第一对照标记是不同的,经固定的标记是光学上能够解析的,经固定的第一和第二对照标签探针和/或其经扩增标签探针分别包含第一和第二对照标签,所述固定步骤通过将标签固定至预定的位置来进行。所述确认步骤还可以包括:测量来自固定至基板的对照标记的光学信号。所述确认步骤还可以包括:将来自固定的对照标记的光学信号与来自固定的第一标记和第二标记的光学信号进行比较,以确定是否存在基于目标核酸区的误差。在其他实施方式中,第一标签和第二对照标签是相同的,第二标签和第一对照标签是相同的。

[0127] 在另一方面,本文所述的方法的计数步骤还可以包括通过下述方式来校正和/或确认所计数的数量:(i)用被构造成与相同的目标核苷酸和/或肽区域或相同目标基因组中的不同区域结合和/或杂交的不同的探针组来重复本文所述的方法的一些或全部步骤(例如包括接触、结合、杂交、连接、扩增和/或固定的步骤),和(ii)将已结合和/或杂交于相同的目标核苷酸和/或肽区域或相同目标基因组的探针组中的标记的计数数量取平均值。在一些实施方式中,取平均值的步骤可以在比较步骤之前进行,由此比较的是与相同的目标核苷酸和/或肽区域结合和/或杂交的不同探针组的组中的标记的平均计数数量,而不是单个探针组中的标记的计数数量。在另一方面,本文所述的方法还可以包括通过下述方式来校正和/或确认对遗传变异的检测:(i)用被构造成与没有任何已知遗传变异的对照区域结合和/或杂交的不同探针组来重复本文所述的方法的一些或全部步骤(例如包括接触、结合、杂交、连接、扩增、固定和/或计数的步骤),和(ii)将已与对照区域结合和/或杂交的探针组中的标记的计数数量取平均值。在一些实施方式中,将与对照区域结合和/或杂交的探针组中的标记的平均数量与结合和/或杂交于本文所述的目标区域的探针组中的标记的数量进行比较,以确认遗传样品中的遗传变异。在另一方面,校正和/或确认的步骤可以与起始步骤同时重复,或者在进行起始步骤之后再重复。

[0128] 在另一方面,来自一个或多个群体的标记(例如荧光染料)可以基于其潜在的光谱特性来测量和/或鉴定。大多数荧光成像系统包括在多个光谱通道中收集图像的选项,这由光源和光谱激发/发射/二向色性滤光器的组合来控制。这能够允许用多个不同输入光色带来查询给定样品上的相同荧光物质,并捕获所需的输出光色带。在正常操作下,荧光团的激发通过用与该物质的最大吸收一致的窄光谱带(例如用宽带LED或弧光灯以及激发滤光器来在光谱上将输出光定形,或者用光谱上均匀的激光)进行照射而实现,并且用匹配的发射滤光器和长通二向色性滤光器来收集来自荧光团的大多数发射,以区分激发和发射(图14)。在替代性操作中,荧光部分的独特身份可以通过用各种激发颜色进行查询并通过与标准操作情况不同(或标准操作情况以外)的所收集的发射带来确认(图15)。收集来自这些各种成像构造(例如各种发射滤光器)的光,并将其与目标荧光团的校正值比较(图16)。在实施例情况下,实验测量结果(点)与该荧光团的预期的校正/参照数据(三角形)匹配,但是与替代假设(正方形)符合不佳。在给定一个或多个通道的测试和校正数据的情况下,可以以自动化且稳健的方式针对各假设校正光谱计算出拟合优度或卡方,并选择最佳拟合。各种参照可以是可关注的,包括在系统中使用的荧光团,以及常见荧光污染物,例如具有单调发射谱(污染物1;三角形)或蓝色权重谱(污染物2;星形)的那些(图17)。

[0129] 针对滤光器选择的设计限制可以与标准设计不同,对于标准设计,目标仅仅是将单通道中所收集的光最大化,同时避免来自其它通道的显著贡献。在我们的发明中,目标是光谱选择性而不仅仅是光的收集。例如,考虑具有显著不同的激发带的两种荧光团,如图18所示(注意,仅显示激发区域而未显示激发光谱)。标准设计可以使对荧光剂1发射的捕获(用Em1滤光器,实线)最大化,并且使对来自荧光剂2前沿的捕捉最小化,并且荧光剂2会可选地被Em2(其是稍微红移的,以避免荧光剂1光的显著收集)捕获。在我们的设计中,需要用Em1滤光器验证荧光剂2的存在,这使待捕获的带变宽(“Em1+”,细虚线)。这产生了额外信息来验证荧光剂2的身份。类似地,Em2可以变宽或者向荧光剂1移动,以捕获更多的该荧光剂的光(EM2+,细虚线)。光谱信息的该增加还必须与来自给定荧光团的全部可获得的光平衡,

以保持可检测性。换言之,来自给定通道中的给定荧光团的贡献只有在相应的信号大于背景噪音时是显著的,并且因此是具有信息量的,除非计划用作阴性对照。以此方式,如果物质-独特特征可以更有效地定量,荧光实体的光谱特征可以用于稳健的鉴定,并且捕获更多的光可以是次要优先的。

[0130] 给出的探针产物可以标记有多于一种荧光团,从而使光谱特征更复杂。例如,探针产物可以总是携带通用荧光剂(例如Alexa647)和基因座特异性荧光团(例如针对基因座1的Alexa 555和针对基因座2的Alexa 594)。由于污染物会极少携带产生两种荧光剂的特征,这可以进一步增加污染排斥的可信性。实施会包括在该实例中的三个以上通道中进行成像,从而通过上述比较测试与参照的拟合优度法来确认各荧光剂的存在或不存在,从而产生基因座1、基因座2或非基因座产物的决定结果。添加额外的荧光剂会辅助荧光剂鉴定,因为更多的光可供收集,但代价是正确形成的测定产物的收率和总成像时间(可能需要额外的通道)。其它光谱修正剂也可用于增加光谱信息和独特性,包括当紧密相邻或位于其它部分中时会改变颜色的FRET对。

[0131] 在另一方面,如本文所述,本说明书的方法可以用于检测肽或蛋白质中的遗传变异。在此类情况下,所述方法还可以包括使第一探针组和第二探针组与遗传样品接触,其中第一探针组包含第一标记探针和第一标签探针,第二探针组包含第二标记探针和第二标签探针。所述方法还可以包括通过物理或化学连接使探针组与目标肽区域结合,来代替在检测核酸分子中的遗传变异的情况下本文所述的杂交步骤。具体而言,所述方法还可以包括将第一探针组和第二探针组的至少一部分分别与遗传样品的肽或蛋白质中的第一和第二目标肽区域结合。例如,所述结合可以通过在与目标肽区域特异性结合的探针组的至少一个探针中具有结合剂来进行。

[0132] 在一些实施方式中,检测肽或蛋白质中的遗传变异的方法还可以包括:至少通过缀合第一标记探针和第一标签探针而利用化学键来缀合第一探针组,并至少通过缀合第二标记探针和第二标签探针来缀合第二探针组,由此代替在检测核酸分子中的遗传变异的情况下本文所述的连接步骤。所述方法还可以包括将标签探针固定至本文所述的基板上的预定位置。在另外的实施方式中,缀合至经固定的标签探针的第一标记探针和第二标记探针分别包含第一标记和第二标记;第一标记和第二标记是不同的;经固定的标记是光学上能够解析的;经固定的第一标签探针和第二标签探针和/或其经扩增的标签探针分别包含第一标记和第二标记;固定步骤通过将标签固定至预定位置来进行。如本文所述,所述方法还可以包括对(i)固定至基板的第一标记的第一数量和(ii)固定至基板的第二标记的第二数量进行计数,并比较所述第一数量和第二数量以确定遗传样品中的遗传变异。

[0133] 用于根据本文所述方法检测遗传变异的系统包括多种元件。一些元件包括将原始生物样品转化成有用的分析物。然后检测该分析物,产生数据,稍后将数据处理成报告。图19中显示了可以包括在所述系统中的各种模块。图20中显示了用于分析数据的各种方法的更多细节(例如包括图像处理)。分析可以在计算机上进行,并且包括与产生数据的装置连接的网络以及用于储存数据和报告的数据服务器。可选地是,分析物数据之外的其他信息可以包括在最终报告中,例如母体年龄或之前的已知风险。在一些实施方式中,测试系统包括一系列模块,其中一些是可选的或者可以根据之前模块的结果而重复。测试可以包括:(1)接收请求,例如来自下指令的临床医生或医师的请求,(2)接收患者样品,(3)对该样品

进行测定(包括品质控制),从而在合适的成像基板上产生测定产物(例如使探针与样品接触、结合和/和杂交,连接所述探针,可选地扩增经连接的探针,并且将探针固定至本文所述的基板), (4) 在一个或多个光谱通道中将基板成像, (5) 分析图像数据, (6) 进行统计学计算(例如比较第一数量和第二数量以确定遗传样品中的遗传变异), (7) 创建和审批临床报告, 和 (8) 将报告返回至下指令的临床医生或医师。测试系统可以包括被构造成接收请求(例如来自下订单的临床医生或医师的请求)的模块, 被构造成接收患者样品的模块, (3) 被构造成执行对该样品进行测定(包括品质控制)以在合适的成像基板上产生测定产物的模块, (4) 被构造成在一个或多个光谱通道中将基板成像的模块, (5) 被构造成分析图像数据的模块, (6) 被构造成执行统计学计算的模块, (7) 被构造成创建和确认临床报告的模块, 和/或 (8) 被构造成将报告返回至下指令的临床医生或医师的模块。

[0134] 在一个方面, 本文所述的测定和方法可以对单个输入样品同时进行。例如, 所述方法可以包括: 验证处于或高于本文所述的最小阈值的胎儿基因组分子的存在, 然后, 如果并且只有满足该最小阈值, 则进行评估靶拷贝数状态的步骤。因此, 可以对输入样品单独运行用于进行执行胎儿组分计算的等位基因特异性测定和用于计算拷贝数状态的基因组靶测定。在其它实施方式中, 本文所述的测定和方法可以在相同时间以相同的流体体积对相同的样品平行地进行。还可以以相同的通用测定处理步骤平行地进行另外的品质控制测定。由于可以针对每种测定和每种测定产物来独特地设计待固定至基板的探针产物、经连接的探针组或经标记的分子中的标签、亲和标签和/或标签探针, 可以在成像基板上的不同物理位置将所有平行测定产物定位、成像和定量。在另一方面, 使用相同的探针和/或检测相同的遗传变异或对照的本文所述的相同测定或方法(或其步骤中的一些)可以在本文所述的相同或不同模块(例如试管)中对多个样品同时进行。在另一方面, 使用不同的探针和/或检测不同的遗传变异或对照的本文所述的测定或方法(或其步骤中的一些)可以在相同或不同模块(例如试管)中对单个或多个样品同时进行。

[0135] 在另一方面, 图像分析可以包括: 图像预处理, 图像区段化以鉴定标记, 表征标记品质, 基于品质过滤所检测的标记的群体, 和根据图像数据的性质进行统计学计算。在一些情况下, 例如当进行等位基因特异性测定并成像时, 可以计算胎儿组分。在其它方面, 例如在基因组靶标测定和成像中, 计算两个靶基因组区域之间的相对拷贝数状态。图像数据的分析可以在控制图像获取的相同计算机上或在网络计算机上实时进行, 从而可以以接近实时的方式将分析结果并入测试 workflow 决策树中。

[0136] 在另一方面, 对于成像用基板的不同部分, 以上测试的步骤 (4) 和 (5) 可以重复多次, 从而使结果支配后续步骤。例如, 本文所述的测试和方法包括: 在测试基因组靶标的相对拷贝数状态之前, 确认在获自受试对象的遗传样品中的胎儿样品的存在和精确水平。如本文所述, 可以使用等位基因敏感性测定来定量胎儿DNA相对于母体DNA的水平。所得的探针产物可以被拉入基板上的胎儿组分区1, 并成像。在一些实施方式中, 如果并且只有所计算的胎儿组分大于最低系统要求, 则可以继续测试并产生有效结果。以此方式, 在进行另外的成像和分析之前, 可以终止那些不能确认至少最小输入胎儿组分的样品测试。相反地, 如果胎儿组分高于最小阈值, 可以继续基因组靶标(例如染色体21、18或13)的进一步的成像(所述测试的步骤4), 随后进行另外的分析(所述测试的步骤5)。也可以使用和测试其它标准。

[0137] 在另一方面,并不是等位基因特异性测定中探测的每一个SNP都可以产生有用的信息。例如,对于给定的SNP(例如等位基因对AB)母体基因组材料可以具有杂合性等位基因,胎儿材料也可能在该位点处是杂合性的(例如AB),因此胎儿材料是不能辨别的,且不能计算胎儿组分。但是,对于相同输入样品的另一SNP位点可能依然显示母体材料是杂合性的(例如AB)而胎儿材料是纯合性的(例如AA)。在该实例中,由于胎儿DNA的存在,等位基因特异性测定可以产生比B计数稍微更多的A计数,由此可以计算胎儿组分。由于对于规定的样品不能推知SNP谱(即基因型),应当设计多个或许多SNP位点,以使得几乎每一个可能的样品都会产生有信息的SNP位点。各SNP位点可以定位至成像用基板上的不同物理位置,例如通过对各SNP使用不同的标签。但是,对于给定测试,胎儿组分仅可以成功地计算一次。因此,可以对用于查询SNP的基板上的单个或多个位置成像并进行分析(例如在1、2、3、4、5、10、20、50以下和/或1、2、3、4、5、10、20、50以上的组中),直到检测到有信息的SNP。通过交替进行成像和分析,可以避免成像所有可能的SNP点,并显著地减少平均测试持续时间,同时保准确性和稳健性。

[0138] 在另一方面,除了终止样品中胎儿组分的比例不足的测试之外,确定样品的胎儿组分还可以辅助所述系统的其它方面。例如,如果胎儿组分较高(例如20%),则对于给定的统计功效,每个基因靶标(例如chr21)所需的计数数量会较低;如果胎儿组分较低(例如1%),则对于相同的统计功效,每个基因组靶标需要非常高的计数数量来达到相同的统计学显著性。因此,在(4-1)对胎儿组分区1进行成像之后,(5-1)对产生所需的计数通量/基因组靶标的那些数据进行分析,(4-2)以所需的通量开始进行基因组靶区2的成像,然后(5-2)对那些图像数据和输入靶标的基因组变异的测试结果进行分析。

[0139] 在另一方面,以上测试的步骤(4)和(5)可以出于品质控制目的而进一步重复,这些目的包括评估:成像用基板上的荧光剂的背景水平、污染性部分、阳性对照或即时测试之外的拷贝数变化的其它原因(例如母体或胎儿中的癌、胎儿嵌合性、孪生)。因为图像分析可以是实时的,并且不需要在产生结果之前完成整个成像运行(与DNA测序法不同),因此中间结果可以由决策树支配后续步骤,并且定制用于获得对个体样品的理想性能的测试。品质控制还可以包括验证:样品具有可接受的品质且存在,成像用基板被正确配置,测定产物存在且/或具有正确的浓度或密度,存在可接受水平的污染,成像仪器起作用,以及分析产生正确的结果,所有都馈至最终测试报告中以供临床团队审阅。

[0140] 在另一方面,以上测试包括一个或多个以下步骤:(1)接收请求(例如来自下指令的临床医生或医师的请求),(2)接收患者样品,(3)对该样品进行测定(包括等位基因特异性部分、基因组靶标部分和品质控制),产生含有测定产物的成像用基板,(4-1)在一个或多个光谱通道中将基板的等位基因特异性区域成像,(5-1)分析等位基因特异性图像数据以计算胎儿组分(待定的足够的胎儿组分),(4-2)在一个或多个光谱通道中将基板的基因组靶标区域成像,(5-2)分析基因组靶标区域图像数据以计算基因组靶标的拷贝数状态,(4-3)在一个或多个光谱通道中将基板的品质控制区域成像,(5-3)分析品质控制图像数据以计算、证实和验证所述测试,(6)进行统计学计算,(7)产生和审批临床报告,和(8)将报告发送回下指令的临床医生或医师。

[0141] 在以下描述中,参照附图来描述各种示例性实施方式。

[0142] 图21是用于定量两个基因组基因座处的基因组拷贝数的测定的实施情况。在该测

定的该实施方式中,105和106是靶分子。105含有对应于查询拷贝数(例如染色体21)的第一基因组基因座“基因座1”的序列,106含有对应于查询拷贝数(例如染色体18)的第二基因组基因座“基因座2”的序列。图21包含了每个基因组基因座一个探针组的实例,但是在该测定的一些实施方式中,可以设计多个探针组以查询基因组基因座内的多个区域。例如,可以设计对应于染色体21的大于10、大于100或大于500个探针组。图21说明了针对每个基因组基因座的仅单个探针组,但是重要的是本发明的范围允许为每个基因组基因座用多个探针组。图21也说明了靶分子和探针组之间的单杂交事件。实践中,在测定样品中会存在多个靶分子。许多靶分子会含有用于杂交至探针组并且形成探针产物的必需序列。不同的靶分子可以与探针组杂交,因为一些靶分子会带有遗传多态性。另外,由基因组DNA产生的靶分子可以具有随机的各种各样的分子尺寸以及各种起始和末端序列。本质上,存在可以与给定探针组杂交的多个靶分子。在单个测定中,添加多个拷贝的给定探针组。因此,在单个测定中可以形成至多数千或数十万或者数百万个特定探针产物。

[0143] 图21描绘了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。第一探针组含有成员探针101、102、103。符号101含有“A”型标记(100)。符号103含有亲和标签(104),其可用于分离和鉴定探针产物。102可以不含有修饰,例如标记或条形码。具有成员探针108、109、110的第二探针组携带第一探针组中的相应特征。但是,108含有“B”型标记(107),其与“A”型可区分。符号110含有亲和标签(111),其可与104相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列但具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列但具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,用于基因座1的许多种探针组的亲和标签可以是相同的或是独特的,用于基因座2的许多种探针组的亲和标签可以是相同的或是独特的。

[0144] 将一个或多个探针组添加至单个容器中的靶分子,并暴露至序列特异性杂交条件。

[0145] 对于各探针组,使三个探针(例如101、102、103)与靶分子(105)杂交(或经由类似的探针-靶标相互作用来连接),从而使靶分子上探针之间无缺口。即,来自探针组的探针彼此相邻并且是有连接能力的。

[0146] 将连接酶添加至经杂交的探针并且暴露至标准连接酶条件。经连接的探针形成探针产物。来自基因座1的所有(或大多数)探针产物都具有标记类型“A”。来自基因座2的所有探针产物都具有标记类型“B”。对应于基因组基因座1和2的探针产物的定量使用标记“A”和“B”来进行。

[0147] 在一些实施方式中,使用探针产物的亲和标签将探针产物固定至基板上。例如,如果亲和标签是DNA序列,则探针产物可以以对于随后的成像而言合适的密度杂交至DNA捕获阵列的区域中。

[0148] 在一些实施方式中,亲和标签104和111含有允许基于表面定位至一个或多个位置的独特的正交序列,其可以在杂交产物之间共有或者不共有。图47和48显示了所得的荧光团图案,其中,产物含有独特的亲和标签序列,且下方的基板含有互补物,所述互补物与基板上相同区域(例如相同的阵列组件)内的每种独特的亲和标签互补。这些图像属于基板的相同区域,但是图47显示了Cy3标记(与染色体18产物共价键和),图48显示了AlexaFluor

647标记(与染色体21产物共价键和)。对于以下的其它测定实施方式可以产生相似的图案。

[0149] 在另一实施方式中,亲和标签104和111含有相同的序列,其允许基于表面定位至基板上的相同区域(例如相同的阵列组件)。即,不同的产物竞争相同的结合位点。图49和51显示了所得的荧光图案,其中,不同的产物含有相同的亲和标签序列,并且下方的基板含有所述亲和标签的互补物。这些图像属于基板上的相同位置,但是图49显示了Cy3标记(与染色体18产物共价键和),图51显示了Alexa Fluor 647标记(与染色体21产物共价键和)。图50和52分别显示了图49和51的放大区域,清楚地证明了单分子解析度和可单个区分的标记。对于以下的其它测定实施方式可以产生相似的图案。

[0150] 在另一实施方式中,亲和标签104和111含有独特的正交序列,其允许基于表面定位至基板上的多于一个位置。图53和54显示了所得的荧光图案,其中,产物含有独特的亲和标签序列,并且下方的基板具有:含有一种亲和标签互补物的互补物的一个区域,和含有另一种亲和标签的互补物的另一单独的区域。这些图像属于基板的两个分开的区域,每个区域含有之前所述的单个亲和标签互补物。图53显示了Cy3标记(与染色体21产物共价键和),图54显示了Alexa Fluor 647标记(与染色体18产物共价键和)。对于以下的其它测定实施方式可以产生相似的图案。

[0151] 根据一些实施方式,本发明的一个特征是通过多个相邻探针的组合而实现了特异性,所述多个相邻探针必须成功地连接在一起以成功地形成、捕获和检测探针产物。如果探针产物因任何原因未成功形成,则其不能使用亲和标签分离或富集并被检测到。例如,如果探针101未成功地连接至探针102,则所得产物不能被检测到。类似地,如果探针103未成功地连接至探针102,则所得产物不能使用亲和标签分离或富集。

[0152] 要求来自探针组的所有探针都成功地与靶分子杂交并且成功地连接在一起,该要求提供了高特异性,并且极大地减少了交叉杂交问题并因此减少了假阳性信号问题。

[0153] 在该测定中,通过序列特异性杂交和连接而实现了特异性。在优选实施方式中,形成探针产物的特异性在分离或富集探针产物之前(例如固定至表面或其它固体基板上时)在反应容器中出现。这避开了基于标准表面的杂交(例如基因组微阵列)的挑战,在所述杂交中,特异性必须通过仅用长(>40bp)寡核苷酸序列进行的杂交(例如Agilent and Affymetrix阵列)来完全实现。

[0154] 使用亲和标签允许将探针产物固定在基板上,因此能够将过量的未结合的探针使用标准方法洗去或者使用标准方法除去。所以表面上的所有或大多数标记是固定至表面的特异性形成的探针产物的一部分。

[0155] 根据一些实施方式,本发明的一个特征是表面捕获不影响准确度。即,其不引入任何偏差。在一个实例中,如果将相同的亲和标签用于来自不同基因组基因座的探针组,则靶向每个基因座的探针组具有不同的标记。可以使用相同的亲和标签将来自两个基因组基因座的探针产物固定至基板上的相同位置。即,来自基因座1和基因座2的探针产物会以相同的效率被捕获,因此不会引入任何基因座特异性偏差。

[0156] 在一些实施方式中,在进行表面捕获之前,使用标准方法除去一些或所有的未结合的探针和/或靶分子。这降低了在表面捕获过程中未结合的探针和/或靶分子与探针产物之间的干扰。

[0157] 根据一些实施方式,本发明的一个特征是多个亲和标签类型可以放置在基板的相

同区域(例如,阵列的相同阵列点或组件)中。这具有许多优点,包括放置对照和校正标志物。图22至46描述了本发明的其他示例性实施方式。这些图不代表所有可能的实施方式,并且将该测定的所有其它变形都作为本发明的一部分包括在内。另外,图21中描述的实施方式的所有特征都适用于本申请所述的测定的所有另外的其它实施方式。

[0158] 图22描述了图21中所描述的一般步骤的变型。图22描绘了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。207和214是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。第一探针组含有成员探针202、204、206。202含有“A”型标记(201)。206含有亲和标签(205),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针209、211、231的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,209含有“B”型标记(208),其与“A”型可区分。213含有亲和标签(212),其可与205相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以是相同的或是独特的,或者是相同和独特的混合,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以是相同的或是独特的,或者是相同和独特的混合。在该实施方式中,探针204和211可以含有一个或多个“C”型标记(203,210)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0159] 图23描述了图21中描述的一般步骤的变型。图23描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。307和314是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。第一探针组含有成员探针302、303、305。302含有“A”型标记(301)。305含有亲和标签(306),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针309、310、312的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,309含有“B”型标记(308),其与“A”型可区分。312含有亲和标签(313),其可与306相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。在该实施方式中,探针305和312含有一个或多个“C”型标记(304,311)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0160] 图24描述了图21描述的一般步骤的变型。图24描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。407和414是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。

[0161] 第一探针组含有成员探针402、405。402含有“A”型标记(401)。405含有亲和标签(406),其可用于分离和鉴定探针产物。

[0162] 具有成员探针409、412的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,409含有“B”型标记(408),其与“A”型可区分。412含有亲和标签(413),其可与406相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标

记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0163] 在该实施方式中,探针402和405与对应于基因座1的序列杂交,但是在靶分子上存在“缺口”,该缺口由位于已杂交的探针402和405之间的一个或多个核苷酸组成。在该实施方式中,DNA聚合酶或其它酶可用于合成共价连接402和405的新多核苷酸物质(404)。即,在该实例中形成的探针产物是单一连续核酸分子,其序列对应于基因座1,并且携带以上标记和/或亲和标签。另外,404可以含有一个或多个“C”型标记,这可能归因于引入了一个或多个携带“C”型标记的核苷酸。该实例也适用于针对基因座2形成的探针产物,其含有探针409和412。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0164] 图25描述了图21描述的一般步骤的变型。图25描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。505和510是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。第一探针组含有成员探针502、503。502含有“A”型标记(501)。503含有亲和标签(504),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针507、508的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,507含有“B”型标记(506),其与“A”型可区分。508含有亲和标签(509),其可与504相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0165] 图26描述了图21描述的一般步骤的变型。图26描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。606和612是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。第一探针组含有成员探针602、603。602含有“A”型标记(601)。603含有亲和标签(605),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针608、609的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,608含有“B”型标记(607),其与“A”型可区分。609含有亲和标签(611),其可与605相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0166] 在该实施方式中,探针603和609含有一个或多个“C”型标记(604,610)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0167] 图27描述了图21描述的一般步骤的变型。图27描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如,用于区分母体和胎儿等位基因,在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下,或用于区分宿主和供体等位基因,在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下。图27描述了两种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。706和707是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。第一探针组含有成员

探针702、703、704。702含有“A”型标记(701)。704含有亲和标签(705),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针709、703、704的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。在该实施方式中,703和704对于这两个探针组是相同的。但是,709含有“B”型标记(708),其与“A”型可区分。在该实施方式中,702和709含有几乎相同的序列,不同之处仅在于序列中的一个核苷酸。因此,被构造成与等位基因1和等位基因2的区域杂交的这两个探针的杂交区序列含有等位基因1的互补区(702)和等位基因2的互补区(709)。另外,702和709上的每个杂交区域的长度以及实验杂交条件被设计成使探针702会仅与等位基因1杂交且探针709会仅与等位基因2杂交。该测定类型的目的在于准确地定量样品中的等位基因1和等位基因2的频率。

[0168] 图28描述了图21描述的一般步骤的变型。图28描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如,用于区分母体和胎儿等位基因,在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下,或用于区分宿主和供体等位基因,在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下。图28描述了两种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。807和810是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。第一探针组含有成员探针802、804、805。802含有“A”型标记(801)。805含有亲和标签(806),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针809、804、805的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。在该实施方式中,804和805对于这两个探针组是相同的。但是,809含有“B”型标记(808),其与“A”型可区分。在该实施方式中,802和809含有几乎相同的序列,不同之处仅在于序列中的一个核苷酸。因此,这两个探针的杂交区序列含有等位基因1的互补区(802)和等位基因2的互补区(809)。另外,802和809上的每个杂交区域的长度以及实验杂交条件被设计成使探针802会仅与等位基因1杂交且探针809会仅与等位基因2杂交。该测定类型的目的在于能够准确地定量样品中的等位基因1和等位基因2的频率。在该实施方式中,探针804含有一个或多个“C”型标记(803)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于等位基因1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自等位基因2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0169] 图29描述了图21描述的一般步骤的变型。图29描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如,用于区分母体和胎儿等位基因,在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下,或用于区分宿主和供体等位基因,在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下。图29描述了两种探针组,用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。

[0170] 907和910是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。第一探针组含有成员探针902、905。902含有“A”型标记(901)。符号905含有亲和标签(906),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针909、905的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。在该实施方式中,905对于这两个探针组是相同的。但是,909含有“B”型标记(908),其与“A”型可区分。在该实施方式中,902和909含有几乎相同的序列,不同之处仅在于序列中的一个核苷酸。因此,这两个探针的杂交区序列含有等位基因1的互补区(902)和等位基因2的互补区(909)。另外,902和909上的每个杂交区域的长度以及实验杂交条件被设计成使探针902会仅与等位基因1杂交且探针909会仅与等位基因2杂交。该测定类型的目的在于能够准确地定量样品中的等位基因1和等位基因2的频率。

[0171] 在该实施方式中,探针902和905与对应于等位基因1的序列杂交,以使在靶分子上

存在“缺口”，该缺口由位于已杂交的探针902和905之间的一个或多个核苷酸组成。在该实施方式中，DNA聚合酶或其它酶可用于合成共价连接902和905的新多核苷酸物质(904)。即，在该实例中形成的探针产物是单一连续核酸分子，其序列对应于等位基因1，并且携带以上标记和/或亲和标签。另外，904可以含有一个或多个“C”型标记，这可能归因于引入了携带“C”型标记的核苷酸。该实例也适用于针对等位基因2形成的探针产物，其含有探针909和905。

[0172] 图30描述了图21描述的一般步骤的变型。图30描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如，用于区分母体和胎儿等位基因，在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下，或用于区分宿主和供体等位基因，在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下。图30描述了两种探针组，用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。

[0173] 1006和1007是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。第一探针组含有成员探针1001、1003、1004。1003含有“A”型标记(1002)。1004含有亲和标签(1005)，其可用于分离和鉴定探针产物。

[0174] 具有成员探针1001、1009、1004的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。在该实施方式中，1001对于这两个探针组是相同的，且1004对于这两个探针组是相同的。但是，1009含有“B”型标记(1008)，其与“A”型可区分。

[0175] 在该实施方式中，1003和1009含有几乎相同的序列，不同之处仅在于序列中的一个核苷酸。因此，这两个探针的杂交区序列分别含有等位基因1的互补区(1003)和等位基因2的互补区(1009)。另外，1003和1009上的每个杂交区域的长度以及实验杂交条件被设计成使探针1003会仅与等位基因1杂交且探针1009会仅与等位基因2杂交。该测定类型的目的在于能够准确地定量样品中的等位基因1和等位基因2的频率。在该实施方式中，探针1001含有一个或多个“C”型标记(1000)。因此，探针产物会含有标记的组合。对于等位基因1，探针产物会含有“A”型和“C”型标记，而来自等位基因2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0176] 图31描述了图21描述的一般步骤的变型。图31描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如，用于区分母体和胎儿等位基因，在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下，或用于区分宿主和供体等位基因，在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下。图31描述了两种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。1104和1105是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。第一探针组含有成员探针1101、1102。1101含有“A”型标记(1100)。1102含有亲和标签(1103)，其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针1107、1102的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。在该实施方式中，1102对于这两个探针组是相同的。但是，1107含有“B”型标记(1106)，其与“A”型可区分。在该实施方式中，1101和1107含有几乎相同的序列，不同之处仅在于序列中的一个核苷酸。因此，这两个探针的杂交区序列含有等位基因1的互补区(1101)和等位基因2的互补区(1107)。另外，1101和1107上的每个杂交区域的长度以及实验杂交条件被设计成使探针1101会仅与等位基因1杂交且探针1107会仅与等位基因2杂交。该测定类型的目的在于能够准确地定量样品中的等位基因1和等位基因2的频率。

[0177] 图32描述了图21描述的一般步骤的变型。图32描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如，用于区分母体和胎儿等位基因，在分离自怀孕妇女的

无细胞DNA的情况下,或用于区分宿主和供体等位基因,在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下。图32描述了两种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。1206和1207是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。第一探针组含有成员探针1202、1203。1202含有“A”型标记(1201)。1203含有亲和标签(1205),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针1209、1203的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。在该实施方式中,1203对于这两个探针组是相同的。但是,1209含有“B”型标记(1208),其与“A”型可区分。在该实施方式中,1202和1209含有几乎相同的序列,不同之处仅在于序列中的一个核苷酸。因此,这两个探针的杂交区序列含有等位基因1的互补区(1202)和等位基因2的互补区(1209)。另外,1202和1209上的每个杂交区域的长度以及实验杂交条件被设计成使探针1202会仅与等位基因1杂交且探针1209会仅与等位基因2杂交。该测定类型的目的在于能够准确地定量样品中的等位基因1和等位基因2的频率。在该实施方式中,探针1203含有一个或多个“C”型标记(1204)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于等位基因1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自等位基因2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0178] 图33描述了图21描述的一般步骤的变型。图33描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。1304和1305是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。第一探针组含有成员探针1301、1302。1301含有“A”型标记(1300)。1301含有亲和标签(1303),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针1307、1308的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,1307含有“B”型标记(1306),其与“A”型可区分。1307含有亲和标签(1309),其可与1303相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。在该实施方式中,探针1301和1307具有相似的结构。例如,在探针1301上存在两个不同的杂交区域,以使探针1302可以连接至1301的每一端,形成由连续的拓扑闭合的DNA分子(例如环状分子)构成的探针产物。探针1301上的非杂交序列可以含有另外的特征,可以是限制性酶位点,或用于通用扩增的引物结合位点。

[0179] 该实施方式的一个特征是所有探针产物都是连续的环状分子。以此方式,可以通过对所有线性核酸分子进行酶促降解(例如使用核酸外切酶)而将探针产物与所有其它核酸分离。

[0180] 图34描述了图21描述的一般步骤的变型。图34描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。1405和1406是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。第一探针组含有成员探针1401、1403。1401含有“A”型标记(1400)。1401含有亲和标签(1404),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针1408、1410的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,1408含有“B”型标记(1407),其与“A”型可区分。1408含有亲和标签(1411),其可与1404相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序

列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。在该实施方式中,探针1401和1408具有相似的结构。例如,在探针1401上存在两个不同的杂交区域,以使探针1403可以连接至1401的每一端,形成由连续的拓扑闭合的DNA分子(例如环状分子)构成的探针产物。探针1401上的非杂交序列可以含有另外的特征,可以是限制性酶位点,或用于通用扩增的引物结合位点。

[0181] 该实施方式的一个特征是所有探针产物都是连续的环状分子。以此方式,可以通过对所有线性核酸分子进行酶促降解(例如使用核酸外切酶)而将探针产物与所有其它核酸分离。在该实施方式中,探针1403和1410含有一个或多个“C”型标记(1402,1409)。因此,探针产物将含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0182] 图35描述了图21描述的一般步骤的变型。图35描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。1505和1506是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。第一探针组含有成员探针1501。1501含有“A”型标记(1500)。1501含有亲和标签(1504),其可用于分离和鉴定探针产物。具有成员探针1508的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,1508含有“B”型标记(1507),其与“A”型可区分。1508含有亲和标签(1511),其可与1504相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。在该实施方式中,探针1501和1508具有相似的结构。

[0183] 例如,在探针1501上存在两个不同的杂交区域,使得当与靶分子杂交时,在两个杂交区域之间存在缺口。在该实施方式中,DNA聚合酶或其它酶可用于合成共价地填充1501的杂交区域之间的缺口的新多核苷酸物质(1503)。即,在该实例中形成的探针产物是单个连续的拓扑闭合的DNA分子(例如环状分子),其序列对应于基因座1,并且携带以上标记和/或亲和标签。另外,1503可以含有一个或多个“C”型标记,这可以归因于引入了携带“C”型标记的核苷酸。该实例也适用于针对基因座2形成的探针产物,其含有探针1508。探针1501和探针1508的非杂交序列可以含有另外的特征,可以是限制酶位点。该实施方式的一个特征是所有探针产物都是连续的环状分子。以此方式,可以通过对所有线性核酸分子进行酶促降解(例如使用核酸外切酶)而将探针产物与所有其它核酸分离。探针产物将含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0184] 图36描述了图21描述的一般步骤的变型。图36描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。1605和1606是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。

[0185] 第一探针组含有成员探针1602。1602含有“A”型标记(1600)。1602含有亲和标签(1601),其可用于分离和鉴定探针产物。

[0186] 具有成员探针1609的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,

1609含有“B”型标记(1608),其与“A”型可区分。1609含有亲和标签(1607),其可与1601相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“A”。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列,但是具有相同的标记类型“B”。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0187] 在该实施方式中,探针1602和1609分别与对应于基因座1或基因座2的序列杂交,并且可以使用DNA聚合酶或其它酶来合成新的聚核苷酸序列,例如在基因座1的情况下未1603,或者在基因座2的情况下为1611。在该实施方式中,1603和1611可以含有一个或多个“C”型标记(1604),这可以归因于引入了携带“C”型标记的一个或多个核苷酸。该实例也适用于针对基因座2形成的探针产物。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。该实施方式产生分别对基因座1或基因座2中的序列具有高度特异性的探针产物。

[0188] 图37描述了图21描述的一般步骤的变型。图37描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。1704和1705是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。

[0189] 第一探针组含有成员探针1702。1702含有亲和标签(1700),其可用于分离和鉴定探针产物。

[0190] 具有成员探针1708的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。1708含有亲和标签(1706),其可与1700相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0191] 在该实施方式中,探针1702和1708分别与对应于基因座1和基因座2的序列杂交。针对基因座1和基因座2的各探针的设计使得紧接杂交区域的第一个相邻核苷酸在针对基因座2和针对基因座1时含有不同的核苷酸。在该实例中,紧接1702的杂交区域的第一个相邻核苷酸是“A”,而紧接1708的杂交区域的第一个相邻核苷酸是“T”。在该实施方式中,针对基因座1的所有探针应该设计成使得与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸会由不同于与针对基因座2的探针的杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的核苷酸组成。即,通过设计,可以根据与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的身份将来自基因座1和基因座2的探针组彼此区分开。

[0192] 在该实施方式中,会使用DNA聚合酶或其它酶来向各探针序列添加至少一个额外的核苷酸。在该实例中,用于DNA聚合酶的核苷酸底物能够用于单个添加,例如,核苷酸可以是双脱氧链终止剂。即,仅一个新的核苷酸应该添加至每个探针序列。在该实例中,添加至探针1702的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(1703)。添加至探针1708的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(1709),从而使针对基因座1的探针产物可以与来自基因座2的探针产物区分开。

[0193] 图38描述了图21描述的一般步骤的变型。图38描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。1804和1805是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。

[0194] 第一探针组含有成员探针1802。1802含有亲和标签(1800),其可用于分离和鉴定探针产物。

[0195] 具有成员探针1808的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。1808含有亲和标签(1806),其可与1800相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0196] 在该实施方式中,探针1802和1808分别与对应于基因座1和基因座2的序列杂交。针对基因座1和基因座2的各探针的设计使得紧接杂交区域的第一个相邻核苷酸在针对基因座2和针对基因座1时含有不同的核苷酸。在该实例中,紧接1802的杂交区域的第一个相邻核苷酸是“A”,而紧接1808的杂交区域的第一个相邻核苷酸是“T”。在该实施方式中,针对基因座1的所有探针应该设计成使得与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸会由不同于与针对基因座2的探针的杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的核苷酸组成。即,通过设计,可以根据与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的身份将来自基因座1和基因座2的探针组彼此区分开。

[0197] 在该实施方式中,会使用DNA聚合酶或其它酶来向各探针序列添加至少一个额外的核苷酸。在该实例中,用于DNA聚合酶的核苷酸底物能够用于单个添加,可能是因为添加至反应混合物的核苷酸是双脱氧核苷酸。即,仅一个新的核苷酸应该添加至每个探针序列。在该实例中,添加至探针1802的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(1803)。添加至探针1808的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(1809),从而使针对基因座1的探针产物可以与来自基因座2的探针产物区分开。

[0198] 在该实施方式中,探针1802和1808含有一个或多个C型标记(1801,1806)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0199] 图39描述了图21描述的一般步骤的变型。图39描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。1906和1907是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。

[0200] 第一探针组含有成员探针1902。1902含有亲和标签(1901),其可用于分离和鉴定探针产物。

[0201] 具有成员探针1910的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。1910含有亲和标签(1908),其可与1901相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0202] 在该实施方式中,探针1902和1910分别与对应于基因座1和基因座2的序列杂交。针对基因座1和基因座2的各探针的设计使得紧接杂交区域的第一个相邻核苷酸在针对基因座2和针对基因座1时含有不同的核苷酸。在该实例中,紧接1902的杂交区域的第一个相邻核苷酸是“A”,而紧接1910的杂交区域的第一个相邻核苷酸是“T”。在该实施方式中,针对基因座1的所有探针应该设计成使得与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸会由不同于与针

对基因座2的探针的杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的核苷酸组成。即,通过设计,可以根据与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的身份将来自基因座1和基因座2的探针组彼此区分开。不同的核苷酸,并非用于区分来自基因座1或基因座2的探针的核苷酸,应该充当链终止剂。在该特定实例中,使用靶分子上的“A”核苷酸来区分针对基因座1的探针,使用“T”核苷酸来区分针对基因座2的探针。在该实例中,“C”核苷酸可以充当链终止剂。在该情况下会将“C”核苷酸添加至测定中,其不能进行链延伸(例如双脱氧C)。另一个限制是:将探针序列设计成不存在以下情况:在1906上在针对基因座1的区别性核苷酸与链终止性核苷酸之间存在针对基因座2的鉴定性核苷酸。在该实例中,在1906上,在1902的杂交区域之后且在与链终止剂C配对的G之前,不会存在“T”核苷酸。

[0203] 在该实施方式中,会使用DNA聚合酶或类似的酶来合成新的核苷酸序列,并且在针对基因座1的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(1903)。在针对基因座2的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(1911),从而使针对基因座1的探针产物可以与来自基因座2的探针产物区分开。在该实施方式中,在链终止位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“C”型标记(1912)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0204] 在另一实施方式中,链终止剂可以不含有标记。在该实施方式中,可以将第四核苷酸添加至测定中,其含有一个或多个“C”型标记。该第四核苷酸不与针对等位基因1的鉴定性核苷酸(在该实例中,A)配对,不与针对等位基因2的鉴定性核苷酸(在该实例中,T)配对,不与链终止性核苷酸(在该实例中,G)配对。在该实例中,带有一个或多个“C”型标记的第四核苷酸是G,并且会与在1906和1907上的C位置配对。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0205] 图40描述了图21描述的一般步骤的变型。图40描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。2005和2006是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。

[0206] 第一探针组含有成员探针2001。2001含有亲和标签(2000),其可用于分离和鉴定探针产物。

[0207] 具有成员探针2008的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。2008含有亲和标签(2007),其可与2000相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0208] 在该实施方式中,探针2001和2008分别与对应于基因座1和基因座2的序列杂交。针对基因座1和基因座2的各探针的设计使得存在一种或多种下述情况:区别性核苷酸(在该实例中,“A”是针对基因座1的区别性核苷酸,“T”是针对基因座2的区别性核苷酸)之后是链终止性核苷酸(在该实例中,“G”),其与探针的杂交区域相邻。重要的是不会存在下述情况:在2005上的2001的杂交区域与2005上的链终止性核苷酸之间存在针对基因座2的区别性核苷酸(在该实例中,“T”)。类似地,不会存在下述情况:在2006上的2008的杂交区域与

2006上的链终止性核苷酸之间存在针对基因座1的区别性核苷酸(在该实例中,“A”)。

[0209] 在该实施方式中,会使用DNA聚合酶或类似的酶来合成新的核苷酸序列(2004, 2011)直到添加了链终止性核苷酸,一个可能的实例是双脱氧C。在该实施方式中,在针对基因座1的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(2003)。在针对基因座2的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(2010),从而使针对基因座1的探针产物可以明显地与来自基因座2的探针产物区分开。

[0210] 图41描述了图21描述的一般步骤的变型。图41描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。2105和2106是分别对应于基因座1和基因座2的靶分子。

[0211] 第一探针组含有成员探针2102。2102含有亲和标签(2100),其可用于分离和鉴定探针产物。

[0212] 具有成员探针2109的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。2109含有亲和标签(2107),其可与2100相同或不同。可以设计靶向“基因座1”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。类似地,可以设计靶向“基因座2”的许多种探针组,其含有独特的探针序列。在该实施方式中,针对基因座1的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的,针对基因座2的许多种探针组的亲和标签可以相同或是独特的。

[0213] 在该实施方式中,探针2102和2109分别与对应于基因座1和基因座2的序列杂交。针对基因座1和基因座2的各探针的设计使得存在一种或多种下述情况:区别性核苷酸(在该实例中,“A”是针对基因座1的区别性核苷酸,“T”是针对基因座2的区别性核苷酸)之后是链终止性核苷酸(在该实例中,“G”),其与探针的杂交区域相邻。重要的是不会存在下述情况:在2105上的2102的杂交区域与2105上的链终止性核苷酸之间存在针对基因座2的区别性核苷酸(在该实例中,“T”)。类似地,不会存在下述情况:在2106上的2109的杂交区域与2106上的链终止性核苷酸之间存在针对基因座1的区别性核苷酸(在该实例中,“A”)。

[0214] 在该实施方式中,会使用DNA聚合酶或类似的酶来合成新的核苷酸序列(2104, 2110)直到添加了链终止性核苷酸,一个可能的实例是双脱氧C。在该实施方式中,在针对基因座1的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(2103)。在针对基因座2的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(2110),从而使针对基因座1的探针产物可以明显地与来自基因座2的探针产物区分开。

[0215] 在该实施方式中,探针2102和2109含有一个或多个“C”型标记(2101,2108)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于基因座1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自基因座2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0216] 图42描述了图21描述的一般步骤的变型。图42描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如,在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下用于区分母体和胎儿等位基因,或在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下用于区分宿主和供体等位基因。图42描述了两种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。2203和2204是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。

[0217] 第一探针组含有成员探针2201。2201含有亲和标签(2200),其可用于分离和鉴定探针产物。在该实施方式中,用于鉴定两个不同的等位基因的探针组相同。即,针对等位基因2的探针组由成员探针2201组成。在该实施方式中,在图42中探针2201分别与对应于等位

基因1和等位基因2的序列杂交。探针2201的设计使得紧接杂交区域的第一个相邻核苷酸在针对等位基因1和针对等位基因2时含有不同的核苷酸。换言之，与杂交区域相邻的第一个核苷酸可以是单核苷酸多态性或SNP。在该实例中，2203上的与2201的杂交区域紧邻的第一个相邻核苷酸是“A”，2204上的与2201的杂交区域紧邻的第一个相邻核苷酸是“T”。即，来自等位基因1和等位基因2的探针产物可以基于与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的身份而彼此区分开。

[0218] 在该实施方式中，将使用DNA聚合酶或其它酶来向各探针序列添加至少一个额外的核苷酸。在该实例中，用于DNA聚合酶的核苷酸底物能够用于单个添加，可能是因为添加至反应混合物的核苷酸是双脱氧核苷酸。即，仅一个新的核苷酸应该添加至每个探针序列。在该实例中，添加至针对等位基因1的探针2201的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(2202)。添加至针对等位基因2的探针2201的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(2205)，从而使针对等位基因1的探针产物可以与来自等位基因2的探针产物清楚地区分开。即，针对等位基因1的探针产物由探针2201加上携带一个或多个“A”型标记的一个额外的核苷酸组成，针对等位基因2的探针产物由探针2201加上携带一个或多个“B”型标记的一个额外的核苷酸组成。

[0219] 图43描述了图21描述的一般步骤的变型。图43描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如，在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下用于区分母体和胎儿等位基因，或在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下用于区分宿主和供体等位基因。图43描述了两种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。2304和2305是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。

[0220] 第一探针组含有成员探针2302。2302含有亲和标签(2300)，其可用于分离和鉴定探针产物。在该实施方式中，用于鉴定两个不同的等位基因的探针组相同。即，针对等位基因2的探针组由成员探针2302组成。在该实施方式中，在图43中探针2302分别与对应于等位基因1和等位基因2的序列杂交。探针2302的设计使得紧接杂交区域的第一个相邻核苷酸在针对等位基因1和针对等位基因2时含有不同的核苷酸。换言之，与杂交区域相邻的第一个核苷酸可以是单核苷酸多态性或SNP。在该实例中，2304上的与2302的杂交区域紧邻的第一个相邻核苷酸是“A”，2305上的与2302的杂交区域紧邻的第一个相邻核苷酸是“T”。即，来自等位基因1和等位基因2的探针产物可以基于与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的身份而彼此区分开。

[0221] 在该实施方式中，将使用DNA聚合酶或其它酶来向各探针序列添加至少一个额外的核苷酸。在该实例中，用于DNA聚合酶的核苷酸底物能够用于单个添加，可能是因为添加至反应混合物的核苷酸是双脱氧核苷酸。即，仅一个新的核苷酸应该添加至每个探针序列。在该实例中，添加至针对等位基因1的探针2302的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(2303)。添加至针对等位基因2的探针2302的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(2306)，从而使针对等位基因1的探针产物可以与来自等位基因2的探针产物清楚地区分开。即，针对等位基因1的探针产物由探针2302加上携带一个或多个“A”型标记的一个额外的核苷酸组成，针对等位基因2的探针产物由探针2302加上携带一个或多个“B”型标记的一个额外的核苷酸组成。

[0222] 在该实施方式中，探针2302含有一个或多个“C”型标记(2301)。因此，探针产物会

含有标记的组合。对于等位基因1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自等位基因2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0223] 图44描述了图21描述的一般步骤的变型。图44描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如,在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下用于区分母体和胎儿等位基因,或在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下用于区分宿主和供体等位基因。图44描述了两种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。2405和2406是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。

[0224] 第一探针组含有成员探针2401。2401含有亲和和标签(2400),其可用于分离和鉴定探针产物。在该实施方式中,用于鉴定两个不同等位基因的探针组相同。即,针对等位基因2的探针组由成员探针2401组成。在该实施方式中,在图44中探针2401分别与对应于等位基因1和等位基因2的序列杂交。探针2401的设计使得紧接杂交区域的第一个相邻核苷酸在针对等位基因1和针对等位基因2时含有不同的核苷酸。换言之,与杂交区域相邻的第一个核苷酸可以是单核苷酸多态性或SNP。在该实例中,2405上的与2401的杂交区域紧邻的第一个相邻核苷酸是“A”,2406上的与2401的杂交区域紧邻的第一个相邻核苷酸是“T”。即,来自等位基因1和等位基因2的探针产物可以基于与杂交区域直接相邻的第一个核苷酸的身份而彼此区分开。

[0225] 在该实施方式中,会使用DNA聚合酶或其它酶来向各探针序列添加至少一个的外的核苷酸。在该实例中,添加至针对等位基因1的探针2401的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(2402)。添加至针对等位基因2的探针2401的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(2407),从而使针对基因座1的探针产物可以与来自基因座2的探针产物清楚地区分开。即,针对等位基因1的探针产物含有探针2401加上携带一个或多个“A”型标记的一个额外的核苷酸,针对等位基因2的探针产物含有探针2401加上携带一个或多个“B”型标记的一个额外的核苷酸。另一种核苷酸,并非用于区分等位基因1和等位基因2的核苷酸,应该充当链终止剂。在该特定实例中,使用靶分子上的“A”核苷酸来鉴定等位基因1,使用“T”核苷酸来鉴定等位基因2。在该实例中,“C”核苷酸可以充当链终止剂。在该情况下,可以将“C”核苷酸添加至测定中,其不能进行链延伸(例如双脱氧C)。一个另外的限制是,将探针序列设计成不存在以下情况:在2405上在针对等位基因1的区别性核苷酸与链终止性核苷酸之间存在针对等位基因2的鉴定性核苷酸。在该实例中,在2405上,在2401的杂交区域之后且在与链终止剂C配对的G之前,不会存在“T”核苷酸。

