(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101988128 A
(43)申请公布日 2011.03.23

(21)申请号 201010591109.9

(22)申请日 2010.12.16

(71)申请人 苏州大学
地址 215123 江苏省苏州市工业园区仁爱路199号苏州大学医学部药理学系
申请人 苏州旷远生物分子技术有限公司

(72)发明人 王进 秦正红 杨舒婷 何晓辉

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有限公司 32103
代理人 马明渡 王华

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)

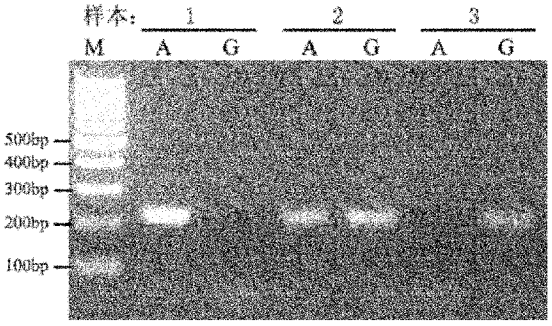
权利要求书 1 页 说明书 6 页 序列表 3 页
附图 3 页

(54)发明名称

一种用于检测CYP2C19基因分型的PCR试剂盒

(57)摘要

一种用于CYP2C19基因分型的PCR试剂盒，采用一系列经修饰的检测引物以及高保真DNA聚合酶介导的聚合酶链式反应，检测基因CYP2C19*1/*2型(即681G/A位点)和/或CYP2C19*1/*3型(即636G/A位点)。本发明的试剂盒，可以实现低成本、高效率、高通量检测CYP2C19基因中影响其编码的药物代谢酶活性的两个位点的碱基类型。这两个位点的突变可以解释中国人群相关药物的弱代谢者，本发明的试剂盒的检测结果可以用于指导个体化用药。



CN 101988128 A

1. 一种用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒，其特征在于：所述试剂盒包括检测基因 CYP2C19*1/*2 型的两条正向引物以及一条反向引物，和 / 或检测基因 CYP2C19*1/*3 型的两条反向引物以及一条正向引物：

所述检测基因 CYP2C19*1/*2 型的两条正向引物以及一条反向引物的碱基序列如下所示：

正向引物：5’-TCCCACTATCATTGATTATTTCTCG-3’；

5’-TCCCACTATCATTGATTATTTCTCA-3’；

反向引物：5’ - TGAATCACAAATACGCAAGCAGTC-3’；

所述检测基因 CYP2C19*1/*3 型的两条反向引物以及一条正向引物的碱基序列如下所示：

反向引物：5’-ACTTGGCCTTACCTGGATC-3’；

5’-ACTTGGCCTTACCTGGATT-3’；

正向引物：5’-TAGCTTCACCCTGTGATCC-3’。

2. 根据权利要求 1 所述的用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒，其特征在于：所述正向引物的 3’端 -1 与 -2 位碱基之间采用耐 3’→ 5’核酸外切酶活性的修饰。

3. 根据权利要求 2 所述的用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒，其特征在于：所述耐 3’→ 5’核酸外切酶活性的修饰为硫代磷酸化修饰。

4. 根据权利要求 1 所述的用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒，其特征在于：所述反向引物的 3’端 -1 与 -2 位碱基之间采用耐 3’→ 5’核酸外切酶活性的修饰。

5. 根据权利要求 4 所述的用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒，其特征在于：所述耐 3’→ 5’核酸外切酶活性的修饰为硫代磷酸化修饰。

一种用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒，特别涉及一种应用聚合酶链式反应（PCR）方法检测影响临床常用药物代谢的细胞色素 P450 酶 2C19 基因的两个位点的基因型，即 CYP2C19 *1/ *2 型（681G/A）与 CYP2C19 *1/ *3 型（636 G/A）的试剂盒，属于生物医学领域中的临床分子检测技术。

背景技术

[0002] 细胞色素 P450（CytochromeP450，CYP450）是由一组结构和功能相关的超家族基因（Superfamily gene）编码的同工酶，对于人类，其主要存在于肝细胞微粒体中。在 CYP450 超家族中，CYP2 是最大的家族，有 15 个亚家族（CYP2A 到 2Q），它们代谢约 20 % 目前临床使用的药物，其中 CYP2A、CYP2C、CYP2D 和 CYP2E 均具有遗传多态性和种族差异。人的肝脏中 CYP2C 约占 20%，现已克隆出 CYP2C8、2C9/10、2C18 和 2C19。近年来 CYP450 的基因型与不同个体的药物代谢酶活性的相关性的研究有很大进展，通过检测编码相关药物代谢酶的基因型来判断不同个体对药物的代谢以及药效、不良反应情况，从而指导用药，达到个体化医疗的目的。