[0226] 在该实施方式中,会使用DNA聚合酶或类似的酶来合成新的核苷酸序列,并且在针对等位基因1的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(2402)。在针对等位基因2的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(2407),从而使针对等位基因1的探针产物可以清楚地与来自等位基因2的探针产物区分开。在该实施方式中,在链终止位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“C”型标记(2403)。因此,探针产物会含有标记的组合。对于等位基因1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自等位基因2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0227] 图45描述了图21描述的一般步骤的变型。图45描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的两种探针组。例如,在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下用于区分母体和胎儿等位基因,或在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下用于区分宿主和供体等

位基因。图45描述了一种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。2505和2506是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。

[0228] 第一探针组含有成员探针2501。2501含有亲和标签(2500)，其可用于分离和鉴定探针产物。在该实施方式中，用于鉴定两个不同等位基因的探针组相同。即，针对等位基因2的探针组由成员探针2501组成。在该实施方式中，在图45中探针2501分别与对应于等位基因1和等位基因2的序列杂交。探针2501的设计使得紧接杂交区域的第一个相邻核苷酸在针对等位基因1和针对等位基因2时含有不同的核苷酸。换言之，与杂交区域相邻的第一个核苷酸可以是单核苷酸多态性或SNP。在该实例中，2505上的与2501的杂交区域紧邻的第一个相邻核苷酸是“A”，2506上的与2501的杂交区域紧邻的第一个相邻核苷酸是“T”。即，来自等位基因1和等位基因2的探针产物可以基于与杂交区域直接相邻的第一个碱基的身份而彼此区分开。

[0229] 在该实施方式中，会使用DNA聚合酶或其它酶来向各探针序列添加至少一个额外的核苷酸。在该实例中，添加至针对等位基因1的探针2501的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(2502)。添加至针对等位基因2的探针2501的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(2507)，从而使针对基因座1的探针产物可以与来自基因座2的探针产物清楚地区分开。即，针对等位基因1的探针产物含有探针2501加上携带一个或多个“A”型标记的一个额外的核苷酸，针对等位基因2的探针产物含有探针2501加上携带一个或多个“B”型标记的一个额外的核苷酸。另一种核苷酸，并非用于区分等位基因1和等位基因2的核苷酸，应该充当链终止剂。在该特定实例中，使用靶分子上的“A”核苷酸来鉴定等位基因1，使用“T”核苷酸来鉴定等位基因2。在该实例中，“C”核苷酸可以充当链终止剂。在该情况下，可以将“C”核苷酸添加至测定中，其不能进行链延伸(例如双脱氧C)。一个另外的限制是，将探针序列设计成不存在以下情况：在2505上在针对等位基因1的区别性核苷酸与链终止性核苷酸之间存在针对等位基因2的鉴定性核苷酸。在该实例中，在2505上，在2501的杂交区域之后且在与链终止剂C配对的G之前，不会存在“T”核苷酸。

[0230] 在该实施方式中，会使用DNA聚合酶或类似的酶来合成新的核苷酸序列，并且在针对等位基因1的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“A”型标记(2502)。在针对等位基因2的区别性核苷酸位置处添加的核苷酸会含有一个或多个“B”型标记(2507)，从而使针对等位基因1的探针产物可以清楚地与来自等位基因2的探针产物区分开。在该实施方式中，可以将第四核苷酸添加至测定中，其含有一个或多个“C”型标记(2508, 2503)。该第四核苷酸不与针对等位基因1的鉴定性核苷酸(在该实例中，A)配对，不与针对等位基因2的鉴定性核苷酸(在该实例中，T)配对，不与链终止性核苷酸(在该实例中，G)配对。在该实例中，带有一个或多个“C”型标记的第四核苷酸是G，并且会与在2505和2506上的C位置配对。因此，探针产物会含有标记的组合。对于等位基因1，探针产物会含有“A”型和“C”型标记，而来自等位基因2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。

[0231] 图46描述了图21描述的一般步骤的变型。图46描述了用于鉴定相同基因组基因座的各种等位基因的一种探针组。例如，在分离自怀孕妇女的无细胞DNA的情况下用于区分母体和胎儿等位基因，或在来自器官移植受体的无细胞DNA的情况下用于区分宿主和供体等位基因。图46描述了一种探针组——用于等位基因1的一种探针组和用于等位基因2的一种探针组。2605和2606是分别对应于等位基因1和等位基因2的靶分子。第一探针组含有成员

探针2602。2602含有“A”型标记(2601)。2602含有亲和标签(2600),其可用于分离和鉴定探针产物。

[0232] 具有成员探针2609的第二探针组携带如第一探针组中那样的相应特征。但是,2609含有“B”型标记(2608),其与“A”型可区分。2609含有亲和标签(2607),其可与2600相同或不同。

[0233] 在该实施方式中,2602和2609含有几乎相同的序列,不同之处仅在于序列中的一个核苷酸。因此,这两个探针的杂交区序列与等位基因1互补(2605)或与等位基因2互补(2606)。另外,2602和2609上的每个杂交区域的长度以及实验杂交条件被设计成使探针2602会仅与等位基因1杂交且探针2609会仅与等位基因2杂交。该测定类型的目的在于能够准确地定量样品中的等位基因1和等位基因2的频率。

[0234] 在该实施方式中,可以使用DNA聚合酶或其它酶来合成新的多核苷酸序列,例如在等位基因1的情况下为2604,在等位基因2的情况下为2611。在该实施方式中,2604和2611可以含有一个或多个“C”型标记(2603,2610),这可归因于引入了携带“C”型标记的一个或多个核苷酸。因此,探针产物会含有标记的组合。对于等位基因1,探针产物会含有“A”型和“C”型标记,而来自等位基因2的探针产物会含有“B”型和“C”型标记。该实施方式产生分别对等位基因1或等位基因2中的序列具有高特异性的探针产物。

[0235] 图55~58描述了图21~46中所描述的一般步骤的变型。图55描述了两种探针组,一种探针组用于基因座1,一种探针组用于基因座2,虽然如此,对于每个基因组基因座可以设计多种探针组。基因座1探针组的左臂由正向引发序列、亲和标签序列和基因座1序列的同源物组成。基因座1探针组的右臂由基因座1序列的同源物和用于用标记A标记基因座1探针组的反向引发序列组成。基因座2探针组的左臂由正向引发序列、亲和标签序列和基因座2序列的同源物组成。基因座2探针组的右臂由基因座2序列的同源物和用于用标记B标记基因座2探针组的反向引发序列组成。正向引发序列和亲和标签序列对于基因座1和基因座2的探针组而言是相同。同源序列对于单个基因组基因座是特异性的。每个探针组的基因座同源序列彼此直接相邻,从而使得当它们与其靶基因座杂交时,它们会彼此直接邻接并由此可以经连接而形成一个连续分子。反向引发序列对于所述标记(例如标记A或标记B)是特异性的,所述标记用于对针对特定亲和标签序列的特定基因座的探针产物进行标记。

[0236] 图56描述了会应用至探针组的集合(例如图55中所述的那些探针组)的工作流程。该描述基于针对一个基因组基因座的一种探针组(例如图55中所示的针对基因座1的探针组)。在步骤1中,将探针组的集合与经纯化的无细胞DNA混合。在步骤2中,使每个探针组中的基因座特异性序列与无细胞DNA样品中的其相应的同源序列杂交。在步骤3中,添加连接酶以催化左臂同源物上的3' 碱基和右同源物的5' 臂之间的磷酸二酯键的形成,以封闭两条臂之间的缺口,并由此形成作为探针产物的一个连续分子。在步骤4中,添加经修饰的引物和PCR反应组分(Taq聚合酶、各dNTP和反应缓冲液)以扩增经连接的探针产物。将正向引物修饰以使其具有5' 磷酸根基团,5' 磷酸根基团使其成为用于步骤6中所用的λ核酸外切酶的优选模板,将反向引物修饰以使其含有标记(蓝色圆圈),所述标记对于针对特定亲和标签的特定基因座的探针产物是特异性的。在步骤5中,PCR扩增探针产物以产生双链PCR产物,其中正向链含有5' 磷酸根基团,反向链含有5' 标记。在步骤6中,添加λ核酸外切酶以在5' 至3' 方向消化正向链——正向链上的5' 磷酸根基团使其成为用于λ核酸外切酶消化的优选模

板。所得材料是具有5'标记的单链(仅反向链)。这是用于与微阵列或单层杂交的经标记的靶材料。

[0237] 图57描述了图56中所述的工作流程的变型版本。在该实施方式中,每个探针组的左臂含有由该图的步骤1~6中的“B”所指示的末端生物素分子。这种生物素化使得能够在杂交-连接反应完成之后和在PCR扩增之前对探针产物的集合进行纯化。对于步骤1~3,该实施方式的流程与图57所述的流程相同。在步骤4中,向杂交-连接反应中添加抗生蛋白链菌素包被的磁珠。探针产物中所含的生物素分子会使所述产物结合至抗生蛋白链菌素。在步骤5中,洗涤磁珠以除去未生物素化的DNA(无细胞基因组DNA和右臂寡核苷酸),以产生纯化的探针产物。步骤6~9以与图56中针对步骤4~7所描述的相同的方式进行。

[0238] 图58提供了如何可以用不同的标记分子标记针对基因座1和基因座2的探针产物的实例。在图58A中,在一个PCR扩增反应中用标记A(绿色)标记基因座1探针产物并用标记B(红色)标记基因座2探针产物。针对两个基因座的探针产物都含有亲和标签序列A。在图58B中,使带不同标记的探针产物的混合物与微阵列位置杂交,在该位置中,捕获探针序列与亲和标签A序列互补。在图58C中,将所述微阵列位置成像,并且对标记A和标记B分子的数量进行计数,以提供样品中存在的基因座1和基因座2的水平的相对量度。

[0239] 图59提供了证据表明:代表针对一个基因座的大量基因组位置的探针产物可以使用杂交-连接过程以连接酶特异性方式生成。8个探针组各自由图55中所述的左臂和右臂组分成,并且含有8个染色体18位置的同源物,将这8个探针组杂交至合成的寡核苷酸模板(约48个核苷酸)并使用连接酶连接,以将每个探针组的左臂和右臂连接起来。使用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析反应产物。凝胶泳道1含有分子量梯度以指示DNA条带的尺寸。泳道2~9含有8个染色体18探针组的杂交-连接反应产物。约100个核苷酸的DNA条带存在于泳道2~9的每一个中,代表约60个核苷酸的左臂和约40个核苷酸的右臂的探针产物。泳道10和11含有未添加连接酶的阴性对照反应物。在泳道10和11中不存在约100个核苷酸的DNA条带。

[0240] 图60提供了数据表明可以使用这些探针组来检测拷贝数状态的相对变化。使用含有8个不同染色体X位置的同源物的8个探针组的混合物来测定包含表1中所示的不同数量的染色体X的细胞系。

[0241] 表1:含有不同拷贝数的染色体X的细胞系

[0242]

Coriell细胞系ID	染色体X的拷贝数
NA12138	1
NA13783	2
NA00254	3
NA01416	4
NA06061	5

[0243] 使用定量PCR来确定在图57中所述的杂交-连接和纯化过程(步骤1~5)之后对于各细胞系而言存在的探针产物的量。如图60A所示,对于各种细胞系测量的拷贝数状态遵循表1中所示的预期趋势。例如,qPCR显示NA12138(其具有一个拷贝的染色体X)的拷贝数状态小于2。NA00254(3个拷贝的X)的测量的拷贝数状态大于2,NA01416(4个拷贝的X)大于3,NA06061(5个拷贝的X)大于4。该方法在检测拷贝数状态的差异时的响应性由图60B进一步说明,在图60B中,将所测量的拷贝数状态相对于理论拷贝数状态绘图。

[0244] 图61提供了证据表明可以如图56和57所示使用探针产物的混合物来产生定量性微阵列数据。

[0245] 图61A描述了在两个正交成像通道(Alexa 488:绿色,Alexa 594:红色)中两个阵列点的代表性荧光图像。自动选择目标区域(ROI)(大圆圈),将任何不需要的亮污染物从图像中遮掩(在ROI内的较小的轮廓区域)。将单个经杂交的测定产物上的单个荧光团可视化为所述阵列点内的小点特征。(i)在绿色通道中成像的“平衡”点(代表以1:1的浓度比输入至所述测定的基因组靶标),和(ii)在红色通道中成像的相同点。(iii)在绿色通道中成像的“增加”点(代表以大于1:1的浓度比输入至所述测定的基因组靶标),和(iv)在红色通道中成像的相同点。

[0246] 图61B呈现了对于“平衡的”和“增加的”条件的各自五个点在2个通道中的所检测的荧光团的原始计数。除了荧光剂的绝对数量上的一些变化外,在“平衡的”情况下,两个通道中的数量紧密追随,但在“增加的”情况下却显示出的明显分离。

[0247] 图61C显示了对于来自“平衡”和“增加的”条件各自的5个点,用绿色通道中荧光剂的数量除以红色通道中荧光剂的数量所得到的计算比值。“平衡”情况集中在1.0的比值附近,“增加”情况为升高的比值。将“平衡”情况认为是比较两个平衡的基因组基因座,并将“增加”情况认为是一个基因座相对于另一个基因座增加的情况,我们可以使用独立的2组t检验来计算这两种条件的分离的置信度,产生的p值为 8×10^{-14} 。

[0248] 图62描述了图55~58中所描述的一般步骤的变型。在该实施方式中,针对各基因组位置设计第二探针组,即探针组B,使得探针组B中的基因组同源序列与探针组A中的基因组同源序列反向互补。探针组A会与基因组DNA的反向链杂交,探针组B会与基因组DNA的正向链杂交。相对于图55~58所述的实施方式,该实施方式会提供增加的灵敏度,因为其会产生约2倍的探针产物数量/基因座。

[0249] 图63描述了图57中所描述的一般步骤的变型。在该实施方式中,对在步骤6中使用的反向引物进行额外的修饰,以使得连接寡核苷酸序列中的前5个核苷酸的4个键是硫代磷酸酯键。该修饰会使在PCR扩增(步骤7)过程中产生的所有PCR产物都在5'末端具有硫代磷酸酯修饰。该修饰会保护反向链免遭在步骤8中用 λ 核酸外切酶处理的过程中可能出现的任何消化。

[0250] 虽然正向链上的5'磷酸酯基团使得其是用于 λ 核酸外切酶消化的优选模板,但反向链仍然在一定程度上易受消化的损伤。反向链的5'末端的硫代磷酸酯修饰会减少其对 λ 核酸外切酶消化的易受损性。

[0251] 图64描述了图55~58中所描述的一般步骤的变型。在该实施方式中,通过向步骤6中的扩增反应中添加反向引物而不添加正向引物而将探针产物的PCR扩增替换成线性扩增。如果仅存在反向引物,扩增产物会是单链的-具有5'末端标记的反向链。由于扩增产物已经是单链的,在杂交至微阵列之前其不需要进一步的处理,即可以省略 λ 核酸外切酶消化。由于在该实施方式中未使用正向引物,探针组的左臂不需要含有正向引发序列。左臂会仅由亲和标签序列和基因座同源序列组成,如图64所示。

[0252] 图55~58中描述的一般步骤的另一个实施方式是:步骤3中的单次连接反应过程被循环连接反应过程代替。这通过将用于催化连接反应的热不稳定性连接酶(例如T4连接酶)替换成热稳定性连接酶(例如Taq连接酶)而实现。当使用热稳定性连接酶时,可以将杂

交-连接反应加热至会使所有DNA双链体在最初的杂交和连接循环发生后都解链的温度(例如95℃)。这会使基因组模板DNA完全可供另一探针组杂交和连接。随后降低温度(例如至45℃)会使接下来的杂交和连接事件能够发生。在会使DNA双链体解链的温度和会使杂交和连接出现的温度之间进行的每个杂交和连接反应热循环将线性地增加该反应所产生的探针产物的量。如果使反应经历30个这样的循环,会产生使用单次连接反应的过程时至多30倍的探针产物的量。

[0253] 图65描述了图62中所述的变型步骤的另一实施方式。该实施方式利用了将针对各探针组的反向互补物的存在与热稳定性连接酶的使用组合起来的连接酶链反应(LCR),以能够进行使产物以指数形式扩增的循环连接反应。图65描述了两种探针组,针对一个基因座的探针组A和探针组B;其中探针组B中的基因组同源序列是探针组A中的基因组同源序列的反向互补物。各探针组的5'臂由亲和标签序列和同源物组成,而各探针组的3'臂由同源序列和所附的标记组成。在热循环反应的第一个循环中,基因组DNA会是使杂交和连接能够发生以产生探针产物的唯一可用模板,如图65A所示。但是在第二个循环中,在第一个循环中产生的探针产物B会充当用于探针组A的额外模板,并且类似地,在第一个循环中产生的探针产物A会充当用于探针组B的额外模板,如图65B所示。以该相同的方式,来自每个相继循环的探针产物会在下一循环中充当用于探针组杂交和连接的模板。该过程会消除对探针产物的PCR扩增的需要,所述探针产物可以直接用作微阵列靶标。

[0254] 图65中所示的步骤的另一实施方式是利用LCR但是使用具有图55中所述结构的探针组的实施方式,即,左臂和右臂都侧接有引发序列,左臂含有生物素分子,右臂不含有标记。在完成LCR后,如图56和57所示,使用磁珠将探针产物纯化(可选的),然后进行PCR扩增并制备微阵列靶标。

[0255] 图66描述图65中所描述的步骤的又一实施方式。各探针组的5'臂由亲和标签序列和同源物组成,而各探针组的3'臂由同源序列和引发序列组成且没有标记附着,如图66A所示。在完成LCR之后,可以将探针产物纯化。然后通过添加附着有标记的单个引物以及反应组分(Taq聚合酶、各dNTP和反应缓冲液)以线性方式扩增LCR产物,如图66B所示。该扩增的产物将是单链的(仅反向链),具有5'标记,如图66C所示。因此,不需要用λ核酸外切酶对其进行处理,而其可以直接用作微阵列靶标。

[0256] 在另一方面,用本文所述的方法确定的遗传变异指示了受试对象中癌、药代动力学变化性、药物毒性、移植排斥或非整倍性的存在或不存在。在另一方面,经确定的遗传变异指示了癌的存在或不存在。因此,可以进行本文所述的方法来诊断癌。

[0257] 肿瘤学的一个重大挑战是癌的早期检测。这对于难以成像或活组织检查的癌(例如胰腺癌、肺癌)尤其正确。患者血液中的无细胞肿瘤DNA(肿瘤cfDNA)提供了非入侵性检测肿瘤的方法。这些可以是实体肿瘤、良性肿瘤、微肿瘤、液体肿瘤、转移物或其它体细胞生长物。检测可以在肿瘤发展的任何阶段,虽然理想地是在早期(I期或II期)。早期检测允许进行可以延长生命或导致消退的干预(例如外科手术、化疗、药物治疗)。肿瘤学的其他问题包括监视治疗功效、治疗剂剂量的滴定、在相同器官中作为原发性肿瘤或者在远端位置处的肿瘤复发以及检测转移。本发明可用于所有这些应用。

[0258] 在一些实施方式中,本说明书的探针组可以被构造成靶向与肿瘤相关的已知遗传变异。这些可以包括突变、SNP、拷贝数变体(例如扩增、缺失)、拷贝中性变体(例如倒位、易

位)和/或这些变化的复杂组合。例如,与肿瘤相关的已知遗传变异包括在 cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic; nature.com/ng/journal/v45/n10/full/ng.2760.html#supplementary-information 中列出的那些以及在以下表2和3中列出的那些:^BGENE=在峰内来自校正至FDR的p值;^K已知经常扩增的致癌基因或缺失的TSG;^P推测的癌基因;^E表观遗传调控因子;^M线粒体相关基因; **与峰区域直接相邻;^T与近端着丝粒染色体的端粒或着丝粒相邻。

[0259]

表 2: 与肿瘤相关的示例性遗传变异(基因的扩增)

峰名称	排名	基因组位置	峰区域	GISTIC q-值	基因计数	靶标	频繁突变的基因 ^B
CCND1	1	11q13.3	chr11:69464719-69502928	2.05E-278	2	CCND1 ^K	CCND1 = 6.6e-08
EGFR	2	7p11.2	chr7:55075808-55093954	2.30E-240	1	EGFR ^K	EGFR = 2.2e-15
MYC	3	8q24.21	chr8:128739772-128762863	6.50E-180	1	MYC ^K	
TERC	4	3q26.2	chr3:169389459-169490555	5.40E-117	2	TERC ^P	
ERBB2	5	17q12	chr17:37848534-37877201	1.59E-107	1	ERBB2 ^K	ERBB2 = 1.3e-06
CCNE1	6	19q12	chr19:30306758-30316875	4.77E-90	1	CCNE1 ^K	
MCL1	7	1q21.3	chr1:150496857-150678056	1.25E-80	6	MCL1 ^K	
MDM2	8	12q15	chr12:69183279-69260755	2.59E-62	2	MDM2 ^K	
INTS4	9	11q14.1	chr11:77610143-77641464	1.01E-54	1	INTS4	
WHSC1L1	10	8p11.23	chr8:38191804-38260814	3.43E-46	2	WHSC1L1 ^E , LETM2 ^M	
CDK4	11	12q14.1	chr12:58135797-58156509	5.14E-41	5	CDK4 ^K	CDK4 = 0.0048
KAT6A	12	8p11.21	chr8:41751300-41897859	2.97E-39	2	KAT6A ^{PE} , IKBKB ^{**}	
SOX2	13	3q26.33	chr3:181151312-181928394	1.21E-38	2	SOX2 ^K	
PDGFRA	14	4q12	chr4:54924794-55218386	1.08E-37	3	PDGFRA ^K	
BDHI	15	3q29	chr3:197212101-197335320	1.21E-31	1	BDHI ^M	
1q44	16	1q44 ^T	chr1:242979907-249250621	4.48E-31	83	SMYD3 ^E	
MDM4	17	1q32.1	chr1:204367383-204548517	1.98E-29	3	MDM4 ^K	
TERT	18	5p15.33	chr5:1287704-1300024	9.34E-27	1	TERT ^K	
KDM5A	19	12p13.33 ^T	chr12:1-980639	1.59E-25	11	KDM5A ^E	
MYCL1	20	1p34.2	chr1:40317971-40417342	3.99E-25	2	MYCL1 ^K	
IGF1R	21	15q26.3	chr15:98667475-100292401	8.62E-25	9	IGF1R ^K	
PARP10	22	8q24.3	chr8:144925436-145219779	5.44E-20	15	PARP10 ^{PE} , CYC1 ^M	
G6PD	23	Xq28	chrX:153760870-15376785	3.66E-19	1	G6PD	
PHF12	24	17q11.2	chr17:27032828-27327946	1.75E-16	21	PHF12 ^E , ERAL1 ^M	
20q13.33	25	20q13.33	chr20:62187847-62214354	2.96E-16	2		
PAF1	26	19q13.2	chr19:39699366-39945515	1.66E-15	13	PAF1 ^{PE}	IL28A=0.021, SUPT5H=0.084
BCL2L1	27	20q11.21	chr20:30179028-30320705	2.85E-15	4	BCL2L1 ^K	

[0260]

TUBD1	28	17q23.1	chr17:57922443-57946458	7.19E-15	1	TUBD1	TUBD1 = 0.009
[ZNF703]	29	8p11.23	chr8:37492669-37527108	2.44E-14	0		
1q23.3	30	1q23.3	chr1:160949115-16115281	7.73E-13	9		
8q22.2	31	8q22.2	chr8:101324079-101652657	4.22E-11	3		SNX31 = 0.015
BRD4	32	19p13.12	chr19:15310246-15428182	5.04E-10	3	NOTCH3 ^P , BRD4 ^{PE}	
KRAS	33	12p12.1	chr12:24880663-25722878	9.47E-10	7	KRAS ^K	KRAS = 1.5e-14
NKX2-1	34	14q13.2	chr14:35587755-37523513	1.33E-09	14	NKX2-1 ^K	NFKB1A=0.0098, RALGAP1=0.027
NFE2L2	35	2q31.2	chr2:178072322-178171101	5.48E-09	5	NFE2L2	NFE2L2 = 3.9e-14
ZNF217	36	20q13.2	chr20:52148496-52442225	5.83E-08	1	ZNF217 ^K	ZNF217 = 0.0082
13q34	37	13q34 ^T	chr13:108818892-11516987	6.28E-08	45	ING1 ^E	ING1 = 0.00026
KAT6B	38	10q22.2	chr10:76497097-77194071	1.41E-07	9	KAT6B ^E , VDAC2 ^M	
NSD1	39	5q35.3	chr5:176337344-177040112	1.75E-06	22	NSD1 ^E , PRELID1 ^M	NSD1 = 4.9e-10
FGFR3	40	4p16.3	chr4:1778797-1817427	2.14E-06	2	FGFR3 ^P , LETM1 ^M	FGFR3 = 0.00018
9p13.3	41	9p13.3	chr9:35652385-35739486	2.55E-06	8		
COX18	42	4q13.3	chr4:73530210-74658151	2.68E-06	7	COX18 ^M	
7q36.3	43	7q36.3 ^T	chr7:153768037-159138663	3.19E-06	30	PTPRN2 ^L , DPP6 ^L	
18q11.2	44	18q11.2	chr18:23857484-24119078	3.83E-06	2		
SOX17	45	8q11.23	chr8:55069781-55384342	2.02E-05	1	SOX17	SOX17 = 0.00092
11q22.2	46	11q22.2	chr11:102295593-10251208	0.00015337	3		
CBX8	47	17q25.3	chr17:77770110-77795534	0.00023029	1	CBX8 ^E	
AKT1	48	14q32.33	chr14:105182581-10533374	0.00028451	7	AKT1 ^K	AKT1 = 1.1e-14
CDK6	49	7q21.2	chr7:92196092-92530348	0.00069831	3	CDK6 ^K	
6p21.1	50	6p21.1	chr6:41519930-44297771	0.0010459	70		
EHF	51	11p13	chr11:34574296-34857324	0.0011002	1	EHF	
6q21	52	6q21	chr6:107098934-107359899	0.0011806	4		
19q13.42	53	19q13.42 ^T	chr19:55524376-59128983	0.0013319	138	TRIM28 ^E , SUV420H2 ^E	ZNF471 = 5.4e-05
17q21.33	54	17q21.33	chr17:47346425-47509605	0.0025775	2		
BPTF	55	17q24.2	chr17:65678858-66288612	0.0028375	11	BPTF ^E	

[0261]

E2F3	56	6p22.3	chr6:19610794-22191922	0.0033658	7	E2F3 ^K	
19p13.2	57	19p13.2	chr19:10260457-10467501	0.0038041	12	MRPL4 ^M	DNMT1 = 0.099
17q25.1	58	17q25.1	chr17:73568926-73594884	0.012337	2		
KDM2A	59	11q13.2	chr11:67025375-67059633	0.012445	3	KDM2A ^E	
8q21.13	60	8q21.13	chr8:80432552-81861219	0.020548	6	MRPS28 ^M	
2p15	61	2p15	chr2:59143237-63355557	0.021056	25		XPO1 = 1.1e-05
14q11.2	62	14q11.2 ^T	chr14:1-21645085	0.027803	57		
NEDD9	63	6p24.2	chr6:11180426-11620845	0.082606	2	NEDD9 ^K	
5p13.1	64	5p13.1	chr5:35459650-50133375	0.094657	61		SLC1A3=0.0021, IL7R=0.0021
LINC00536	65						
6					1	LINC00536	
10p15.1	66	8q23.3	chr8:116891361-117360815	0.095294	21		
22q11.21	67	10p15.1	chr10:4190059-6130004	0.10391			
		22q11.21	chr22:18613558-23816427	0.13213	105		
PHF3	68	6q12	chr6:63883156-64483307	0.17851	4	PHF3 ^E , EYS ^L	PHF3 = 0.051
PAX8	69	2q13	chr2:113990138-114122826	0.19717	2	PAX8 ^K	
						SMARCA2 ^E , KDM4C ^E , UHRF2 ^E , KIAA2026 ^E	
9p24.2	70	9p24.2 ^T	chr9:1-7379570	0.20405	45		

表 3：与肿瘤相关的示例性遗传变异(基因的缺失)

峰名称	排名	基因组位置	峰区域	GISTIC q-值	基因计数	靶标	频繁突变的基因
CDKN2A	1	9p21.3	chr9:21865498-22448737	0	4	CDKN2A ^K	CDKN2A 4.4e-15
STK11	2	19p13.3	chr19:1103715-1272039	1.46E-238	7	STK11 ^K	STK11 = 2.5e-13
PDE4D	3	5q11.2	chr5:58260298-59787985	2.02E-143	3	PDE4D ^L	
PARK2	4	6q26	chr6:161693099-163153207	5.85E-137	1	PARK2 ^{L-K}	
LRP1B	5	2q22.1	chr2:139655617-143637838	4.25E-107	1	LRP1B ^L	
CSMD1	6	8p23.2	chr8:2079140-6262191	2.39E-96	1	CSMD1 ^L	
1p36.23	7	1p36.23	chr1:7829287-8925111	1.23E-93	8		

[0262]

ARID1A	8	1p36.11	chr1:26900639-27155421	5.74E-87	2	ARID1A ^K	ARID1A = 1.5e-14
PTEN	9	10q23.31	chr10:89615138-90034038	1.12E-79	2	PTEN ^K	PTEN = 2.2e-15
WWOX	10	16q23.1	chr16:78129058-79627770	8.14E-76	1	WWOX ^L	WWOX = 0.092
RBI	11	13q14.2	chr13:48833767-49064807	3.88E-75	2	RBI ^K	RBI = 1.7e-13
FAM190A	12	4q22.1	chr4:90844993-93240505	9.26E-75	1	FAM190A ^L	
2q37.3	13	2q37.3 ^T	chr2:241544527-243199373	1.77E-70	29	ING5 ^E	
22q13.32	14	22q13.32 ^T	chr22:48026910-51304566	8.20E-65	45	BRD1 ^E , HDAC10 ^E	
11p15.5	15	11p15.5 ^T	chr11:1-709860	1.02E-62	34	SIRT3 ^E , PHRF1 ^E	HRAS = 7.8e-13
LINC00290	16	4q34.3	chr4:178911874-183060693	1.21E-55	1	LINC00290	
FHIT	17	3p14.2	chr3:59034763-61547330	3.01E-55	1	FHIT ^L	
RBFOX1	18	16p13.3	chr16:5144019-7771745	1.00E-45	1	RBFOX1 ^L	
PTPRD	19	9p24.1	chr9:8310705-12693402	3.24E-38	1	PTPRD ^L	
18q23	20	18q23 ^T	chr18:74979706-78077248	1.69E-37	12		
FAT1	21	4q35.2	chr4:187475875-188227950	6.81E-36	1	FAT1 ^K	FAT1 = 2.4e-15
MPHOSP H8	22	13q12.11 ^T	chr13:1-20535070	2.57E-31	10	MPHOSP8 ^E	
15q15.1	23	15q15.1	chr15:41795901-42068054	2.71E-29	4		MGA = 0.0083, RP4P1=0.035
11q25	24	11q25 ^T	chr11:133400280-135006516	4.93E-26	14		
1p13.2	25	1p13.2	chr1:110048528-117687124	1.69E-25	100	TRIM33 ^E	NRAS=1.8e-13 , CD58=0.079
NFI	26	17q11.2	chr17:29326736-29722618	6.59E-23	5	NFI ^K	NFI = 3.3e-13
MACROD 2	27	20p12.1	chr20:14302876-16036135	9.00E-19	3	MACROD2 ^L	
7p22.3	28	7p22.3 ^T	chr7:1-1496620	1.04E-17	18		
6p25.3	29	6p25.3	chr6:1608837-2252425	3.01E-17	2		
21q11.2	30	21q11.2 ^T	chr21:1-15482604	2.34E-14	14		
9p13.1	31	9p13.1	chr9:38619152-71152237	9.75E-14	48		
ZNF132	32	19q13.43 ^T	chr19:58661582-59128983	3.77E-13	24	TRIM28 ^E , ZNF132	
5q15	33	5q15	chr5:73236070-114508587	8.15E-13	156	APC ^K , CHD1 ^E	APC=2.6e-13 ,

[0264]

CDKN1B	56	12p13.1	chr12:12710990-12966966	0.00035777	5	CDKN1B ^K	CDKN1B 2.2e-06
14q32.33	57	14q32.33 ^T	chr14:94381429-107349540	0.00074358	227	SETD3 ^E TDRD9 ^E	AKT1=2.1e-13 TRAF3=9.7e-05
14q11.2	58	14q11.2 ^T	chr14:1-30047530	0.0010181	162	PRMT5 ^E CHD8 ^E	CHD8 = 0.034
2p25.3	59	2p25.3 ^T	chr2:1-20072169	0.0011137	86	MYCN ^K	MYCN=0.068
5q35.3	60	5q35.3 ^T	chr5:153840473-180915260	0.0028515	212	NSD1 ^E ODZ2 ^L	NPM1=3.5e-13 NSD1=1.9e-09 ZNF454=0.0019 UBLCPI=0.03 GABRB2=0.07
PTTG1P	61	21q22.3	chr21:46230687-46306160	0.012227	1	PTTG1P	
22q11.1	62	22q11.1 ^T	chr22:1-17960585	0.020332	15		
SMAD4	63	18q21.2	chr18:48472083-48920689	0.036866	3	SMAD4 ^K	SMAD4 = 6.6e-15
17p13.3	64	17p13.3 ^T	chr17:1-1180022	0.040814	16		
4p16.3	65	4p16.3 ^T	chr4:1-1243876	0.056345	27		
9p21.2	66	9p21.2	chr9:27572512-28982153	0.091742	3		
10q25.1	67	10q25.1	chr10:99340084-113910615	0.11879	137	HPSE2 ^L SMNDC1 ^E	SMC3=0.00031 GSTO2=0.086
SMYD3	68	1q44	chr1:245282267-247110824	0.15417	8	SMYD3 ^E	
8p11.21	69	8p11.21	chr8:42883855-47753079	0.17382	4		
Xp22.33	70	Xp22.33 ^T	chrX:1-11137490	0.21462	52		MXR45 = 0.031

[0265] 在一些实施方式中，通过设计出与一个探针臂中的断点至少部分地重叠的探针，可以容易地靶向出现在已知位置的倒位(图67A)。结合“正常”序列的第一探针靶向未倒位的基因组材料(图67B)，并且携带第一标记类型。结合“倒位”的靶标的第二探针携带第二标记类型(图67C)。共同的右探针臂结合不易发生倒位的天然序列，并与前两个探针直接相邻。该右探针臂还携带共同的下拉标签，其将探针产物定位至成像用基板的相同区域。以此方式，探针对可以与基因组靶标杂交、连接并且成像，以产生两种潜在物质的

相对计数。

[0266] 类似地,还可以测定具有已知断点的易位。图68A显示了以其天然顺序或经易位的两个基因元件。与这些易位断点至少部分重叠的探针臂允许区分基因材料的正常顺序和转座顺序。如图68B和68C中所示,通过选择两条左臂上的独特标记,可以在成像过程中区分和计数所得的经连接的探针产物。

[0267] 检测拷贝中性变化(例如倒位、易位)的这些方法还可用于检测癌中或其它疾病或病况中的种系变异体。

[0268] 突变或SNP也涉及在许多癌中,并且以与在出生前诊断应用中确定胎儿组分时所查询的那些类似的方式被靶向。在图69A和69B所示的一些实施方式中,左探针臂被设计成利用由一个或多个错配SNP引起的能量失衡。这使一个探针臂(1101,携带一个标记)比第二探针臂(1107,携带第二类型的标记)更有利地结合。两种设计都连接至携带通用下拉标签的相同右探针臂(1102)。

[0269] 可以通过一种方法或者多于一种方法的组合来探测给定的患者血液。另外,在一些情况下,定制针对患者的特异性探针可能是有价值的。这会包括表征来自原发性肿瘤的样品(例如活组织检查)中的肿瘤特征(SNP,易位,倒位等),并且创建对于检测患者血液中的那些患者特异性遗传变异而优化了的一种或多种定制探针组,提供低成本的非侵入性监视方法。这在复发的情况可以具有重大价值,其中尽可能早地检测肿瘤类型(与原始肿瘤相同或相关)的低水平复发是理想的。

[0270] 对于常见疾病发展途径,可以设计额外的判别组来预期和监视疾病进展。例如,如果突变倾向于以给定秩序累积,可以将探针设计成监视当前状态和发展“检查点”,并且指导治疗选择。

[0271] 癌的早期检测:例如,ALK易位已经与肺癌相关。可以使用设计成查询ALK易位的探针来用血液样品检测这种类型的肿瘤。这会特别有利的,因为检测肺肿瘤的标准方法是通过胸部x射线来进行,其是对患者健康可能有害的昂贵方法,因此不标准地进行。

[0272] 检测原发性肿瘤类型的复发:例如,HER2+乳腺癌通过外科手术除去,并且患者处于消退中。可以使用靶向HER2基因的探针来在一个或多个时间点监视HER2基因的扩增。如果检测到这些,则患者可能在原发位置或其它位置具有第二HER2+肿瘤。

[0273] 检测非原发性肿瘤类型:例如,HER2+乳腺癌通过外科手术除去,并且患者处于消退中。可以使用靶向EGFR基因的探针来监视EGFR+肿瘤。如果检测到这些,则患者可能在原发位置或其他位置具有第二EGFR+肿瘤。

[0274] 转移的检测:例如,患者具有HER2+乳腺肿瘤。可以使用设计成查询ALK易位的探针来用血液样品检测这种类型的肿瘤。该肿瘤可能不在乳腺中,并且更可能位于肺中。如果检测到这些,则患者可能在原发性器官的远端具有转移性肿瘤。

[0275] 确定肿瘤异质性:许多肿瘤具有以不同的遗传变异体为特征的多个克隆群体。例如,乳腺肿瘤可以具有HER2+的一种细胞群体和EGFR+的另一种细胞群体。使用设计成靶向这两种变体的探针会允许鉴定该潜在的遗传异质性。

[0276] 肿瘤负荷的测量:在所有以上实例中,可以测量肿瘤cfDNA的量并且可以将其用于确定患者肿瘤的尺寸、生长速率、侵袭性、阶段、预后、诊断和其它属性。理想地是,在多于一个时间点进行测量,以显示肿瘤cfDNA的量的变化。

[0277] 监视治疗：例如，用赫赛汀治疗HER2+乳腺肿瘤。可以使用靶向HER2基因的探针来监视肿瘤cfDNA的量，其可以是肿瘤尺寸的代替指标。其可以用于确定肿瘤尺寸是否变化以及是否可以改变治疗以优化患者的后果。这可以包括改变剂量、停止治疗、改变为另一疗法、组合多种疗法。

[0278] 肿瘤DNA的筛选：目前对于癌不存在通用筛选。本发明提供了一种途径来检测体内的一些或所有位置处的肿瘤。例如，在整个基因组上以100kb的间距开发出一组探针。该组可用作检测整个基因组上的遗传变异的途径。在一个实例中，该组检测整个基因组上的某一尺寸的拷贝数变化。这种拷贝数变化与肿瘤细胞相关，因此该测试检测肿瘤细胞的存在。不同的肿瘤类型可以产生不同量的肿瘤cfDNA或者可以具有基因组的不同部分中的变异。因此，该测试可以能够鉴定哪个器官受影响。此外，肿瘤cfDNA的测得量可以表示肿瘤的阶段或尺寸或者肿瘤的位置。以此方式，该测试是许多或全部肿瘤类型的全基因组筛选。

[0279] 对于所有以上测试，为了减少假阳性，可以使用阈值来确定肿瘤的存在或确定性。此外，所述测试可以在多个样品上或者在多个时间点重复，以增加结果的确定性。所述结果还可以与其它信息或症状组合，以提供关于肿瘤的更多信息或更确定的信息。

[0280] 可用于本文所述的方法来测量目标核酸区的拷贝数的示例性探针组和引物列于以下表4中。表4中的每个示例性探针组包含两种探针。第一（标签）探针具有包括正向引发位点、标签和同源物1的结构。第二（标记）探针具有包括同源物2和反向引物位点的结构，其用于进行标记。还显示了探针（标签、同源序列等）的组成序列。

[0281]

表 4: 示例性探针和引物

染色体	基因座 ID	因	标签探针(正向引物+标签+5p 同源物)	标记探针(3'-Hop+反向引物)	正向引物	标签	同源物 5p	同源物 3p	反向引物
18	18-1		GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCACC AAGGAAGAAGTG AGGGCTTCTC (SEQ ID NO: 1)	CGTGCTAATAGTC TCAGGGCTTCCCTC CACCGAACGTGTC T (SEQ ID NO: 17)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	GGAAGAA GTGAGGG CTTCTC (SEQ ID NO: 35)	CGTGCTA ATAGTCT CAGGGC (SEQ ID NO: 51)	TTCCCTCCA CCGAACGT GTCT (SEQ ID NO: 67)
18	18-2		GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCACC AAAATCAAGGT GACCAGCTCC (SEQ ID NO: 2)	CGACGCTTCATTG CTTCATTTTCCCTCC ACCGAACGTGTCT (SEQ ID NO: 18)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	AAATCAA GGTGACC AGCTCC (SEQ ID NO: 36)	CGACGCT TCATTGC TTCATT (SEQ ID NO: 52)	TTCCCTCCA CCGAACGT GTCT (SEQ ID NO: 67)
18	18-3		GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCACC AATCATCTGCCA AGACAGAAGTTC (SEQ ID NO: 3)	CTTGCGCCAAACA ATTGTCCTTCCCTCC ACCGAACGTGTCT (SEQ ID NO: 19)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	TCATCTGC CAAGACA GAAGTTC (SEQ ID NO: 37)	CTTGCGC CAAACAA TTGTCC (SEQ ID NO: 53)	TTCCCTCCA CCGAACGT GTCT (SEQ ID NO: 67)
18	18-4		GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCACC AAGCAGGAGAGT CAAAGGCTG (SEQ ID NO: 4)	GCTGCAGAGTTTG CATTCAATTCCCTCC ACCGAACGTGTCT (SEQ ID NO: 20)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	GCAGGAG AGTCAAA GGTCTG (SEQ ID NO: 38)	GCTGCAG AGTTTG ATTCA (SEQ ID NO: 54)	TTCCCTCCA CCGAACGT GTCT (SEQ ID NO: 67)
18	18-5		GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCACC AAGTTGCCATGG AGATTGTGC (SEQ ID NO: 5)	CATACACACAGAC CGAGAGTCTTCTC CCACCGAACGTGT CT (SEQ ID NO: 21)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	GTTGCCAT GGAGATT GTTGC (SEQ ID NO: 39)	CATACAC ACAGACC GAGAGTC (SEQ ID NO: 55)	TTCCCTCCA CCGAACGT GTCT (SEQ ID NO: 67)

[0282]

18	18-6	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCCTCACC AACAGCTCAGTG ATGTCATTGC (SEQ ID NO: 6)	GGATGTCAGCCAG CATAAGTTTCCTC CACCGAAGTGTC T (SEQ ID NO: 22)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	CAGCTCA GTGATGTC ATTGC (SEQ ID NO: 40)	GGATGTC AGCCAGC ATAAGT (SEQ ID NO: 56)	TTCCTCCA CCGAACGT GTCT (SEQ ID NO: 67)
18	18-7	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCCTCACC AACCTTGACCTCT GCTAATGTGG (SEQ ID NO: 7)	GCAAGTGCCAAAC AGTTCTTTCCTCC ACCGAAGTGTC (SEQ ID NO: 23)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	CCTTGACC TCTGCTAA TGTGG (SEQ ID NO: 41)	GCAAGTG CCAAACA GTTCTC (SEQ ID NO: 57)	TTCCTCCA CCGAACGT GTCT (SEQ ID NO: 67)
18	18-8	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCCTCACC AACACCTTGTC ACAGCTACAG (SEQ ID NO: 8)	GATTCAGCACAC TTGAGTCTTTCCTC CACCGAAGTGTC T (SEQ ID NO: 24)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	CACCTGTC CAACAGC TACAG (SEQ ID NO: 42)	GATTCCA GCACACT TGAGTCT (SEQ ID NO: 58)	TTCCTCCA CCGAACGT GTCT (SEQ ID NO: 67)
X	X-1	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCCTCACC AAAGAAATGATC TTCAGGCTGTC (SEQ ID NO: 9)	CCGTTGCAGGTTT AAATGGCGCCTA TTGCAAGCCCTCT T (SEQ ID NO: 25)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	AGAAATG ATCTTCAG GCCTGC (SEQ ID NO: 43)	CCGTTGC AGGTTTA AATGGC (SEQ ID NO: 59)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)
X	X-2	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCCTCACC AAAAGTAATCAC TCTGGGTGGC (SEQ ID NO: 10)	CAAGAGTGCTTTA TGGGCTGCCCTA TTGCAAGCCCTCT T (SEQ ID NO: 26)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	AAGTAAT CACTCTGG GTGGC (SEQ ID NO: 44)	CAAGAGT GCTTTAT GGGCT (SEQ ID NO: 60)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)
X	X-3	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCCTCACC AAAGCTCACAGA CAACCTGTG (SEQ ID NO: 11)	GCACTCAAGGAGA TCAGACTGGCCCT ATTGCAAGCCCTC TT (SEQ ID NO: 27)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	AGCTCAC AGACAAC CTTGTG (SEQ ID NO: 45)	GCACTCA AGGAGAT CAGACTG (SEQ ID NO: 61)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)
X	X-4	GCCCTCATCTTCT	GGCTATCGAACTA	GCCCTCAT	GTTCTCAC	GCAATAG	GGCTATC	GCCCTATT

[0283]

		TCCCTGCGTTCTCTC ACCACCTCTCACC AAGCAATAGACA CCTACAGGCG (SEQ ID NO: 12)	CAACACAGCCCT ATTGCAAGCCCTC TT (SEQ ID NO: 28)	CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	CACCCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	ACACCTA CAGGCG (SEQ ID NO: 46)	GAACCTAC AACACACA (SEQ ID NO: 62)	GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)
X	X-5	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCTCACC AAGCACATTATC AAGGCCACG (SEQ ID NO: 13)	GTAGCTGTCTGTG GTGTGATCGCCCT ATTGCAAGCCCTC TT (SEQ ID NO: 29)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	GCACATT ATCAAAG GCCACG (SEQ ID NO: 47)	GTAGCTG TCTGTGG TGTGATC (SEQ ID NO: 63)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)
X	X-6	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCTCACC AACACGACCTA AAGCATGTGC (SEQ ID NO: 14)	CAAGAACTTCGA GCCTTAGCAGCCC TATTGCAAGCCCT CTT (SEQ ID NO: 30)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	CAACGAC CTAAAGC ATGTGC (SEQ ID NO: 48)	CAAGAA ACTTCGA GCCTTAG CA (SEQ ID NO: 64)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)
X	X-7	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCTCACC AAGACATACATG GCCTTGGCAG (SEQ ID NO: 15)	GTGAACCAAGTCCG AGTGAAAGCCCTA TTGCAAGCCCTCT T (SEQ ID NO: 31)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	GACATAC ATGGCTTT GGCAG (SEQ ID NO: 49)	GTGAACC AGTCCGA GTGAAA (SEQ ID NO: 65)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)
X	X-8	GCCCTCATCTTCT TCCCTGCGTTCTC ACCACCTCTCACC AAGAGATACTGC CACTTATGCACG (SEQ ID NO: 16)	GCAAATGATGTTT AGCACACGCCCT ATTGCAAGCCCTC TT (SEQ ID NO: 32)	GCCCTCAT CTTCTTCCC TGC (SEQ ID NO: 33)	GTTCTCAC CACCCTCA CCAA (SEQ ID NO: 34)	GAGATAC TGCCACTT ATGCACG (SEQ ID NO: 50)	GCAAATG ATGTCA GCACCAC (SEQ ID NO: 66)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)

[0284] 可用于本文所述的方法中以检测位于SNP位点处的多态性的示例性探针组和引物列于以下表5中。表5中的每个示例性探针组中包含三种探针，两种等位基因特异性探针(其用于进行标记)和一种标签探针。在这些实例中，两种等位基因特异性探针具有在一个或多个核苷酸处不同的同源序列。第一等位基因探针的结构包括正向引物位点等位基因1和同

源性等位基因1;第二等位基因探针的结构包括正向引物位点等位基因2和同源性等位基因2。在实践中,经标记的引物在使用时可以在这两个引物上带有不同的标记(因此标记是等位基因特异性的)。在这些实例中,还存在通用3' 探针,其包括同源区(不具有任何SNP)、标签序列和反向引物位点。还显示了探针(标签、同源序列等)的组成序列。

[0285]

表 5: 示例性探针和引物。

染色体	标记探针 - 等位基因 1 (正向引物 5p 等位基因 1)	标记探针 - 等位基因 2 (正向引物 5p 等位基因 2)	标签探针 (同源物 3p + 标签 + 反向引物)	正向引物 - 等位基因 1	正向引物 - 等位基因 2	同源物 5p - 等位基因 1	同源物 5p - 等位基因 2	同源物 3p	标签	反向引物
chr21	TTCTCTCCACCG AAGGTGCTAG ACGAGTCTAG CTTACTcg (SEQ ID NO: 69)	GGCCTATTGCA AGCCTCTTAG ACGAGTCTAG CTTACTTa (SEQ ID NO: 112)	CACCTGACAAAG TTCTCAGCGCCG AAGTTCTCCGA GGATGCCCTCATT (SEQ ID NO: 155)	TTCTCTCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GGCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	AGACCAG CACAACT TACTcg (SEQ ID NO: 198)	AGACCA GCACAA CTTACTTa (SEQ ID NO: 241)	CACCTG ACAAAG TTCTCA CGC (SEQ ID NO: 284)	GCCGAA GTCTC CGAAG AT (SEQ ID NO: 327)	GCCCTC ATCTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr3	TTCTCTCCACCG AAGGTGCTCC AAATgCACCTG CCcg (SEQ ID NO: 70)	GGCCTATTGCA AGCCTCTTCC AAATgCACCTG CCcg (SEQ ID NO: 113)	CATTAGGGATTAA CGGCTTGGGACA GACTGACGGAGC TTGAGCCCTCATT (SEQ ID NO: 156)	TTCTCTCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GGCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CCAAATgC ACCTGCCg (SEQ ID NO: 199)	CCAAAT CACCTGC Cca (SEQ ID NO: 242)	CATTAG GGATT ACGGCT TGG (SEQ ID NO: 285)	GACAGA CTGACG GAGCTT CA (SEQ ID NO: 328)	GCCCTC ATCTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr13	TTCTCTCCACCG AAGGTGCTAG TTTGACAAAG GCATTTcg (SEQ ID NO: 71)	GGCCTATTGCA AGCCTCTTAG TTTGACAAAG GCATTTTa (SEQ ID NO: 114)	CACAGGTTAAGA AGACTTCTGCTG ACTTGGCCGACA TGATCGCCCTCAT (SEQ ID NO: 157)	TTCTCTCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GGCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	AGTTTGG ACAAAG CaATTTg (SEQ ID NO: 200)	AGTTTGG ACAAAG GCgATTTa (SEQ ID NO: 243)	CACACG TTAAGA AGACTT TCTGC (SEQ ID NO: 286)	TGACTC TGCGC ACATGA TC (SEQ ID NO: 329)	GCCCTC ATCTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr3	TTCTCTCCACCG AAGGTGCTAG AGCTTAGCCAA TAICAAgAAGg (SEQ ID NO: 72)	GGCCTATTGCA AGCCTCTTAG AGCTTAGCCAA TAICAAgAAGg (SEQ ID NO: 115)	CTAAGTGCCCTCC ATGAGAAAGGAT CCGATAGCCCTCT GCAGGCCCTCATC (SEQ ID NO: 158)	TTCTCTCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GGCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	TGAGCTT AGCCAATA TCAAGAA Gg (SEQ ID NO: 201)	TGAGCTT AGCCAAT ATCAAcA AGa (SEQ ID NO: 244)	CTAAGT GCCCTC CATGAG AAAG (SEQ ID NO: 287)	GATCCG ATAGCC CTCTGC AG (SEQ ID NO: 330)	GCCCTC ATCTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr9	TTCTCTCCACCG AAGGTGCTAC GTGAACCTTCC TTGGTAAc (SEQ ID NO: 73)	GGCCTATTGCA AGCCTCTTAG GTGAACCTTCC TTGGTAAc (SEQ ID NO: 116)	GCACAGATTTCCTC ACACTCTCAACA GGCCTGCTAAAC ACCGCCCTCATCT (SEQ ID NO: 159)	TTCTCTCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GGCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	ACGTGAA CTTTCTCT GGTAAc (SEQ ID NO: 202)	ACGTGA ACTTTC TTGGTAAc (SEQ ID NO: 245)	GCACAG ATTTC CACACT CT (SEQ ID NO: 288)	CAACAG GCCCTC TAAACA CC (SEQ ID NO: 331)	GCCCTC ATCTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr3	TTCTCTCCACCG AAGGTGCTAG AAGATGTTCTA ATACCTTGCg (SEQ ID NO: 74)	GGCCTATTGCA AGCCTCTTAG AAGATGTTCTA ATACCTTGCg (SEQ ID NO: 117)	CTTACAGGAGGT CTGGCATCAGGTC AACAAACGAGGG ACTCGCCCTCATC (SEQ ID NO: 160)	TTCTCTCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GGCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	TGAAGAT GTCTTAAT ACCTTGCg (SEQ ID NO: 203)	TGAAGAT GTCTTAAT TACCTTg (SEQ ID NO: 246)	CTTACA GGAGGT CTGGCA TCA (SEQ ID NO: 289)	GGTCAA CAACCG AGGAGC TC (SEQ ID NO: 332)	GCCCTC ATCTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)

[0286]

chr17	TTCCTCCACCG AACGTGTCTCA GTGTGGAGAc GAACg (SEQ ID NO: 75)	GCCTATTGCA AGCCTCTTCA GTGTGGAGAc GAACa (SEQ ID NO: 118)	CCACAATGAGAA GGCAGAGTTGTC ATTAAATGCTGGG GCGCCTCATCTT CTTCCCTGC (SEQ ID NO: 161)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CAGTGTG GAGACGA ACg (SEQ ID NO: 204)	CAGTGTG GAGACg AACa (SEQ ID NO: 247)	CCACAA TGAGAA GGCAGA G (SEQ ID NO: 290)	TTGTCA TTAATG CTGGCG GC (SEQ ID NO: 333)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr16	TTCCTCCACCG AACGTGTCTAG GCAGGTAATG TCATGAAATg (SEQ ID NO: 76)	GCCTATTGCA AGCCTCTTAG GCAGGTAATG TCATGAAATg (SEQ ID NO: 119)	GCTGTGGCATAGC TACACTCCGGTGA CGGTTGCAACTT TGCCCTCATCTC TTCCCTGC (SEQ ID NO: 162)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	AGGCAGG GTAAATGTC ATGAAATg (SEQ ID NO: 205)	AGGCAG GGTAATG TCATGAA gTt (SEQ ID NO: 248)	GCTGTG GCATAG CTACAC TC (SEQ ID NO: 291)	CGGTGA CGGTT GCAACT TT (SEQ ID NO: 334)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr21	TTCCTCCACCG AACGTGTCTGA TTGTCTGGAGc GCTg (SEQ ID NO: 77)	GCCTATTGCA AGCCTCTTGA TTGTCTGGAGg GCTc (SEQ ID NO: 120)	CAGGTAATTTGT GGGTCTGGTCCG GCAGTTAAAGGT CTCGCCCTCATCT TCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 163)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GAITGTCT GGAGcG Tg (SEQ ID NO: 206)	GAITGTCT TGGAGgG CTc (SEQ ID NO: 249)	CAGGGT AATTG TGGGTc TG (SEQ ID NO: 292)	GTCCGG CAGTTA AGGGTC TC (SEQ ID NO: 335)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr2	TTCCTCCACCG AACGTGTCTAG GGAGCAATAGG Ccg (SEQ ID NO: 78)	GCCTATTGCA AGCCTCTTAG GGAGCAATAGG Cta (SEQ ID NO: 121)	GGGTAATCCAGA AAGATAAGANTAC TCACAAACGACT GCGCAGCCCTCAT CTTCTCCCTGC (SEQ ID NO: 164)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	AGGGAGC AATAGGc g (SEQ ID NO: 207)	AGGGAG CAATAGG Cta (SEQ ID NO: 250)	GGGCTA TCCAGA AAGATA AGAA (SEQ ID NO: 293)	TACTCA CAAAAG ACTGCG CA (SEQ ID NO: 336)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr2	TTCCTCCACCG AACGTGTCTCT GCAGGTACA AcACg (SEQ ID NO: 79)	GCCTATTGCA AGCCTCTTCT GCAGGTACA AgACa (SEQ ID NO: 122)	CATAACTGGTGA GTATTCTACTCT ATATGGCCGACTG GAGGGCCCTCATC TTCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 165)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CTGCAGG GTACAcA Cg (SEQ ID NO: 208)	CTGCAG GGTACA AgACa (SEQ ID NO: 251)	CATAAC TGTGG AGTATT TCACT (SEQ ID NO: 294)	CGTATAT GGCCGA CTGGAG G (SEQ ID NO: 337)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr19	TTCCTCCACCG AACGTGTCTCG TAICTGGGAAG AcGGe (SEQ ID NO: 80)	GCCTATTGCA AGCCTCTTCC TAICTGGGAAG ATGg (SEQ ID NO: 123)	CTTCAAGGAAGA AATCAACAGGGT AGGGTTGGCGC GATAAGGGCCCTC ATCTTCTCCCTG C (SEQ ID NO: 166)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CGTATCTG GGAAGAc GGe (SEQ ID NO: 209)	CGTATCT GGGAAG ATGg (SEQ ID NO: 252)	CTTCAA GGAAG AAATTC AACAGG G (SEQ ID NO: 295)	TAGGGT TTGGG CGATAA GG (SEQ ID NO: 338)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr9	TTCCTCCACCG AACGTGTCTCC TGTAATCCCTT GCAATge (SEQ ID NO: 81)	GCCTATTGCA AGCCTCTTCC TGTAATCCCTT GCAATaa (SEQ ID NO: 124)	CATGGATTCAACA CAGCAACACCA AGTCAACACCC GAGACGCCCTCAT CTTCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 167)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CCTGTAAT CCCTTGC AATge (SEQ ID NO: 210)	CCTGTAAT TCCCTTG CAATaa (SEQ ID NO: 253)	CATGGA TTCAAC ACAGCA AACA (SEQ ID NO: 296)	CCAAGT CAACCA CCCGAG AC (SEQ ID NO: 339)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)

[0287]

chr16	TTCTCCACCG AACGTGTCTGG TCTCAGCACGG TcTt (SEQ ID NO: 82)	GGCCTATTGCA AGCCCTCTTGG TCTCAGCACGG TcCt (SEQ ID NO: 125)	CTTGACCTCCIT CACTCTTACACTT CCCTGGCCTTCCCT TCTGCCCTCACTT TCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 168)	TTCTCTCCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GGCTTCA GCACGGT Ct _g (SEQ ID NO: 211)	GGCTTCA GCACGGT cCt (SEQ ID NO: 254)	CTCTGA CCTCCT TCACTC TTAC (SEQ ID NO: 297)	ACTTCC CTGGCC TTCCTT CT (SEQ ID NO: 340)	GCCCTC ATCTTC TTCCTT GC (SEQ ID NO: 33)
chr9	TTCTCCACCG AACGTGTCTGC ACCTCCCTAcC ACAe (SEQ ID NO: 83)	GGCCTATTGCA AGCCCTCTTGG ACCTCCCTACA CAI (SEQ ID NO: 126)	GCTTTCATTGIG CTAAACCTCGCTT GGGTCTCTCCTG AACGCCCTCACTT TCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 169)	TTCTCTCCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GCACCTC CCTACAC Ac (SEQ ID NO: 212)	GCACCTC CCTACA Cat (SEQ ID NO: 255)	GCTTTC ATTGT GCTAAA CCTC (SEQ ID NO: 298)	GCTTGG GTCTC TCCTGA AC (SEQ ID NO: 341)	GCCCTC ATCTTC TTCCTT GC (SEQ ID NO: 33)
chr3	TTCTCCACCG AACGTGTCTGC CTTAGCTAGA GAGAAgC (SEQ ID NO: 84)	GGCCTATTGCA AGCCCTCTTGG CTTAGCTAGA GAGAAgC (SEQ ID NO: 127)	CATCCAGATGCC CTCAACAGTCCG AACCACAATGCT GCCCTCACTTCT TCCCTGC (SEQ ID NO: 170)	TTCTCTCCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GCCTCTA GCTAGAG AGAAgC (SEQ ID NO: 213)	GCCTCTA GCTAGA GAGAAgC (SEQ ID NO: 256)	CACTCC AGATGC CCTCAT (SEQ ID NO: 299)	AACGTC CGAAC ACAATG CT (SEQ ID NO: 342)	GCCCTC ATCTTC TTCCTT GC (SEQ ID NO: 33)
chr20	TTCTCCACCG AACGTGTCTCT GGCAGTCTAGC CgTTAc (SEQ ID NO: 85)	GGCCTATTGCA AGCCCTCTTCT GGCAGTCTAGC CaTTAt (SEQ ID NO: 128)	GTAGAAATCCCA AGGCAATCAGCT CCTCGCACTCAAC AGTCGCCCTCAT CTTCTCCCTGC (SEQ ID NO: 171)	TTCTCTCCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CTGGCAG TCTAGCCg TTAc (SEQ ID NO: 214)	CTGGCA GTCTAGC CaTTAt (SEQ ID NO: 257)	GTAGAA ATCCCA AGGCAA TCAG (SEQ ID NO: 300)	CTCTCT GCATCC AACAGT CG (SEQ ID NO: 343)	GCCCTC ATCTTC TTCCTT GC (SEQ ID NO: 33)
chrX	TTCTCCACCG AACGTGTCTTG TCTTAGAATT GGCAACTgC (SEQ ID NO: 86)	GGCCTATTGCA AGCCCTCTTGG TCTTAGAATT GGCAACTgC (SEQ ID NO: 129)	GAACAATACT CCACAGAACCC CACCCTAGCACTC CTTCTGCCCTCA TCTTCTCCCTGC (SEQ ID NO: 172)	TTCTCTCCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	TGCTTAG AATTGGC AACTgC (SEQ ID NO: 215)	TGCTTA GAATTG GCAACTa Gt (SEQ ID NO: 258)	GAACAA CTAAT CCACAG AACC (SEQ ID NO: 301)	CCACCG TAGCAC TCCTTC TT (SEQ ID NO: 344)	GCCCTC ATCTTC TTCCTT GC (SEQ ID NO: 33)
chr7	TTCTCCACCG AACGTGTCTGC AGGAAAGCCT AcTGAAe (SEQ ID NO: 87)	GGCCTATTGCA AGCCCTCTTGG AGGAAAGCCT ATGAAt (SEQ ID NO: 130)	GTGCAGAGGACA GGAAGAACGGAG CGTCGGTAGTGTA AAGCCCTCACTT CTTCCCTGC (SEQ ID NO: 173)	TTCTCTCCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GCAGGAA AGCCTAcT GAAC (SEQ ID NO: 216)	GCAGGA AAGCCTA tTGAAt (SEQ ID NO: 259)	GTGCAG AGGACA GGAAG AA (SEQ ID NO: 302)	CCACCG GTGGT AGTGTA AA (SEQ ID NO: 345)	GCCCTC ATCTTC TTCCTT GC (SEQ ID NO: 33)
chr3	TTCTCCACCG AACGTGTCTGG GAGCCAGAGA AATgC (SEQ ID NO: 88)	GGCCTATTGCA AGCCCTCTTGG GAGCCAGAGA AATtCt (SEQ ID NO: 131)	GGTGTCAAGA CATACACCTTAAC AATCTGACGAAC CTACCGGCCCTCA TCTTCTCCCTGC (SEQ ID NO: 174)	TTCTCTCCA CCGAACG TGCT (SEQ ID NO: 67)	GCCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GGGAGCC AGAGAA TgTCC (SEQ ID NO: 217)	GGGAGC CAGAGA AATtCt (SEQ ID NO: 260)	GGTGTCT TCAAGA CATACA CCTTA (SEQ ID NO: 303)	CAAACT CGACGA ACCTAC CG (SEQ ID NO: 346)	GCCCTC ATCTTC TTCCTT GC (SEQ ID NO: 33)

[0288]

chr2	TTCCTCCACCG AACGTGCTCTG TCTCCAGTCC ACTTCATgAa (SEQ ID NO: 89)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTG TCTCCAGTCC ACTTCATgAa (SEQ ID NO: 132)	GGAACCTCTGTG ACCTTGGATGGCC CATCTTAATGTG TGGCCCTCATCT CTTCCCTGC (SEQ ID NO: 175)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	TGCTCCA GTTCACAT (SEQ ID NO: 218)	TGTCTCC AGTTCCA CTTCAIg TAa (SEQ ID NO: 261)	GGAACC TCTGTG ACCTTG GA (SEQ ID NO: 304)	TGGCCC ATCCTT ATGTG TG (SEQ ID NO: 347)	GCCCTC ATCTTC TTCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr15	TTCCTCCACCG AACGTGCTCC CGTTAATGCC TAcfeg (SEQ ID NO: 90)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTCC CGTTAATGCC TAflla (SEQ ID NO: 133)	CCCAGTGGTACCT TCTGAAGTCTGT ATTGCTCAAGCCC GCCCTCATCTCT TCCCTGC (SEQ ID NO: 176)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CCCGTTAA TTGCTAc Teg (SEQ ID NO: 219)	CCCGTTA ATGCCT Aflla (SEQ ID NO: 262)	CCCAGT GGTACC TTCTGA A (SEQ ID NO: 305)	GGTGT TATGC TCAAGC CC (SEQ ID NO: 348)	GCCCTC ATCTTC TTCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr15	TTCCTCCACCG AACGTGCTCT CGGTCCACTG GaAAg (SEQ ID NO: 91)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTCT CGGTCCACTG GgAAa (SEQ ID NO: 134)	CTCTGTGTGCTTA TTTGGTAACTTG ATTCTGGCCCTCC CATCGCCCTCATC TTCCTCCCTGC (SEQ ID NO: 177)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CTCGGT CCACTGgA Aag (SEQ ID NO: 220)	CTCGGT CCACTGG gAAa (SEQ ID NO: 263)	CTCTGT TTGCTT ATTGG GTAAAC (SEQ ID NO: 306)	TTGAT CTGGC CTCCCA TC (SEQ ID NO: 349)	GCCCTC ATCTTC TTCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr2	TTCCTCCACCG AACGTGCTAC ACCAATGATC AGTTACg (SEQ ID NO: 92)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTAC ACCAATGATC AGTTACa (SEQ ID NO: 135)	CCCCTGGATGCC TCCCTACAGCCGG CTAATTAGGTGCC CTCATCTCTTCC CTGC (SEQ ID NO: 178)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	ACACCCA TGATTCAG TTACg (SEQ ID NO: 221)	ACACCCA TGATTCa GTACa (SEQ ID NO: 264)	CCCAC GGAAGC CTCC (SEQ ID NO: 307)	CTCACG CCGGT ATTAG GT (SEQ ID NO: 350)	GCCCTC ATCTTC TTCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr9	TTCCTCCACCG AACGTGCTGC TAGATGAACA TCACAgGe (SEQ ID NO: 93)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTGC TAGATGAACA TCACAGt (SEQ ID NO: 136)	CGGAGAGACGCA TCTGAAAGTCTG GGTAGGTGAGG ACGCCCTCATCT CTTCCCTGC (SEQ ID NO: 179)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GCTAGTAT GAACATC ACAGGe (SEQ ID NO: 222)	GCTAGT TGAAAT CACAGt (SEQ ID NO: 265)	CGGAGA GACGCA TCTGAA (SEQ ID NO: 308)	AGTCTG GGTAGG TGGAGG AC (SEQ ID NO: 351)	GCCCTC ATCTTC TTCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr7	TTCCTCCACCG AACGTGCTAC AAATGAGTAAG AAGCGAGTcg (SEQ ID NO: 94)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTAC AAATGAGTAAG AAGCGAGTla (SEQ ID NO: 137)	CAGGATTCAGC TTACAGGGCGAC TGAGCCACATCCA ACTGCCCTCATCT TCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 180)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	ACAAATG AGTAAGA AGCGAGTc g (SEQ ID NO: 223)	ACAAATG AGTAAG AAGCGA GTla (SEQ ID NO: 266)	CAGGAT TTCCAG CTTACA GGG (SEQ ID NO: 309)	CGACTG AGCCAC ATCCAA CT (SEQ ID NO: 352)	GCCCTC ATCTTC TTCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr20	TTCCTCCACCG AACGTGCTGA TAAGGGTGTCT CTgCg (SEQ ID NO: 95)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTGA TAAGGGTGTCT CTaCa (SEQ ID NO: 138)	CTTGCAAGATGTG CCTCTTAGAGCCT CAGCCGGAATG AAGCCCTCATCT CTTCCCTGC (SEQ ID NO: 181)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GATAAGG GTTGTCT gCg (SEQ ID NO: 224)	GATAAGG GTTGTCT TaCa (SEQ ID NO: 267)	CTTGCA AGATGT GCCTCT TA (SEQ ID NO: 310)	GAGCCT CAGCCG GAATGT AA (SEQ ID NO: 353)	GCCCTC ATCTTC TTCCT GC (SEQ ID NO: 33)

[0289]

chr20	TTCCTCCACCG AACGTGCTCC ATGCACAGCT ACcc (SEQ ID NO: 96)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTCC ATGCACAGCT ACta (SEQ ID NO: 139)	GGTGTTCTCTCT AAACACAAATG CCATTCTGCACCA ATGCGCCTCATC TTCCTCCCTGC (SEQ ID NO: 182)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTTAIT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CCATGCA CCAGCTA Ccc (SEQ ID NO: 225)	CCATGCA CCAGCTA Cta (SEQ ID NO: 268)	GGTGG TTTCTC TAAACA CAAA (SEQ ID NO: 311)	TTGCCA TTCTGC ACCAAT GC (SEQ ID NO: 354)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr1	TTCCTCCACCG AACGTGCTAA CTGTACCCTAC TCCCAge (SEQ ID NO: 97)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTAA CTGTACCCTAC TCCCAat (SEQ ID NO: 140)	GCAGGGTATTGA GAGAAAGGATCTAT TGGTGTTCGGGC TGATGCCCTCATC TTCCTCCCTGC (SEQ ID NO: 183)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTTAIT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	AACGTGA CCCTACTC CCAge (SEQ ID NO: 226)	AACGTGA CCCTACT CCCAat (SEQ ID NO: 269)	GCAGGG TATTGA GAGAA GGATC (SEQ ID NO: 312)	TATTGG TGTTCG CGGCTG AT (SEQ ID NO: 355)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr2	TTCCTCCACCG AACGTGCTAG GACCAAGGGA CCAGTTAg (SEQ ID NO: 98)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTAG GACCAAGGGA CCAGTTAc (SEQ ID NO: 141)	GTGCACATTTCTT GATGAAGGGATG GGCGTAAACAGGA GGACTGCCCTCAT CTTCTCCCTGC (SEQ ID NO: 184)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTTAIT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	AGGACCA AGGACG AGTTAg (SEQ ID NO: 227)	AGGACC AAGGA CCAGTTc Ac (SEQ ID NO: 270)	GTGCAC ATTCTT TGATGA AGGG (SEQ ID NO: 313)	ATGGGC GTAACA GGAGG ACT (SEQ ID NO: 356)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr7	TTCCTCCACCG AACGTGCTAG AGTTCTCCAA GAAATTGcg (SEQ ID NO: 99)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTAG AGTTCTCCAA GAAATTGta (SEQ ID NO: 142)	GAGCAATGGCTGT TTCATGAGAGGAA TGGCTACCTGCA TCAGCCCTCATCT TCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 185)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTTAIT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	AGAGTTC CTCCAAG AAATTGcg (SEQ ID NO: 228)	AGAGTTC CTCCAAG AAATTGta (SEQ ID NO: 271)	GAGCAA TGCCTG TTTCAI GAGA (SEQ ID NO: 314)	GGAAATG GCCTAC CTGCAT CA (SEQ ID NO: 357)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr5	TTCCTCCACCG AACGTGCTAC ATTATACAGCAT GCTGGeTatc (SEQ ID NO: 100)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTAC ATTATACAGCAT GCTGGeTAg (SEQ ID NO: 143)	GTTAACATATATAC AGCATGGTGGCC CCGTTGTGTCTAT CGCATCGCCCTCA TCTTCTCCCTGC (SEQ ID NO: 186)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTTAIT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	ACATTATA CAGCATG CTGGeTatc (SEQ ID NO: 229)	ACATTAT ACAGCAT GCTGGT Aga (SEQ ID NO: 272)	GTTAAC ATTATAC AGCATG GTGGC (SEQ ID NO: 315)	CCCGTT GTTGTC ATCGCA TC (SEQ ID NO: 358)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr2	TTCCTCCACCG AACGTGCTGA GGAAGAAAGT GAGgTTTGe (SEQ ID NO: 101)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTGA GGAAGAAAGT GAGaTTTgt (SEQ ID NO: 144)	GCAGAACATGTGTC CTGAAGCGTTCGA TGCCTCCCATGAG TGCCCTCATCTTC TTCCTGC (SEQ ID NO: 187)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTTAIT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GAGGAAG AAAGTGA GgTTTGe (SEQ ID NO: 230)	GAGGA GAAAGT GAGaTTT Gt (SEQ ID NO: 273)	GCAGAA CATGTC CTGAAG C (SEQ ID NO: 316)	GTTCGA TGCCTC CCAATG GT (SEQ ID NO: 359)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr15	TTCCTCCACCG AACGTGCTCT GAATTATGTC TTACCAaGAGe (SEQ ID NO: 102)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTCT GAATTATGTC TTACCAaGAGt (SEQ ID NO: 145)	CAGCTGTTCCTCA AACCCATCAACCC GCGTAGATGTTCC TGCCCTCATCTTC TTCCCTGC (SEQ ID NO: 188)	TTCCTCCA CCGAACG TGCTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTTAIT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CTGAATTA TGTGCTTA CCAAaGAGe (SEQ ID NO: 231)	CTGAAT ATGTGT TACCAG AGt (SEQ ID NO: 274)	CAGCTT GTTCCT AAACCC AT (SEQ ID NO: 317)	CAACCC GCGTAG ATGTTT CT (SEQ ID NO: 360)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr9	TTCCTCCACCG	GCCCTATTGCA	CAAAGTGTGGAA	TTCCTCCA	GCCTTAIT	TGGGTCTCT	TGGGTCTC	CAAAGT	GCCAGC	GCCCTC

[0290]

	AACGTTCTTG GGTTCTGATAA CCTTAICAAGc (SEQ ID NO: 103)	AGCCCTCTTTG GGTTCTGATAA CCTTAICAAGc (SEQ ID NO: 146)	GTTGCTTCCGCCA GCTCAAGAGTGT AGCCGCCCTCAIC (SEQ ID NO: 189)	CCGAACG TGTTCT (SEQ ID NO: 67)	GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GATAACCT TATCAAGc (SEQ ID NO: 232)	TGATAAC CTTAICA Act (SEQ ID NO: 275)	GTGGAA GTTGCT TCC (SEQ ID NO: 318)	TCAAGA GTGTAG CC (SEQ ID NO: 361)	ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr2	TTCTCCACCG AACGTTCTTG TTAGTCAAAc TGcTGe (SEQ ID NO: 104)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTG TTAGTCAAAc TGcTGe (SEQ ID NO: 147)	GGTCGACTTTGTC CATCTTCTTG CTTGCGGAGTGT CCCTCACTTCTT CCCTGC (SEQ ID NO: 190)	TTCTCCA CCGAACG TGTTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GGTTAGT CAAACAT GcTGe (SEQ ID NO: 233)	GGTTAGT CAAACAT GcTGe (SEQ ID NO: 276)	GGTCGA CTTTGT CCAACC (SEQ ID NO: 319)	TTCTG ATCTTG ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 362)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr17	TTCTCCACCG AACGTTCTGA CACTGGCAGAA TCAAAICAc (SEQ ID NO: 105)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTG CACTGGCAGAA TCAAAICAc (SEQ ID NO: 148)	CTCTGTGCTGT GGACTCATGCA GGCGTTCCCTATA CGCCCTCACTTTC TTCCCTGC (SEQ ID NO: 191)	TTCTCCA CCGAACG TGTTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GACACTG GCAGAA CAAACAc (SEQ ID NO: 234)	GACACT GGCAGA ATCAAAc CAa (SEQ ID NO: 277)	CTCTGT TGCTG TGGACT C (SEQ ID NO: 320)	ATCGCA GGCGT CCCTAT AC (SEQ ID NO: 363)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr6	TTCTCCACCG AACGTTCTAG AGTTACACCTT TAGCTAACcAc (SEQ ID NO: 106)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTG AGTTACACCTT TAGCTAACcAc (SEQ ID NO: 149)	CTAACTAGAAITA GTCTGCTGCTA TTGGACCTCCGAC CACGAGCCCTCAT CTTCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 192)	TTCTCCA CCGAACG TGTTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	AGAGTTA CACCTTA GCTAACcA c (SEQ ID NO: 235)	AGAGTTA CACCTTA AGCTAAC aG (SEQ ID NO: 278)	CTAACT AGAAIT AGTCTG CCTGCC (SEQ ID NO: 321)	TATGG ACCTCC GACCAC GA (SEQ ID NO: 364)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr7	TTCTCCACCG AACGTTCTCC AGGAGTTCAA GaAGCg (SEQ ID NO: 107)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTG AGGAGTTCAA GgAGCg (SEQ ID NO: 150)	GTGAGCCATAATC GTGTAAGCCAC CAITTAGAICCGC GGCCCTCACTTTC TTCCCTGC (SEQ ID NO: 193)	TTCTCCA CCGAACG TGTTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	CCAGGAG TTCAGAA GCg (SEQ ID NO: 236)	CCAGGA GTTCAAG gAGCg (SEQ ID NO: 279)	GTGAGC CATAAT CGTGT A (SEQ ID NO: 322)	AGCAC CATTA GATCCG CG (SEQ ID NO: 365)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr4	TTCTCCACCG AACGTTCTAC CACTCCTTCT CCCaTCTc (SEQ ID NO: 108)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTG CACTCCTTCT CCCaTCTc (SEQ ID NO: 151)	GAGAATTAATGCT CCCTCTCTGGAC CAGTAGAAGTCT GCCCGCCCTCAT CTTCTTCCCTGC (SEQ ID NO: 194)	TTCTCCA CCGAACG TGTTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	ACCACTC CTTCTCTC CaTCTc (SEQ ID NO: 237)	ACCACTC CTTCTCTC CCgTCTc (SEQ ID NO: 280)	GAGAAT TAATG TCCCTC TCCTG (SEQ ID NO: 323)	GACCAG TAGAAG TCTGCC CG (SEQ ID NO: 366)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr2	TTCTCCACCG AACGTTCTGT CTTAIGGACA ATGGTATAG (SEQ ID NO: 109)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTG CTTAIGGACA ATGGTATAG (SEQ ID NO: 152)	GTGGTCTGTGT GACCAATTCAGA ATGGCGAGTGT GCCCTCACTTCT TCCCTGC (SEQ ID NO: 195)	TTCTCCA CCGAACG TGTTCT (SEQ ID NO: 67)	GCCTATT GCAAGCCC TCTT (SEQ ID NO: 68)	GTCTTATG GGACAAT GGHGAIA g (SEQ ID NO: 238)	GTCTTAT GGACA ATGGTc ATAI (SEQ ID NO: 281)	GTGGT TGCTGT TGACCA A (SEQ ID NO: 324)	TTTCAG AATGGC CGAGCT GT (SEQ ID NO: 367)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr17	TTCTCCACCG AACGTTCTCT	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTCT	GGTGGCACTGCT GAICTAATAGTGA	TTCTCCA CCGAACG	GCCTATT GCAAGCCC	CTACCTC AACCTCg	CTACCT CAACCT	GGTTC AACTGC	AGGTGA CCTTCT	GCCCTC ATCTTC

[0291]

	ACCC'TCAAGCC TC _g Te (SEQ ID NO: 110)	ACCCTCAAGCC TCaTt (SEQ ID NO: 153)	CCTTCCTTGACGC CGCCCTCATCTTC TTCCCTGC (SEQ ID NO: 196)	TGTCT (SEQ NO: 67)	ID	TCCTT (SEQ ID NO: 68)	Tc (SEQ ID NO: 239)	CaTt (SEQ ID NO: 282)	TGATCT AT (SEQ ID NO: 325)	TGTACG CC (SEQ ID NO: 368)	TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)
chr7	TTCC'TCCACCG AACGTGTCTCC AAGACTGATCA TGC _{cg} (SEQ ID NO: 111)	GCCCTATTGCA AGCCCTCTTCC AAGACTGAICA TGC _{ta} (SEQ ID NO: 154)	CCTTCCAGTCAA GGCAGGGCGGT CCTTATTCCAIC GCCCTCATCTTCT TCCCTGC (SEQ ID NO: 197)	TTCCCTCA CCGAACG TGCT (SEQ NO: 67)	ID	GCCCTATT GCAAGCCC TCCTT (SEQ ID NO: 68)	CCAAGAC TGATCATG Ccg (SEQ ID NO: 240)	CCAAGA CTGATCA TGCT _a (SEQ ID NO: 283)	CTTTC CAGTCA AGGCAG (SEQ ID NO: 326)	GGCGCG TCCTTA TTTCCA TC (SEQ ID NO: 369)	GCCCTC ATCTTC TTCCCT GC (SEQ ID NO: 33)

[0292] 实施例

[0293] 以下操作规程描述了通过杂交-连接、纯化、扩增、微阵列靶标制备、微阵列杂交和

微阵列洗涤对至多24个无细胞DNA样品进行的处理。

[0294] 制备或获得以下材料：在20μL体积的水中的无细胞DNA (cfDNA)；探针混合物：各自浓度为2nM的所有标签和标记探针寡核苷酸的混合物；Taq连接酶 (40U/μL)；磁珠：MyOne抗生蛋白链菌素C1 Dynabeads；珠结合和洗涤缓冲液，1X和2X浓度；正向扩增引物，带有5' 磷酸修饰；反向扩增引物，带标记；AmpliTaq Gold酶 (5U/μL)；dNTP混合物；λ核酸外切酶 (5U/μL)；杂交缓冲液，1.25X；杂交对照寡核苷酸；微阵列洗涤缓冲液A；微阵列洗涤缓冲液B；微阵列洗涤缓冲液C

[0295] 杂交-连接反应：将cfDNA样品 (20μL) 添加至96孔反应板的A3-H3孔中。向各cfDNA样品添加以下试剂，总反应体积为50μL，并且通过上下吹吸5-8次而混合。

成分	体积
H ₂ O	19.33μL
探针混合物	5μL
10X Taq连接酶缓冲液	5μL
Taq连接酶	0.67μL

[0297] 将板放置在热循环仪中，并且使用以下循环策略进行连接：(i) 95℃下5分钟；(ii) 95℃下30秒；(iii) 45℃下25分钟；(iv) 重复步骤b-c 4次；和(v) 保持4℃。

[0298] 杂交-连接产物纯化：

[0299] 洗涤Dynabeads：将一小瓶Dynabeads以最高速设置涡旋混合30秒。将260μL的珠转移至1.5mL管中。将900μL的2X珠结合和洗涤缓冲液以及混合珠通过上下吹吸5-8次而混合。将管放置在磁力支架上1分钟，弃去上清液。从磁力支架取出管并通过上下吹吸5-8次将经洗涤的磁珠再悬浮在900μL的2X珠结合和洗涤缓冲液中。将管放置在磁力支架上1分钟，弃去上清液。从磁力支架取出管，添加1,230μL的2X珠结合和洗涤缓冲液。通过上下吹吸5-8次将所述珠再悬浮。

[0300] 固定HL产物：将50μL经洗涤的珠转移至96孔反应板中的各杂交-连接反应产物中，并通过上下吹吸8次而混合，在室温温育15分钟，在温育时间过程中在板形磁体上混合2次。将所述珠在板形磁体上分离3分钟，然后除去并弃去上清液。从板形磁体取下所述板，添加200μL 1X珠结合和洗涤缓冲液，并通过上下吹吸5-8次将珠再悬浮。将所述板放置在板形磁体上1分钟，弃去上清液。从板形磁体取下所述板，添加180μL 1X SSC，并通过上下吹吸5-8次将所述珠再悬浮。将所述板放置在板形磁体上1分钟，弃去上清液。

[0301] 纯化杂交-连接产物：将50μL新制备的0.15M NaOH添加至各孔，通过上下吹吸5-8次将所述珠再悬浮，并且在室温温育10分钟。将所述板放置在板形磁体上2分钟，然后取下，弃去上清液。从板形磁体上取下所述板，添加200μL新制备的0.1M NaOH，通过上下吹吸5-8次将所述珠再悬浮。将所述板放置在板形磁体上1分钟，弃去上清液。从板形磁体上取下所述板，添加180μL 0.1M NaOH，通过上下吹吸5-8次将所述珠再悬浮。将所述板放置在板形磁体上1分钟，弃去上清液。从板形磁体上取下所述板，添加200μL的1X结合和洗涤缓冲液，通过上下吹吸5-8次将所述珠再悬浮。将所述板放置在板形磁体上1分钟，弃去上清液。从板形磁体上取下所述板，添加180μL TE，通过上下吹吸5-8次将所述珠再悬浮。将所述板放置在板形磁体上1分钟，弃去上清液。向各孔添加20μL水，通过上下吹吸5-8次将所述珠再悬浮。将所述板密封，并贮存在4℃直到用于随后的步骤中。

[0302] 扩增:向96孔反应板中的每个杂交-连接反应产物中添加以下试剂,总反应体积50 μL 。

[0303]	成分	体积
	H ₂ O	17.25 μL
	正向引物10 μM	2.5 μL
	反向引物10 μM	2.5 μL
	4mM dNTP混合物(L/N 052114)	2.5 μL
	10X AmpliTaq Gold缓冲液	5 μL
	AmpliTaq Gold酶	0.25 μL

[0304] 将板放置在热循环仪中,并且使用以下循环策略连接探针:(i) 95 $^{\circ}\text{C}$ 下5分钟;(ii) 95 $^{\circ}\text{C}$ 下30秒;(iii) 45 $^{\circ}\text{C}$ 下25分钟;(iv) 重复步骤b-c 4次;和(v) 保持4 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0305] 杂交-连接产物纯化:通过上下吹吸5-8次使试剂混合。将板放置在热循环仪中,并且使用以下循环策略来扩增探针:(i) 95 $^{\circ}\text{C}$ 下5分钟;(ii) 95 $^{\circ}\text{C}$ 下30秒;(iii) 54 $^{\circ}\text{C}$ 下30秒;(iv) 72 $^{\circ}\text{C}$ 下60秒,(v) 重复步骤b-d29次;(vi) 72 $^{\circ}\text{C}$ 下5分钟;(vii) 重复步骤b-c4次;并且(v) 保持4 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0306] 微阵列靶标制备(单链消化):向96孔反应板中的各经扩增的反应产物中添加以下试剂,总反应体积60 μL 。

[0307]	成分	体积
	H ₂ O	3 μL
	10X λ 核酸外切酶缓冲液	6 μL
	λ 核酸外切酶	1 μL

[0308] 通过上下吹吸5-8次使试剂混合。将板放置在热循环仪中,并且使用以下循环策略消化探针:(i) 37 $^{\circ}\text{C}$ 下60分钟;(ii) 80 $^{\circ}\text{C}$ 下30分钟;(iii) 保持4 $^{\circ}\text{C}$ 。将板放置在Speed-vac中,使用中等热设置将样品干燥约60分钟或者直到所有液体已经蒸发。将样品在黑暗中贮存在4 $^{\circ}\text{C}$,直到用于随后的步骤。

[0309] 微阵列杂交:向96孔反应板中的各经干燥的微阵列靶标添加以下试剂,总反应体积20 μL 。

[0310]	成分	体积
	H ₂ O	3 μL
	1.25X杂交缓冲液	16 μL
	杂交对照寡核苷酸	1 μL

[0311] 通过上下吹吸10-20次使试剂混合以将其再悬浮,并短暂地旋转以使内含物到达板孔的底部。将板放置在热循环仪中,并且使用以下循环策略使探针变性:(i) 70 $^{\circ}\text{C}$ 下3分钟;(ii) 保持42 $^{\circ}\text{C}$ 。在跟踪页(Tracking Sheet)中针对各样品记录待使用的微阵列条形码。制备杂交室,该杂交室含有用于待处理的每个微阵列的Lifter Slip。对于每个样品,向杂交室中的Lifter Slip的中心添加15 μL 微阵列靶标,然后通过将上边缘向下放在Lifter Slip上并使其缓慢落下变平而立即将合适的微阵列放置在靶流体上。关闭杂交室,在42 $^{\circ}\text{C}$ 将其温育60分钟。打开杂交室,从Lifter Slip取出各微阵列并放入浸没在微阵列洗涤缓冲

液A中的支架中。一旦所有微阵列位于支架中,以650rpm将支架搅拌5分钟。从微阵列洗涤缓冲液A中取出微阵列的支架,在干净的擦拭布(room wipe)上吸掉过量液体,将支架快速地置于微阵列洗涤缓冲液B中。以650rpm将支架搅拌5分钟。从微阵列洗涤缓冲液B中取出微阵列的支架,在干净的擦拭布上吸掉过量液体,将支架快速地置于微阵列洗涤缓冲液C中。以650rpm将支架搅拌5分钟。在微阵列洗涤缓冲液C中洗涤5分钟完成后,立即从该缓冲液中缓慢地取出微阵列的支架。这花费5-10秒以使洗涤缓冲液从盖玻片表面的展开最大化。在干净的擦拭布上吸掉过量液体。使用真空抽吸器除去存在于各微阵列任一表面上的任何残留的缓冲液液滴。将微阵列贮存在处于氮气下于黑暗中的载玻片支架中,直到分析所述微阵列。

- [0001] <110> 卓异生物公司
- [0002] <120> 用于单分子检测的检验测量测定及其应用
- [0003] <130> 3197-1901352D1
- [0004] <150> US 61/867,554
- [0005] <151> 2013-08-19
- [0006] <150> US 61/867,559
- [0007] <151> 2013-08-19
- [0008] <160> 369
- [0009] <170> PatentIn version 3.5
- [0010] <210> 1
- [0011] <211> 60
- [0012] <212> DNA
- [0013] <213> 人工序列
- [0014] <220>
- [0015] <223> 合成序列
- [0016] <400> 1
- [0017] gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa ggaagaagtg agggcttctc 60
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 60
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <220>
- [0023] <223> 合成序列
- [0024] <400> 2
- [0025] gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa aaatcaaggt gaccagctcc 60
- [0026] <210> 3
- [0027] <211> 62
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工序列
- [0030] <220>
- [0031] <223> 合成序列
- [0032] <400> 3
- [0033] gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa tcatctgcca agacagaagt 60
- [0034] tc 62
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 60
- [0037] <212> DNA
- [0038] <213> 人工序列

[0039]	<220>
[0040]	<223> 合成序列
[0041]	<400> 4
[0042]	gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa gcaggagagt caaaggtctg 60
[0043]	<210> 5
[0044]	<211> 60
[0045]	<212> DNA
[0046]	<213> 人工序列
[0047]	<220>
[0048]	<223> 合成序列
[0049]	<400> 5
[0050]	gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa gttgcatgg agattgttg 60
[0051]	<210> 6
[0052]	<211> 60
[0053]	<212> DNA
[0054]	<213> 人工序列
[0055]	<220>
[0056]	<223> 合成序列
[0057]	<400> 6
[0058]	gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa cagctcagtg atgtcattgc 60
[0059]	<210> 7
[0060]	<211> 61
[0061]	<212> DNA
[0062]	<213> 人工序列
[0063]	<220>
[0064]	<223> 合成序列
[0065]	<400> 7
[0066]	gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa ccttgacctc tgctaattgtg 60
[0067]	g 61
[0068]	<210> 8
[0069]	<211> 60
[0070]	<212> DNA
[0071]	<213> 人工序列
[0072]	<220>
[0073]	<223> 合成序列
[0074]	<400> 8
[0075]	gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa cacctgtcca acagctacag 60
[0076]	<210> 9
[0077]	<211> 61

[0078] <212> DNA
[0079] <213> 人工序列
[0080] <220>
[0081] <223> 合成序列
[0082] <400> 9
[0083] gccctcatct tcttcctgc gttctacca ccctaccaa agaatgtatc ttcaggcctg 60
[0084] c 61
[0085] <210> 10
[0086] <211> 60
[0087] <212> DNA
[0088] <213> 人工序列
[0089] <220>
[0090] <223> 合成序列
[0091] <400> 10
[0092] gccctcatct tcttcctgc gttctacca ccctaccaa aagtaatcac tctgggtggc 60
[0093] <210> 11
[0094] <211> 60
[0095] <212> DNA
[0096] <213> 人工序列
[0097] <220>
[0098] <223> 合成序列
[0099] <400> 11
[0100] gccctcatct tcttcctgc gttctacca ccctaccaa agctcacaga caaccttgtg 60
[0101] <210> 12
[0102] <211> 60
[0103] <212> DNA
[0104] <213> 人工序列
[0105] <220>
[0106] <223> 合成序列
[0107] <400> 12
[0108] gccctcatct tcttcctgc gttctacca ccctaccaa gcaatagaca cctacaggcg 60
[0109] <210> 13
[0110] <211> 60
[0111] <212> DNA
[0112] <213> 人工序列
[0113] <220>
[0114] <223> 合成序列
[0115] <400> 13
[0116] gccctcatct tcttcctgc gttctacca ccctaccaa gcacattatc aaaggccacg 60

[0117]	<210> 14
[0118]	<211> 60
[0119]	<212> DNA
[0120]	<213> 人工序列
[0121]	<220>
[0122]	<223> 合成序列
[0123]	<400> 14
[0124]	gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa caacgaccta aagcatgtgc 60
[0125]	<210> 15
[0126]	<211> 60
[0127]	<212> DNA
[0128]	<213> 人工序列
[0129]	<220>
[0130]	<223> 合成序列
[0131]	<400> 15
[0132]	gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa gacatacatg gctttggcag 60
[0133]	<210> 16
[0134]	<211> 62
[0135]	<212> DNA
[0136]	<213> 人工序列
[0137]	<220>
[0138]	<223> 合成序列
[0139]	<400> 16
[0140]	gccctcatct tcttcctgc gttctcacca ccctcaccaa gagatactgc cacttatgca 60
[0141]	cg 62
[0142]	<210> 17
[0143]	<211> 40
[0144]	<212> DNA
[0145]	<213> 人工序列
[0146]	<220>
[0147]	<223> 合成序列
[0148]	<400> 17
[0149]	cgtgctaata gtctcagggc ttctccacc gaacgtgtct 40
[0150]	<210> 18
[0151]	<211> 40
[0152]	<212> DNA
[0153]	<213> 人工序列
[0154]	<220>
[0155]	<223> 合成序列

- [0156] <400> 18
[0157] cgacgcttca ttgcttcatt ttcctccacc gaacgtgtct 40
[0158] <210> 19
[0159] <211> 40
[0160] <212> DNA
[0161] <213> 人工序列
[0162] <220>
[0163] <223> 合成序列
[0164] <400> 19
[0165] cttgcgcaa acaattgtcc ttcctccacc gaacgtgtct 40
[0166] <210> 20
[0167] <211> 40
[0168] <212> DNA
[0169] <213> 人工序列
[0170] <220>
[0171] <223> 合成序列
[0172] <400> 20
[0173] gctgcagagt ttgcattcat ttcctccacc gaacgtgtct 40
[0174] <210> 21
[0175] <211> 41
[0176] <212> DNA
[0177] <213> 人工序列
[0178] <220>
[0179] <223> 合成序列
[0180] <400> 21
[0181] catacacaca gaccgagagt cttcctccac cgaacgtgtc t 41
[0182] <210> 22
[0183] <211> 40
[0184] <212> DNA
[0185] <213> 人工序列
[0186] <220>
[0187] <223> 合成序列
[0188] <400> 22
[0189] ggatgtcage cagcataagt ttcctccacc gaacgtgtct 40
[0190] <210> 23
[0191] <211> 40
[0192] <212> DNA
[0193] <213> 人工序列
[0194] <220>

[0195] <223> 合成序列
[0196] <400> 23
[0197] gcaagtgcc aacagttctc ttcctccacc gaacgtgtct 40
[0198] <210> 24
[0199] <211> 41
[0200] <212> DNA
[0201] <213> 人工序列
[0202] <220>
[0203] <223> 合成序列
[0204] <400> 24
[0205] gattccagca cacttgagtc tttcctccac cgaacgtgtc t 41
[0206] <210> 25
[0207] <211> 40
[0208] <212> DNA
[0209] <213> 人工序列
[0210] <220>
[0211] <223> 合成序列
[0212] <400> 25
[0213] ccgttgccagg tttaaattggc gccctattgc aagccctctt 40
[0214] <210> 26
[0215] <211> 40
[0216] <212> DNA
[0217] <213> 人工序列
[0218] <220>
[0219] <223> 合成序列
[0220] <400> 26
[0221] caagagtgc tttatgggcct gccctattgc aagccctctt 40
[0222] <210> 27
[0223] <211> 41
[0224] <212> DNA
[0225] <213> 人工序列
[0226] <220>
[0227] <223> 合成序列
[0228] <400> 27
[0229] gcactcaagg agatcagact ggccctattg caagccctct t 41
[0230] <210> 28
[0231] <211> 41
[0232] <212> DNA
[0233] <213> 人工序列

[0234]	<220>
[0235]	<223> 合成序列
[0236]	<400> 28
[0237]	ggctatcgaa ctacaaccac agccctattg caagccctct t 41
[0238]	<210> 29
[0239]	<211> 41
[0240]	<212> DNA
[0241]	<213> 人工序列
[0242]	<220>
[0243]	<223> 合成序列
[0244]	<400> 29
[0245]	gtagctgtct gtggtgtgat cgccctattg caagccctct t 41
[0246]	<210> 30
[0247]	<211> 42
[0248]	<212> DNA
[0249]	<213> 人工序列
[0250]	<220>
[0251]	<223> 合成序列
[0252]	<400> 30
[0253]	caagaaactt cgagccttag cagccctatt gcaagccctc tt 42
[0254]	<210> 31
[0255]	<211> 40
[0256]	<212> DNA
[0257]	<213> 人工序列
[0258]	<220>
[0259]	<223> 合成序列
[0260]	<400> 31
[0261]	gtgaaccagt ccgagtgaaa gccctattgc aagccctctt 40
[0262]	<210> 32
[0263]	<211> 41
[0264]	<212> DNA
[0265]	<213> 人工序列
[0266]	<220>
[0267]	<223> 合成序列
[0268]	<400> 32
[0269]	gcaaatgatg ttcagcacca cgccctattg caagccctct t 41
[0270]	<210> 33
[0271]	<211> 20
[0272]	<212> DNA

[0273] <213> 人工序列
[0274] <220>
[0275] <223> 合成序列
[0276] <400> 33
[0277] gccctcatct tcttcctgc 20
[0278] <210> 34
[0279] <211> 20
[0280] <212> DNA
[0281] <213> 人工序列
[0282] <220>
[0283] <223> 合成序列
[0284] <400> 34
[0285] gttctcacca ccctcaccaa 20
[0286] <210> 35
[0287] <211> 20
[0288] <212> DNA
[0289] <213> 人工序列
[0290] <220>
[0291] <223> 合成序列
[0292] <400> 35
[0293] ggaagaagtg agggcttctc 20
[0294] <210> 36
[0295] <211> 20
[0296] <212> DNA
[0297] <213> 人工序列
[0298] <220>
[0299] <223> 合成序列
[0300] <400> 36
[0301] aaatcaaggt gaccagctcc 20
[0302] <210> 37
[0303] <211> 22
[0304] <212> DNA
[0305] <213> 人工序列
[0306] <220>
[0307] <223> 合成序列
[0308] <400> 37
[0309] tcatttgcca agacagaagt tc 22
[0310] <210> 38
[0311] <211> 20

[0312]	<212> DNA
[0313]	<213> 人工序列
[0314]	<220>
[0315]	<223> 合成序列
[0316]	<400> 38
[0317]	gcaggagagt caaaggtctg 20
[0318]	<210> 39
[0319]	<211> 20
[0320]	<212> DNA
[0321]	<213> 人工序列
[0322]	<220>
[0323]	<223> 合成序列
[0324]	<400> 39
[0325]	gttgccatgg agattgttgc 20
[0326]	<210> 40
[0327]	<211> 20
[0328]	<212> DNA
[0329]	<213> 人工序列
[0330]	<220>
[0331]	<223> 合成序列
[0332]	<400> 40
[0333]	cagctcagtg atgtcattgc 20
[0334]	<210> 41
[0335]	<211> 21
[0336]	<212> DNA
[0337]	<213> 人工序列
[0338]	<220>
[0339]	<223> 合成序列
[0340]	<400> 41
[0341]	ccttgacctc tgctaattgtg g 21
[0342]	<210> 42
[0343]	<211> 20
[0344]	<212> DNA
[0345]	<213> 人工序列
[0346]	<220>
[0347]	<223> 合成序列
[0348]	<400> 42
[0349]	cacctgtcca acagctacag 20
[0350]	<210> 43

[0351] <211> 21
[0352] <212> DNA
[0353] <213> 人工序列
[0354] <220>
[0355] <223> 合成序列
[0356] <400> 43
[0357] agaatgtatc ttcaggcctg c 21
[0358] <210> 44
[0359] <211> 20
[0360] <212> DNA
[0361] <213> 人工序列
[0362] <220>
[0363] <223> 合成序列
[0364] <400> 44
[0365] aagtaatcac tctgggtggc 20
[0366] <210> 45
[0367] <211> 20
[0368] <212> DNA
[0369] <213> 人工序列
[0370] <220>
[0371] <223> 合成序列
[0372] <400> 45
[0373] agctcacaga caaccttggtg 20
[0374] <210> 46
[0375] <211> 20
[0376] <212> DNA
[0377] <213> 人工序列
[0378] <220>
[0379] <223> 合成序列
[0380] <400> 46
[0381] gcaatagaca cctacaggcg 20
[0382] <210> 47
[0383] <211> 20
[0384] <212> DNA
[0385] <213> 人工序列
[0386] <220>
[0387] <223> 合成序列
[0388] <400> 47
[0389] gcacattatc aaaggccacg 20

[0390] <210> 48
[0391] <211> 20
[0392] <212> DNA
[0393] <213> 人工序列
[0394] <220>
[0395] <223> 合成序列
[0396] <400> 48
[0397] caacgacct aagcatgtgc 20
[0398] <210> 49
[0399] <211> 20
[0400] <212> DNA
[0401] <213> 人工序列
[0402] <220>
[0403] <223> 合成序列
[0404] <400> 49
[0405] gacatacatg gctttggcag 20
[0406] <210> 50
[0407] <211> 22
[0408] <212> DNA
[0409] <213> 人工序列
[0410] <220>
[0411] <223> 合成序列
[0412] <400> 50
[0413] gagatactgc cacttatgca cg 22
[0414] <210> 51
[0415] <211> 20
[0416] <212> DNA
[0417] <213> 人工序列
[0418] <220>
[0419] <223> 合成序列
[0420] <400> 51
[0421] cgtgctaata gtctcagggc 20
[0422] <210> 52
[0423] <211> 20
[0424] <212> DNA
[0425] <213> 人工序列
[0426] <220>
[0427] <223> 合成序列
[0428] <400> 52

[0429] cgacgcttca ttgcttcatt 20
[0430] <210> 53
[0431] <211> 20
[0432] <212> DNA
[0433] <213> 人工序列
[0434] <220>
[0435] <223> 合成序列
[0436] <400> 53
[0437] cttgcgccaa acaattgtcc 20
[0438] <210> 54
[0439] <211> 20
[0440] <212> DNA
[0441] <213> 人工序列
[0442] <220>
[0443] <223> 合成序列
[0444] <400> 54
[0445] gctgcagagt ttgcattcat 20
[0446] <210> 55
[0447] <211> 21
[0448] <212> DNA
[0449] <213> 人工序列
[0450] <220>
[0451] <223> 合成序列
[0452] <400> 55
[0453] catacacaca gaccgagagt c 21
[0454] <210> 56
[0455] <211> 20
[0456] <212> DNA
[0457] <213> 人工序列
[0458] <220>
[0459] <223> 合成序列
[0460] <400> 56
[0461] ggatgtcagc cagcataagt 20
[0462] <210> 57
[0463] <211> 20
[0464] <212> DNA
[0465] <213> 人工序列
[0466] <220>
[0467] <223> 合成序列

[0468] <400> 57
[0469] gcaagtgcc aacagttctc 20
[0470] <210> 58
[0471] <211> 21
[0472] <212> DNA
[0473] <213> 人工序列
[0474] <220>
[0475] <223> 合成序列
[0476] <400> 58
[0477] gattccagca cacttgagtc t 21
[0478] <210> 59
[0479] <211> 20
[0480] <212> DNA
[0481] <213> 人工序列
[0482] <220>
[0483] <223> 合成序列
[0484] <400> 59
[0485] ccgttgcagg tttaaattggc 20
[0486] <210> 60
[0487] <211> 20
[0488] <212> DNA
[0489] <213> 人工序列
[0490] <220>
[0491] <223> 合成序列
[0492] <400> 60
[0493] caagagtgcct ttatgggcct 20
[0494] <210> 61
[0495] <211> 21
[0496] <212> DNA
[0497] <213> 人工序列
[0498] <220>
[0499] <223> 合成序列
[0500] <400> 61
[0501] gcactcaagg agatcagact g 21
[0502] <210> 62
[0503] <211> 21
[0504] <212> DNA
[0505] <213> 人工序列
[0506] <220>

[0507] <223> 合成序列
[0508] <400> 62
[0509] ggctatcgaa ctacaaccac a 21
[0510] <210> 63
[0511] <211> 21
[0512] <212> DNA
[0513] <213> 人工序列
[0514] <220>
[0515] <223> 合成序列
[0516] <400> 63
[0517] gtagctgtct gtggtgtgat c 21
[0518] <210> 64
[0519] <211> 22
[0520] <212> DNA
[0521] <213> 人工序列
[0522] <220>
[0523] <223> 合成序列
[0524] <400> 64
[0525] caagaaactt cgagccttag ca 22
[0526] <210> 65
[0527] <211> 20
[0528] <212> DNA
[0529] <213> 人工序列
[0530] <220>
[0531] <223> 合成序列
[0532] <400> 65
[0533] gtgaaccagt ccgagtgaaa 20
[0534] <210> 66
[0535] <211> 21
[0536] <212> DNA
[0537] <213> 人工序列
[0538] <220>
[0539] <223> 合成序列
[0540] <400> 66
[0541] gcaaattgatg ttcagcacca c 21
[0542] <210> 67
[0543] <211> 20
[0544] <212> DNA
[0545] <213> 人工序列

[0546] <220>
[0547] <223> 合成序列
[0548] <400> 67
[0549] ttctctccacc gaacgtgtct 20
[0550] <210> 68
[0551] <211> 20
[0552] <212> DNA
[0553] <213> 人工序列
[0554] <220>
[0555] <223> 合成序列
[0556] <400> 68
[0557] gccctattgc aagccctctt 20
[0558] <210> 69
[0559] <211> 40
[0560] <212> DNA
[0561] <213> 人工序列
[0562] <220>
[0563] <223> 合成序列
[0564] <400> 69
[0565] ttctctccacc gaacgtgtct agaccagcac aacttactcg 40
[0566] <210> 70
[0567] <211> 37
[0568] <212> DNA
[0569] <213> 人工序列
[0570] <220>
[0571] <223> 合成序列
[0572] <400> 70
[0573] ttctctccacc gaacgtgtct ccaaatgcac ctgcctg 37
[0574] <210> 71
[0575] <211> 41
[0576] <212> DNA
[0577] <213> 人工序列
[0578] <220>
[0579] <223> 合成序列
[0580] <400> 71
[0581] ttctctccacc gaacgtgtct agtttggaca aaggcaattc g 41
[0582] <210> 72
[0583] <211> 44
[0584] <212> DNA

- [0585] <213> 人工序列
[0586] <220>
[0587] <223> 合成序列
[0588] <400> 72
[0589] ttcttcacc gaacgtgtct tgagcttagc caatatcaag aagg 44
[0590] <210> 73
[0591] <211> 42
[0592] <212> DNA
[0593] <213> 人工序列
[0594] <220>
[0595] <223> 合成序列
[0596] <400> 73
[0597] ttcttcacc gaacgtgtct acgtgaactt tccttggtac ac 42
[0598] <210> 74
[0599] <211> 44
[0600] <212> DNA
[0601] <213> 人工序列
[0602] <220>
[0603] <223> 合成序列
[0604] <400> 74
[0605] ttcttcacc gaacgtgtct tgaagatgtt ctaatacctt gccg 44
[0606] <210> 75
[0607] <211> 38
[0608] <212> DNA
[0609] <213> 人工序列
[0610] <220>
[0611] <223> 合成序列
[0612] <400> 75
[0613] ttcttcacc gaacgtgtct cagtgtggag actgaacg 38
[0614] <210> 76
[0615] <211> 43
[0616] <212> DNA
[0617] <213> 人工序列
[0618] <220>
[0619] <223> 合成序列
[0620] <400> 76
[0621] ttcttcacc gaacgtgtct aggcagggtatgtcatgaa atg 43
[0622] <210> 77
[0623] <211> 37

[0624] <212> DNA
[0625] <213> 人工序列
[0626] <220>
[0627] <223> 合成序列
[0628] <400> 77
[0629] ttcttcacc gaacgtgtct gattgtctgg agcgctg 37
[0630] <210> 78
[0631] <211> 36
[0632] <212> DNA
[0633] <213> 人工序列
[0634] <220>
[0635] <223> 合成序列
[0636] <400> 78
[0637] ttcttcacc gaacgtgtct agggagcaat aggccg 36
[0638] <210> 79
[0639] <211> 37
[0640] <212> DNA
[0641] <213> 人工序列
[0642] <220>
[0643] <223> 合成序列
[0644] <400> 79
[0645] ttcttcacc gaacgtgtct ctgcaggta caacacg 37
[0646] <210> 80
[0647] <211> 38
[0648] <212> DNA
[0649] <213> 人工序列
[0650] <220>
[0651] <223> 合成序列
[0652] <400> 80
[0653] ttcttcacc gaacgtgtct cgtatctggg aagacggc 38
[0654] <210> 81
[0655] <211> 40
[0656] <212> DNA
[0657] <213> 人工序列
[0658] <220>
[0659] <223> 合成序列
[0660] <400> 81
[0661] ttcttcacc gaacgtgtct cctgtaatcc cttgcaatgc 40
[0662] <210> 82

[0663] <211> 38
[0664] <212> DNA
[0665] <213> 人工序列
[0666] <220>
[0667] <223> 合成序列
[0668] <400> 82
[0669] ttcttcacc gaacgtgtct ggtctcagca cggttctg 38
[0670] <210> 83
[0671] <211> 37
[0672] <212> DNA
[0673] <213> 人工序列
[0674] <220>
[0675] <223> 合成序列
[0676] <400> 83
[0677] ttcttcacc gaacgtgtct gcacctcct accacac 37
[0678] <210> 84
[0679] <211> 41
[0680] <212> DNA
[0681] <213> 人工序列
[0682] <220>
[0683] <223> 合成序列
[0684] <400> 84
[0685] ttcttcacc gaacgtgtct gcctctagct agagagaagt c 41
[0686] <210> 85
[0687] <211> 39
[0688] <212> DNA
[0689] <213> 人工序列
[0690] <220>
[0691] <223> 合成序列
[0692] <400> 85
[0693] ttcttcacc gaacgtgtct ctggcagtct agccgttac 39
[0694] <210> 86
[0695] <211> 43
[0696] <212> DNA
[0697] <213> 人工序列
[0698] <220>
[0699] <223> 合成序列
[0700] <400> 86
[0701] ttcttcacc gaacgtgtct tgtcttagaa tttggcaact ggc 43

[0702]	<210> 87
[0703]	<211> 39
[0704]	<212> DNA
[0705]	<213> 人工序列
[0706]	<220>
[0707]	<223> 合成序列
[0708]	<400> 87
[0709]	ttcctccacc gaacgtgtct gcaggaaagc ctactgaac 39
[0710]	<210> 88
[0711]	<211> 39
[0712]	<212> DNA
[0713]	<213> 人工序列
[0714]	<220>
[0715]	<223> 合成序列
[0716]	<400> 88
[0717]	ttcctccacc gaacgtgtct gggagccaga gaaatgtcc 39
[0718]	<210> 89
[0719]	<211> 44
[0720]	<212> DNA
[0721]	<213> 人工序列
[0722]	<220>
[0723]	<223> 合成序列
[0724]	<400> 89
[0725]	ttcctccacc gaacgtgtct tgtctccagt tccacttcat ttag 44
[0726]	<210> 90
[0727]	<211> 39
[0728]	<212> DNA
[0729]	<213> 人工序列
[0730]	<220>
[0731]	<223> 合成序列
[0732]	<400> 90
[0733]	ttcctccacc gaacgtgtct cccgttaatt gcctactcg 39
[0734]	<210> 91
[0735]	<211> 38
[0736]	<212> DNA
[0737]	<213> 人工序列
[0738]	<220>
[0739]	<223> 合成序列
[0740]	<400> 91

[0741] ttcctccacc gaacgtgtct ctcggtccca ctggaaag 38
[0742] <210> 92
[0743] <211> 41
[0744] <212> DNA
[0745] <213> 人工序列
[0746] <220>
[0747] <223> 合成序列
[0748] <400> 92
[0749] ttcctccacc gaacgtgtct acacccatga ttcagttact g 41
[0750] <210> 93
[0751] <211> 41
[0752] <212> DNA
[0753] <213> 人工序列
[0754] <220>
[0755] <223> 合成序列
[0756] <400> 93
[0757] ttcctccacc gaacgtgtct gctagtatga acatcacagg c 41
[0758] <210> 94
[0759] <211> 43
[0760] <212> DNA
[0761] <213> 人工序列
[0762] <220>
[0763] <223> 合成序列
[0764] <400> 94
[0765] ttcctccacc gaacgtgtct acaaatgagt aagaagcgag tcg 43
[0766] <210> 95
[0767] <211> 38
[0768] <212> DNA
[0769] <213> 人工序列
[0770] <220>
[0771] <223> 合成序列
[0772] <400> 95
[0773] ttcctccacc gaacgtgtct gataagggtt gctctgcg 38
[0774] <210> 96
[0775] <211> 37
[0776] <212> DNA
[0777] <213> 人工序列
[0778] <220>
[0779] <223> 合成序列

[0780]	<400> 96
[0781]	ttcctccacc gaacgtgtct ccatgcacca gctaccc 37
[0782]	<210> 97
[0783]	<211> 40
[0784]	<212> DNA
[0785]	<213> 人工序列
[0786]	<220>
[0787]	<223> 合成序列
[0788]	<400> 97
[0789]	ttcctccacc gaacgtgtct aactgtaccc tactcccagc 40
[0790]	<210> 98
[0791]	<211> 41
[0792]	<212> DNA
[0793]	<213> 人工序列
[0794]	<220>
[0795]	<223> 合成序列
[0796]	<400> 98
[0797]	ttcctccacc gaacgtgtct aggaccaagg gaccagttta g 41
[0798]	<210> 99
[0799]	<211> 42
[0800]	<212> DNA
[0801]	<213> 人工序列
[0802]	<220>
[0803]	<223> 合成序列
[0804]	<400> 99
[0805]	ttcctccacc gaacgtgtct agagttcctc caagaaattg cg 42
[0806]	<210> 100
[0807]	<211> 44
[0808]	<212> DNA
[0809]	<213> 人工序列
[0810]	<220>
[0811]	<223> 合成序列
[0812]	<400> 100
[0813]	ttcctccacc gaacgtgtct acattataca gcatgctggc tatc 44
[0814]	<210> 101
[0815]	<211> 41
[0816]	<212> DNA
[0817]	<213> 人工序列
[0818]	<220>

[0819] <223> 合成序列
[0820] <400> 101
[0821] ttctccacc gaacgtgtct gaggaagaaa gtgaggtttg c 41
[0822] <210> 102
[0823] <211> 44
[0824] <212> DNA
[0825] <213> 人工序列
[0826] <220>
[0827] <223> 合成序列
[0828] <400> 102
[0829] ttctccacc gaacgtgtct ctgaattatg tgcttaccaa gagc 44
[0830] <210> 103
[0831] <211> 44
[0832] <212> DNA
[0833] <213> 人工序列
[0834] <220>
[0835] <223> 合成序列
[0836] <400> 103
[0837] ttctccacc gaacgtgtct tgggttctga taaccttatac aagc 44
[0838] <210> 104
[0839] <211> 39
[0840] <212> DNA
[0841] <213> 人工序列
[0842] <220>
[0843] <223> 合成序列
[0844] <400> 104
[0845] ttctccacc gaacgtgtct ggtagtcaa acatgctgc 39
[0846] <210> 105
[0847] <211> 42
[0848] <212> DNA
[0849] <213> 人工序列
[0850] <220>
[0851] <223> 合成序列
[0852] <400> 105
[0853] ttctccacc gaacgtgtct gacactggca gaatcaaatac ac 42
[0854] <210> 106
[0855] <211> 44
[0856] <212> DNA
[0857] <213> 人工序列

[0858]	<220>
[0859]	<223> 合成序列
[0860]	<400> 106
[0861]	ttcctccacc gaacgtgtct agagttacac ctttagctaa ccac 44
[0862]	<210> 107
[0863]	<211> 38
[0864]	<212> DNA
[0865]	<213> 人工序列
[0866]	<220>
[0867]	<223> 合成序列
[0868]	<400> 107
[0869]	ttcctccacc gaacgtgtct ccaggagttc aagaagcg 38
[0870]	<210> 108
[0871]	<211> 41
[0872]	<212> DNA
[0873]	<213> 人工序列
[0874]	<220>
[0875]	<223> 合成序列
[0876]	<400> 108
[0877]	ttcctccacc gaacgtgtct accactcctt tctcccatct c 41
[0878]	<210> 109
[0879]	<211> 44
[0880]	<212> DNA
[0881]	<213> 人工序列
[0882]	<220>
[0883]	<223> 合成序列
[0884]	<400> 109
[0885]	ttcctccacc gaacgtgtct gtcttatggg acaatggttg atag 44
[0886]	<210> 110
[0887]	<211> 38
[0888]	<212> DNA
[0889]	<213> 人工序列
[0890]	<220>
[0891]	<223> 合成序列
[0892]	<400> 110
[0893]	ttcctccacc gaacgtgtct ctaccctcaa ccctcgtc 38
[0894]	<210> 111
[0895]	<211> 38
[0896]	<212> DNA

- [0897] <213> 人工序列
- [0898] <220>
- [0899] <223> 合成序列
- [0900] <400> 111
- [0901] ttctctccacc gaacgtgtct ccaagactga tcatgccg 38
- [0902] <210> 112
- [0903] <211> 40
- [0904] <212> DNA
- [0905] <213> 人工序列
- [0906] <220>
- [0907] <223> 合成序列
- [0908] <400> 112
- [0909] gccctattgc aagccctctt agaccagcac aacttactta 40
- [0910] <210> 113
- [0911] <211> 37
- [0912] <212> DNA
- [0913] <213> 人工序列
- [0914] <220>
- [0915] <223> 合成序列
- [0916] <400> 113
- [0917] gccctattgc aagccctctt ccaaattcac ctgcecca 37
- [0918] <210> 114
- [0919] <211> 41
- [0920] <212> DNA
- [0921] <213> 人工序列
- [0922] <220>
- [0923] <223> 合成序列
- [0924] <400> 114
- [0925] gccctattgc aagccctctt agtttggaca aaggcgattt a 41
- [0926] <210> 115
- [0927] <211> 44
- [0928] <212> DNA
- [0929] <213> 人工序列
- [0930] <220>
- [0931] <223> 合成序列
- [0932] <400> 115
- [0933] gccctattgc aagccctctt tgagcttagc caatatcaac aaga 44
- [0934] <210> 116
- [0935] <211> 42

[0936] <212> DNA
[0937] <213> 人工序列
[0938] <220>
[0939] <223> 合成序列
[0940] <400> 116
[0941] gccctattgc aagccctctt acgtgaactt tccttggtaa at 42
[0942] <210> 117
[0943] <211> 44
[0944] <212> DNA
[0945] <213> 人工序列
[0946] <220>
[0947] <223> 合成序列
[0948] <400> 117
[0949] gccctattgc aagccctctt tgaagatggt ctaatacctt gcta 44
[0950] <210> 118
[0951] <211> 38
[0952] <212> DNA
[0953] <213> 人工序列
[0954] <220>
[0955] <223> 合成序列
[0956] <400> 118
[0957] gccctattgc aagccctctt cagtgtggag accgaaca 38
[0958] <210> 119
[0959] <211> 43
[0960] <212> DNA
[0961] <213> 人工序列
[0962] <220>
[0963] <223> 合成序列
[0964] <400> 119
[0965] gccctattgc aagccctctt aggcagggtatgtcatgaa gtt 43
[0966] <210> 120
[0967] <211> 37
[0968] <212> DNA
[0969] <213> 人工序列
[0970] <220>
[0971] <223> 合成序列
[0972] <400> 120
[0973] gccctattgc aagccctctt gattgtctgg agggctc 37
[0974] <210> 121

[0975]	<211> 36
[0976]	<212> DNA
[0977]	<213> 人工序列
[0978]	<220>
[0979]	<223> 合成序列
[0980]	<400> 121
[0981]	gccctattgc aagccctctt agggagcaat aggcta 36
[0982]	<210> 122
[0983]	<211> 37
[0984]	<212> DNA
[0985]	<213> 人工序列
[0986]	<220>
[0987]	<223> 合成序列
[0988]	<400> 122
[0989]	gccctattgc aagccctctt ctgcagggtta caagaca 37
[0990]	<210> 123
[0991]	<211> 38
[0992]	<212> DNA
[0993]	<213> 人工序列
[0994]	<220>
[0995]	<223> 合成序列
[0996]	<400> 123
[0997]	gccctattgc aagccctctt cgtatctggg aagatggg 38
[0998]	<210> 124
[0999]	<211> 40
[1000]	<212> DNA
[1001]	<213> 人工序列
[1002]	<220>
[1003]	<223> 合成序列
[1004]	<400> 124
[1005]	gccctattgc aagccctctt cctgtaatcc cttgcaataa 40
[1006]	<210> 125
[1007]	<211> 38
[1008]	<212> DNA
[1009]	<213> 人工序列
[1010]	<220>
[1011]	<223> 合成序列
[1012]	<400> 125
[1013]	gccctattgc aagccctctt ggtctcagca cggtcctt 38

[1014]	<210> 126
[1015]	<211> 37
[1016]	<212> DNA
[1017]	<213> 人工序列
[1018]	<220>
[1019]	<223> 合成序列
[1020]	<400> 126
[1021]	gccctattgc aagccctctt gcacctccct atcacat 37
[1022]	<210> 127
[1023]	<211> 41
[1024]	<212> DNA
[1025]	<213> 人工序列
[1026]	<220>
[1027]	<223> 合成序列
[1028]	<400> 127
[1029]	gccctattgc aagccctctt gcctctagct agagagaagc g 41
[1030]	<210> 128
[1031]	<211> 39
[1032]	<212> DNA
[1033]	<213> 人工序列
[1034]	<220>
[1035]	<223> 合成序列
[1036]	<400> 128
[1037]	gccctattgc aagccctctt ctggcagtct agccattat 39
[1038]	<210> 129
[1039]	<211> 43
[1040]	<212> DNA
[1041]	<213> 人工序列
[1042]	<220>
[1043]	<223> 合成序列
[1044]	<400> 129
[1045]	gccctattgc aagccctctt tgtcttagaa ttggcaact agt 43
[1046]	<210> 130
[1047]	<211> 39
[1048]	<212> DNA
[1049]	<213> 人工序列
[1050]	<220>
[1051]	<223> 合成序列
[1052]	<400> 130

- [1053] gccctattgc aagccctctt gcaggaaagc ctattgaat 39
- [1054] <210> 131
- [1055] <211> 39
- [1056] <212> DNA
- [1057] <213> 人工序列
- [1058] <220>
- [1059] <223> 合成序列
- [1060] <400> 131
- [1061] gccctattgc aagccctctt gggagccaga gaaatttct 39
- [1062] <210> 132
- [1063] <211> 44
- [1064] <212> DNA
- [1065] <213> 人工序列
- [1066] <220>
- [1067] <223> 合成序列
- [1068] <400> 132
- [1069] gccctattgc aagccctctt tgtctccagt tccacttcat gtaa 44
- [1070] <210> 133
- [1071] <211> 39
- [1072] <212> DNA
- [1073] <213> 人工序列
- [1074] <220>
- [1075] <223> 合成序列
- [1076] <400> 133
- [1077] gccctattgc aagccctctt cccgttaatt gcctattta 39
- [1078] <210> 134
- [1079] <211> 38
- [1080] <212> DNA
- [1081] <213> 人工序列
- [1082] <220>
- [1083] <223> 合成序列
- [1084] <400> 134
- [1085] gccctattgc aagccctctt ctcggtccca ctgggaaa 38
- [1086] <210> 135
- [1087] <211> 41
- [1088] <212> DNA
- [1089] <213> 人工序列
- [1090] <220>
- [1091] <223> 合成序列

- [1092] <400> 135
[1093] gccctattgc aagccctctt acacccatga ttcagttacc a 41
[1094] <210> 136
[1095] <211> 41
[1096] <212> DNA
[1097] <213> 人工序列
[1098] <220>
[1099] <223> 合成序列
[1100] <400> 136
[1101] gccctattgc aagccctctt gctagtatga acatcacaag t 41
[1102] <210> 137
[1103] <211> 43
[1104] <212> DNA
[1105] <213> 人工序列
[1106] <220>
[1107] <223> 合成序列
[1108] <400> 137
[1109] gccctattgc aagccctctt acaaagtgagt aagaagcgag tta 43
[1110] <210> 138
[1111] <211> 38
[1112] <212> DNA
[1113] <213> 人工序列
[1114] <220>
[1115] <223> 合成序列
[1116] <400> 138
[1117] gccctattgc aagccctctt gataagggtt gctctaca 38
[1118] <210> 139
[1119] <211> 37
[1120] <212> DNA
[1121] <213> 人工序列
[1122] <220>
[1123] <223> 合成序列
[1124] <400> 139
[1125] gccctattgc aagccctctt ccatgcacca gctacta 37
[1126] <210> 140
[1127] <211> 40
[1128] <212> DNA
[1129] <213> 人工序列
[1130] <220>

- [1131] <223> 合成序列
[1132] <400> 140
[1133] gccctattgc aagccctctt aactgtaccc tactcccaat 40
[1134] <210> 141
[1135] <211> 41
[1136] <212> DNA
[1137] <213> 人工序列
[1138] <220>
[1139] <223> 合成序列
[1140] <400> 141
[1141] gccctattgc aagccctctt aggaccaagg gaccagttca c 41
[1142] <210> 142
[1143] <211> 42
[1144] <212> DNA
[1145] <213> 人工序列
[1146] <220>
[1147] <223> 合成序列
[1148] <400> 142
[1149] gccctattgc aagccctctt agagttcctc caagaaattg ta 42
[1150] <210> 143
[1151] <211> 44
[1152] <212> DNA
[1153] <213> 人工序列
[1154] <220>
[1155] <223> 合成序列
[1156] <400> 143
[1157] gccctattgc aagccctctt acattataca gcatgctggt taga 44
[1158] <210> 144
[1159] <211> 41
[1160] <212> DNA
[1161] <213> 人工序列
[1162] <220>
[1163] <223> 合成序列
[1164] <400> 144
[1165] gccctattgc aagccctctt gaggaagaaa gtgagatttg t 41
[1166] <210> 145
[1167] <211> 44
[1168] <212> DNA
[1169] <213> 人工序列

[1170]	<220>
[1171]	<223> 合成序列
[1172]	<400> 145
[1173]	gccctattgc aagccctctt ctgaattatg tgcttaccag gagt 44
[1174]	<210> 146
[1175]	<211> 44
[1176]	<212> DNA
[1177]	<213> 人工序列
[1178]	<220>
[1179]	<223> 合成序列
[1180]	<400> 146
[1181]	gccctattgc aagccctctt tgggttctga taaccttatac aact 44
[1182]	<210> 147
[1183]	<211> 39
[1184]	<212> DNA
[1185]	<213> 人工序列
[1186]	<220>
[1187]	<223> 合成序列
[1188]	<400> 147
[1189]	gccctattgc aagccctctt ggtagtcaa acatgttgt 39
[1190]	<210> 148
[1191]	<211> 42
[1192]	<212> DNA
[1193]	<213> 人工序列
[1194]	<220>
[1195]	<223> 合成序列
[1196]	<400> 148
[1197]	gccctattgc aagccctctt gacactggca gaatcaaacc aa 42
[1198]	<210> 149
[1199]	<211> 44
[1200]	<212> DNA
[1201]	<213> 人工序列
[1202]	<220>
[1203]	<223> 合成序列
[1204]	<400> 149
[1205]	gccctattgc aagccctctt agagttacac ctttagctaa ctag 44
[1206]	<210> 150
[1207]	<211> 38
[1208]	<212> DNA

- [1209] <213> 人工序列
[1210] <220>
[1211] <223> 合成序列
[1212] <400> 150
[1213] gccctattgc aagccctctt ccaggagttc aaggagca 38
[1214] <210> 151
[1215] <211> 41
[1216] <212> DNA
[1217] <213> 人工序列
[1218] <220>
[1219] <223> 合成序列
[1220] <400> 151
[1221] gccctattgc aagccctctt accactcctt tctcccgtct t 41
[1222] <210> 152
[1223] <211> 44
[1224] <212> DNA
[1225] <213> 人工序列
[1226] <220>
[1227] <223> 合成序列
[1228] <400> 152
[1229] gccctattgc aagccctctt gtcttatggg acaatggtcg atat 44
[1230] <210> 153
[1231] <211> 38
[1232] <212> DNA
[1233] <213> 人工序列
[1234] <220>
[1235] <223> 合成序列
[1236] <400> 153
[1237] gccctattgc aagccctctt ctaccctcaa ccctcatt 38
[1238] <210> 154
[1239] <211> 38
[1240] <212> DNA
[1241] <213> 人工序列
[1242] <220>
[1243] <223> 合成序列
[1244] <400> 154
[1245] gccctattgc aagccctctt ccaagactga tcatgcta 38
[1246] <210> 155
[1247] <211> 61

- [1248] <212> DNA
[1249] <213> 人工序列
[1250] <220>
[1251] <223> 合成序列
[1252] <400> 155
[1253] cacttgacaa agttctcacg cgccgaagtt ctccgaagga tgccctcatc ttcttccctg 60
[1254] c 61
[1255] <210> 156
[1256] <211> 61
[1257] <212> DNA
[1258] <213> 人工序列
[1259] <220>
[1260] <223> 合成序列
[1261] <400> 156
[1262] cattagggat taacggcttg ggacagactg acggagcttc agccctcatc ttcttccctg 60
[1263] c 61
[1264] <210> 157
[1265] <211> 63
[1266] <212> DNA
[1267] <213> 人工序列
[1268] <220>
[1269] <223> 合成序列
[1270] <400> 157
[1271] cacacgttaa gaagactttc tgctgactct gccgcacatg atcgccctca tcttcttccc 60
[1272] tgc 63
[1273] <210> 158
[1274] <211> 62
[1275] <212> DNA
[1276] <213> 人工序列
[1277] <220>
[1278] <223> 合成序列
[1279] <400> 158
[1280] ctaagtgcc cccatgagaa aggatccgat agccctctgc agccctcat cttcttccct 60
[1281] gc 62
[1282] <210> 159
[1283] <211> 60
[1284] <212> DNA
[1285] <213> 人工序列
[1286] <220>

[1287]	<223> 合成序列
[1288]	<400> 159
[1289]	gcacagatttt cccacactct caacaggcct gctaaacacc gccctcatct tcttccctgc 60
[1290]	<210> 160
[1291]	<211> 61
[1292]	<212> DNA
[1293]	<213> 人工序列
[1294]	<220>
[1295]	<223> 合成序列
[1296]	<400> 160
[1297]	cttacaggag gtctggcatc aggtcaacaa ccgagggact cgccctcatc ttcttccctg 60
[1298]	c 61
[1299]	<210> 161
[1300]	<211> 59
[1301]	<212> DNA
[1302]	<213> 人工序列
[1303]	<220>
[1304]	<223> 合成序列
[1305]	<400> 161
[1306]	ccacaatgag aaggcagagt tgtcattaat gctggcggcg ccctcatctt cttccctgc 59
[1307]	<210> 162
[1308]	<211> 60
[1309]	<212> DNA
[1310]	<213> 人工序列
[1311]	<220>
[1312]	<223> 合成序列
[1313]	<400> 162
[1314]	gctgtggcat agctacactc cggtgacggt ttgcaacttt gccctcatct tcttccctgc 60
[1315]	<210> 163
[1316]	<211> 60
[1317]	<212> DNA
[1318]	<213> 人工序列
[1319]	<220>
[1320]	<223> 合成序列
[1321]	<400> 163
[1322]	cagggttaatt tgtgggtctg gtccggcagt taagggtctc gccctcatct tcttccctgc 60
[1323]	<210> 164
[1324]	<211> 62
[1325]	<212> DNA

- [1326] <213> 人工序列
[1327] <220>
[1328] <223> 合成序列
[1329] <400> 164
[1330] gggctatcca gaaagataag aatactcaca aacgactgcg cagccctcat cttcttcct 60
[1331] gc 62
[1332] <210> 165
[1333] <211> 63
[1334] <212> DNA
[1335] <213> 人工序列
[1336] <220>
[1337] <223> 合成序列
[1338] <400> 165
[1339] cataactggt ggagtatttc actcgtatat ggccgactgg agggccctca tttcttccc 60
[1340] tgc 63
[1341] <210> 166
[1342] <211> 64
[1343] <212> DNA
[1344] <213> 人工序列
[1345] <220>
[1346] <223> 合成序列
[1347] <400> 166
[1348] cttcaaggaa gaaattcaac agggtagggt ttgcggcgat aaggccctc atcttcttcc 60
[1349] ctgc 64
[1350] <210> 167
[1351] <211> 62
[1352] <212> DNA
[1353] <213> 人工序列
[1354] <220>
[1355] <223> 合成序列
[1356] <400> 167
[1357] catggattca acacagcaaa caccaagtca accacccgag acgccctcat cttcttcct 60
[1358] gc 62
[1359] <210> 168
[1360] <211> 62
[1361] <212> DNA
[1362] <213> 人工序列
[1363] <220>
[1364] <223> 合成序列

- [1365] <400> 168
[1366] ctctgacctc cttcactctt acacttccct ggcttccctt ctgccctcat cttcttccct 60
[1367] gc 62
[1368] <210> 169
[1369] <211> 62
[1370] <212> DNA
[1371] <213> 人工序列
[1372] <220>
[1373] <223> 合成序列
[1374] <400> 169
[1375] gctttcattt gtgctaaacc tcgcttgggt cctctcctga acgccctcat cttcttccct 60
[1376] gc 62
[1377] <210> 170
[1378] <211> 58
[1379] <212> DNA
[1380] <213> 人工序列
[1381] <220>
[1382] <223> 合成序列
[1383] <400> 170
[1384] catcccagat gccctcataa cgtccgaacc acaatgctgc cctcatcttc ttccctgc 58
[1385] <210> 171
[1386] <211> 62
[1387] <212> DNA
[1388] <213> 人工序列
[1389] <220>
[1390] <223> 合成序列
[1391] <400> 171
[1392] gtagaaatcc caaggcaatc agctcctcgc atccaacagt cggccctcat cttcttccct 60
[1393] gc 62
[1394] <210> 172
[1395] <211> 63
[1396] <212> DNA
[1397] <213> 人工序列
[1398] <220>
[1399] <223> 合成序列
[1400] <400> 172
[1401] gaacaactaa ctccacagaa cccccaccgt agcactcctt cttgccctca tcttcttccc 60
[1402] tgc 63
[1403] <210> 173

- [1404] <211> 59
[1405] <212> DNA
[1406] <213> 人工序列
[1407] <220>
[1408] <223> 合成序列
[1409] <400> 173
[1410] gtgcagagga caggaagaac ggagcgtcgg tagtgtaaag ccctcatctt cttccctgc 59
[1411] <210> 174
[1412] <211> 63
[1413] <212> DNA
[1414] <213> 人工序列
[1415] <220>
[1416] <223> 合成序列
[1417] <400> 174
[1418] ggtgcttcaa gacatacacc ttaacaactc gacgaacctc ccggccctca tttttttccc 60
[1419] tgc 63
[1420] <210> 175
[1421] <211> 60
[1422] <212> DNA
[1423] <213> 人工序列
[1424] <220>
[1425] <223> 合成序列
[1426] <400> 175
[1427] ggaacctctg tgaccttgga tggcccatcc ttatgtgctg gccctcatct tttccctgc 60
[1428] <210> 176
[1429] <211> 59
[1430] <212> DNA
[1431] <213> 人工序列
[1432] <220>
[1433] <223> 合成序列
[1434] <400> 176
[1435] cccagtggta ctttctgaag gtcgttattg ctcaagcccg ccctcatctt cttccctgc 59
[1436] <210> 177
[1437] <211> 63
[1438] <212> DNA
[1439] <213> 人工序列
[1440] <220>
[1441] <223> 合成序列
[1442] <400> 177

[1443] cttctgttgc ttatttgggt aacttgattc tggccctccc atcgccctca ttttcttccc 60
[1444] tgc 63
[1445] <210> 178
[1446] <211> 56
[1447] <212> DNA
[1448] <213> 人工序列
[1449] <220>
[1450] <223> 合成序列
[1451] <400> 178
[1452] cccactggat gcctccctca cgccggtat ttaggtgccc tcattcttct ccctgc 56
[1453] <210> 179
[1454] <211> 58
[1455] <212> DNA
[1456] <213> 人工序列
[1457] <220>
[1458] <223> 合成序列
[1459] <400> 179
[1460] cggagagacg catctgaaag tctgggtagg tggaggacgc cctcatcttc ttccctgc 58
[1461] <210> 180
[1462] <211> 61
[1463] <212> DNA
[1464] <213> 人工序列
[1465] <220>
[1466] <223> 合成序列
[1467] <400> 180
[1468] caggatttcc agcttacagg gcgactgagc cacatccaac tgccctcatc ttcttccctg 60
[1469] c 61
[1470] <210> 181
[1471] <211> 60
[1472] <212> DNA
[1473] <213> 人工序列
[1474] <220>
[1475] <223> 合成序列
[1476] <400> 181
[1477] cttgcaagat gtgcctctta gagcctcagc cggaattgaa gccctcatct ttttccctgc 60
[1478] <210> 182
[1479] <211> 62
[1480] <212> DNA
[1481] <213> 人工序列

- [1482] <220>
[1483] <223> 合成序列
[1484] <400> 182
[1485] gggtggtttc tctaaacaca aattgccatt ctgcaccaat gcgccctcat cttcttcct 60
[1486] gc 62
[1487] <210> 183
[1488] <211> 62
[1489] <212> DNA
[1490] <213> 人工序列
[1491] <220>
[1492] <223> 合成序列
[1493] <400> 183
[1494] gcagggtatt gagagaagga tctattgggtg ttgcggctg atgccctcat cttcttcct 60
[1495] gc 62
[1496] <210> 184
[1497] <211> 62
[1498] <212> DNA
[1499] <213> 人工序列
[1500] <220>
[1501] <223> 合成序列
[1502] <400> 184
[1503] gtgcacattt cttgatgaag ggatgggcgt aacaggagga ctgccctcat cttcttcct 60
[1504] gc 62
[1505] <210> 185
[1506] <211> 62
[1507] <212> DNA
[1508] <213> 人工序列
[1509] <220>
[1510] <223> 合成序列
[1511] <400> 185
[1512] gagcaatgcc tgtttcatga gaggaatggc ctacctgcat cagccctcat cttcttcct 60
[1513] gc 62
[1514] <210> 186
[1515] <211> 64
[1516] <212> DNA
[1517] <213> 人工序列
[1518] <220>
[1519] <223> 合成序列
[1520] <400> 186

- [1521] gttaacatta tacagcatgg tggccccgtt gttgtcatcg catcgccctc atctttcttcc 60
- [1522] ctgc 64
- [1523] <210> 187
- [1524] <211> 59
- [1525] <212> DNA
- [1526] <213> 人工序列
- [1527] <220>
- [1528] <223> 合成序列
- [1529] <400> 187
- [1530] gcagaacatg tcctgaagcg ttcgatgcgt cccatgagtg ccctcatctt cttccctgc 59
- [1531] <210> 188
- [1532] <211> 60
- [1533] <212> DNA
- [1534] <213> 人工序列
- [1535] <220>
- [1536] <223> 合成序列
- [1537] <400> 188
- [1538] cagcttggtc ccaaaccat caaccgcgt agatgttctt gccctcatct tcttccctgc 60
- [1539] <210> 189
- [1540] <211> 61
- [1541] <212> DNA
- [1542] <213> 人工序列
- [1543] <220>
- [1544] <223> 合成序列
- [1545] <400> 189
- [1546] caaagtgtgg aagttgcttc cgccagctca agagtgtagc cgccctcatc ttcttccctg 60
- [1547] c 61
- [1548] <210> 190
- [1549] <211> 58
- [1550] <212> DNA
- [1551] <213> 人工序列
- [1552] <220>
- [1553] <223> 合成序列
- [1554] <400> 190
- [1555] ggtcgacttt gtccatcctt cttgatcctg cgcgatgtgc cctcatcttc ttccctgc 58
- [1556] <210> 191
- [1557] <211> 59
- [1558] <212> DNA
- [1559] <213> 人工序列

[1560]	<220>
[1561]	<223> 合成序列
[1562]	<400> 191
[1563]	ctctgttgcc tgtggactca tgcaggcgt tccctatacg ccctcatctt cttccctgc 59
[1564]	<210> 192
[1565]	<211> 64
[1566]	<212> DNA
[1567]	<213> 人工序列
[1568]	<220>
[1569]	<223> 合成序列
[1570]	<400> 192
[1571]	ctaactagaa ttagtctgcc tgcctattgg acctccgacc acgagccctc atctttcttcc 60
[1572]	ctgc 64
[1573]	<210> 193
[1574]	<211> 59
[1575]	<212> DNA
[1576]	<213> 人工序列
[1577]	<220>
[1578]	<223> 合成序列
[1579]	<400> 193
[1580]	gtgagccata atcgtgtcaa gccaccatTT agatccgcgg ccctcatctt cttccctgc 59
[1581]	<210> 194
[1582]	<211> 63
[1583]	<212> DNA
[1584]	<213> 人工序列
[1585]	<220>
[1586]	<223> 合成序列
[1587]	<400> 194
[1588]	gagaattaat gctccctctc ctggaccagt agaagtctgc ccggccctca tctttcttccc 60
[1589]	tgc 63
[1590]	<210> 195
[1591]	<211> 59
[1592]	<212> DNA
[1593]	<213> 人工序列
[1594]	<220>
[1595]	<223> 合成序列
[1596]	<400> 195
[1597]	gtggtctgct gttgaccaat ttcagaatgg ccgagctgtg ccctcatctt cttccctgc 59
[1598]	<210> 196

[1599]	<211> 60
[1600]	<212> DNA
[1601]	<213> 人工序列
[1602]	<220>
[1603]	<223> 合成序列
[1604]	<400> 196
[1605]	ggttgcaact gctgatctat aggtgacctt cttgtacgcc gccctcatct tcttcctgc 60
[1606]	<210> 197
[1607]	<211> 58
[1608]	<212> DNA
[1609]	<213> 人工序列
[1610]	<220>
[1611]	<223> 合成序列
[1612]	<400> 197
[1613]	ctttcccagt caaggcaggg cgcgtcctta ttcccatgc cctcatcttc ttccctgc 58
[1614]	<210> 198
[1615]	<211> 20
[1616]	<212> DNA
[1617]	<213> 人工序列
[1618]	<220>
[1619]	<223> 合成序列
[1620]	<400> 198
[1621]	agaccagcac aacttactcg 20
[1622]	<210> 199
[1623]	<211> 17
[1624]	<212> DNA
[1625]	<213> 人工序列
[1626]	<220>
[1627]	<223> 合成序列
[1628]	<400> 199
[1629]	ccaaatgcac ctgcctg 17
[1630]	<210> 200
[1631]	<211> 21
[1632]	<212> DNA
[1633]	<213> 人工序列
[1634]	<220>
[1635]	<223> 合成序列
[1636]	<400> 200
[1637]	agtttgaca aaggcaattc g 21

[1638] <210> 201
[1639] <211> 24
[1640] <212> DNA
[1641] <213> 人工序列
[1642] <220>
[1643] <223> 合成序列
[1644] <400> 201
[1645] tgagcttagc caatatcaag aagg 24
[1646] <210> 202
[1647] <211> 22
[1648] <212> DNA
[1649] <213> 人工序列
[1650] <220>
[1651] <223> 合成序列
[1652] <400> 202
[1653] acgtgaactt tccttggtac ac 22
[1654] <210> 203
[1655] <211> 24
[1656] <212> DNA
[1657] <213> 人工序列
[1658] <220>
[1659] <223> 合成序列
[1660] <400> 203
[1661] tgaagatggt ctaatacctt gccg 24
[1662] <210> 204
[1663] <211> 18
[1664] <212> DNA
[1665] <213> 人工序列
[1666] <220>
[1667] <223> 合成序列
[1668] <400> 204
[1669] cagtgtggag actgaacg 18
[1670] <210> 205
[1671] <211> 23
[1672] <212> DNA
[1673] <213> 人工序列
[1674] <220>
[1675] <223> 合成序列
[1676] <400> 205

[1677] aggcagggtg atgtcatgaa atg 23
[1678] <210> 206
[1679] <211> 17
[1680] <212> DNA
[1681] <213> 人工序列
[1682] <220>
[1683] <223> 合成序列
[1684] <400> 206
[1685] gattgtctgg agcgctg 17
[1686] <210> 207
[1687] <211> 16
[1688] <212> DNA
[1689] <213> 人工序列
[1690] <220>
[1691] <223> 合成序列
[1692] <400> 207
[1693] agggagcaat aggccg 16
[1694] <210> 208
[1695] <211> 17
[1696] <212> DNA
[1697] <213> 人工序列
[1698] <220>
[1699] <223> 合成序列
[1700] <400> 208
[1701] ctgcagggtg caacacg 17
[1702] <210> 209
[1703] <211> 18
[1704] <212> DNA
[1705] <213> 人工序列
[1706] <220>
[1707] <223> 合成序列
[1708] <400> 209
[1709] cgtatctggg aagacggc 18
[1710] <210> 210
[1711] <211> 20
[1712] <212> DNA
[1713] <213> 人工序列
[1714] <220>
[1715] <223> 合成序列

[1716] <400> 210
[1717] cctgtaatcc cttgcaatgc 20
[1718] <210> 211
[1719] <211> 18
[1720] <212> DNA
[1721] <213> 人工序列
[1722] <220>
[1723] <223> 合成序列
[1724] <400> 211
[1725] ggtctcagca cggttctg 18
[1726] <210> 212
[1727] <211> 17
[1728] <212> DNA
[1729] <213> 人工序列
[1730] <220>
[1731] <223> 合成序列
[1732] <400> 212
[1733] gcacctccct accacac 17
[1734] <210> 213
[1735] <211> 21
[1736] <212> DNA
[1737] <213> 人工序列
[1738] <220>
[1739] <223> 合成序列
[1740] <400> 213
[1741] gcctctagct agagagaagt c 21
[1742] <210> 214
[1743] <211> 19
[1744] <212> DNA
[1745] <213> 人工序列
[1746] <220>
[1747] <223> 合成序列
[1748] <400> 214
[1749] ctggcagtct agccgttac 19
[1750] <210> 215
[1751] <211> 23
[1752] <212> DNA
[1753] <213> 人工序列
[1754] <220>

[1755] <223> 合成序列
[1756] <400> 215
[1757] tgtcttagaa tttggcaact ggc 23
[1758] <210> 216
[1759] <211> 19
[1760] <212> DNA
[1761] <213> 人工序列
[1762] <220>
[1763] <223> 合成序列
[1764] <400> 216
[1765] gcaggaaagc ctactgaac 19
[1766] <210> 217
[1767] <211> 19
[1768] <212> DNA
[1769] <213> 人工序列
[1770] <220>
[1771] <223> 合成序列
[1772] <400> 217
[1773] gggagccaga gaaatgtcc 19
[1774] <210> 218
[1775] <211> 24
[1776] <212> DNA
[1777] <213> 人工序列
[1778] <220>
[1779] <223> 合成序列
[1780] <400> 218
[1781] tgtctccagt tccacttcat ttag 24
[1782] <210> 219
[1783] <211> 19
[1784] <212> DNA
[1785] <213> 人工序列
[1786] <220>
[1787] <223> 合成序列
[1788] <400> 219
[1789] cccgttaatt gcctactcg 19
[1790] <210> 220
[1791] <211> 18
[1792] <212> DNA
[1793] <213> 人工序列

[1794]	<220>
[1795]	<223> 合成序列
[1796]	<400> 220
[1797]	ctcgggtccca ctggaaag 18
[1798]	<210> 221
[1799]	<211> 21
[1800]	<212> DNA
[1801]	<213> 人工序列
[1802]	<220>
[1803]	<223> 合成序列
[1804]	<400> 221
[1805]	acacccatga ttcagttact g 21
[1806]	<210> 222
[1807]	<211> 21
[1808]	<212> DNA
[1809]	<213> 人工序列
[1810]	<220>
[1811]	<223> 合成序列
[1812]	<400> 222
[1813]	gctagtatga acatcacagg c 21
[1814]	<210> 223
[1815]	<211> 23
[1816]	<212> DNA
[1817]	<213> 人工序列
[1818]	<220>
[1819]	<223> 合成序列
[1820]	<400> 223
[1821]	acaaatgagt aagaagcgag tcg 23
[1822]	<210> 224
[1823]	<211> 18
[1824]	<212> DNA
[1825]	<213> 人工序列
[1826]	<220>
[1827]	<223> 合成序列
[1828]	<400> 224
[1829]	gataagggtt gctctgcg 18
[1830]	<210> 225
[1831]	<211> 17
[1832]	<212> DNA

- [1833] <213> 人工序列
[1834] <220>
[1835] <223> 合成序列
[1836] <400> 225
[1837] ccatgcacca gctaccc 17
[1838] <210> 226
[1839] <211> 20
[1840] <212> DNA
[1841] <213> 人工序列
[1842] <220>
[1843] <223> 合成序列
[1844] <400> 226
[1845] aactgtaccc tactcccagc 20
[1846] <210> 227
[1847] <211> 21
[1848] <212> DNA
[1849] <213> 人工序列
[1850] <220>
[1851] <223> 合成序列
[1852] <400> 227
[1853] aggaccaagg gaccagttta g 21
[1854] <210> 228
[1855] <211> 22
[1856] <212> DNA
[1857] <213> 人工序列
[1858] <220>
[1859] <223> 合成序列
[1860] <400> 228
[1861] agagttcctc caagaaattg cg 22
[1862] <210> 229
[1863] <211> 24
[1864] <212> DNA
[1865] <213> 人工序列
[1866] <220>
[1867] <223> 合成序列
[1868] <400> 229
[1869] acattataca gcatgctggc tatic 24
[1870] <210> 230
[1871] <211> 21

[1872] <212> DNA
[1873] <213> 人工序列
[1874] <220>
[1875] <223> 合成序列
[1876] <400> 230
[1877] gaggaagaaa gtgaggtttg c 21
[1878] <210> 231
[1879] <211> 24
[1880] <212> DNA
[1881] <213> 人工序列
[1882] <220>
[1883] <223> 合成序列
[1884] <400> 231
[1885] ctgaattatg tgcttaccaa gaggc 24
[1886] <210> 232
[1887] <211> 24
[1888] <212> DNA
[1889] <213> 人工序列
[1890] <220>
[1891] <223> 合成序列
[1892] <400> 232
[1893] tgggttctga taaccttattc aaggc 24
[1894] <210> 233
[1895] <211> 19
[1896] <212> DNA
[1897] <213> 人工序列
[1898] <220>
[1899] <223> 合成序列
[1900] <400> 233
[1901] ggtagtcaa acatgctgc 19
[1902] <210> 234
[1903] <211> 22
[1904] <212> DNA
[1905] <213> 人工序列
[1906] <220>
[1907] <223> 合成序列
[1908] <400> 234
[1909] gacactggca gaatcaaattc ac 22
[1910] <210> 235

[1911]	<211> 24
[1912]	<212> DNA
[1913]	<213> 人工序列
[1914]	<220>
[1915]	<223> 合成序列
[1916]	<400> 235
[1917]	agagttacac ctttagctaa ccac 24
[1918]	<210> 236
[1919]	<211> 18
[1920]	<212> DNA
[1921]	<213> 人工序列
[1922]	<220>
[1923]	<223> 合成序列
[1924]	<400> 236
[1925]	ccaggagttc aagaagcg 18
[1926]	<210> 237
[1927]	<211> 21
[1928]	<212> DNA
[1929]	<213> 人工序列
[1930]	<220>
[1931]	<223> 合成序列
[1932]	<400> 237
[1933]	accactcctt tctcccatct c 21
[1934]	<210> 238
[1935]	<211> 24
[1936]	<212> DNA
[1937]	<213> 人工序列
[1938]	<220>
[1939]	<223> 合成序列
[1940]	<400> 238
[1941]	gtcttatggg acaatggttg atag 24
[1942]	<210> 239
[1943]	<211> 18
[1944]	<212> DNA
[1945]	<213> 人工序列
[1946]	<220>
[1947]	<223> 合成序列
[1948]	<400> 239
[1949]	ctaccctcaa ccctcgtc 18

[1950]	<210> 240
[1951]	<211> 18
[1952]	<212> DNA
[1953]	<213> 人工序列
[1954]	<220>
[1955]	<223> 合成序列
[1956]	<400> 240
[1957]	ccaagactga tcatgccg 18
[1958]	<210> 241
[1959]	<211> 20
[1960]	<212> DNA
[1961]	<213> 人工序列
[1962]	<220>
[1963]	<223> 合成序列
[1964]	<400> 241
[1965]	agaccagcac aacttactta 20
[1966]	<210> 242
[1967]	<211> 17
[1968]	<212> DNA
[1969]	<213> 人工序列
[1970]	<220>
[1971]	<223> 合成序列
[1972]	<400> 242
[1973]	ccaaattcac ctgccca 17
[1974]	<210> 243
[1975]	<211> 21
[1976]	<212> DNA
[1977]	<213> 人工序列
[1978]	<220>
[1979]	<223> 合成序列
[1980]	<400> 243
[1981]	agtttggaca aaggcgattt a 21
[1982]	<210> 244
[1983]	<211> 24
[1984]	<212> DNA
[1985]	<213> 人工序列
[1986]	<220>
[1987]	<223> 合成序列
[1988]	<400> 244

[1989] tgagcttagc caatatcaac aaga 24
[1990] <210> 245
[1991] <211> 22
[1992] <212> DNA
[1993] <213> 人工序列
[1994] <220>
[1995] <223> 合成序列
[1996] <400> 245
[1997] acgtgaactt tccttggtta at 22
[1998] <210> 246
[1999] <211> 24
[2000] <212> DNA
[2001] <213> 人工序列
[2002] <220>
[2003] <223> 合成序列
[2004] <400> 246
[2005] tgaagatggtt ctaatacctt gcta 24
[2006] <210> 247
[2007] <211> 18
[2008] <212> DNA
[2009] <213> 人工序列
[2010] <220>
[2011] <223> 合成序列
[2012] <400> 247
[2013] cagtgtggag accgaaca 18
[2014] <210> 248
[2015] <211> 23
[2016] <212> DNA
[2017] <213> 人工序列
[2018] <220>
[2019] <223> 合成序列
[2020] <400> 248
[2021] aggcagggtta atgtcatgaa gtt 23
[2022] <210> 249
[2023] <211> 17
[2024] <212> DNA
[2025] <213> 人工序列
[2026] <220>
[2027] <223> 合成序列

[2028]	<400> 249
[2029]	gattgtctgg agggctc 17
[2030]	<210> 250
[2031]	<211> 16
[2032]	<212> DNA
[2033]	<213> 人工序列
[2034]	<220>
[2035]	<223> 合成序列
[2036]	<400> 250
[2037]	aggagcaat aggcta 16
[2038]	<210> 251
[2039]	<211> 17
[2040]	<212> DNA
[2041]	<213> 人工序列
[2042]	<220>
[2043]	<223> 合成序列
[2044]	<400> 251
[2045]	ctgcagggtg caagaca 17
[2046]	<210> 252
[2047]	<211> 18
[2048]	<212> DNA
[2049]	<213> 人工序列
[2050]	<220>
[2051]	<223> 合成序列
[2052]	<400> 252
[2053]	cgtatctggg aagatggg 18
[2054]	<210> 253
[2055]	<211> 20
[2056]	<212> DNA
[2057]	<213> 人工序列
[2058]	<220>
[2059]	<223> 合成序列
[2060]	<400> 253
[2061]	cctgtaatcc cttgcaataa 20
[2062]	<210> 254
[2063]	<211> 18
[2064]	<212> DNA
[2065]	<213> 人工序列
[2066]	<220>

- [2067] <223> 合成序列
- [2068] <400> 254
- [2069] ggtctcagca cggtcctt 18
- [2070] <210> 255
- [2071] <211> 17
- [2072] <212> DNA
- [2073] <213> 人工序列
- [2074] <220>
- [2075] <223> 合成序列
- [2076] <400> 255
- [2077] gcacctccct atcacat 17
- [2078] <210> 256
- [2079] <211> 21
- [2080] <212> DNA
- [2081] <213> 人工序列
- [2082] <220>
- [2083] <223> 合成序列
- [2084] <400> 256
- [2085] gcctctagct agagagaagc g 21
- [2086] <210> 257
- [2087] <211> 19
- [2088] <212> DNA
- [2089] <213> 人工序列
- [2090] <220>
- [2091] <223> 合成序列
- [2092] <400> 257
- [2093] ctggcagtct agccattat 19
- [2094] <210> 258
- [2095] <211> 23
- [2096] <212> DNA
- [2097] <213> 人工序列
- [2098] <220>
- [2099] <223> 合成序列
- [2100] <400> 258
- [2101] tgtcttagaa tttggcaact agt 23
- [2102] <210> 259
- [2103] <211> 19
- [2104] <212> DNA
- [2105] <213> 人工序列

[2106] <220>
[2107] <223> 合成序列
[2108] <400> 259
[2109] gcaggaaagc ctattgaat 19
[2110] <210> 260
[2111] <211> 19
[2112] <212> DNA
[2113] <213> 人工序列
[2114] <220>
[2115] <223> 合成序列
[2116] <400> 260
[2117] gggagccaga gaaatttct 19
[2118] <210> 261
[2119] <211> 24
[2120] <212> DNA
[2121] <213> 人工序列
[2122] <220>
[2123] <223> 合成序列
[2124] <400> 261
[2125] tgtctccagt tccacttcat gtaa 24
[2126] <210> 262
[2127] <211> 19
[2128] <212> DNA
[2129] <213> 人工序列
[2130] <220>
[2131] <223> 合成序列
[2132] <400> 262
[2133] cccgttaatt gcctattta 19
[2134] <210> 263
[2135] <211> 18
[2136] <212> DNA
[2137] <213> 人工序列
[2138] <220>
[2139] <223> 合成序列
[2140] <400> 263
[2141] ctcggtccca ctgggaaa 18
[2142] <210> 264
[2143] <211> 21
[2144] <212> DNA

[2145] <213> 人工序列
[2146] <220>
[2147] <223> 合成序列
[2148] <400> 264
[2149] acacccatga ttcagttacc a 21
[2150] <210> 265
[2151] <211> 21
[2152] <212> DNA
[2153] <213> 人工序列
[2154] <220>
[2155] <223> 合成序列
[2156] <400> 265
[2157] gctagtatga acatcacaag t 21
[2158] <210> 266
[2159] <211> 23
[2160] <212> DNA
[2161] <213> 人工序列
[2162] <220>
[2163] <223> 合成序列
[2164] <400> 266
[2165] acaaatgagt aagaagcgag tta 23
[2166] <210> 267
[2167] <211> 18
[2168] <212> DNA
[2169] <213> 人工序列
[2170] <220>
[2171] <223> 合成序列
[2172] <400> 267
[2173] gataagggtt gctctaca 18
[2174] <210> 268
[2175] <211> 17
[2176] <212> DNA
[2177] <213> 人工序列
[2178] <220>
[2179] <223> 合成序列
[2180] <400> 268
[2181] ccatgcacca gctacta 17
[2182] <210> 269
[2183] <211> 20

[2184]	<212> DNA
[2185]	<213> 人工序列
[2186]	<220>
[2187]	<223> 合成序列
[2188]	<400> 269
[2189]	aactgtaccc tactcccaat 20
[2190]	<210> 270
[2191]	<211> 21
[2192]	<212> DNA
[2193]	<213> 人工序列
[2194]	<220>
[2195]	<223> 合成序列
[2196]	<400> 270
[2197]	aggaccaagg gaccagttca c 21
[2198]	<210> 271
[2199]	<211> 22
[2200]	<212> DNA
[2201]	<213> 人工序列
[2202]	<220>
[2203]	<223> 合成序列
[2204]	<400> 271
[2205]	agagttcctc caagaaattg ta 22
[2206]	<210> 272
[2207]	<211> 24
[2208]	<212> DNA
[2209]	<213> 人工序列
[2210]	<220>
[2211]	<223> 合成序列
[2212]	<400> 272
[2213]	acattataca gcatgctggg taga 24
[2214]	<210> 273
[2215]	<211> 21
[2216]	<212> DNA
[2217]	<213> 人工序列
[2218]	<220>
[2219]	<223> 合成序列
[2220]	<400> 273
[2221]	gaggaagaaa gtgagatttg t 21
[2222]	<210> 274

[2223]	<211> 24
[2224]	<212> DNA
[2225]	<213> 人工序列
[2226]	<220>
[2227]	<223> 合成序列
[2228]	<400> 274
[2229]	ctgaattatg tgcttaccag gagt 24
[2230]	<210> 275
[2231]	<211> 24
[2232]	<212> DNA
[2233]	<213> 人工序列
[2234]	<220>
[2235]	<223> 合成序列
[2236]	<400> 275
[2237]	tgggttctga taaccttata aact 24
[2238]	<210> 276
[2239]	<211> 19
[2240]	<212> DNA
[2241]	<213> 人工序列
[2242]	<220>
[2243]	<223> 合成序列
[2244]	<400> 276
[2245]	ggttagtcaa acatgttgt 19
[2246]	<210> 277
[2247]	<211> 22
[2248]	<212> DNA
[2249]	<213> 人工序列
[2250]	<220>
[2251]	<223> 合成序列
[2252]	<400> 277
[2253]	gacactggca gaatcaaacc aa 22
[2254]	<210> 278
[2255]	<211> 24
[2256]	<212> DNA
[2257]	<213> 人工序列
[2258]	<220>
[2259]	<223> 合成序列
[2260]	<400> 278
[2261]	agagttacac ctttagctaa ctag 24

[2262]	<210> 279
[2263]	<211> 18
[2264]	<212> DNA
[2265]	<213> 人工序列
[2266]	<220>
[2267]	<223> 合成序列
[2268]	<400> 279
[2269]	ccaggagttc aaggagca 18
[2270]	<210> 280
[2271]	<211> 21
[2272]	<212> DNA
[2273]	<213> 人工序列
[2274]	<220>
[2275]	<223> 合成序列
[2276]	<400> 280
[2277]	accactcctt tctcccgtct t 21
[2278]	<210> 281
[2279]	<211> 24
[2280]	<212> DNA
[2281]	<213> 人工序列
[2282]	<220>
[2283]	<223> 合成序列
[2284]	<400> 281
[2285]	gtcttatggg acaatggtcg atat 24
[2286]	<210> 282
[2287]	<211> 18
[2288]	<212> DNA
[2289]	<213> 人工序列
[2290]	<220>
[2291]	<223> 合成序列
[2292]	<400> 282
[2293]	ctaccctcaa ccctcatt 18
[2294]	<210> 283
[2295]	<211> 18
[2296]	<212> DNA
[2297]	<213> 人工序列
[2298]	<220>
[2299]	<223> 合成序列
[2300]	<400> 283

[2301] ccaagactga tcattgcta 18
[2302] <210> 284
[2303] <211> 21
[2304] <212> DNA
[2305] <213> 人工序列
[2306] <220>
[2307] <223> 合成序列
[2308] <400> 284
[2309] cacttgacaa agttctcacg c 21
[2310] <210> 285
[2311] <211> 21
[2312] <212> DNA
[2313] <213> 人工序列
[2314] <220>
[2315] <223> 合成序列
[2316] <400> 285
[2317] cattagggat taacggcttg g 21
[2318] <210> 286
[2319] <211> 23
[2320] <212> DNA
[2321] <213> 人工序列
[2322] <220>
[2323] <223> 合成序列
[2324] <400> 286
[2325] cacacgttaa gaagactttc tgc 23
[2326] <210> 287
[2327] <211> 22
[2328] <212> DNA
[2329] <213> 人工序列
[2330] <220>
[2331] <223> 合成序列
[2332] <400> 287
[2333] ctaagtgcce tccatgagaa ag 22
[2334] <210> 288
[2335] <211> 20
[2336] <212> DNA
[2337] <213> 人工序列
[2338] <220>
[2339] <223> 合成序列

[2340] <400> 288
[2341] gcacagattt cccacactct 20
[2342] <210> 289
[2343] <211> 21
[2344] <212> DNA
[2345] <213> 人工序列
[2346] <220>
[2347] <223> 合成序列
[2348] <400> 289
[2349] cttacaggag gtctggcatc a 21
[2350] <210> 290
[2351] <211> 19
[2352] <212> DNA
[2353] <213> 人工序列
[2354] <220>
[2355] <223> 合成序列
[2356] <400> 290
[2357] ccacaatgag aaggcagag 19
[2358] <210> 291
[2359] <211> 20
[2360] <212> DNA
[2361] <213> 人工序列
[2362] <220>
[2363] <223> 合成序列
[2364] <400> 291
[2365] gctgtggcat agctacactc 20
[2366] <210> 292
[2367] <211> 20
[2368] <212> DNA
[2369] <213> 人工序列
[2370] <220>
[2371] <223> 合成序列
[2372] <400> 292
[2373] cagggttaatt tgtgggtctg 20
[2374] <210> 293
[2375] <211> 22
[2376] <212> DNA
[2377] <213> 人工序列
[2378] <220>

- [2379] <223> 合成序列
[2380] <400> 293
[2381] gggctatcca gaaagataag aa 22
[2382] <210> 294
[2383] <211> 23
[2384] <212> DNA
[2385] <213> 人工序列
[2386] <220>
[2387] <223> 合成序列
[2388] <400> 294
[2389] cataactggg ggagtatttc act 23
[2390] <210> 295
[2391] <211> 24
[2392] <212> DNA
[2393] <213> 人工序列
[2394] <220>
[2395] <223> 合成序列
[2396] <400> 295
[2397] cttcaaggaa gaaattcaac aggg 24
[2398] <210> 296
[2399] <211> 22
[2400] <212> DNA
[2401] <213> 人工序列
[2402] <220>
[2403] <223> 合成序列
[2404] <400> 296
[2405] catggattca acacagcaaa ca 22
[2406] <210> 297
[2407] <211> 22
[2408] <212> DNA
[2409] <213> 人工序列
[2410] <220>
[2411] <223> 合成序列
[2412] <400> 297
[2413] ctctgacctc cttcactctt ac 22
[2414] <210> 298
[2415] <211> 22
[2416] <212> DNA
[2417] <213> 人工序列

[2418] <220>
[2419] <223> 合成序列
[2420] <400> 298
[2421] gcttttcattt gtgctaaacc tc 22
[2422] <210> 299
[2423] <211> 18
[2424] <212> DNA
[2425] <213> 人工序列
[2426] <220>
[2427] <223> 合成序列
[2428] <400> 299
[2429] catcccagat gccctcat 18
[2430] <210> 300
[2431] <211> 22
[2432] <212> DNA
[2433] <213> 人工序列
[2434] <220>
[2435] <223> 合成序列
[2436] <400> 300
[2437] gtagaaatcc caaggcaatc ag 22
[2438] <210> 301
[2439] <211> 23
[2440] <212> DNA
[2441] <213> 人工序列
[2442] <220>
[2443] <223> 合成序列
[2444] <400> 301
[2445] gaacaactaa ctccacagaa ccc 23
[2446] <210> 302
[2447] <211> 19
[2448] <212> DNA
[2449] <213> 人工序列
[2450] <220>
[2451] <223> 合成序列
[2452] <400> 302
[2453] gtgcagagga caggaagaa 19
[2454] <210> 303
[2455] <211> 23
[2456] <212> DNA

- [2457] <213> 人工序列
[2458] <220>
[2459] <223> 合成序列
[2460] <400> 303
[2461] ggtgcttcaa gacatacacc tta 23
[2462] <210> 304
[2463] <211> 20
[2464] <212> DNA
[2465] <213> 人工序列
[2466] <220>
[2467] <223> 合成序列
[2468] <400> 304
[2469] ggaacctctg tgaccttgga 20
[2470] <210> 305
[2471] <211> 19
[2472] <212> DNA
[2473] <213> 人工序列
[2474] <220>
[2475] <223> 合成序列
[2476] <400> 305
[2477] cccagtggta ccttctgaa 19
[2478] <210> 306
[2479] <211> 23
[2480] <212> DNA
[2481] <213> 人工序列
[2482] <220>
[2483] <223> 合成序列
[2484] <400> 306
[2485] cttctgttgc ttatttgggt aac 23
[2486] <210> 307
[2487] <211> 16
[2488] <212> DNA
[2489] <213> 人工序列
[2490] <220>
[2491] <223> 合成序列
[2492] <400> 307
[2493] ccactggat gcctcc 16
[2494] <210> 308
[2495] <211> 18

[2496] <212> DNA
[2497] <213> 人工序列
[2498] <220>
[2499] <223> 合成序列
[2500] <400> 308
[2501] cggagagacg catctgaa 18
[2502] <210> 309
[2503] <211> 21
[2504] <212> DNA
[2505] <213> 人工序列
[2506] <220>
[2507] <223> 合成序列
[2508] <400> 309
[2509] caggatttcc agcttacagg g 21
[2510] <210> 310
[2511] <211> 20
[2512] <212> DNA
[2513] <213> 人工序列
[2514] <220>
[2515] <223> 合成序列
[2516] <400> 310
[2517] cttgcaagat gtgcctctta 20
[2518] <210> 311
[2519] <211> 22
[2520] <212> DNA
[2521] <213> 人工序列
[2522] <220>
[2523] <223> 合成序列
[2524] <400> 311
[2525] ggggtggtttc tctaaacaca aa 22
[2526] <210> 312
[2527] <211> 22
[2528] <212> DNA
[2529] <213> 人工序列
[2530] <220>
[2531] <223> 合成序列
[2532] <400> 312
[2533] gcagggtatt gagagaagga tc 22
[2534] <210> 313

[2535] <211> 22
[2536] <212> DNA
[2537] <213> 人工序列
[2538] <220>
[2539] <223> 合成序列
[2540] <400> 313
[2541] gtgcacattt cttgatgaag gg 22
[2542] <210> 314
[2543] <211> 22
[2544] <212> DNA
[2545] <213> 人工序列
[2546] <220>
[2547] <223> 合成序列
[2548] <400> 314
[2549] gagcaatgcc tgtttcatga ga 22
[2550] <210> 315
[2551] <211> 24
[2552] <212> DNA
[2553] <213> 人工序列
[2554] <220>
[2555] <223> 合成序列
[2556] <400> 315
[2557] gttaacatta tacagcatgg tggc 24
[2558] <210> 316
[2559] <211> 19
[2560] <212> DNA
[2561] <213> 人工序列
[2562] <220>
[2563] <223> 合成序列
[2564] <400> 316
[2565] gcagaacatg tcctgaagc 19
[2566] <210> 317
[2567] <211> 20
[2568] <212> DNA
[2569] <213> 人工序列
[2570] <220>
[2571] <223> 合成序列
[2572] <400> 317
[2573] cagcttggtc ccaaaccat 20

[2574] <210> 318
[2575] <211> 21
[2576] <212> DNA
[2577] <213> 人工序列
[2578] <220>
[2579] <223> 合成序列
[2580] <400> 318
[2581] caaagtgtgg aagttgcttc c 21
[2582] <210> 319
[2583] <211> 18
[2584] <212> DNA
[2585] <213> 人工序列
[2586] <220>
[2587] <223> 合成序列
[2588] <400> 319
[2589] ggtcgacttt gtccatcc 18
[2590] <210> 320
[2591] <211> 19
[2592] <212> DNA
[2593] <213> 人工序列
[2594] <220>
[2595] <223> 合成序列
[2596] <400> 320
[2597] ctctgttgcc tgtggactc 19
[2598] <210> 321
[2599] <211> 24
[2600] <212> DNA
[2601] <213> 人工序列
[2602] <220>
[2603] <223> 合成序列
[2604] <400> 321
[2605] ctaactagaa ttagtctgcc tgcc 24
[2606] <210> 322
[2607] <211> 19
[2608] <212> DNA
[2609] <213> 人工序列
[2610] <220>
[2611] <223> 合成序列
[2612] <400> 322

[2613] gtgagccata atcgtgtca 19
[2614] <210> 323
[2615] <211> 23
[2616] <212> DNA
[2617] <213> 人工序列
[2618] <220>
[2619] <223> 合成序列
[2620] <400> 323
[2621] gagaattaat gctccctctc ctg 23
[2622] <210> 324
[2623] <211> 19
[2624] <212> DNA
[2625] <213> 人工序列
[2626] <220>
[2627] <223> 合成序列
[2628] <400> 324
[2629] gtggtctgct gttgaccaa 19
[2630] <210> 325
[2631] <211> 20
[2632] <212> DNA
[2633] <213> 人工序列
[2634] <220>
[2635] <223> 合成序列
[2636] <400> 325
[2637] gggtgcaact gctgatctat 20
[2638] <210> 326
[2639] <211> 18
[2640] <212> DNA
[2641] <213> 人工序列
[2642] <220>
[2643] <223> 合成序列
[2644] <400> 326
[2645] ctttcccagt caaggcag 18
[2646] <210> 327
[2647] <211> 20
[2648] <212> DNA
[2649] <213> 人工序列
[2650] <220>
[2651] <223> 合成序列

[2652] <400> 327
[2653] gccgaagttc tccgaaggat 20
[2654] <210> 328
[2655] <211> 20
[2656] <212> DNA
[2657] <213> 人工序列
[2658] <220>
[2659] <223> 合成序列
[2660] <400> 328
[2661] gacagactga cggagcttca 20
[2662] <210> 329
[2663] <211> 20
[2664] <212> DNA
[2665] <213> 人工序列
[2666] <220>
[2667] <223> 合成序列
[2668] <400> 329
[2669] tgactctgcc gcacatgatc 20
[2670] <210> 330
[2671] <211> 20
[2672] <212> DNA
[2673] <213> 人工序列
[2674] <220>
[2675] <223> 合成序列
[2676] <400> 330
[2677] gatccgatag ccctctgcag 20
[2678] <210> 331
[2679] <211> 20
[2680] <212> DNA
[2681] <213> 人工序列
[2682] <220>
[2683] <223> 合成序列
[2684] <400> 331
[2685] caacaggcct gctaaacacc 20
[2686] <210> 332
[2687] <211> 20
[2688] <212> DNA
[2689] <213> 人工序列
[2690] <220>

[2691] <223> 合成序列
[2692] <400> 332
[2693] ggtcaacaac cgagggactc 20
[2694] <210> 333
[2695] <211> 20
[2696] <212> DNA
[2697] <213> 人工序列
[2698] <220>
[2699] <223> 合成序列
[2700] <400> 333
[2701] ttgtcattaa tgctggcggc 20
[2702] <210> 334
[2703] <211> 20
[2704] <212> DNA
[2705] <213> 人工序列
[2706] <220>
[2707] <223> 合成序列
[2708] <400> 334
[2709] cggtgacggt ttgcaacttt 20
[2710] <210> 335
[2711] <211> 20
[2712] <212> DNA
[2713] <213> 人工序列
[2714] <220>
[2715] <223> 合成序列
[2716] <400> 335
[2717] gtccggcagt taagggtctc 20
[2718] <210> 336
[2719] <211> 20
[2720] <212> DNA
[2721] <213> 人工序列
[2722] <220>
[2723] <223> 合成序列
[2724] <400> 336
[2725] tactcacaaa cgactgcgca 20
[2726] <210> 337
[2727] <211> 20
[2728] <212> DNA
[2729] <213> 人工序列

[2730] <220>
[2731] <223> 合成序列
[2732] <400> 337
[2733] cgtatatggc cgactggagg 20
[2734] <210> 338
[2735] <211> 20
[2736] <212> DNA
[2737] <213> 人工序列
[2738] <220>
[2739] <223> 合成序列
[2740] <400> 338
[2741] tagggtttgc ggcgataagg 20
[2742] <210> 339
[2743] <211> 20
[2744] <212> DNA
[2745] <213> 人工序列
[2746] <220>
[2747] <223> 合成序列
[2748] <400> 339
[2749] ccaagtcaac cacccgagac 20
[2750] <210> 340
[2751] <211> 20
[2752] <212> DNA
[2753] <213> 人工序列
[2754] <220>
[2755] <223> 合成序列
[2756] <400> 340
[2757] acttccttg ccttccttct 20
[2758] <210> 341
[2759] <211> 20
[2760] <212> DNA
[2761] <213> 人工序列
[2762] <220>
[2763] <223> 合成序列
[2764] <400> 341
[2765] gcttgggtcc tctcctgaac 20
[2766] <210> 342
[2767] <211> 20
[2768] <212> DNA

[2769] <213> 人工序列
[2770] <220>
[2771] <223> 合成序列
[2772] <400> 342
[2773] aacgtccgaa ccacaatgct 20
[2774] <210> 343
[2775] <211> 20
[2776] <212> DNA
[2777] <213> 人工序列
[2778] <220>
[2779] <223> 合成序列
[2780] <400> 343
[2781] ctctctcgcat ccaacagtcg 20
[2782] <210> 344
[2783] <211> 20
[2784] <212> DNA
[2785] <213> 人工序列
[2786] <220>
[2787] <223> 合成序列
[2788] <400> 344
[2789] ccaccgtagc actccttctt 20
[2790] <210> 345
[2791] <211> 20
[2792] <212> DNA
[2793] <213> 人工序列
[2794] <220>
[2795] <223> 合成序列
[2796] <400> 345
[2797] cggagcgtcg gtagtgtaaa 20
[2798] <210> 346
[2799] <211> 20
[2800] <212> DNA
[2801] <213> 人工序列
[2802] <220>
[2803] <223> 合成序列
[2804] <400> 346
[2805] acaactcgac gaacctaccg 20
[2806] <210> 347
[2807] <211> 20

[2808] <212> DNA
[2809] <213> 人工序列
[2810] <220>
[2811] <223> 合成序列
[2812] <400> 347
[2813] tggcccatcc ttatgtgctg 20
[2814] <210> 348
[2815] <211> 20
[2816] <212> DNA
[2817] <213> 人工序列
[2818] <220>
[2819] <223> 合成序列
[2820] <400> 348
[2821] ggtcgttatt gctcaagccc 20
[2822] <210> 349
[2823] <211> 20
[2824] <212> DNA
[2825] <213> 人工序列
[2826] <220>
[2827] <223> 合成序列
[2828] <400> 349
[2829] ttgattctgg ccctcccatc 20
[2830] <210> 350
[2831] <211> 20
[2832] <212> DNA
[2833] <213> 人工序列
[2834] <220>
[2835] <223> 合成序列
[2836] <400> 350
[2837] ctcacgccgg ctatttaggt 20
[2838] <210> 351
[2839] <211> 20
[2840] <212> DNA
[2841] <213> 人工序列
[2842] <220>
[2843] <223> 合成序列
[2844] <400> 351
[2845] agtctgggta ggtggaggac 20
[2846] <210> 352

[2847] <211> 20
[2848] <212> DNA
[2849] <213> 人工序列
[2850] <220>
[2851] <223> 合成序列
[2852] <400> 352
[2853] cgactgagcc acatccaact 20
[2854] <210> 353
[2855] <211> 20
[2856] <212> DNA
[2857] <213> 人工序列
[2858] <220>
[2859] <223> 合成序列
[2860] <400> 353
[2861] gagcctcagc cggaattgaa 20
[2862] <210> 354
[2863] <211> 20
[2864] <212> DNA
[2865] <213> 人工序列
[2866] <220>
[2867] <223> 合成序列
[2868] <400> 354
[2869] ttgccattct gcaccaatgc 20
[2870] <210> 355
[2871] <211> 20
[2872] <212> DNA
[2873] <213> 人工序列
[2874] <220>
[2875] <223> 合成序列
[2876] <400> 355
[2877] tattggtggt cgcggtgat 20
[2878] <210> 356
[2879] <211> 20
[2880] <212> DNA
[2881] <213> 人工序列
[2882] <220>
[2883] <223> 合成序列
[2884] <400> 356
[2885] atgggcgtaa caggaggact 20

[2886] <210> 357
[2887] <211> 20
[2888] <212> DNA
[2889] <213> 人工序列
[2890] <220>
[2891] <223> 合成序列
[2892] <400> 357
[2893] ggaatggcct acctgcatca 20
[2894] <210> 358
[2895] <211> 20
[2896] <212> DNA
[2897] <213> 人工序列
[2898] <220>
[2899] <223> 合成序列
[2900] <400> 358
[2901] cccgttggtg tcatgcatc 20
[2902] <210> 359
[2903] <211> 20
[2904] <212> DNA
[2905] <213> 人工序列
[2906] <220>
[2907] <223> 合成序列
[2908] <400> 359
[2909] gttcgatgcg tcccatgagt 20
[2910] <210> 360
[2911] <211> 20
[2912] <212> DNA
[2913] <213> 人工序列
[2914] <220>
[2915] <223> 合成序列
[2916] <400> 360
[2917] caaccgcgt agatgttcct 20
[2918] <210> 361
[2919] <211> 20
[2920] <212> DNA
[2921] <213> 人工序列
[2922] <220>
[2923] <223> 合成序列
[2924] <400> 361

[2925] gccagctcaa gagtgtagcc 20
[2926] <210> 362
[2927] <211> 20
[2928] <212> DNA
[2929] <213> 人工序列
[2930] <220>
[2931] <223> 合成序列
[2932] <400> 362
[2933] ttcttgatcc tgcgcgatgt 20
[2934] <210> 363
[2935] <211> 20
[2936] <212> DNA
[2937] <213> 人工序列
[2938] <220>
[2939] <223> 合成序列
[2940] <400> 363
[2941] atcgcaggcg ttccctatac 20
[2942] <210> 364
[2943] <211> 20
[2944] <212> DNA
[2945] <213> 人工序列
[2946] <220>
[2947] <223> 合成序列
[2948] <400> 364
[2949] tattggacct ccgaccacga 20
[2950] <210> 365
[2951] <211> 20
[2952] <212> DNA
[2953] <213> 人工序列
[2954] <220>
[2955] <223> 合成序列
[2956] <400> 365
[2957] agccaccatt tagatccgcg 20
[2958] <210> 366
[2959] <211> 20
[2960] <212> DNA
[2961] <213> 人工序列
[2962] <220>
[2963] <223> 合成序列

[2964] <400> 366
[2965] gaccagtaga agtctgcccc 20
[2966] <210> 367
[2967] <211> 20
[2968] <212> DNA
[2969] <213> 人工序列
[2970] <220>
[2971] <223> 合成序列
[2972] <400> 367
[2973] tttcagaatg gccgagctgt 20
[2974] <210> 368
[2975] <211> 20
[2976] <212> DNA
[2977] <213> 人工序列
[2978] <220>
[2979] <223> 合成序列
[2980] <400> 368
[2981] aggtgacctt cttgtacgcc 20
[2982] <210> 369
[2983] <211> 20
[2984] <212> DNA
[2985] <213> 人工序列
[2986] <220>
[2987] <223> 合成序列
[2988] <400> 369
[2989] ggcgcgctcct tatttccatc 20

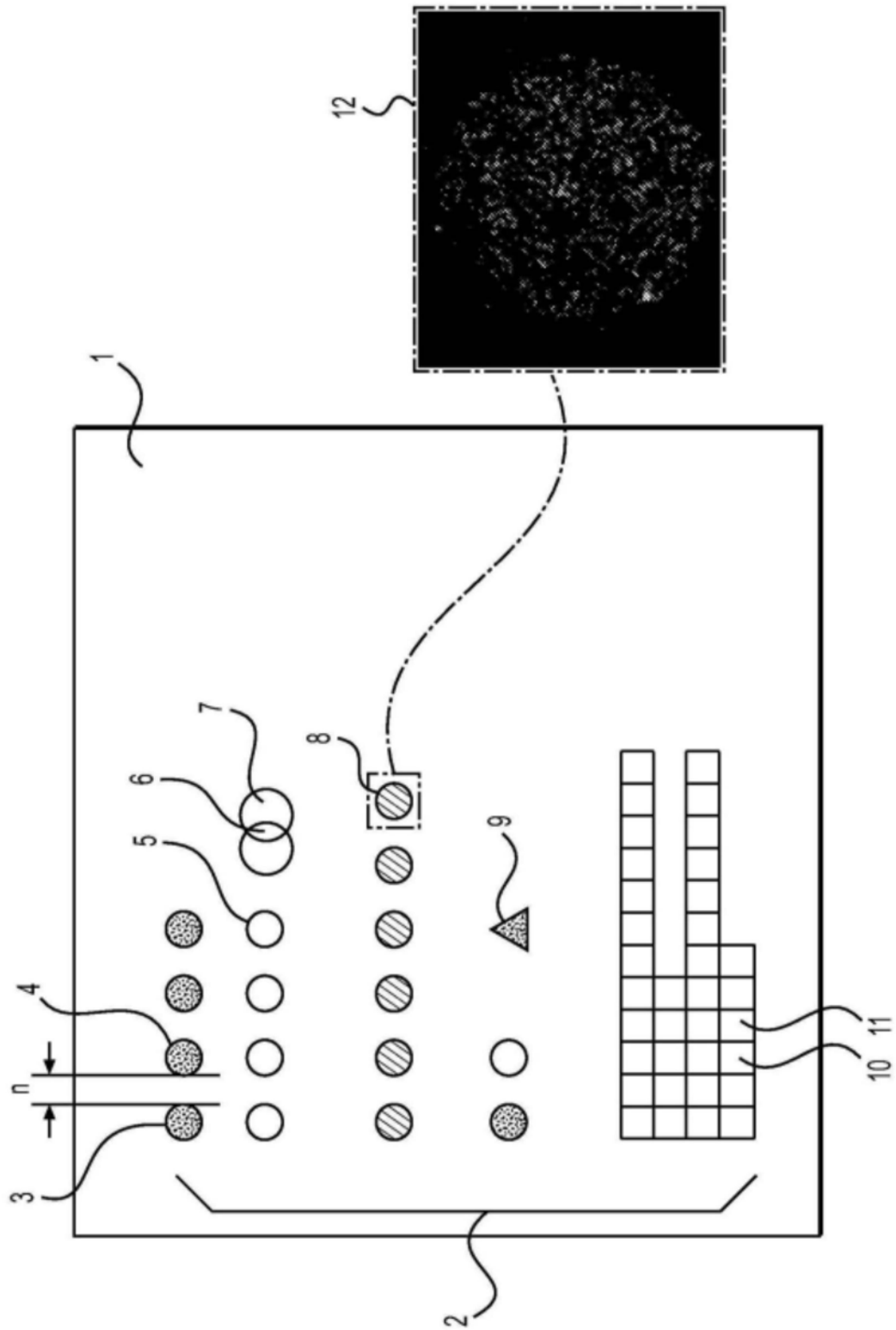


图1

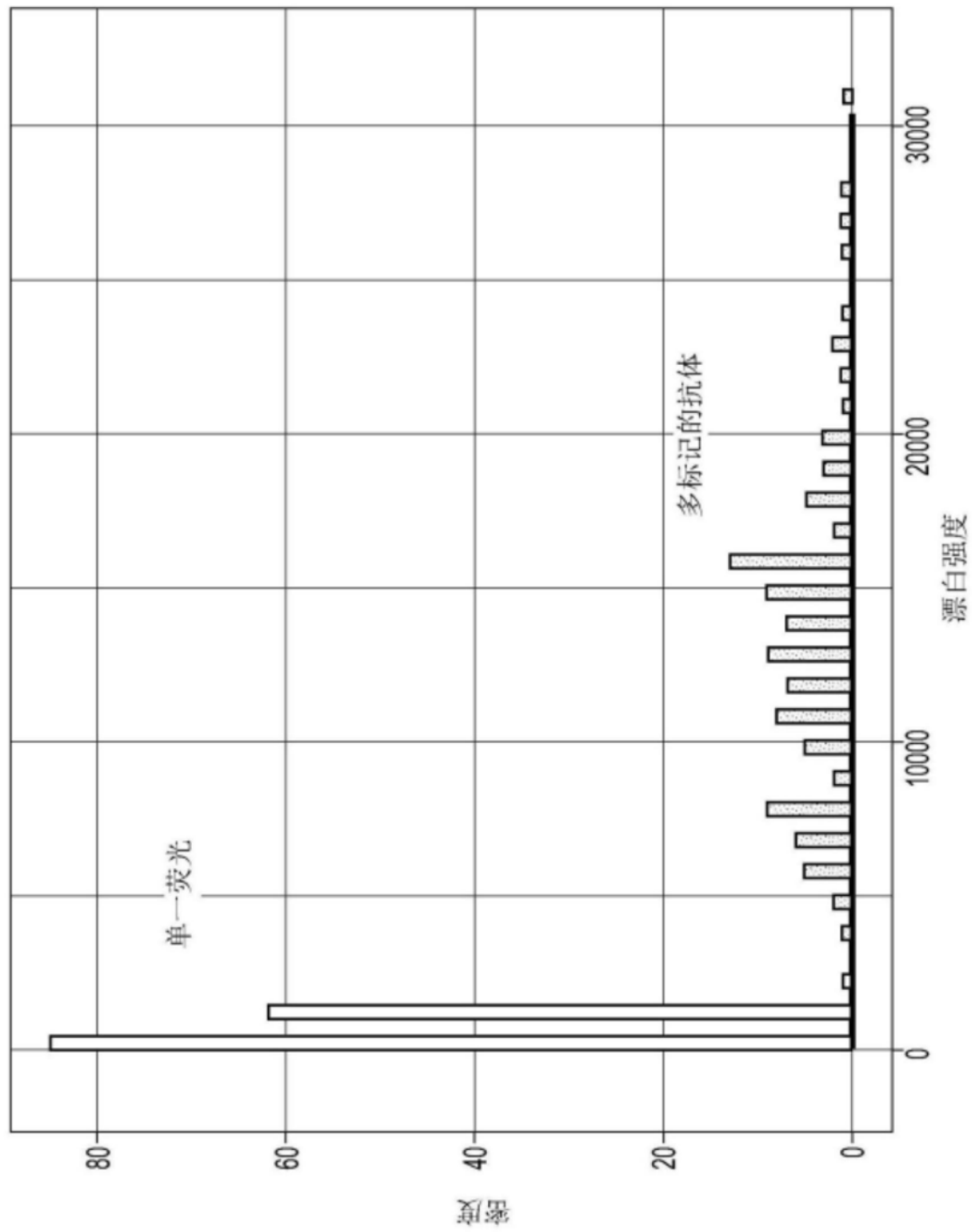


图2

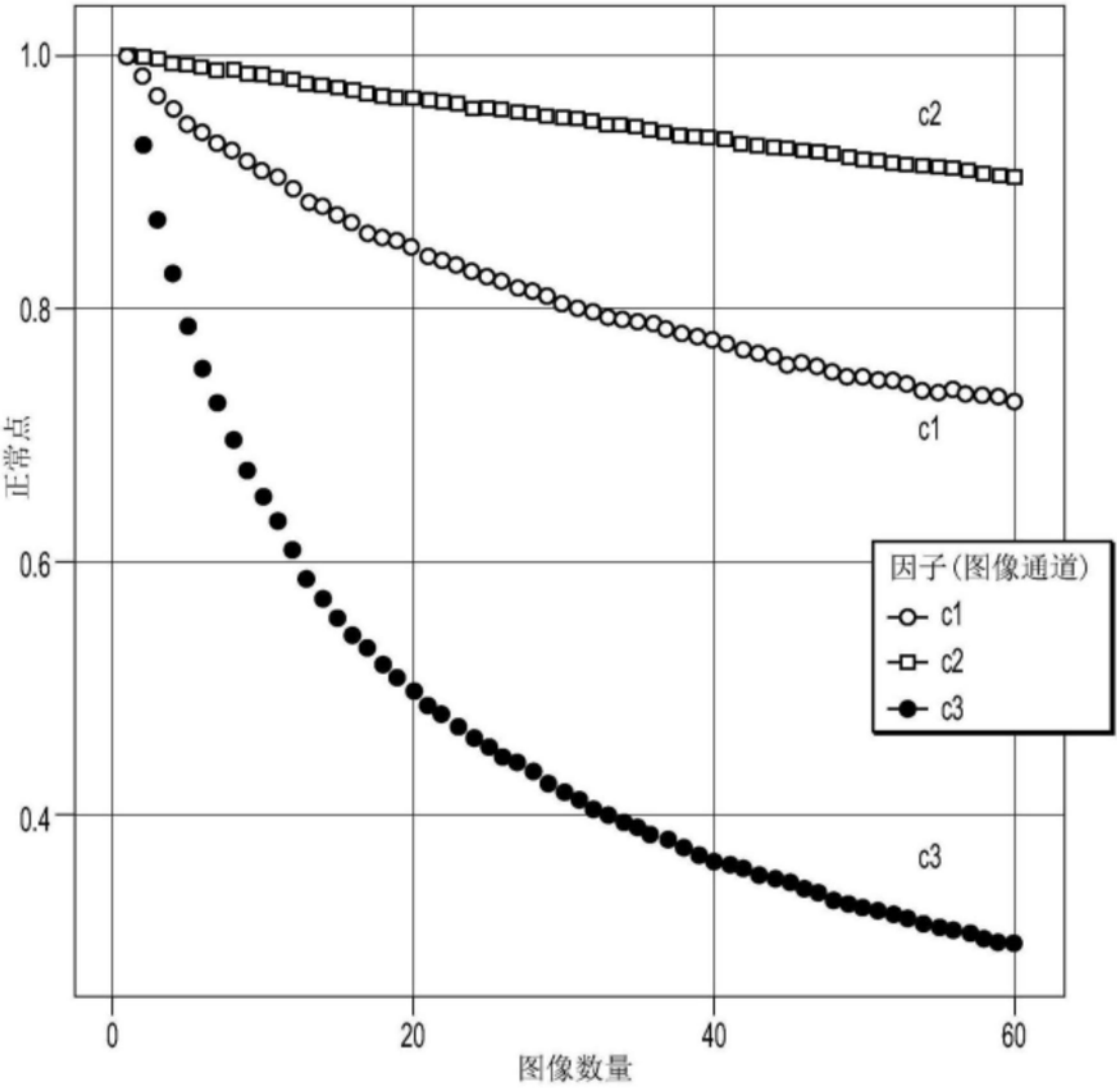


图3

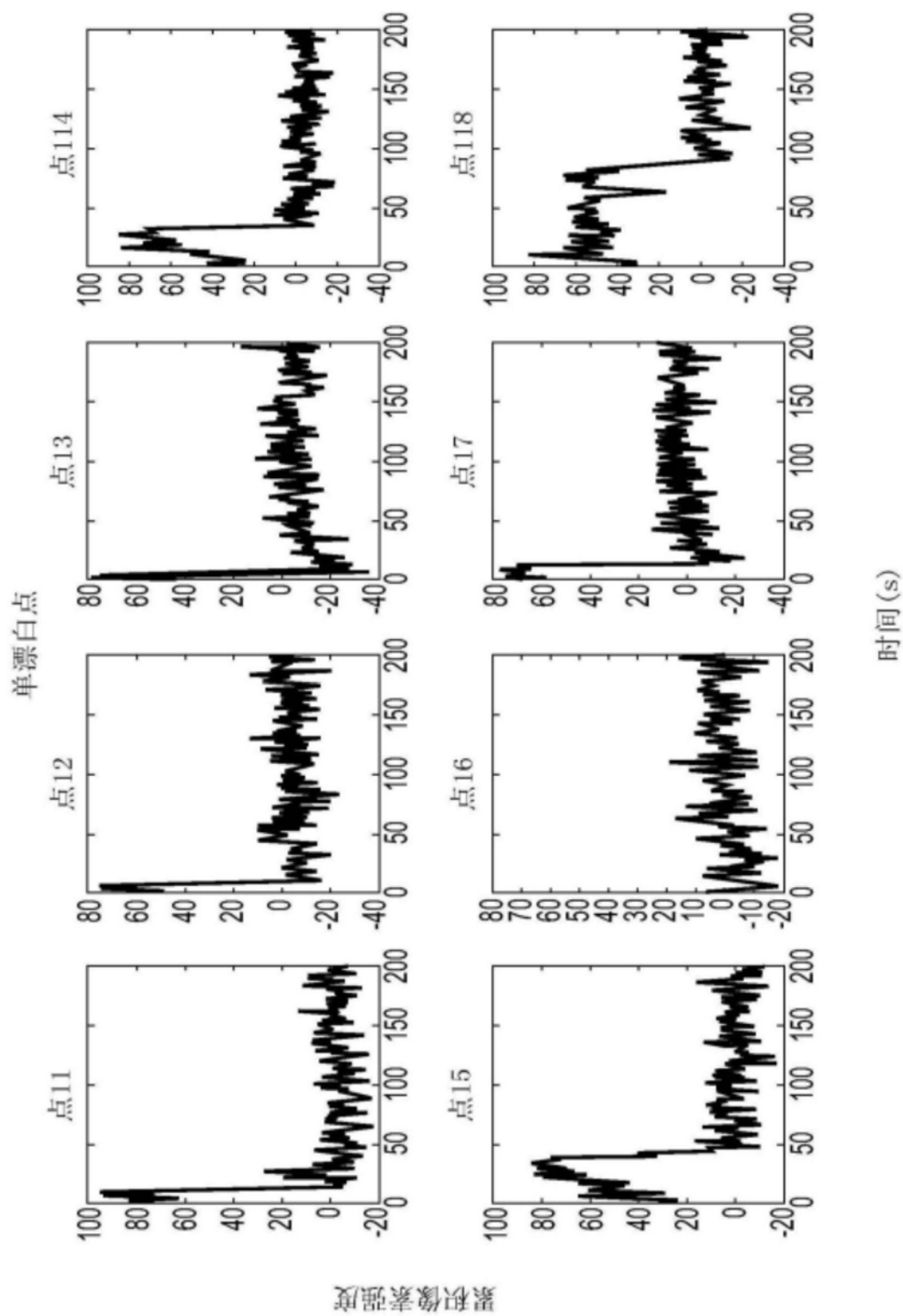


图4

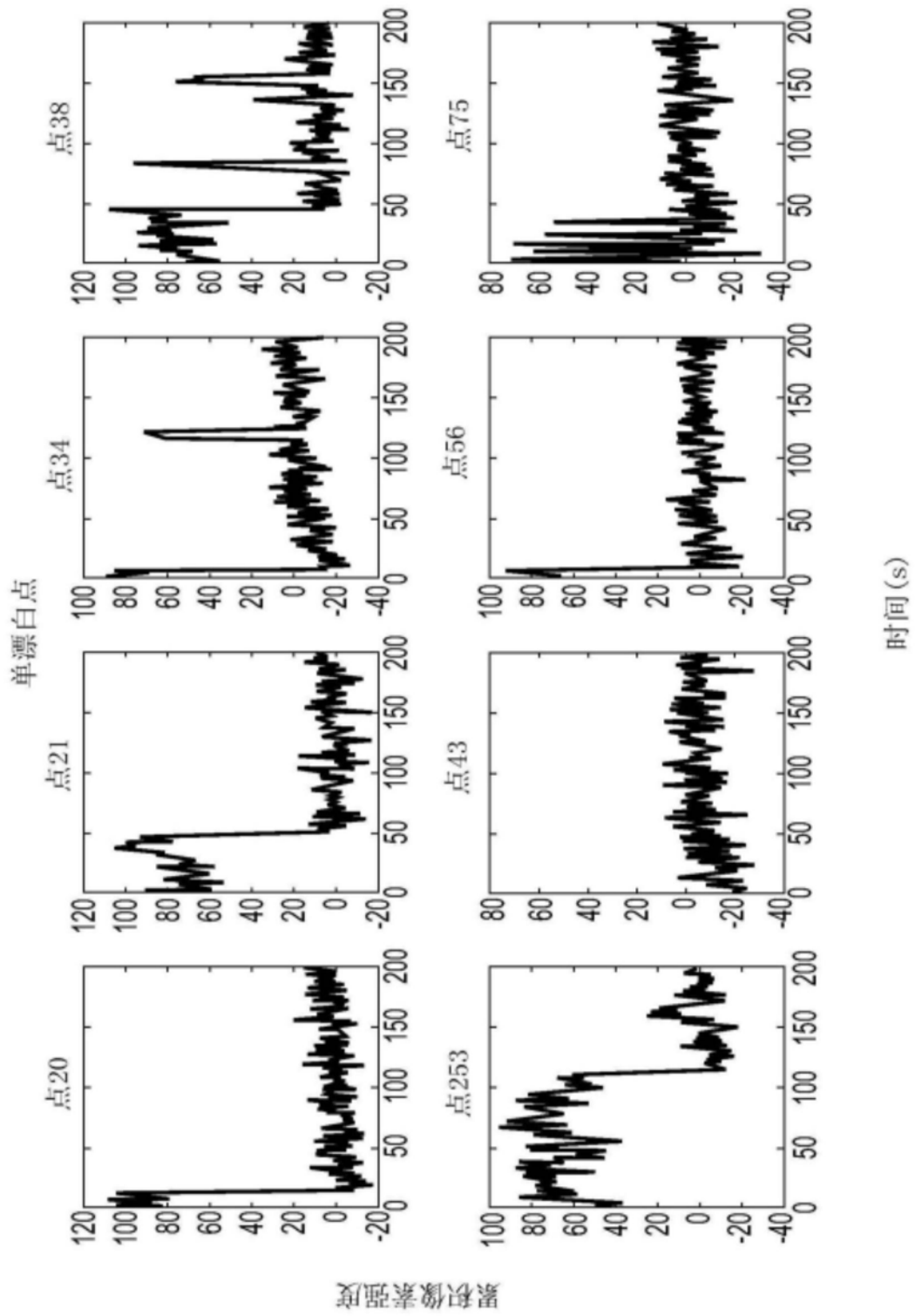


图5

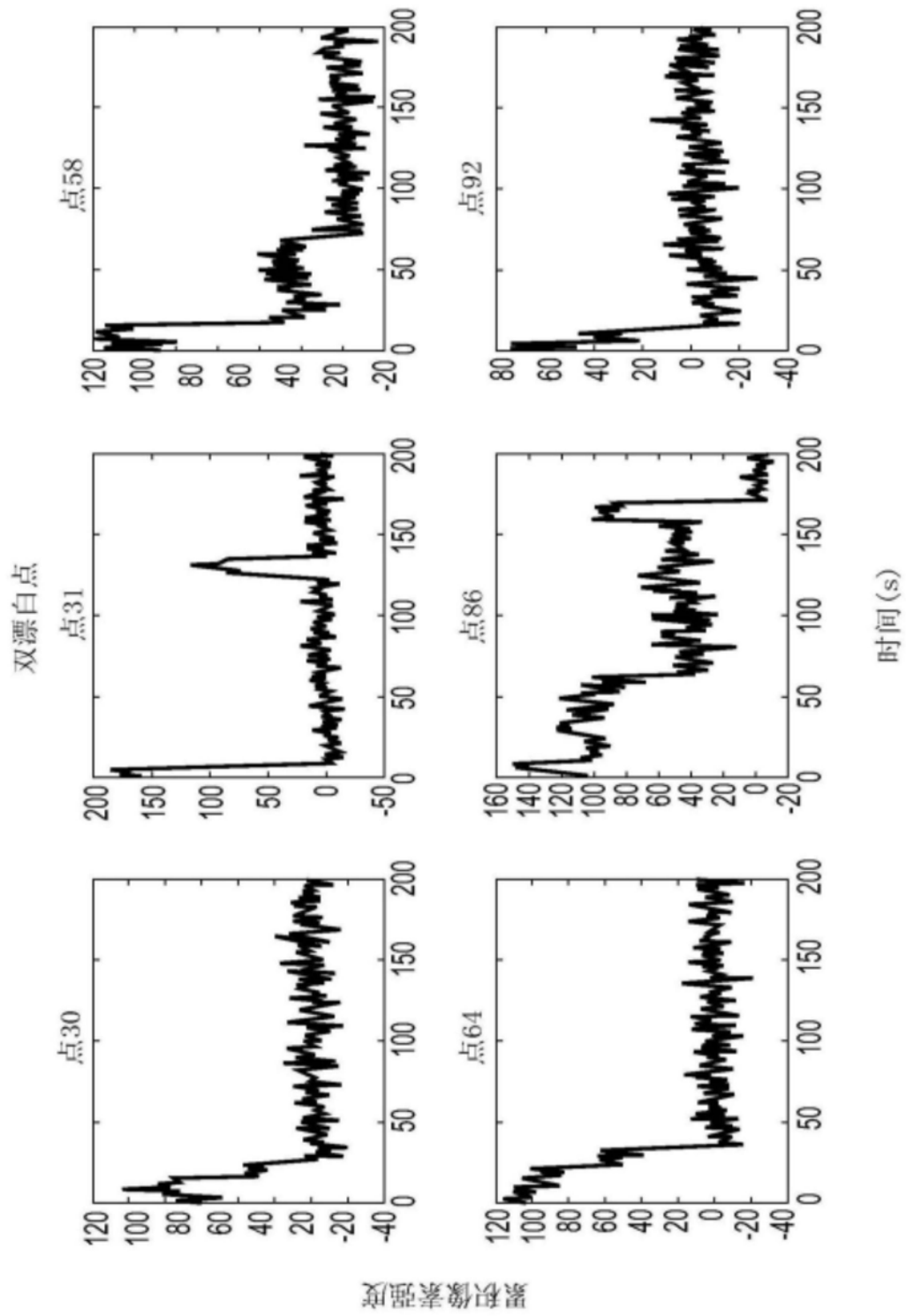


图6

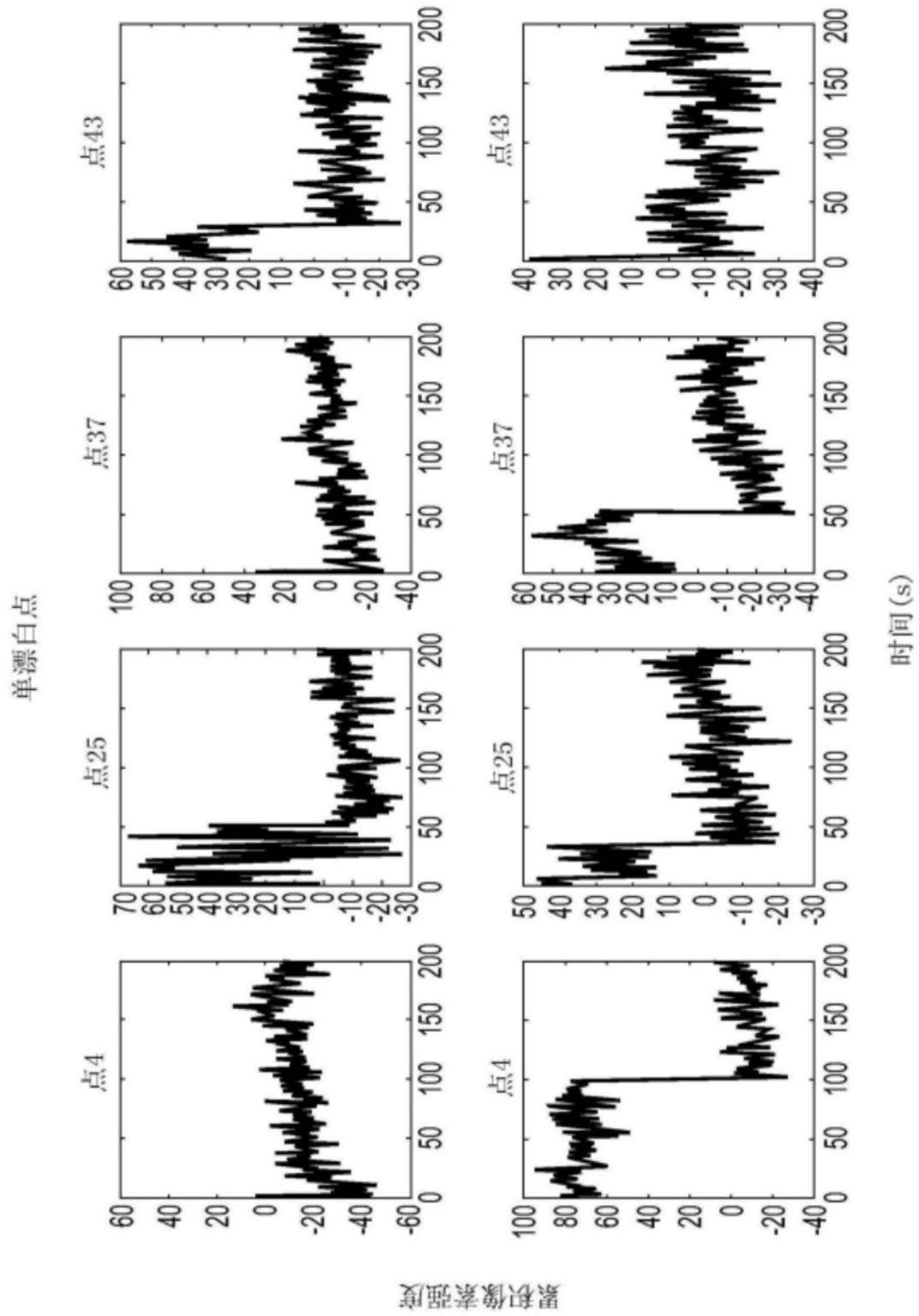


图7

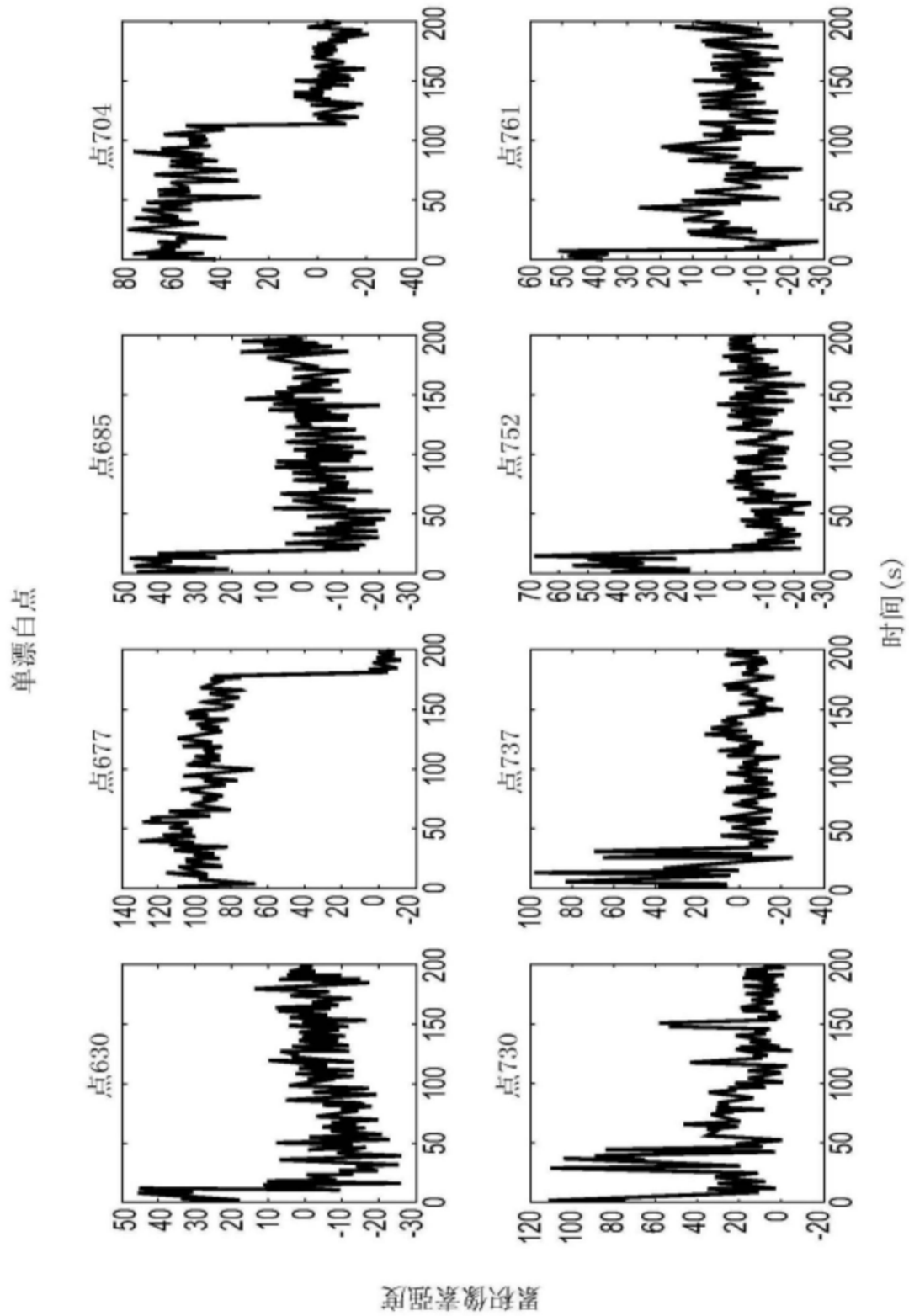


图8

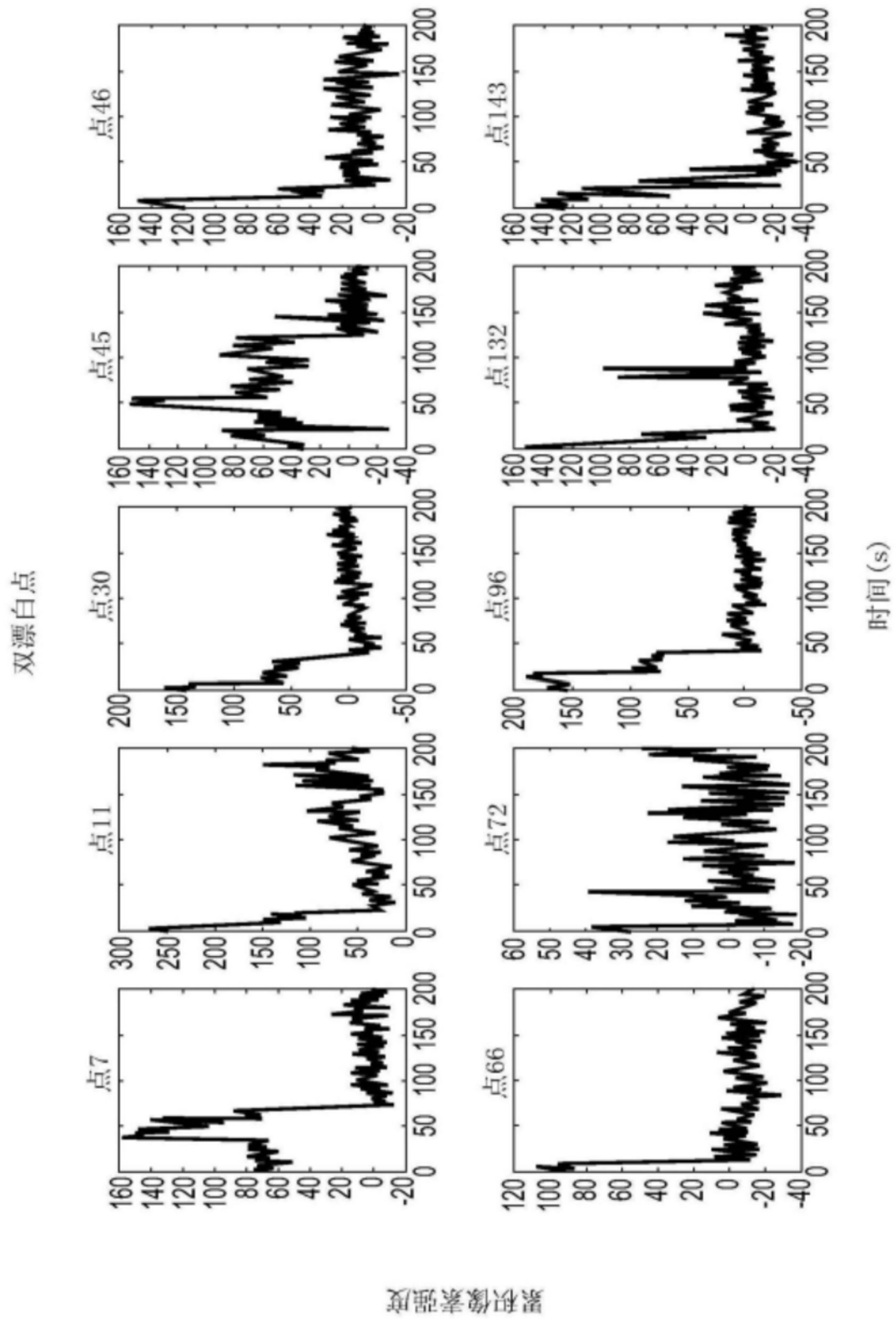


图9

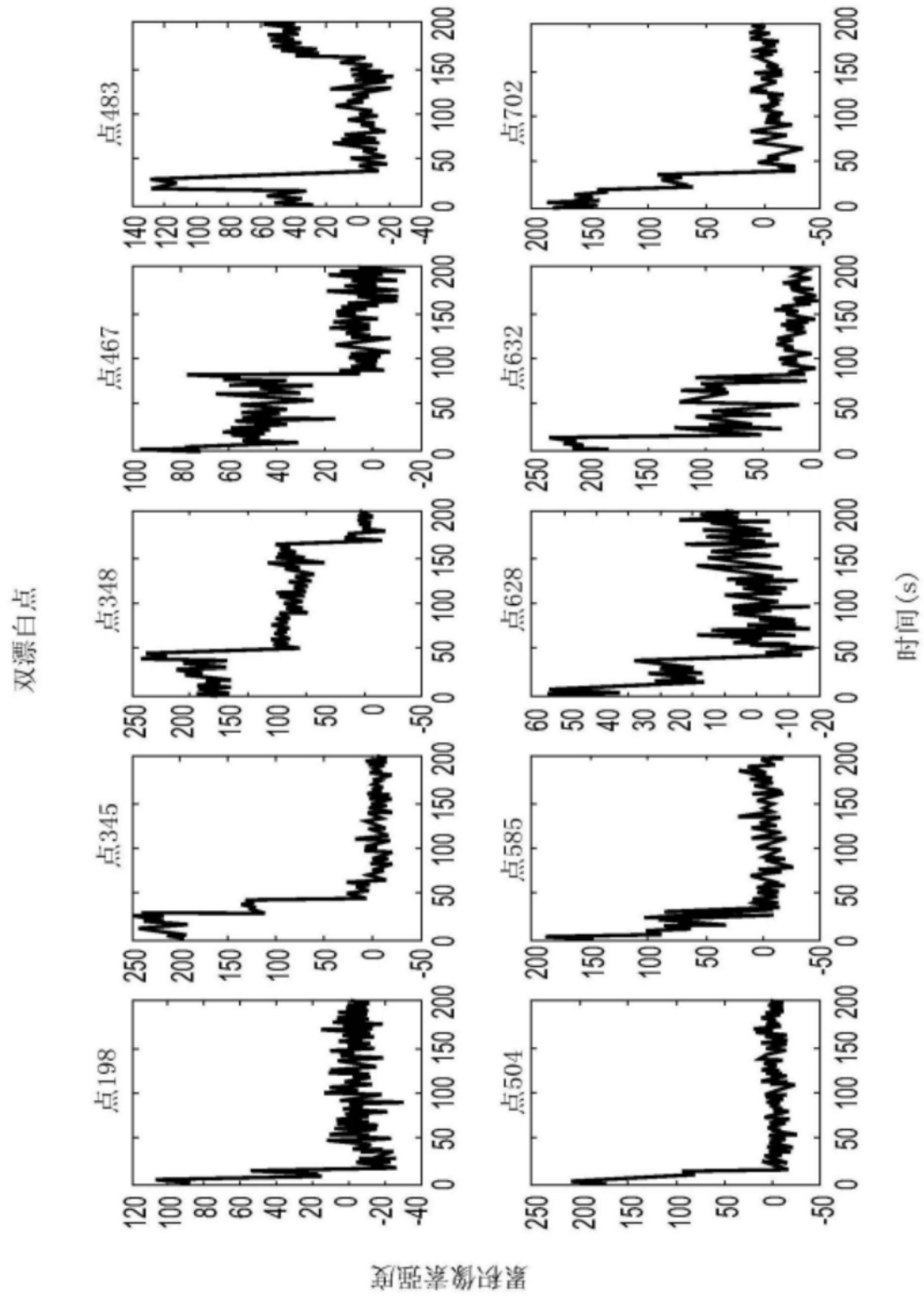


图10

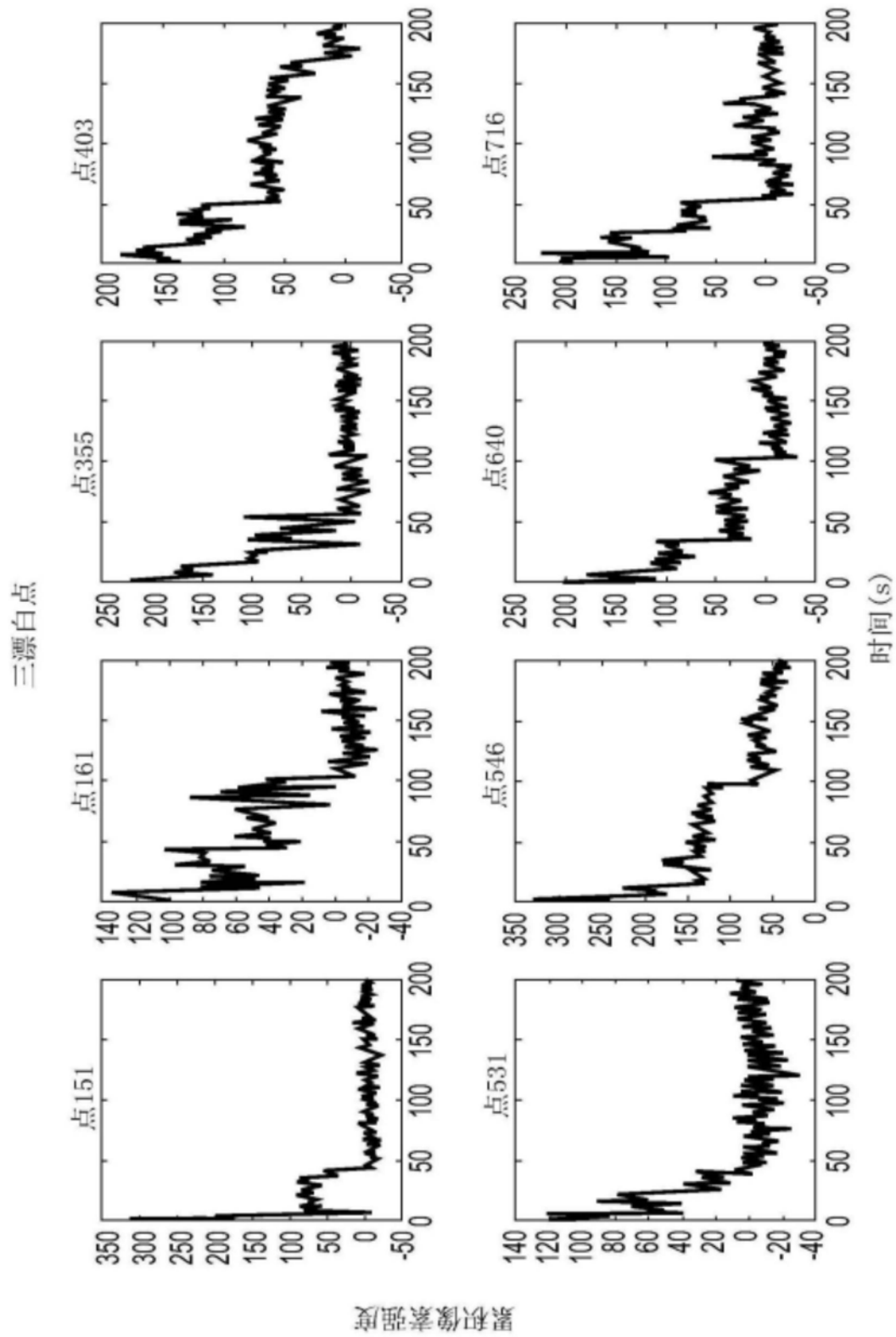


图11

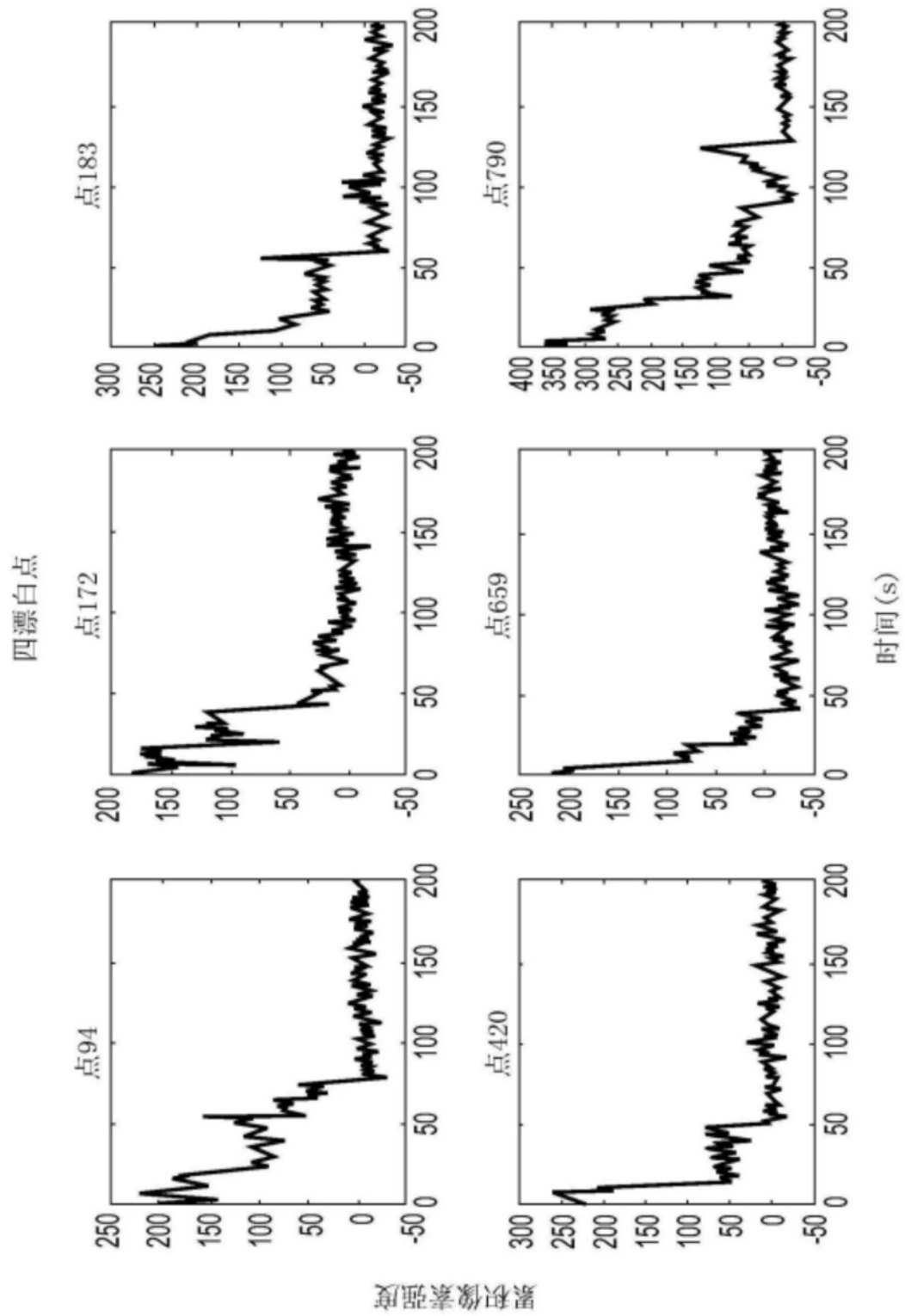


图12

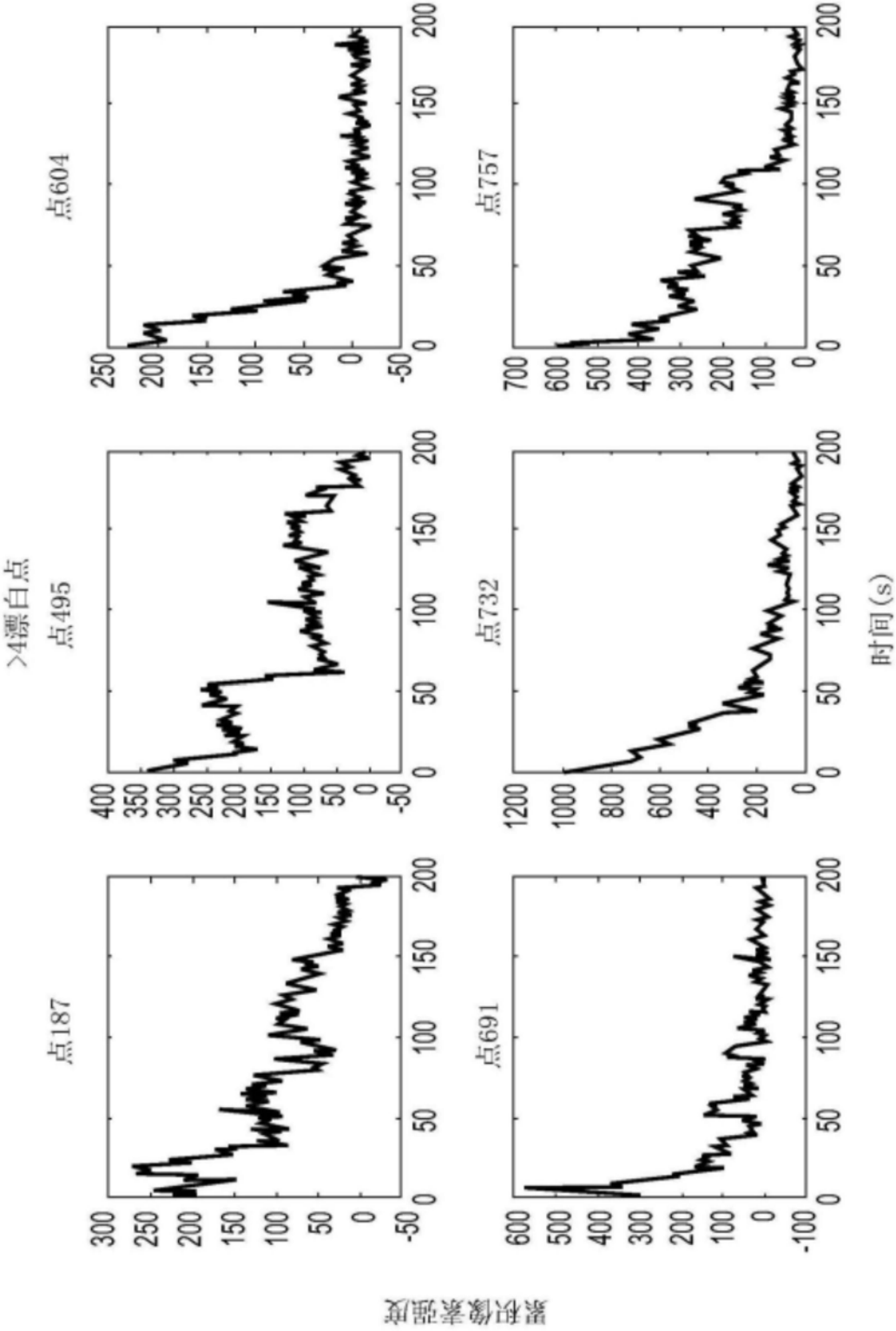


图13

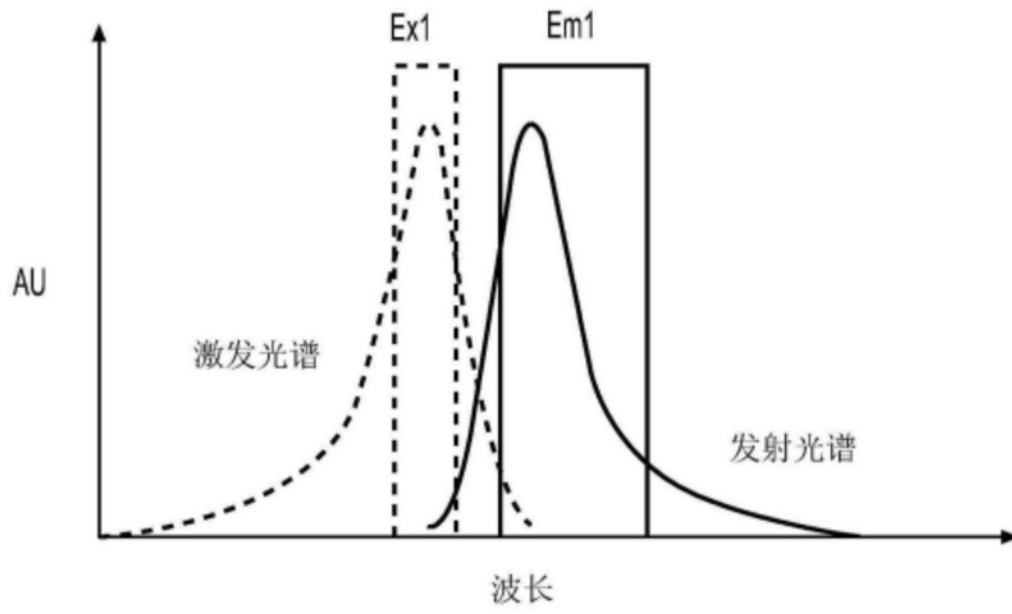


图14

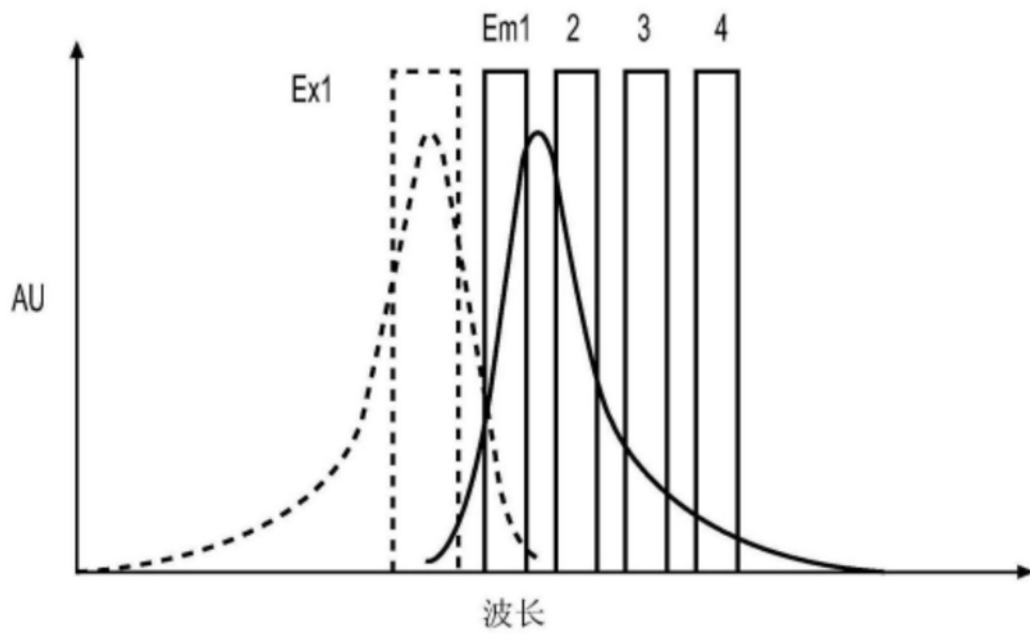


图15

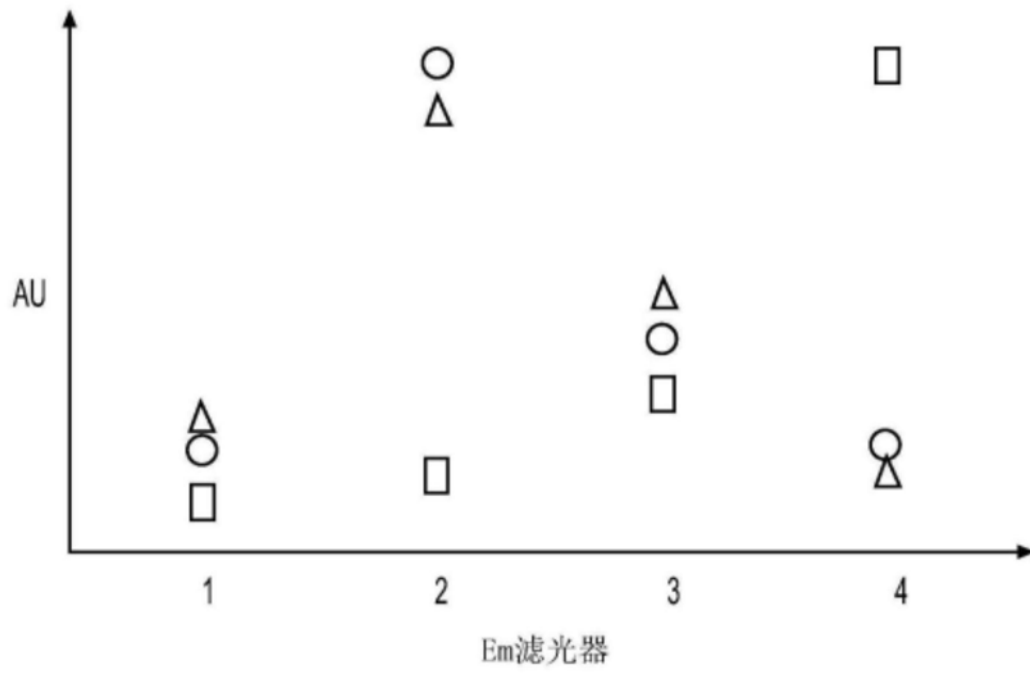


图16

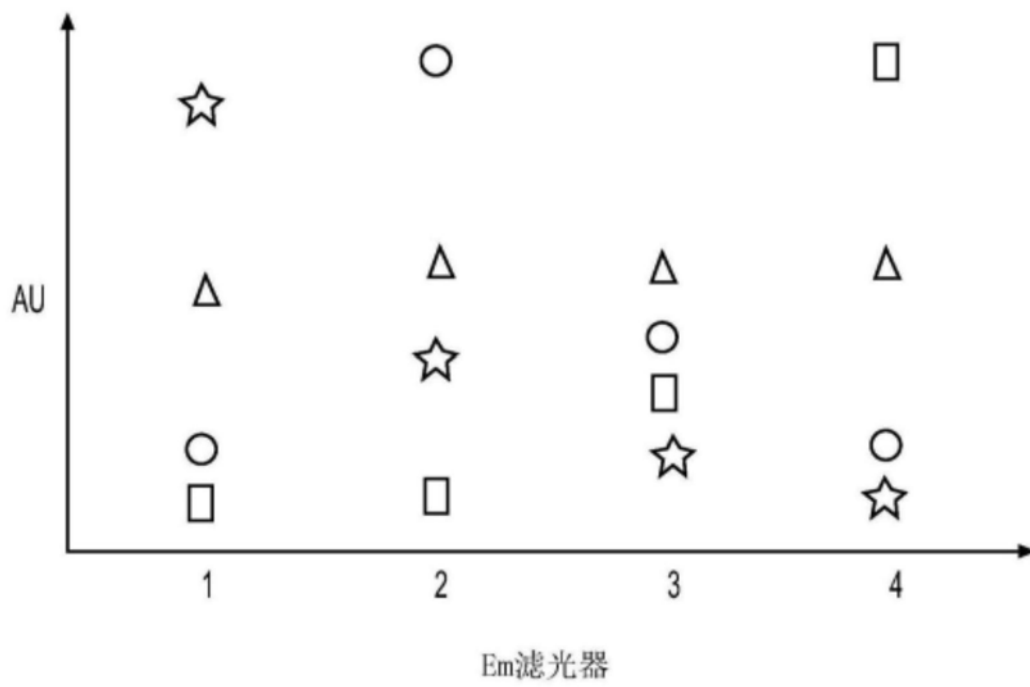


图17

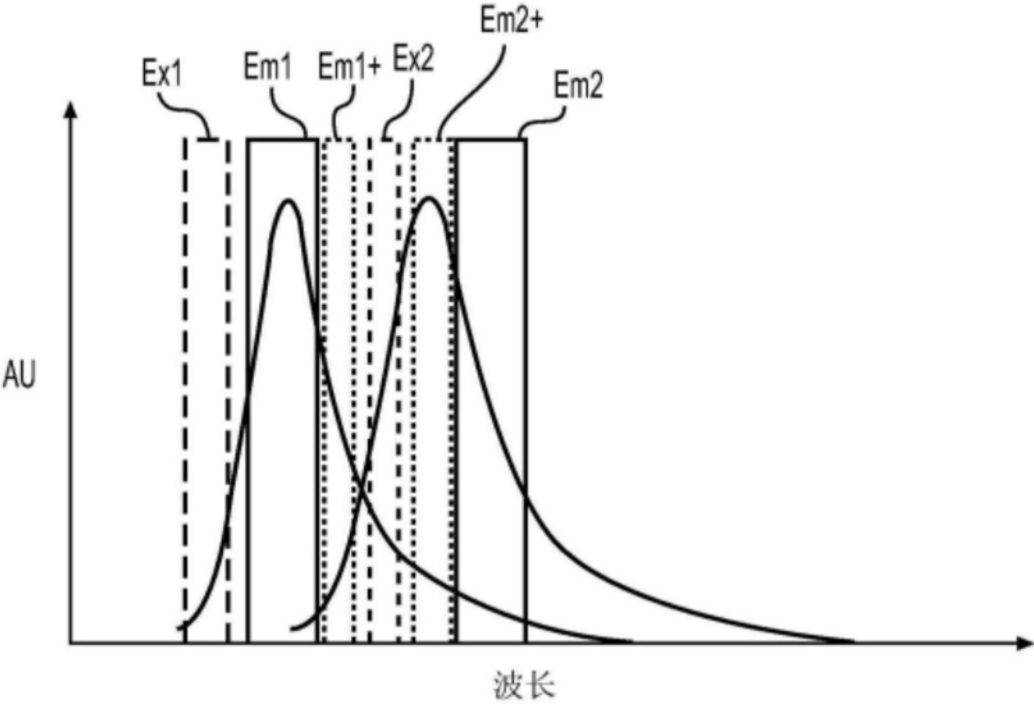


图18

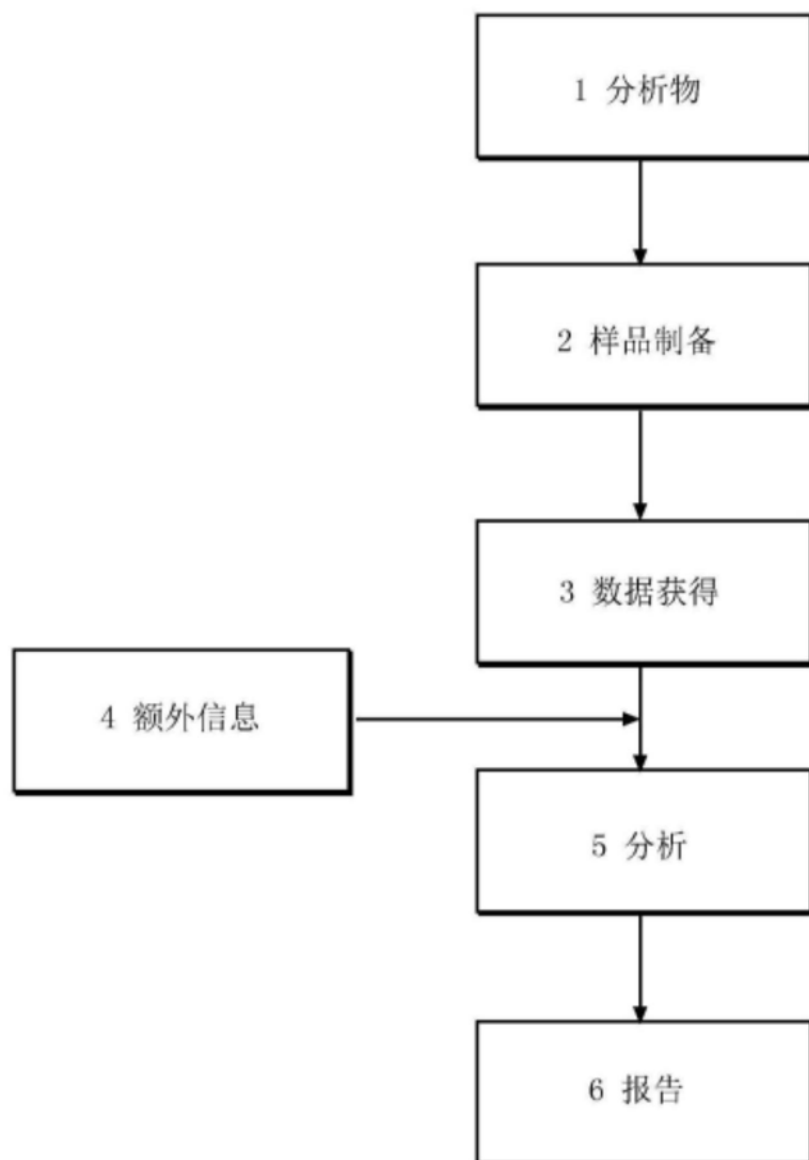


图19

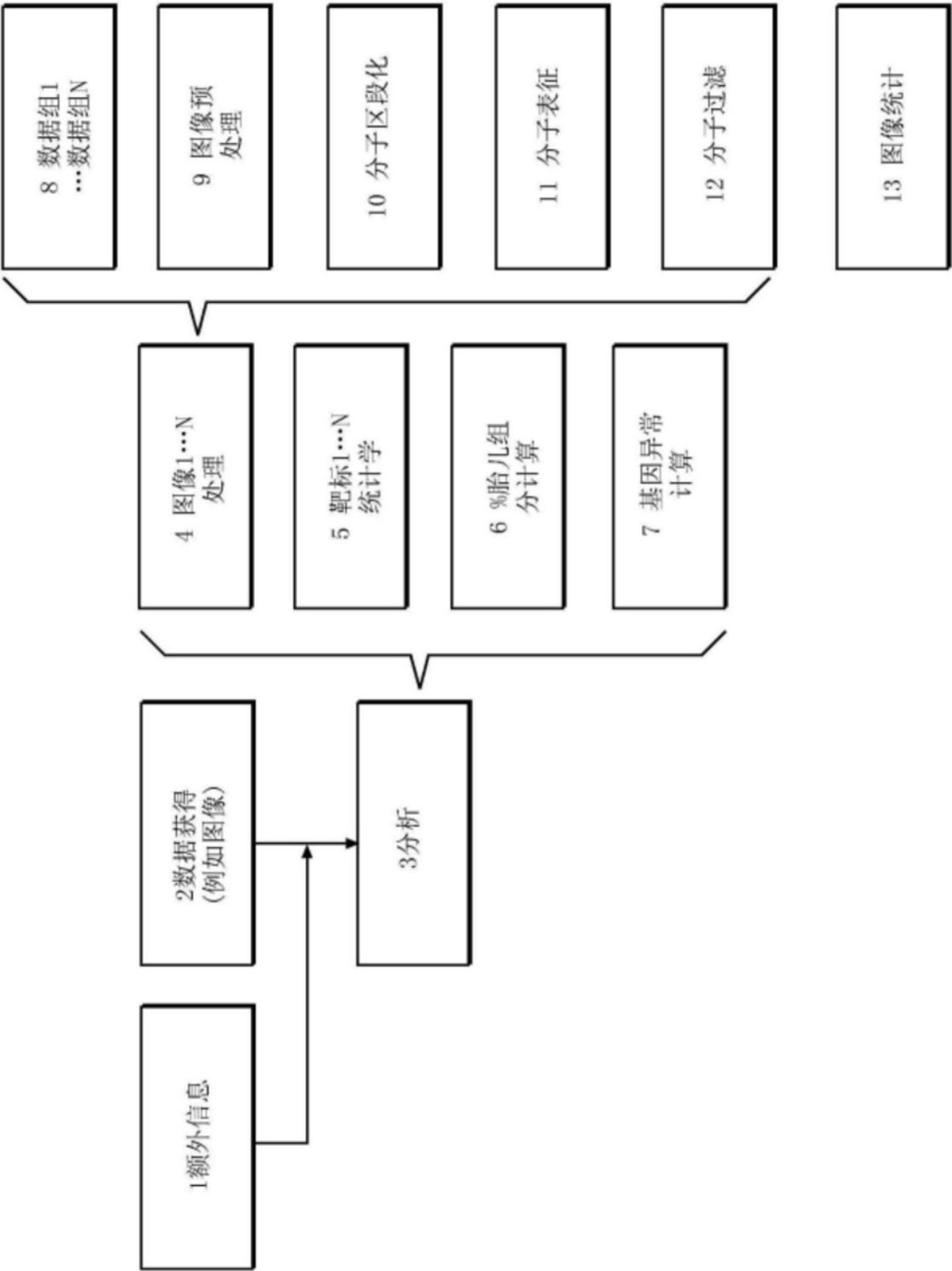


图20

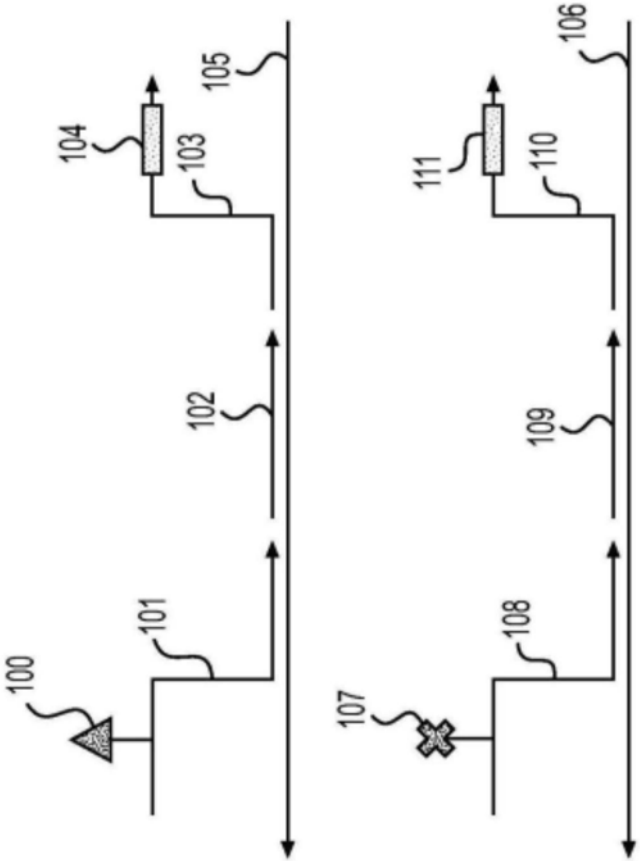


图21

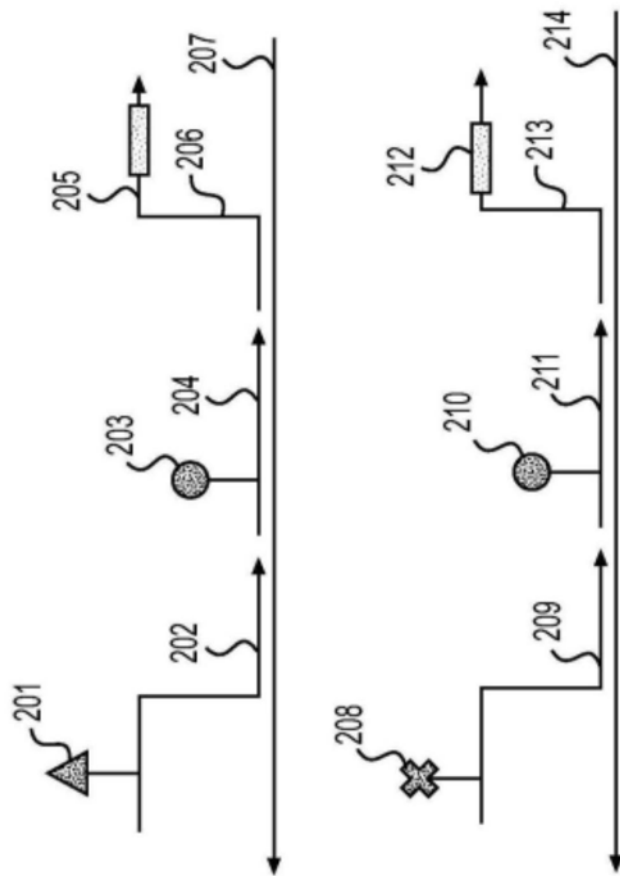


图22

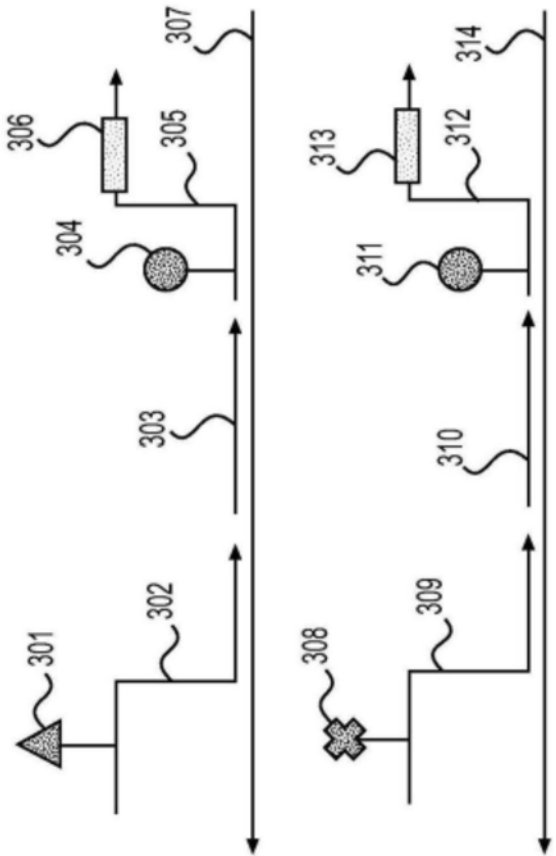


图23

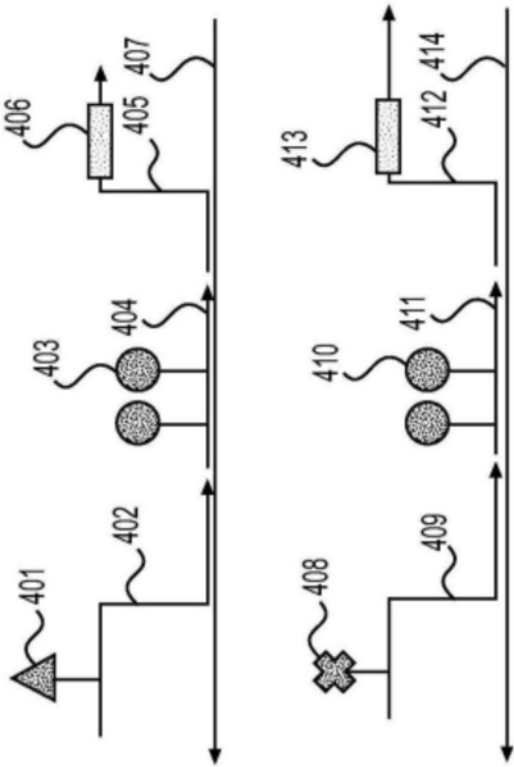


图24

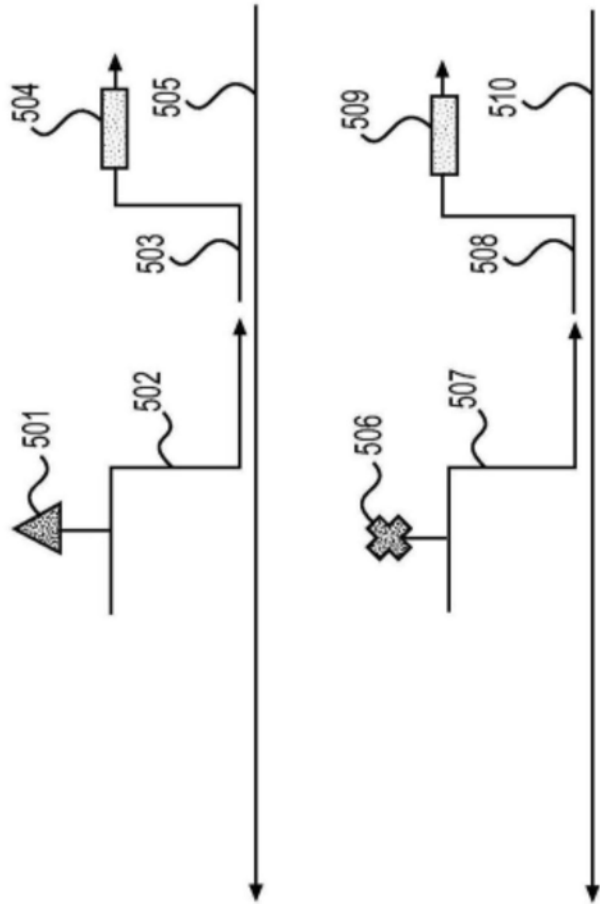


图25

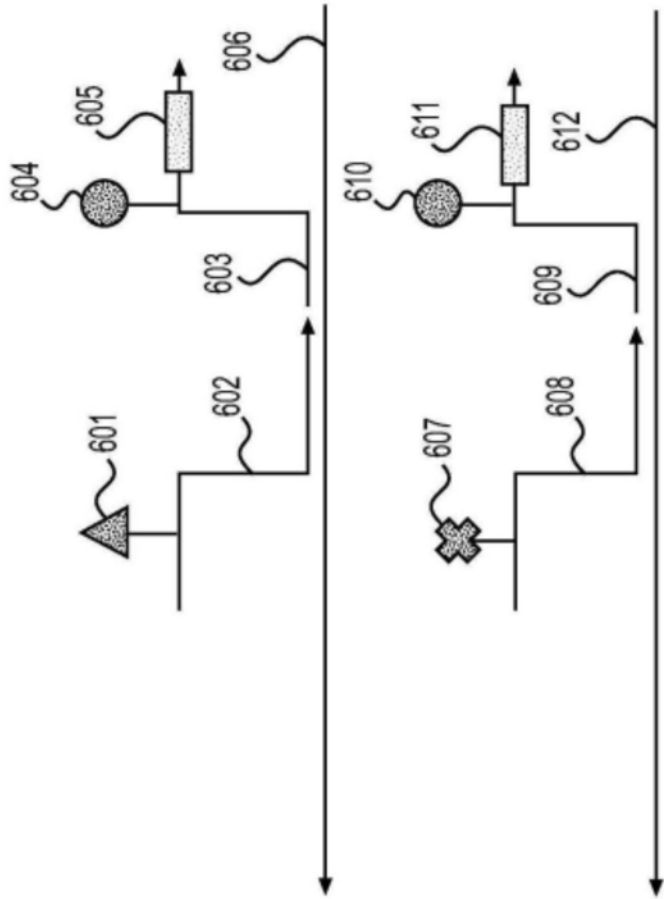


图26

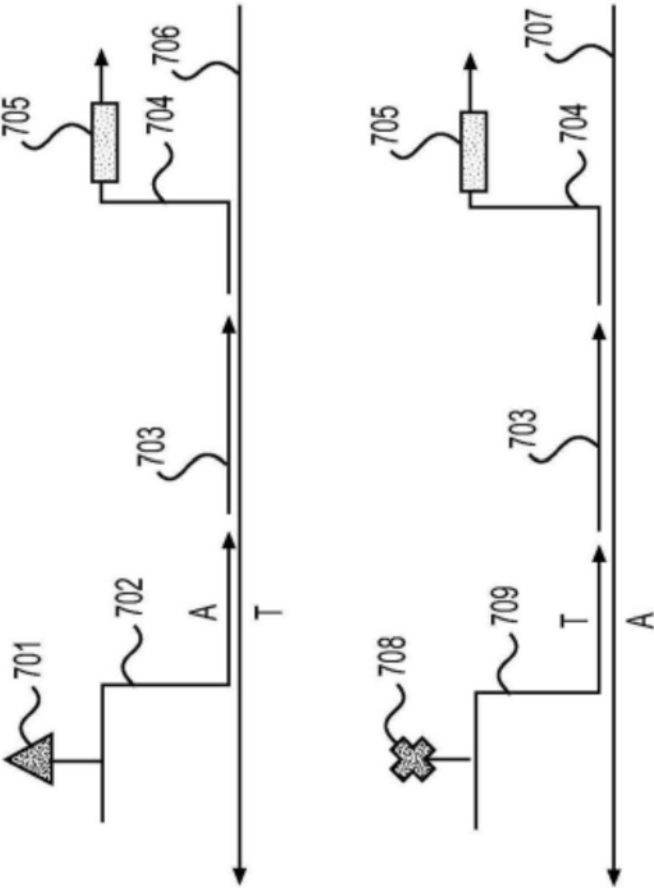


图27

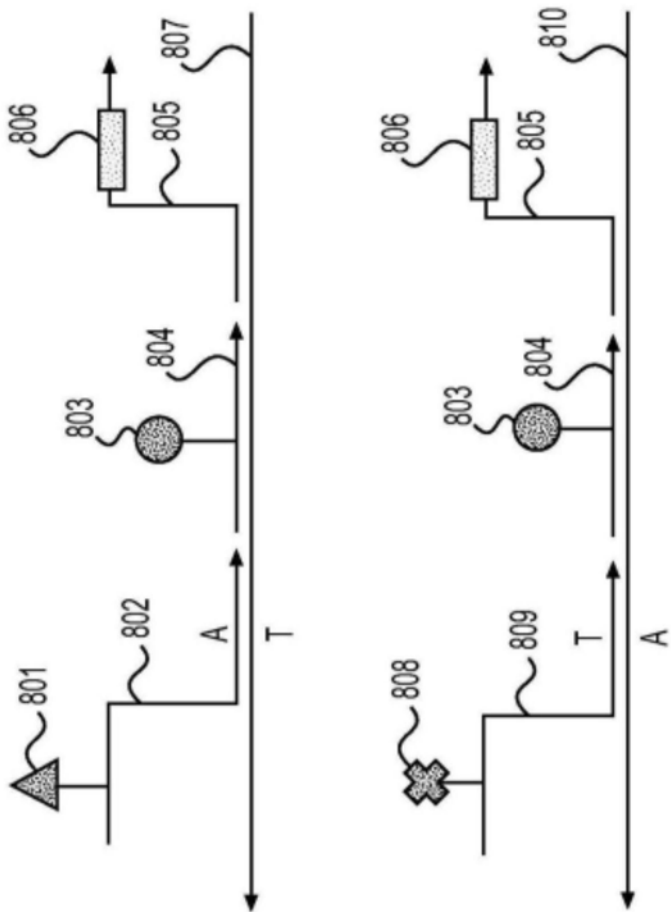


图28

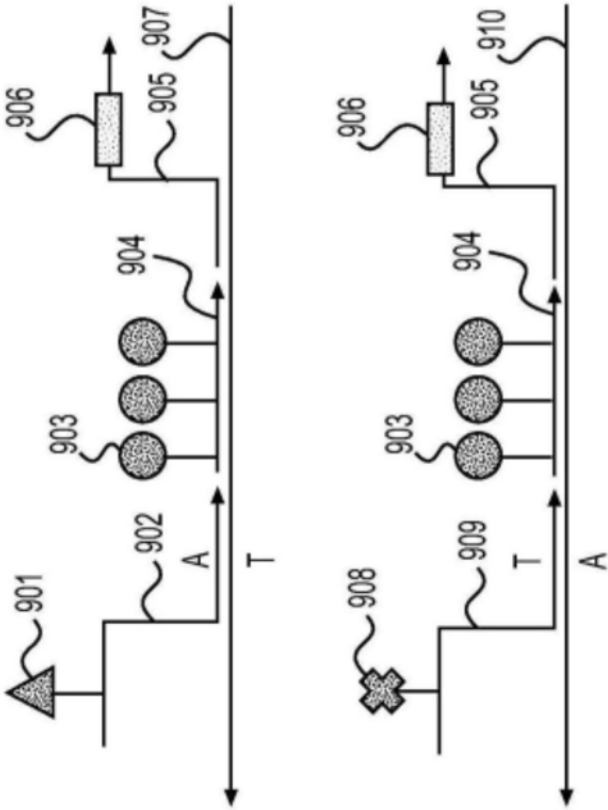


图29

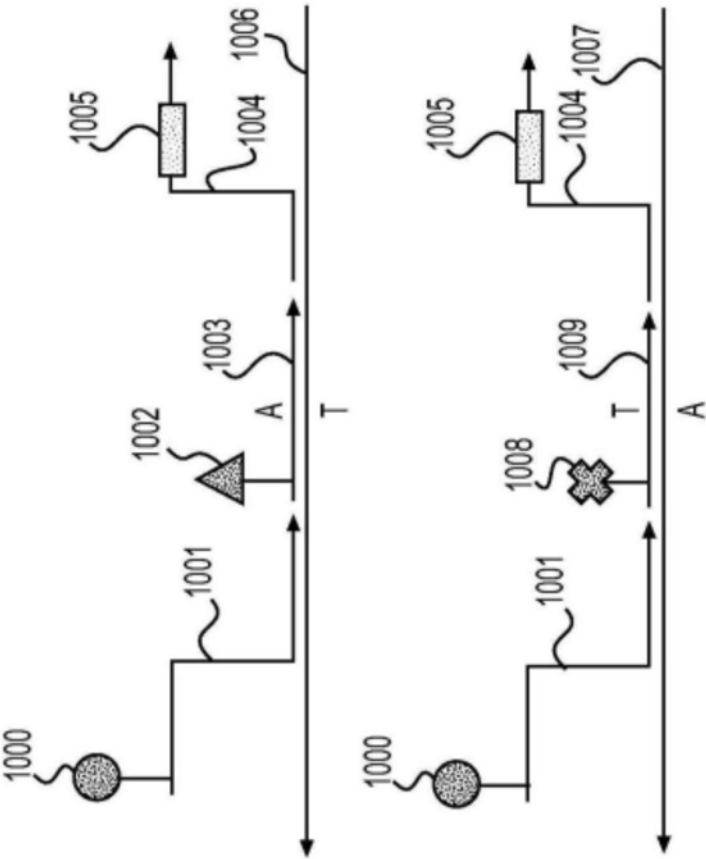


图30

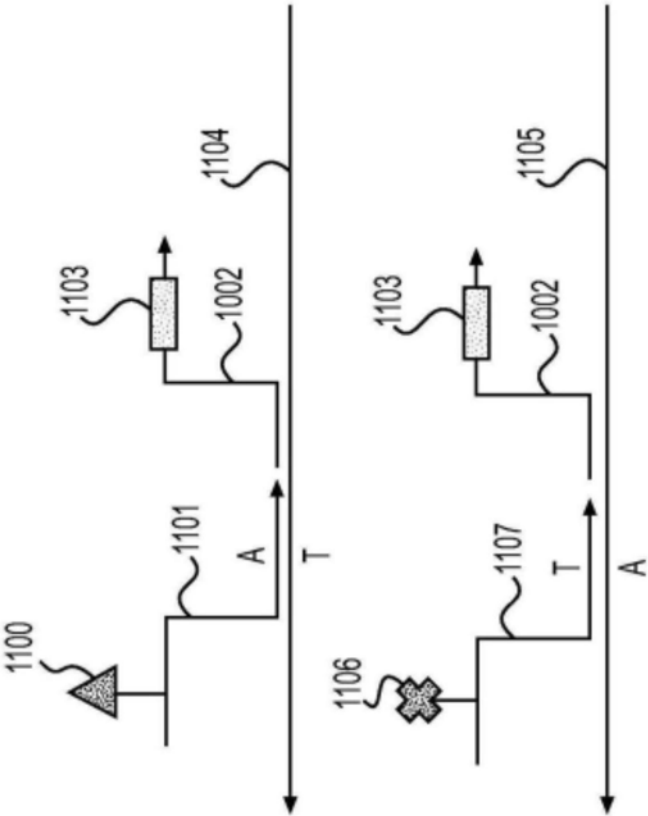


图31

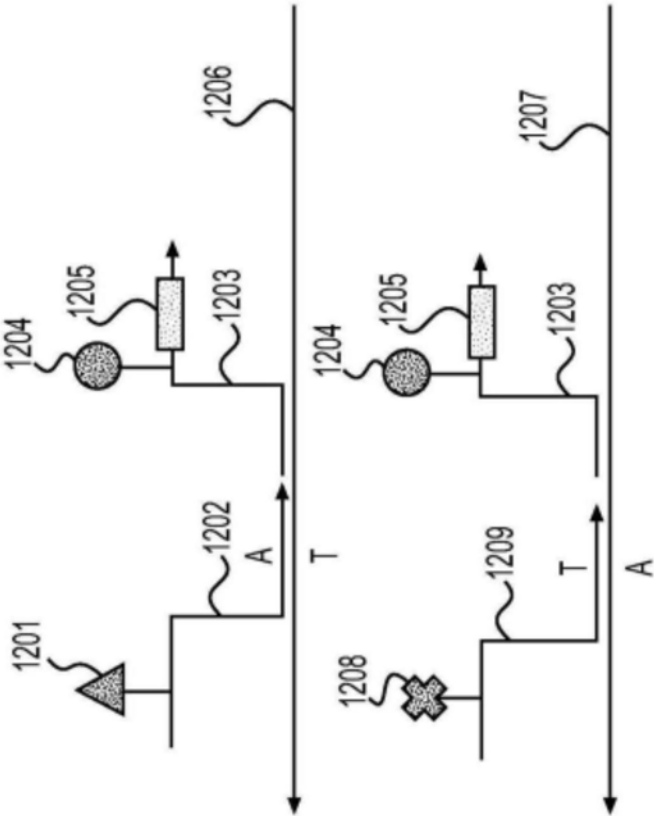


图32

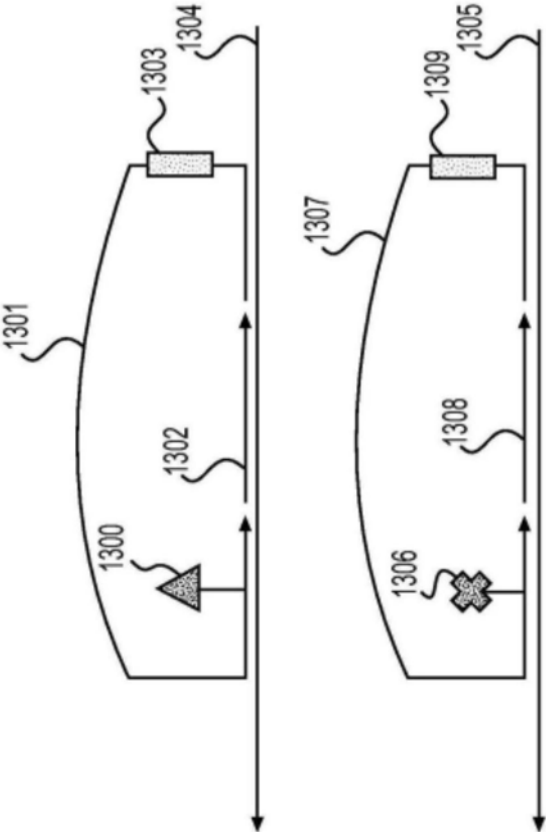


图33

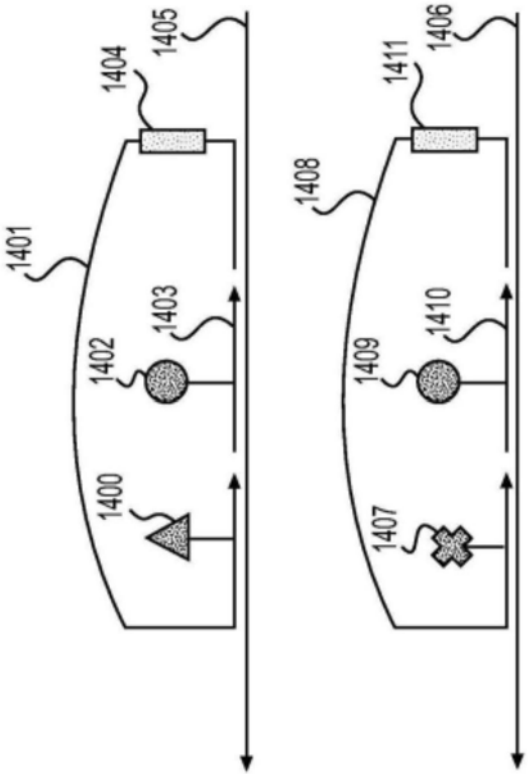


图34

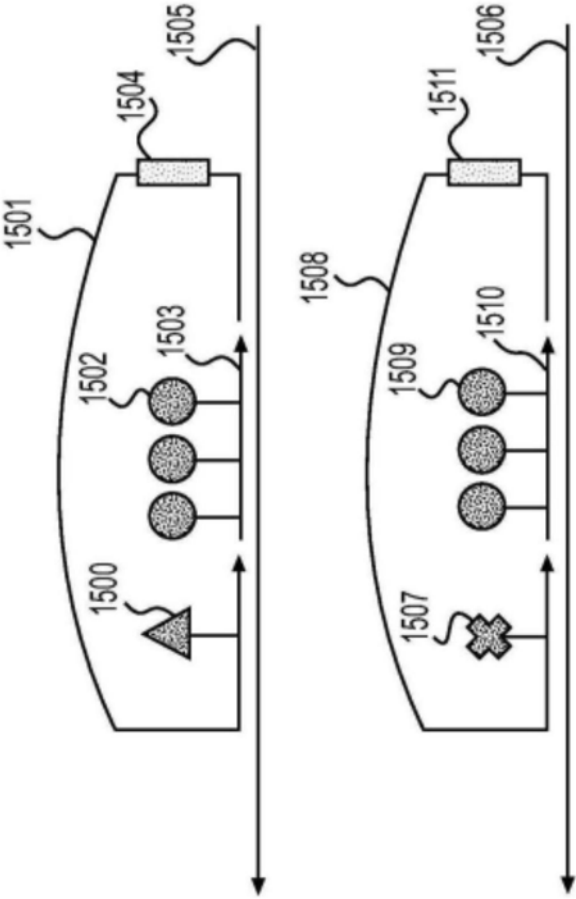


图35

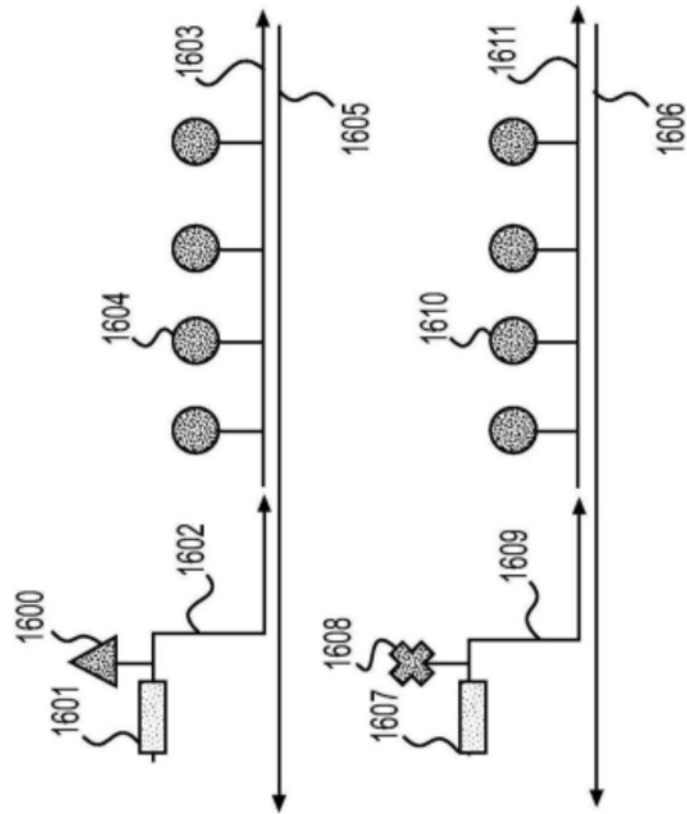


图36

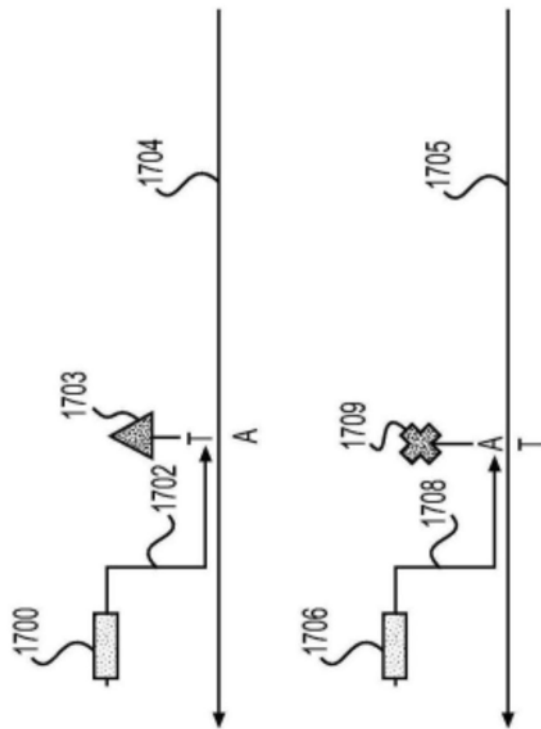


图37

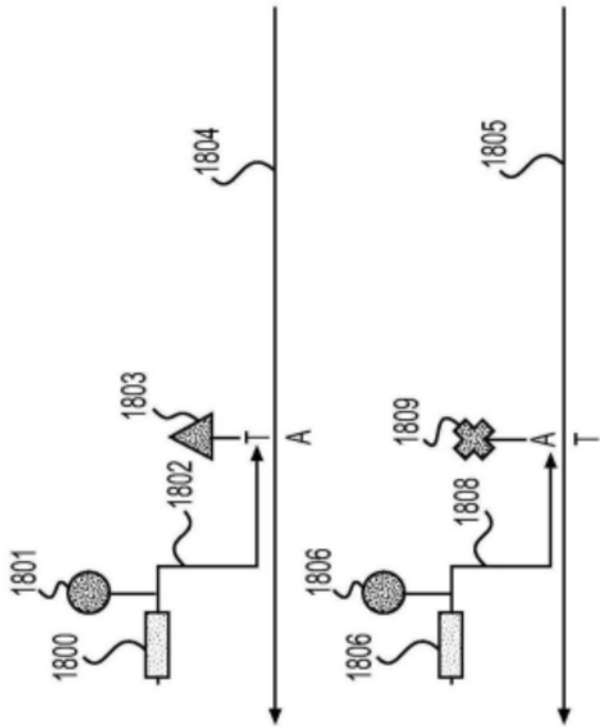


图38

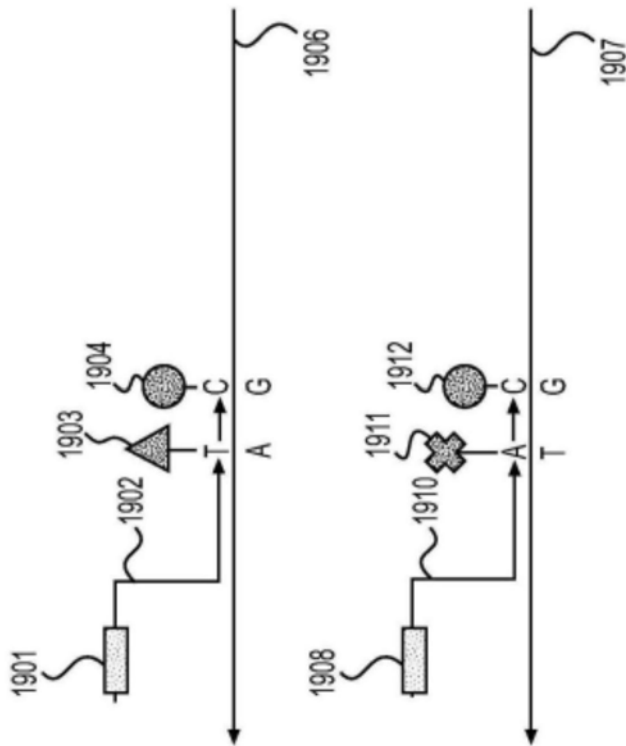


图39

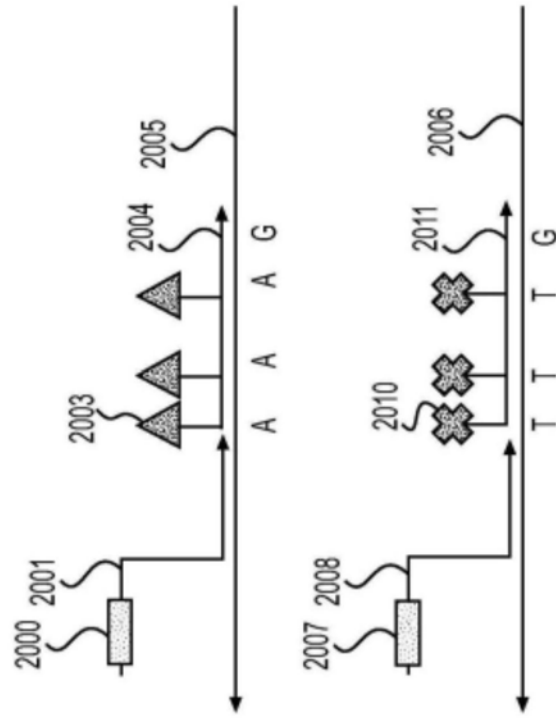


图40

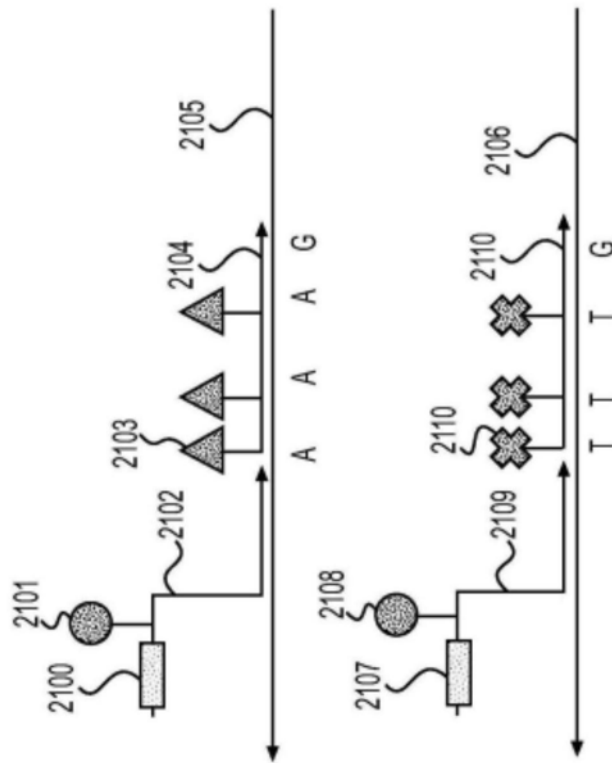


图41

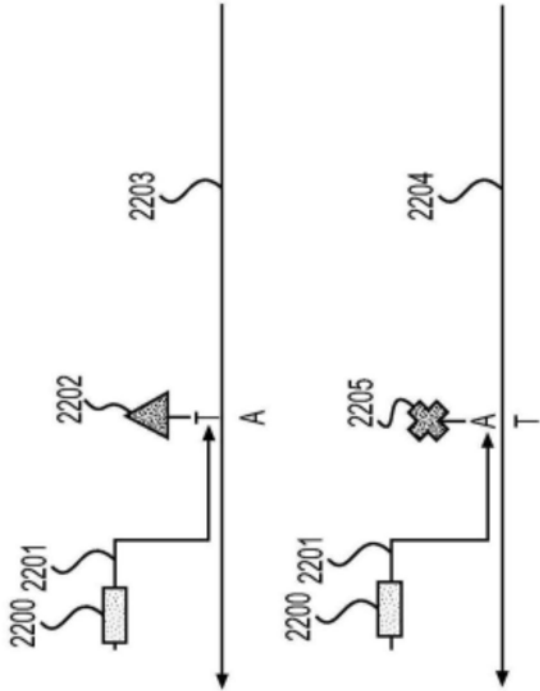


图42

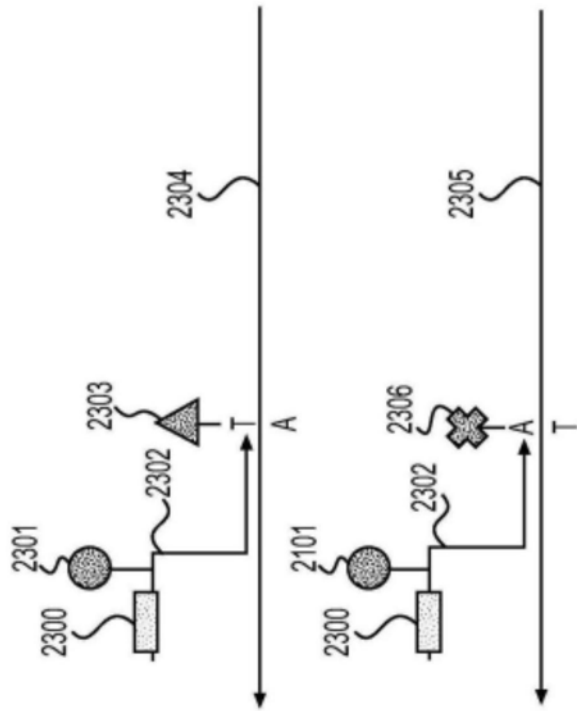


图43

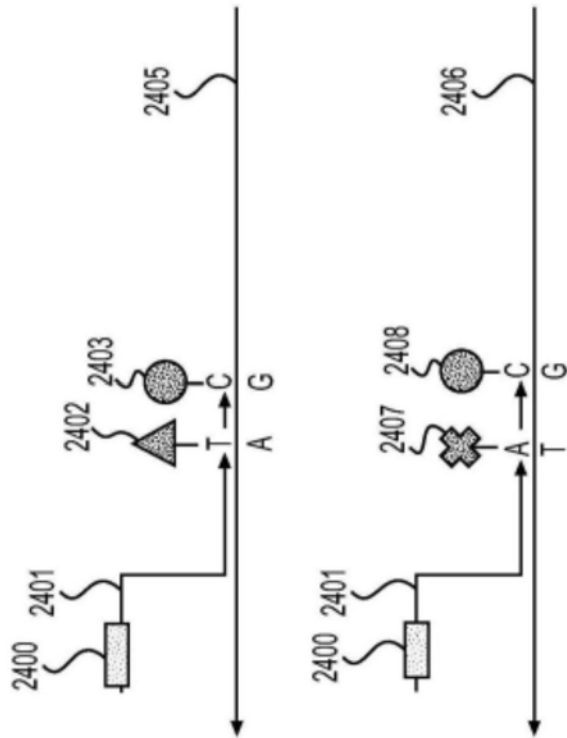


图44

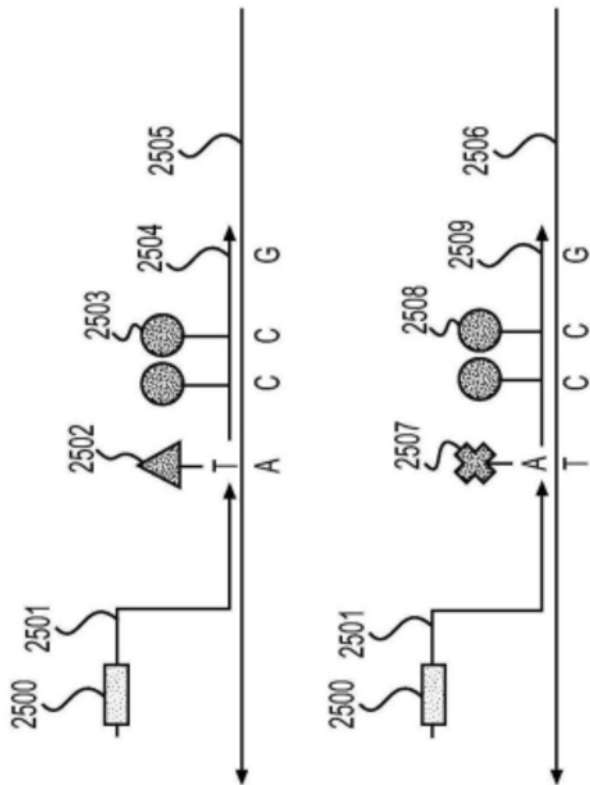


图45

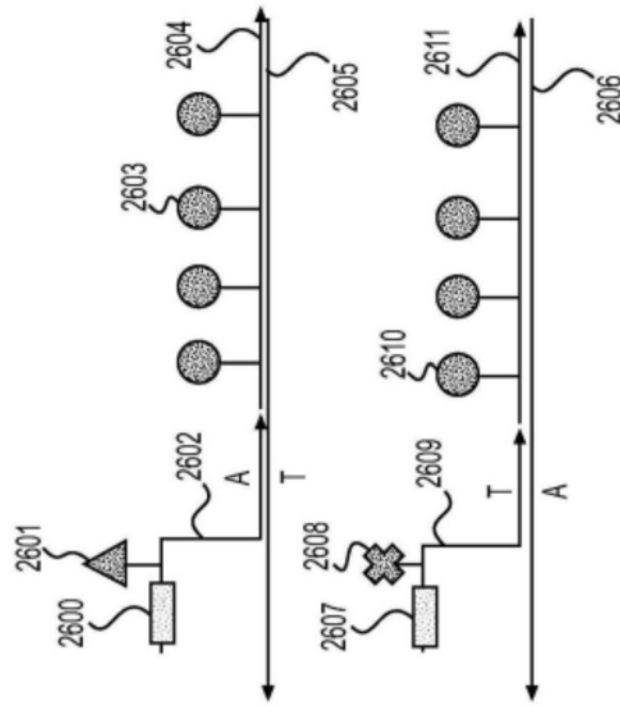


图46

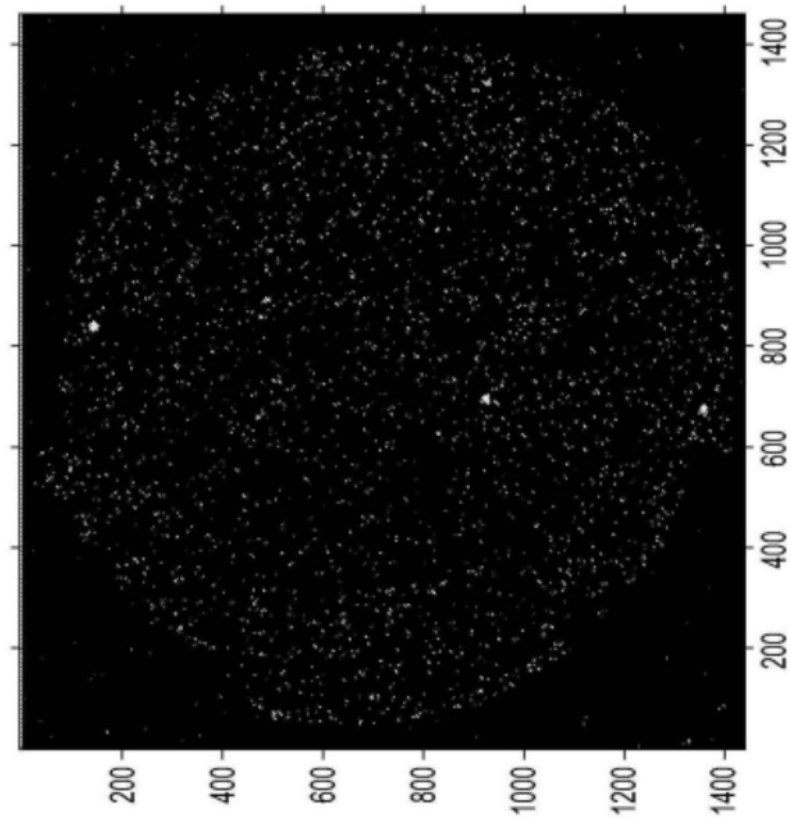


图47

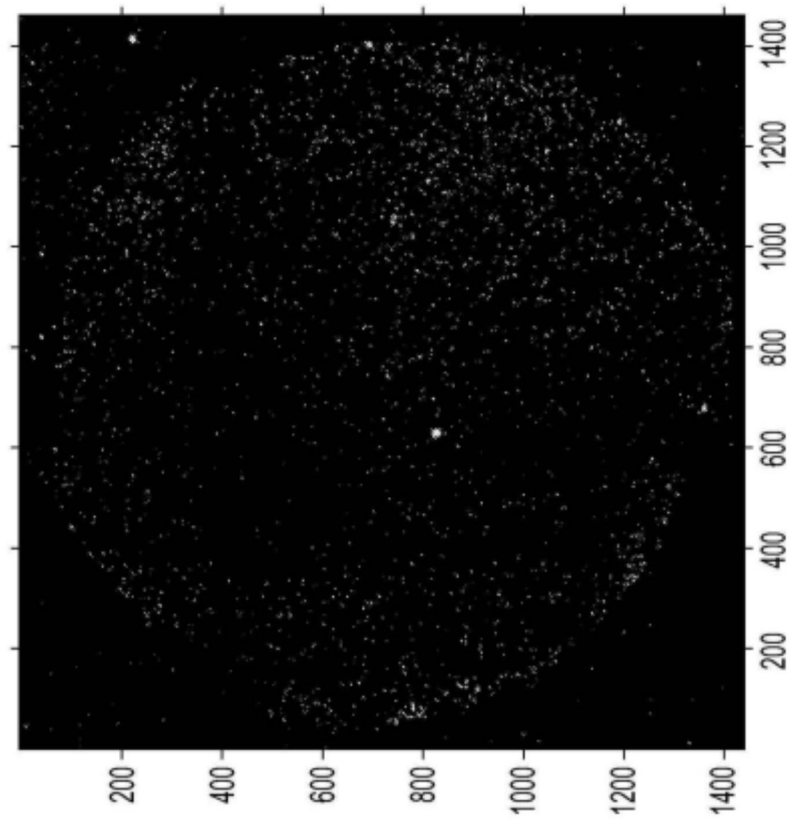


图48

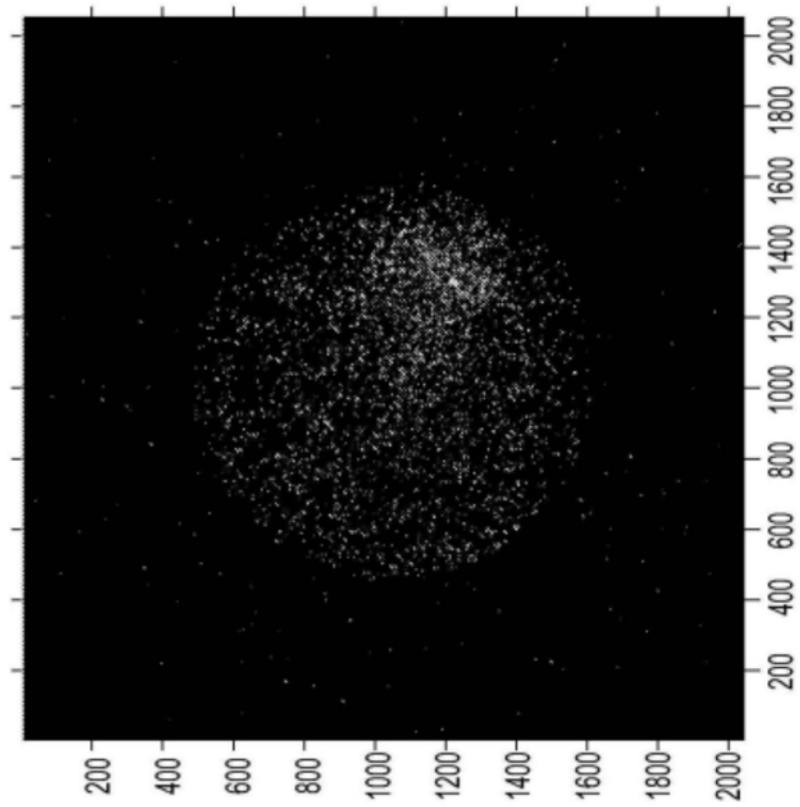


图49

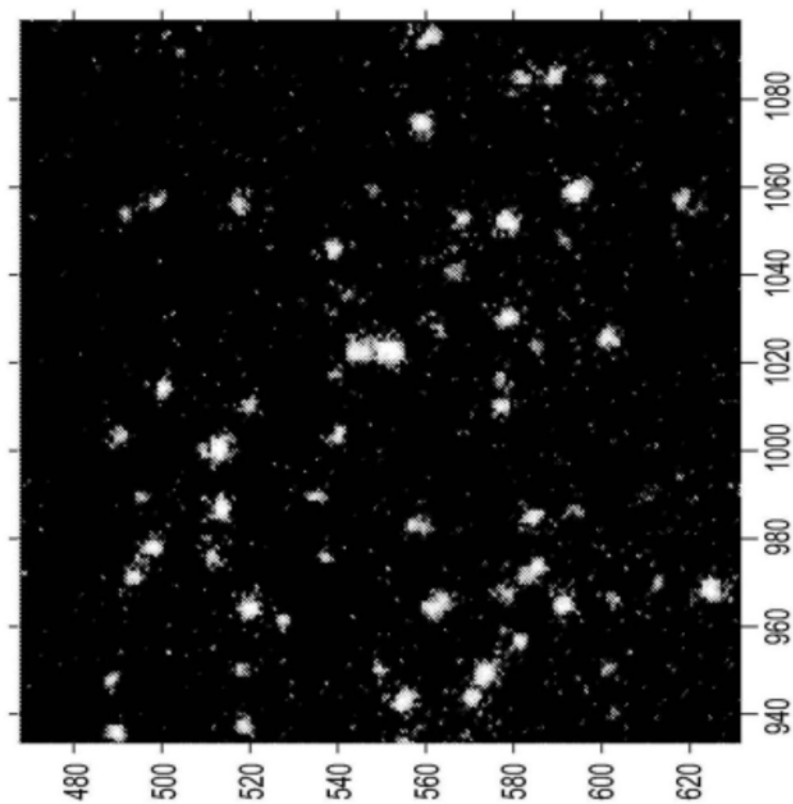


图50

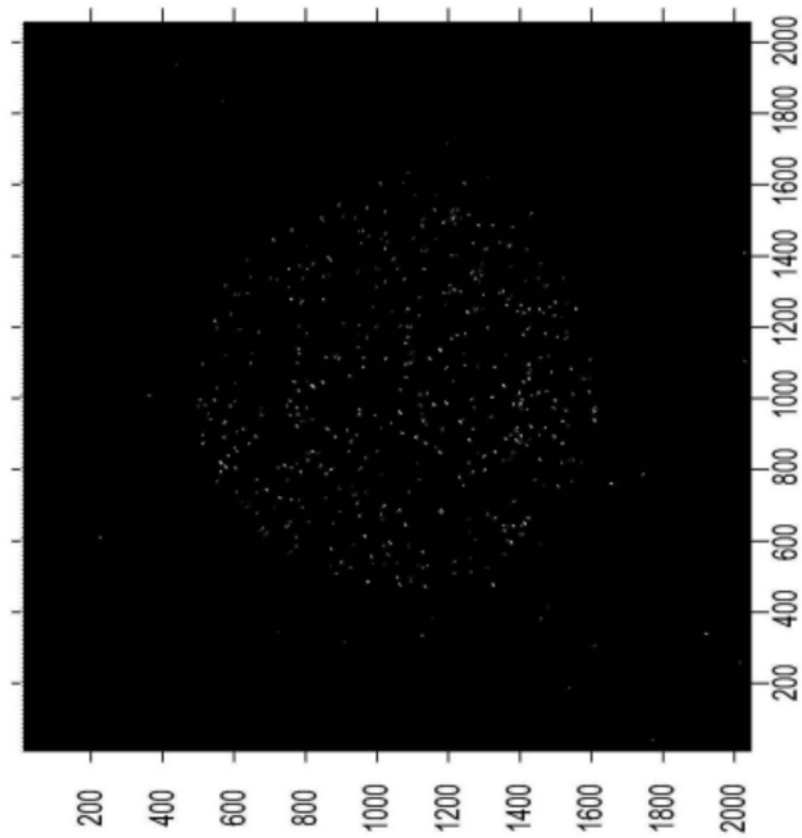


图51

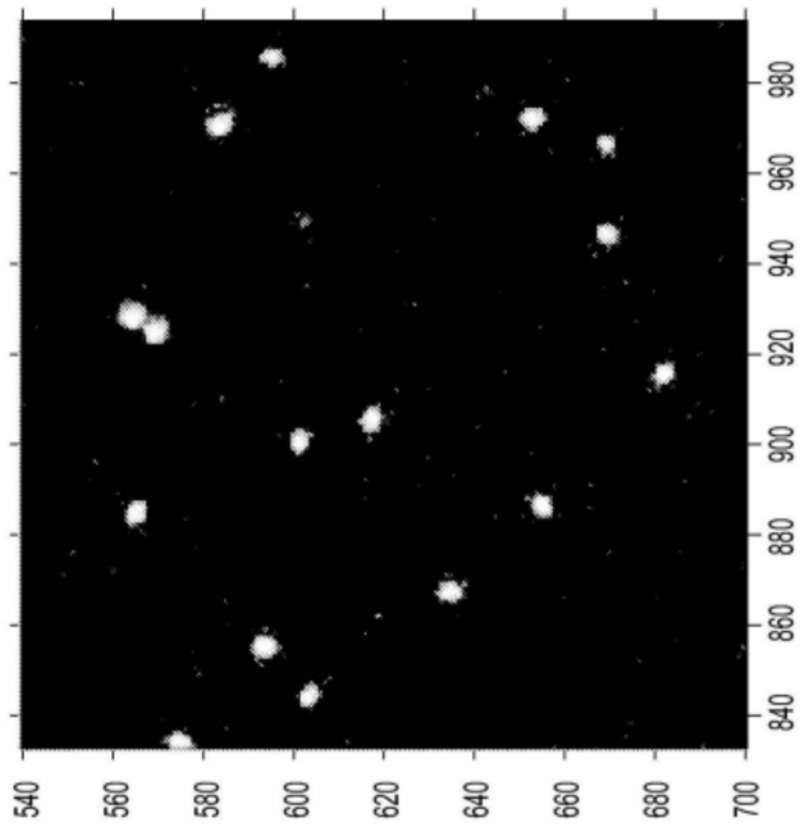


图52

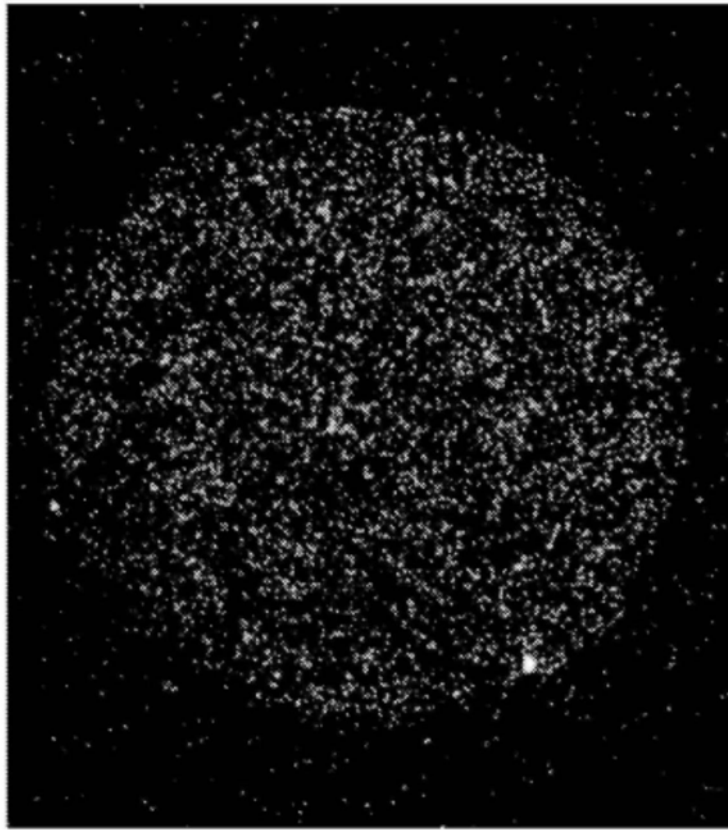


图53

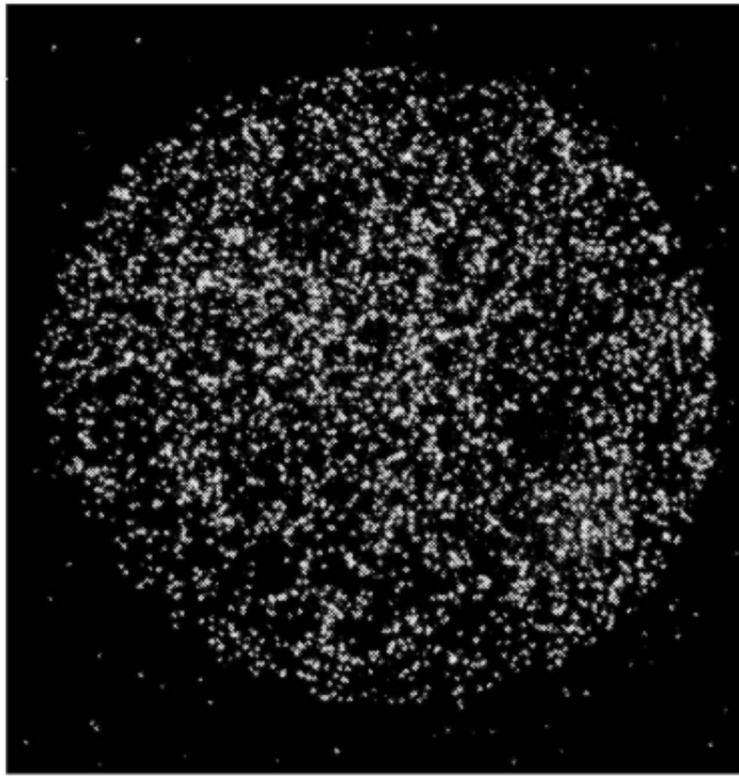


图54

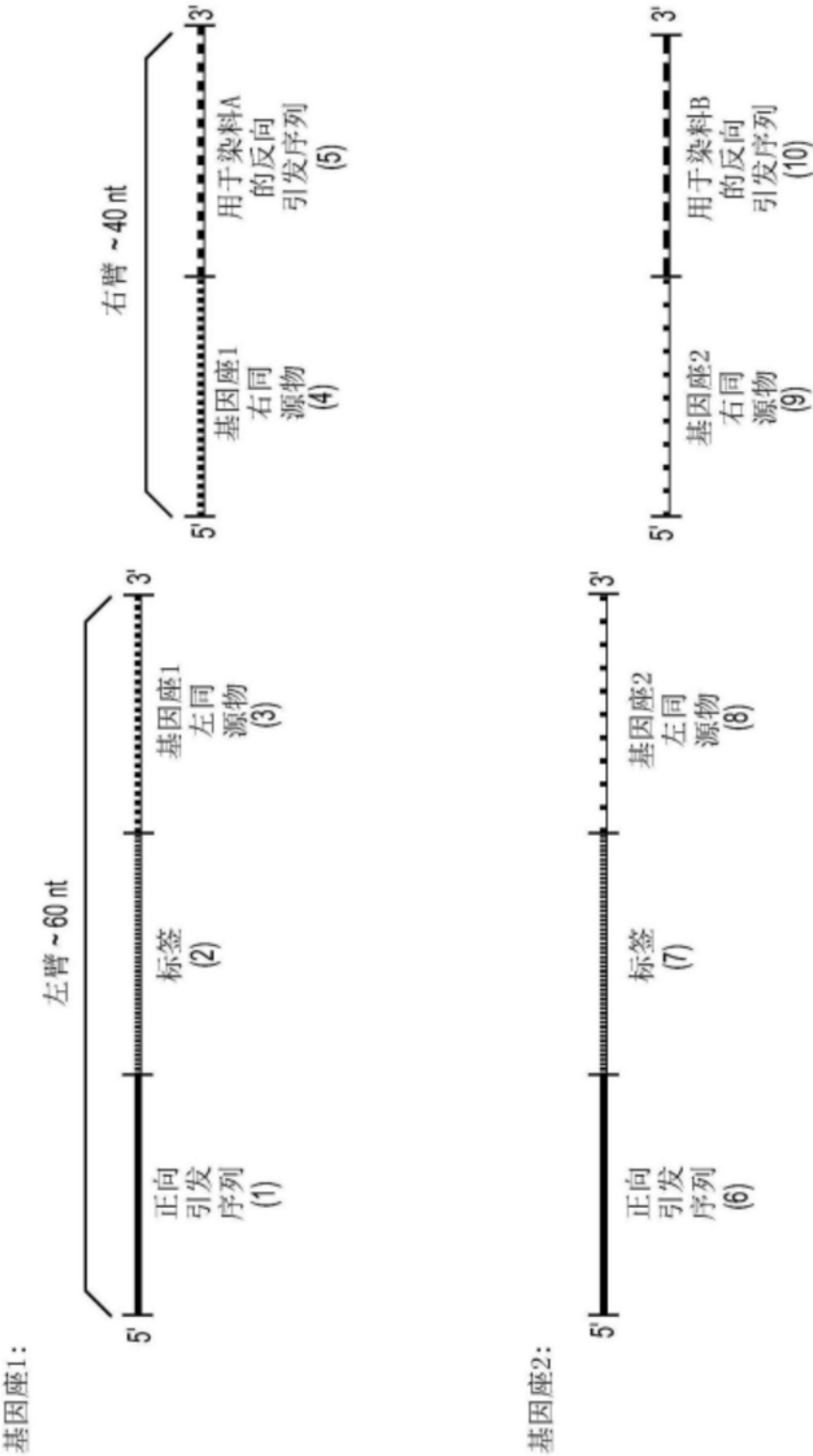


图55

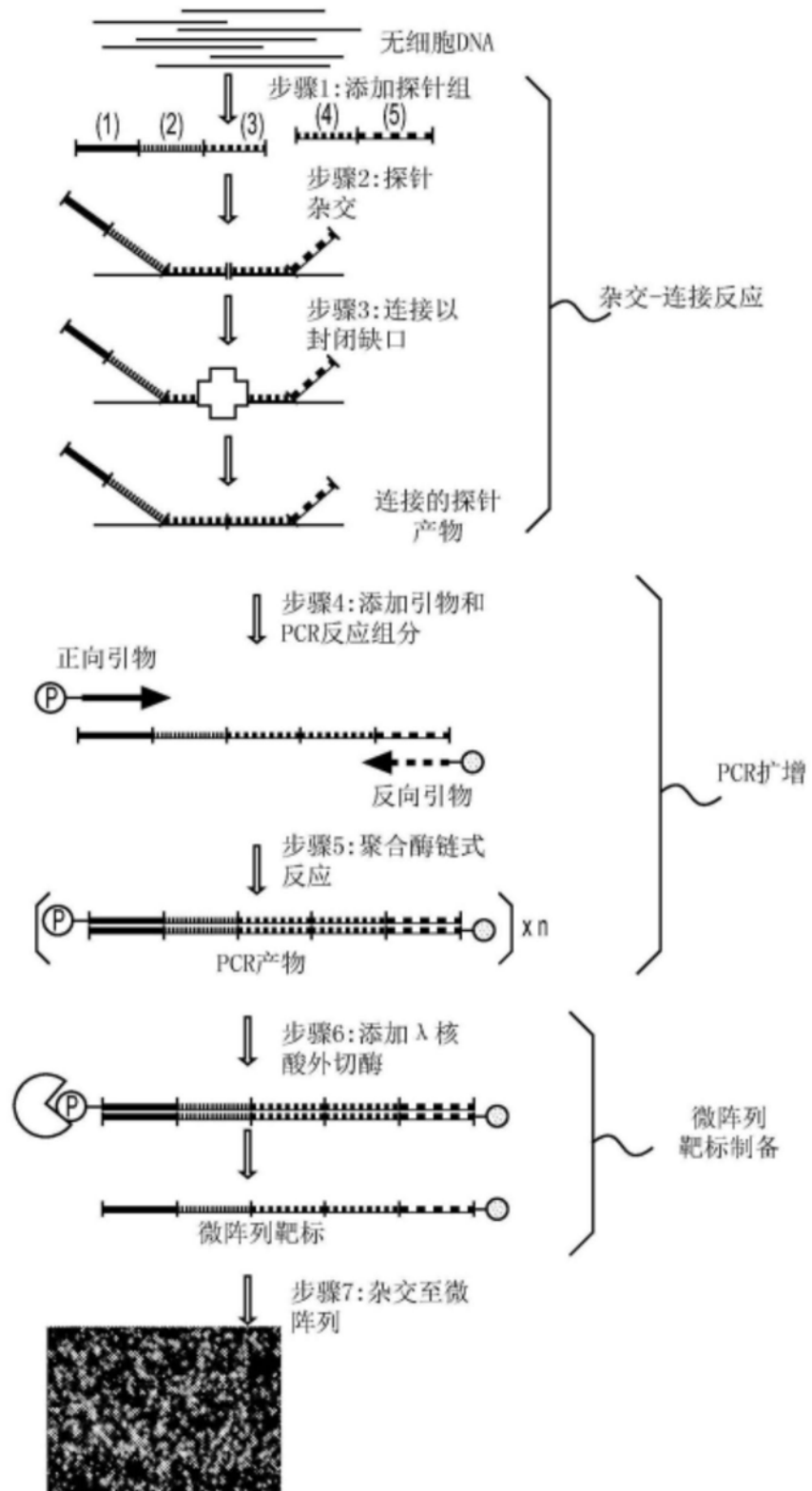


图56

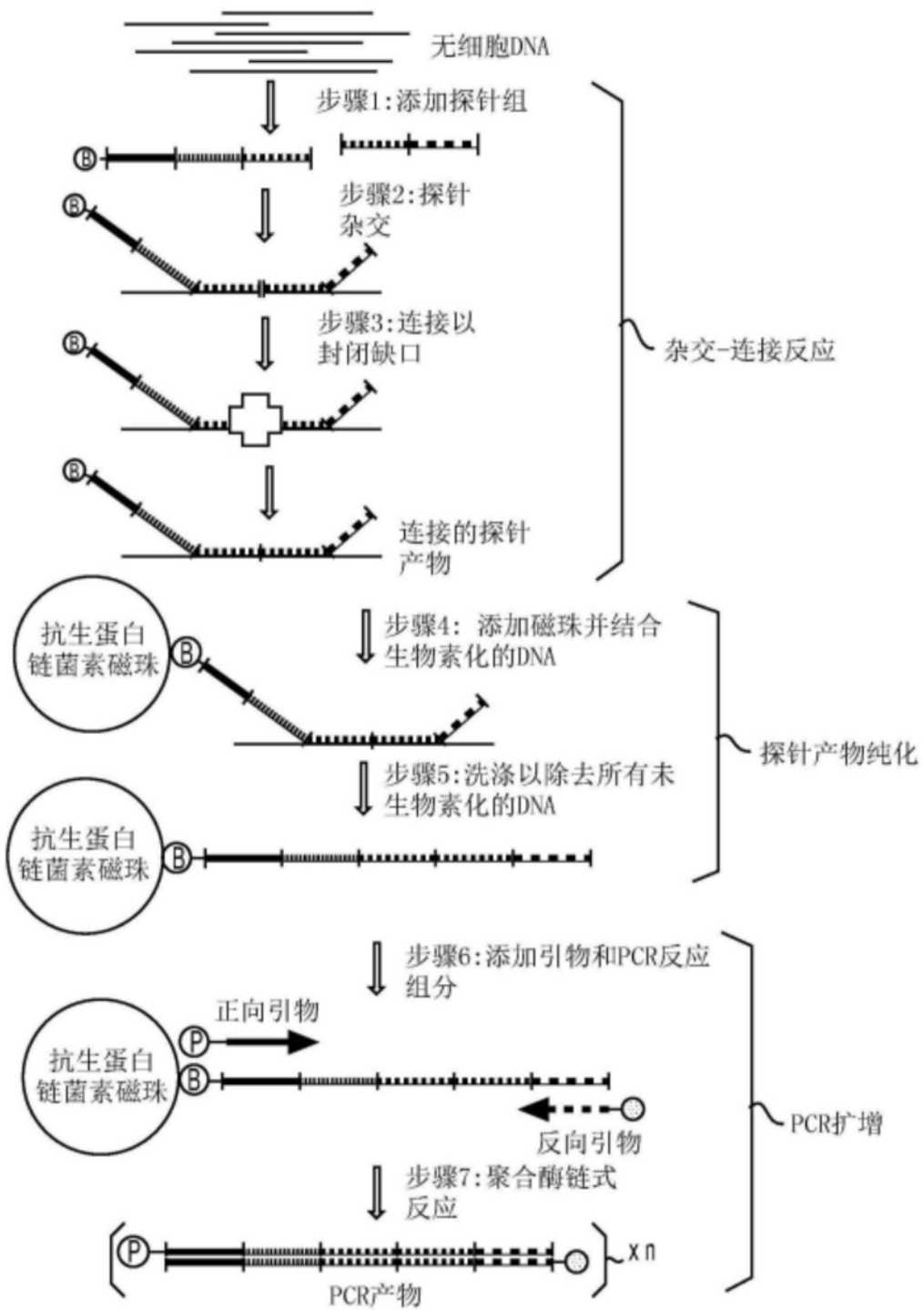


图57

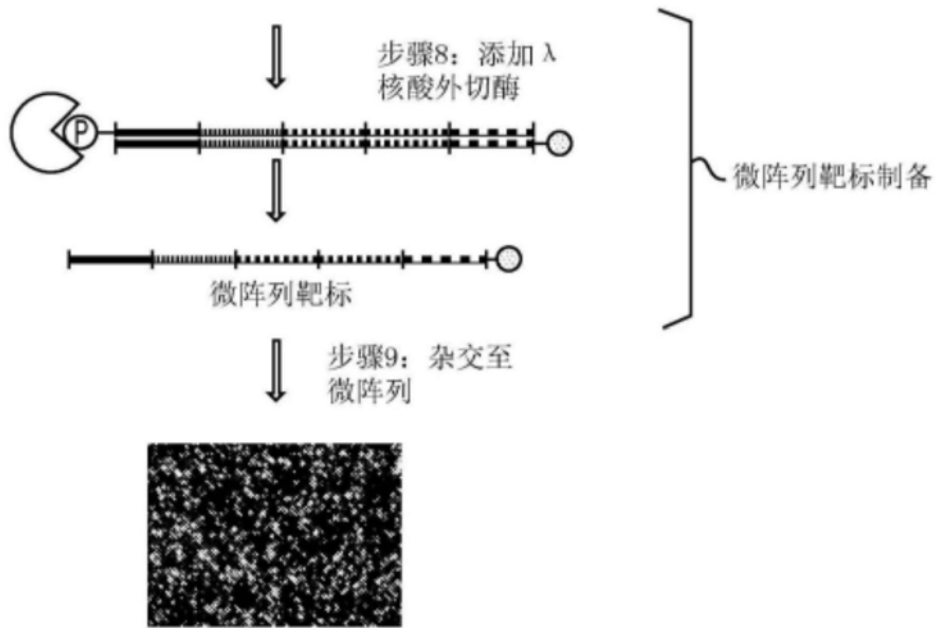


图57续

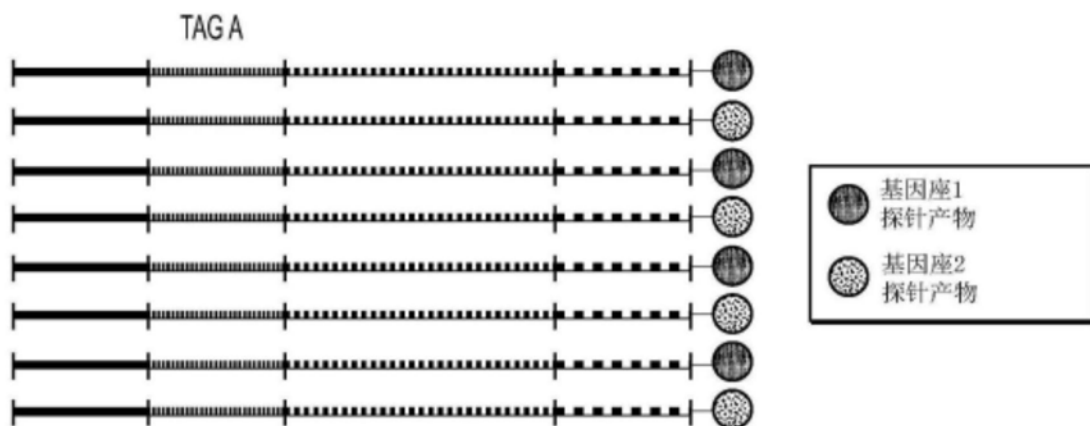


图58A

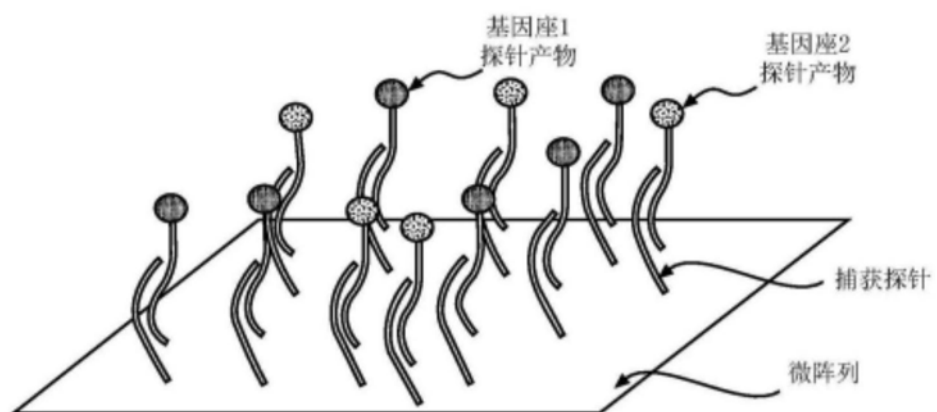


图58B

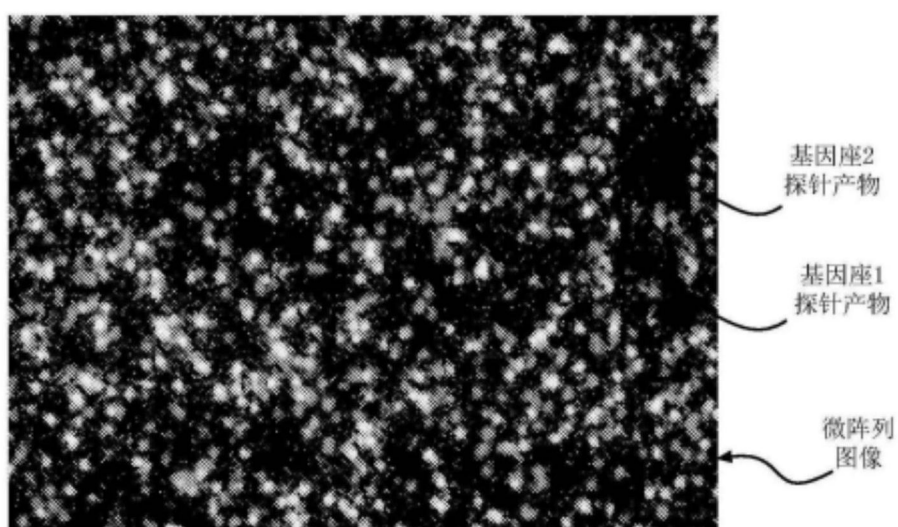


图58C

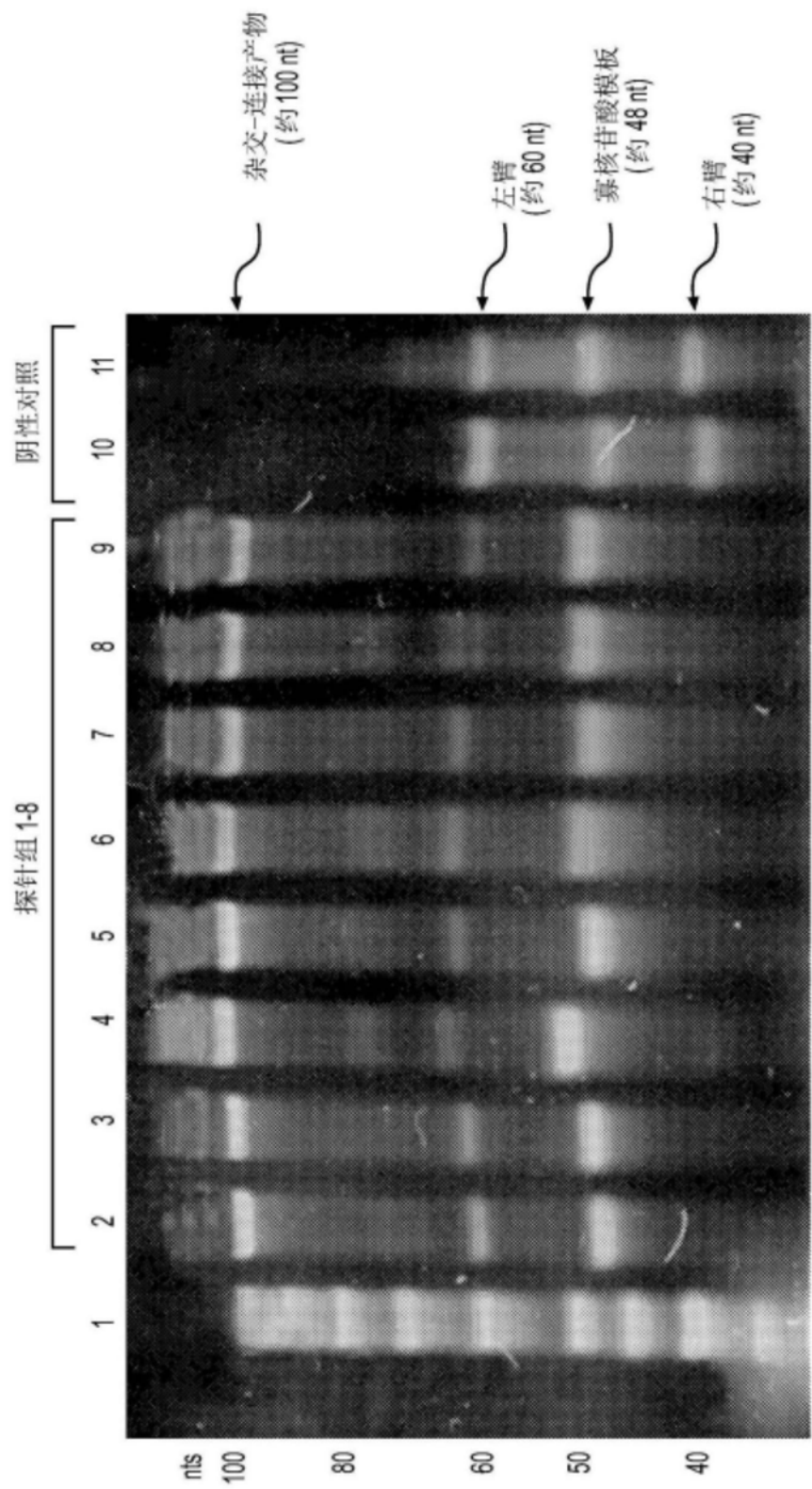


图59

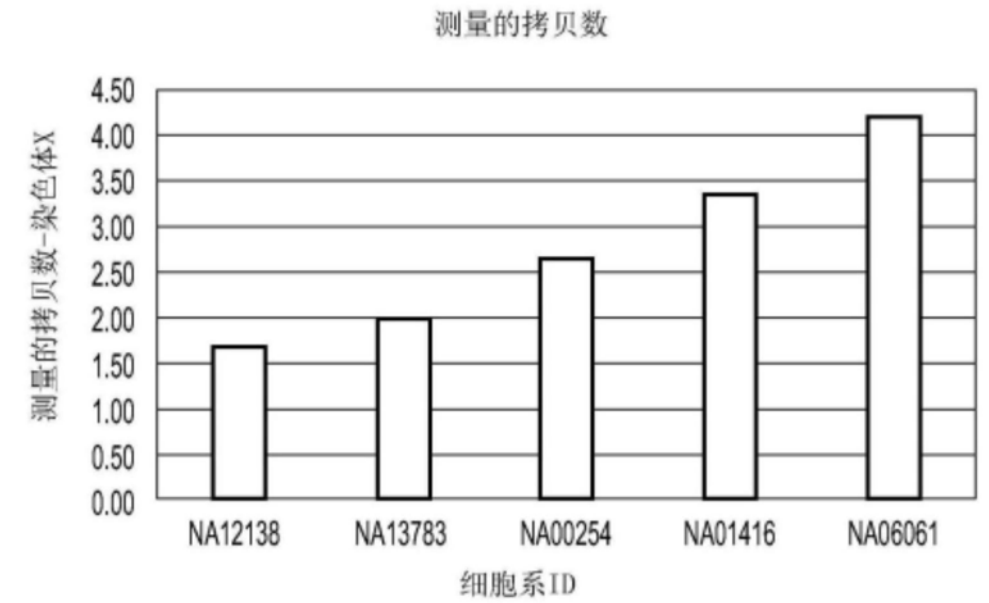


图60A

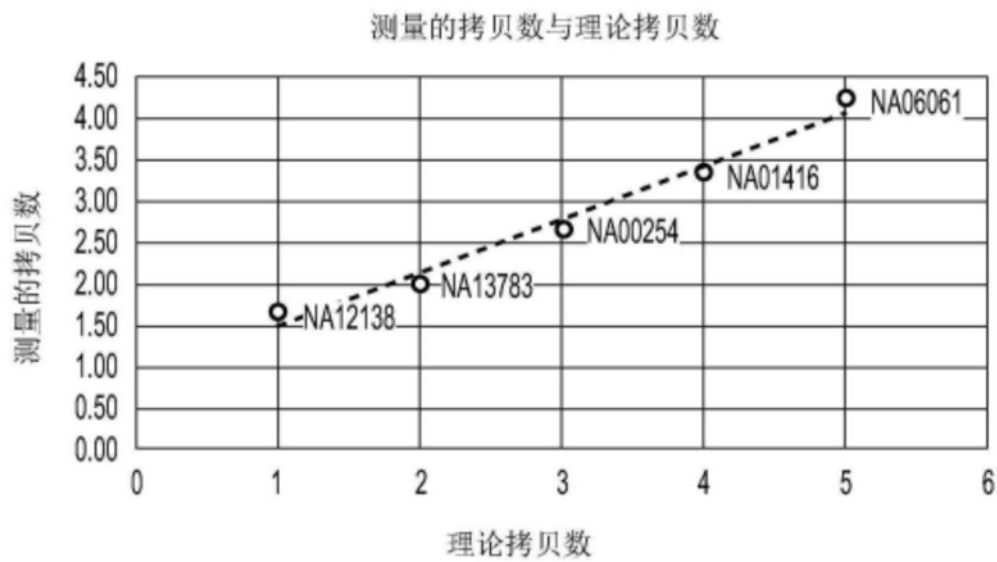


图60B

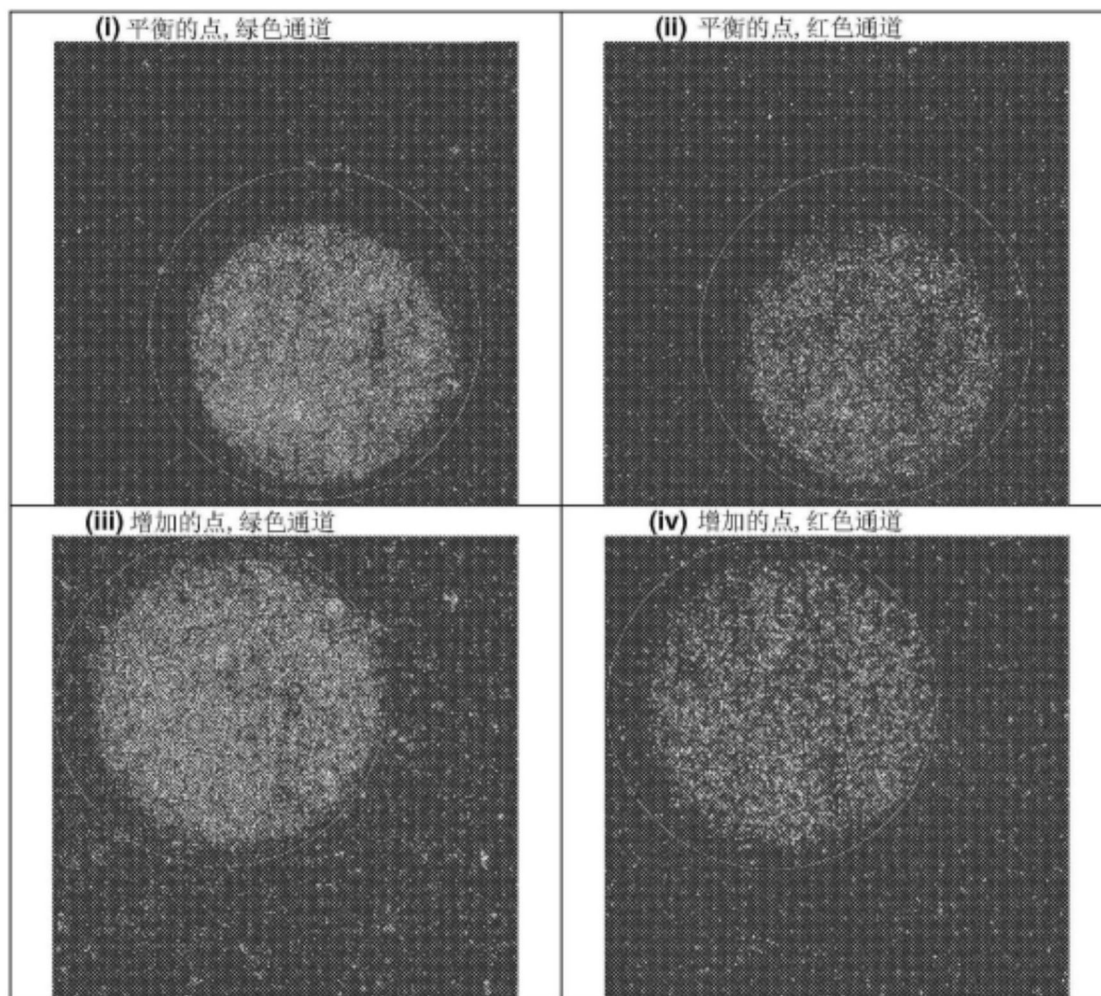


图61A

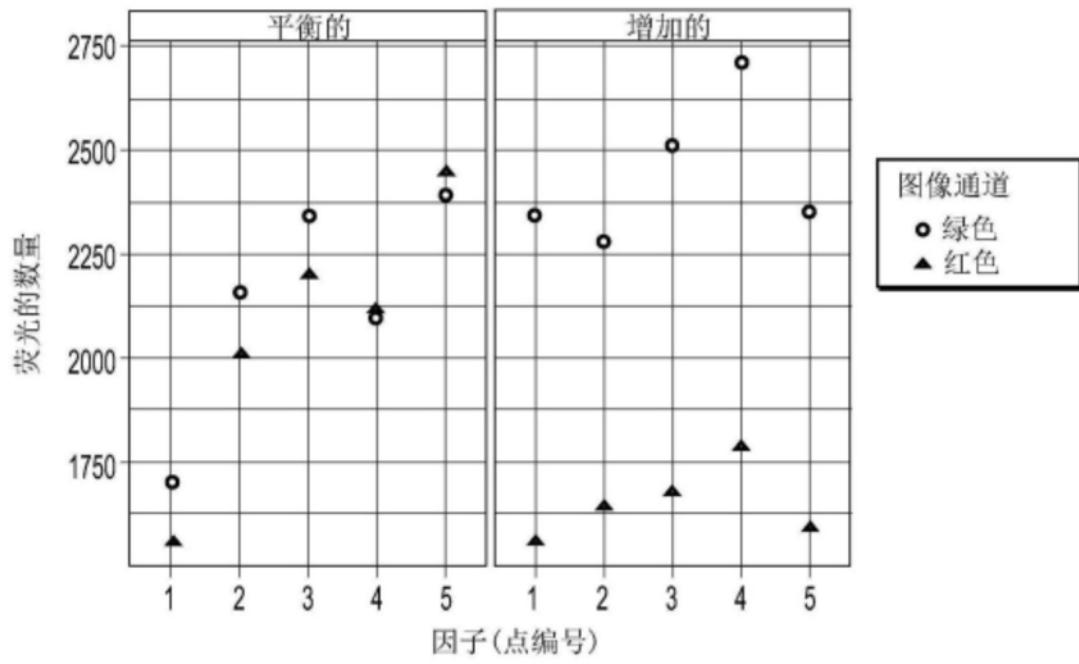


图61B

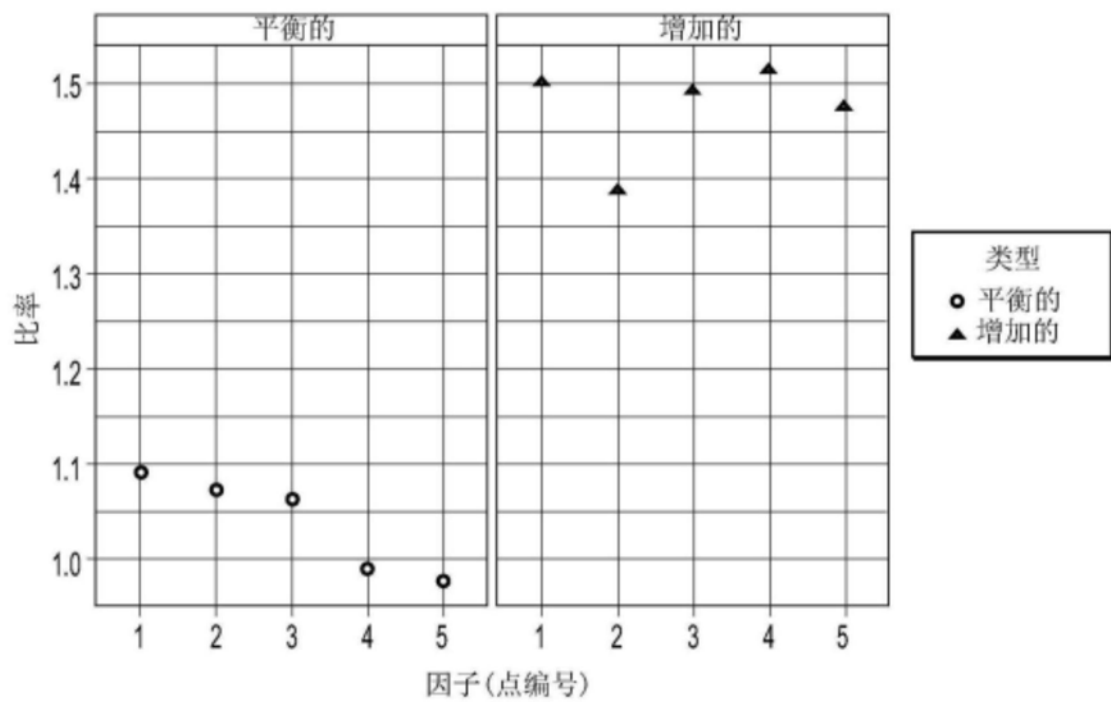


图61C

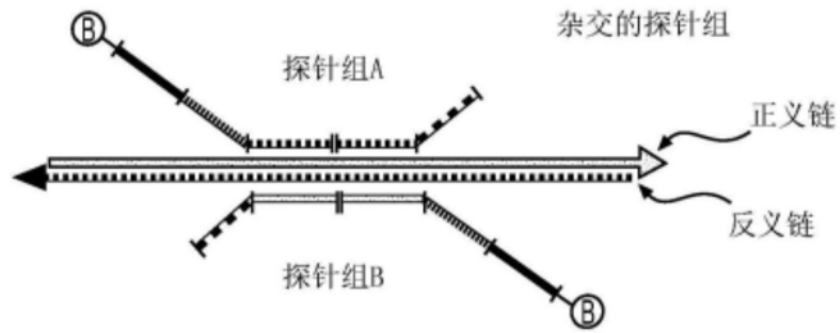


图62

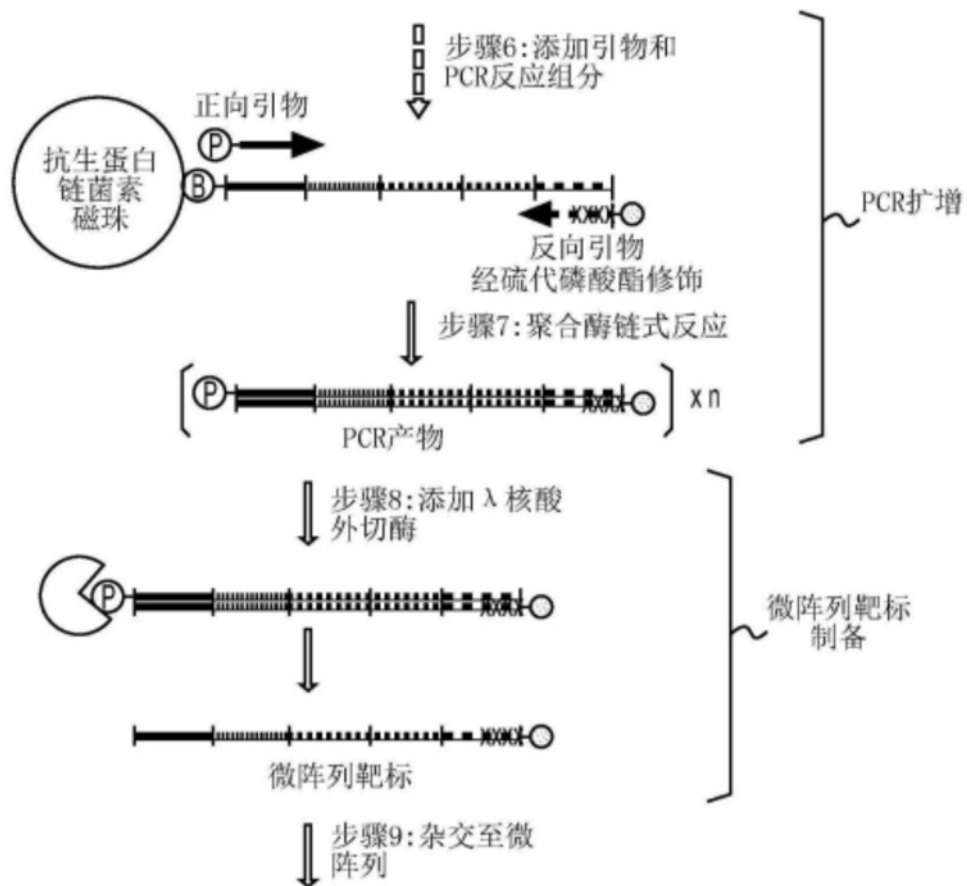


图63

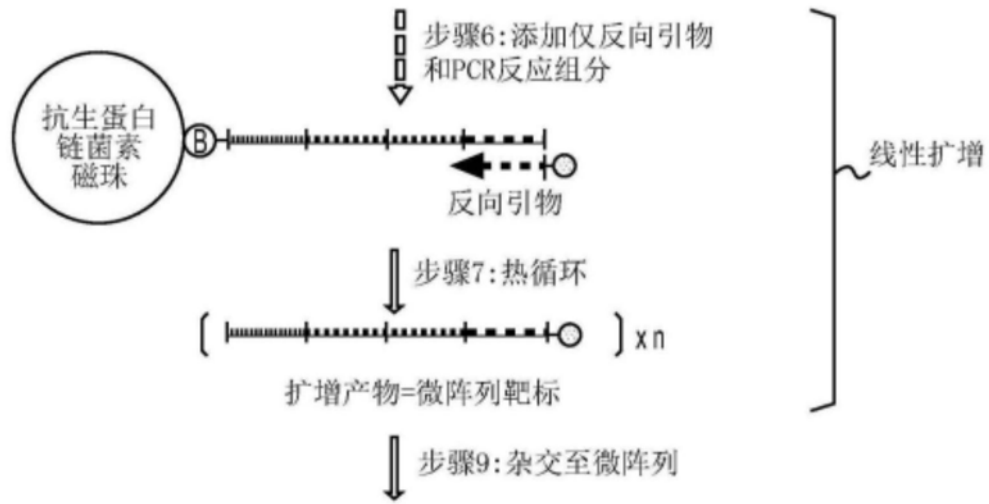


图64

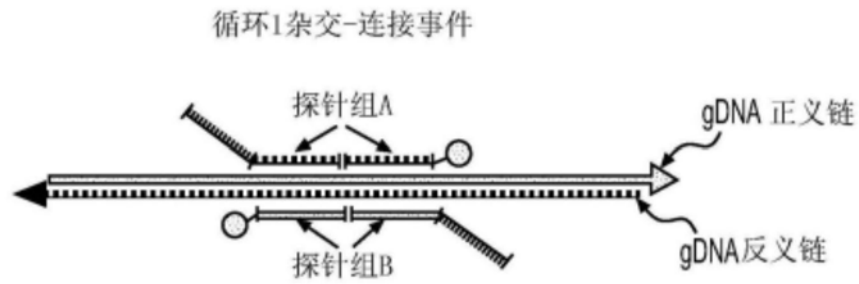


图65A

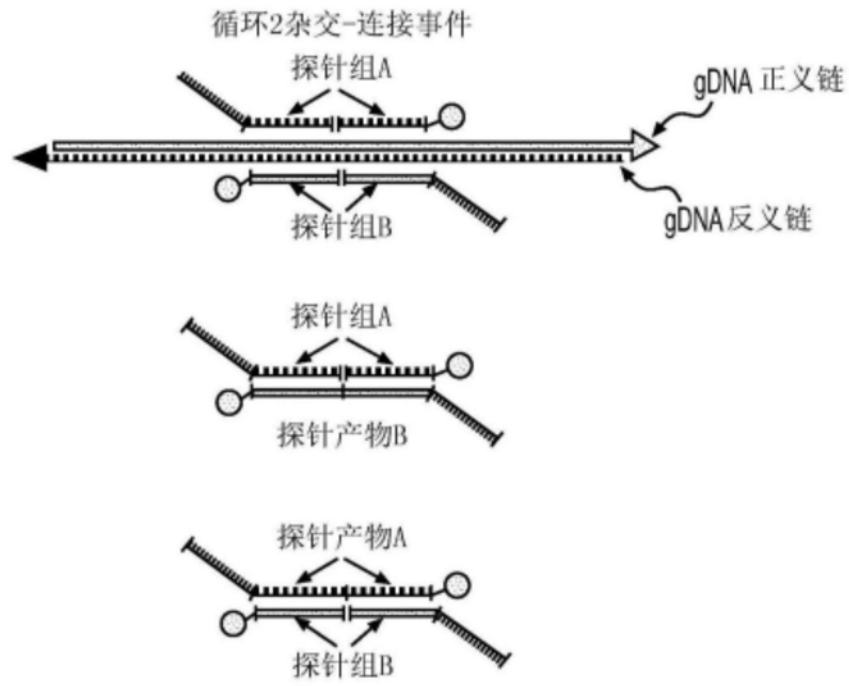


图65B

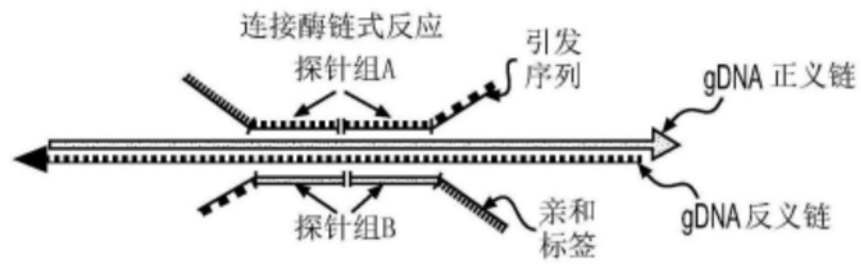


图66A

用一种引物进行线性扩增和标记

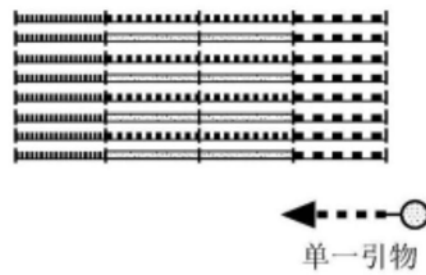


图66B

微阵列靶标

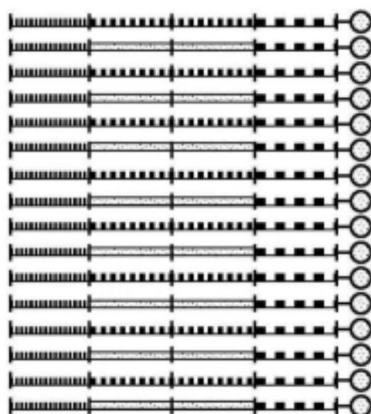


图66C

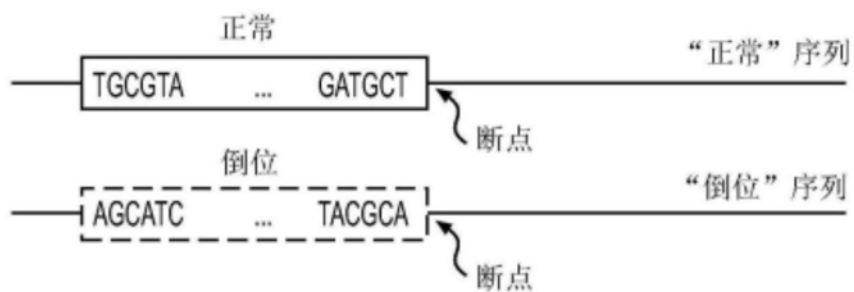


图67A

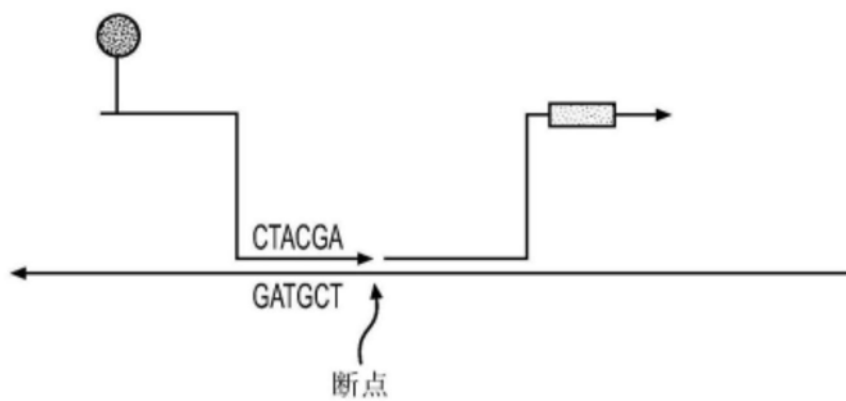


图67B

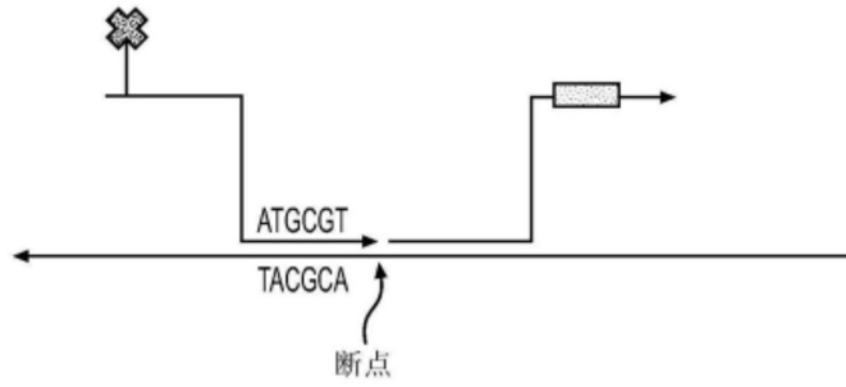


图67C

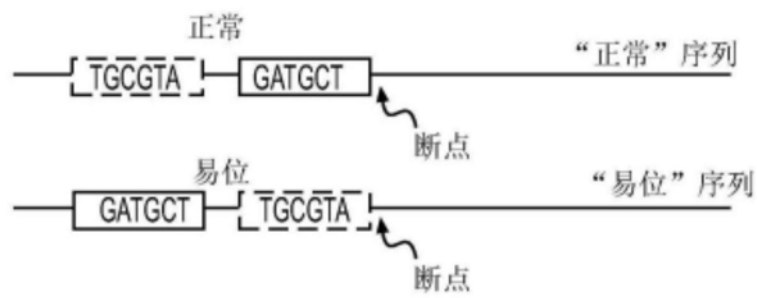


图68A

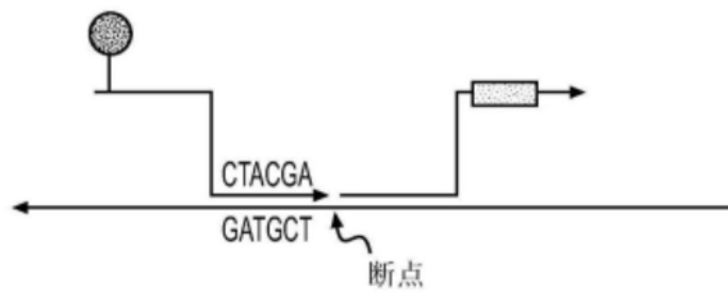


图68B

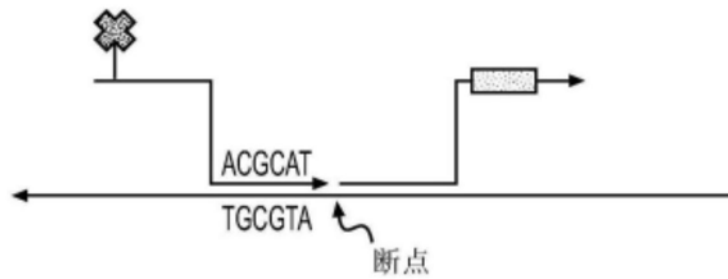


图68C

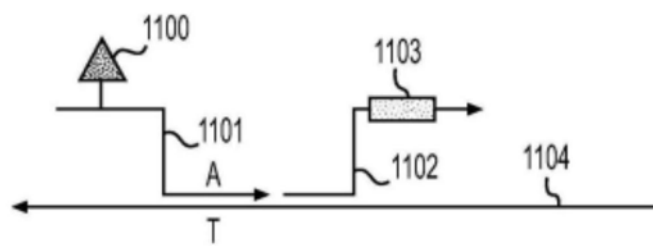


图69A

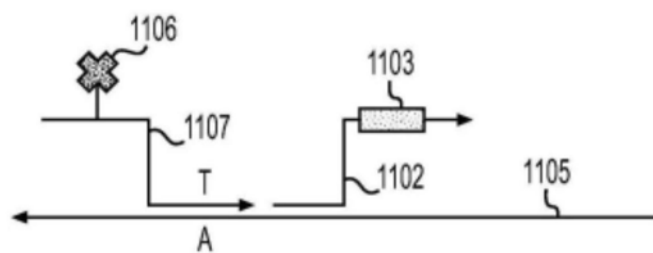


图69B