[0003] CYP2C19（S- 美芬妥英羟化酶）是 CYP450 的主要成分之一，代谢一系列临床上常用药物，如美芬妥英、奥美拉唑、普奈洛尔、地西泮、去甲地西泮，舍曲林及氯吡格雷等，其活性存在显著的个体差异，表现为遗传多态性，从而表现为血药浓度的个体差异。中国人常见的两个 CYP2C19 等位基因多态性是 CYP2C19*2/*2 型和 CYP2C19*3/*3 型，分别为 CYP2C19 基因的第 5 外显子 G681A 和第 4 外显子 G636A 的点突变。其中 G681A 点突变产生了一个异常的拼接位点，使外显子 5’端的前 40bp 碱基发生缺失，改变了随后的 mRNA 的阅读框，从而使蛋白的合成过早终止，导致合成的酶缺乏血红素结合位点，使其失去活性。G636A 点突变使编码色氨酸的密码子突变为终止密码子，也导致了蛋白合成提前终止，使该蛋白因缺乏血红素及底物结合区而无活性。这些点突变引起编码的酶的活性下降，代谢底物的能力减弱，使血药浓度增高，从而引起与血药浓度相关的药物不良反应。

[0004] 研究表明，CYP2C19 对药物代谢的能力随着等位基因的不同组合而呈现出一定的规律性，表现为：正常基因纯合子 > 正常基因与突变基因杂合子 > 突变基因纯合子或杂合子，即通常所说的基因剂量效应。CYP2C19*1/*1 野生纯合子代表的是强代谢者（EM，extensive metabolisers），CYP2C19*2/*2 或 CYP2C19*3/*3 突变纯合子代表的是弱代谢者（PM，poor metabolisers），CYP2C19*1/*2 或 CYP2C19*1/*3 杂合子代表的是中间代谢者（IM），即杂合子强代谢者。CYP2C19*2/*2 和 CYP2C19*3/*3 这两个点突变可以完全解释中国人群弱代谢者（PM）。

奥美拉唑是目前应用最为广泛的质子泵抑制剂（PPI）之一，能抑制胃酸分泌，对 H2 受体阻滞剂治疗无效的难治性溃疡也有突出疗效，其两条主要代谢途径为羟化代谢和 S 原子氧化代谢。奥美拉唑羟化代谢受 CYP2C19 遗传基因调控。在 CYP2C19 EM 人群中，80% 都是由 CYP2C19 代谢，CYP3A 介导的 S 原子氧化则是 CYP2C19 PM 人群中的主要代谢途径。奥美

拉唑代谢存在显著的个体差异，CYP2C19 的 PM 人群奥美拉唑的血药浓度高于 EM 人群的 5 倍左右，因而应用等量奥美拉唑的 PM 者疗效显著优于 EM 者。然而，值得注意的是，长期大剂量使用 PPI 治疗会增加髋部骨折的危险，并且剂量越大，骨折危险性越高，这与质子泵抑制剂减少钙的吸收有关，因此根据 CYP2C19 基因型的多态性来选择最小有效剂量治疗有适应证的患者有重要的临床意义。

[0005] 目前用于检测 CYP2C19 基因型的方法有很多种，常规是首先抽取人外周静脉血，提取基因组 DNA，扩增 CYP2C19 突变所在区域序列，然后进行 DNA 直接测序，从测序结果判断相应位点的基因型，这种常规基因检测方法虽然可以达到检测的目的，但是直接测序的检测周期长、操作步骤过于繁琐、不能及时得到结果报告；直接测序的成本较高，这给患者以及医疗单位带来较大经济支出；另一种较为常见的检测方法为 RFLP（限制性内切酶酶解片段长度多态性），这一方法具有简便、经济和可靠的特点，但其具有酶切位点局限性，并且难以进行高通量平行分析；还有一种普通 PCR 技术，其采用一对普通引物和低保真聚合酶 Taq 进行 PCR 扩增，得到的结果特异性不高，常常造成假阳性。上述三种方法都不能满足临床检验科室进行 CYP2C19 基因型检测的要求。

发明内容

[0006] 本发明提供一种应用高保真 DNA 聚合酶介导的聚合酶链式反应（PCR）CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒，包含检测 CYP2C19*1/*2 型和 CYP2C19*1/*3 型，分别为 CYP2C19 基因的第 5 外显子 G681A 和第 4 外显子 G636A 的点突变。目的是解决现有用 PCR 扩增方法检测 CYP2C19 的基因型时价格昂贵、低效率、低通量以及假阳性高的问题。

[0007] 为达到上述目的，本发明采用的技术方案是：一种用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒，其特征在于：所述试剂盒包括检测基因 CYP2C19*1/*2 型（即 681 G/A 位点）的两条正向引物以及一条反向引物，和 / 或检测基因 CYP2C19*1/*3 型（即 636 G/A 位点）的两条反向引物以及一条正向引物：

所述检测基因 CYP2C19*1/*2 型（即 681 G/A 位点）的两条正向引物以及一条反向引物的碱基序列如下所示：

正向引物：

CYP2C19 681G:5’-TCCCACTATCATTGATTATTTCTCG-3’；

CYP2C19 681A:5’-TCCCACTATCATTGATTATTTCTCA-3’；

反向引物：

CYP2C19 681R:5’ -TGAATCACAAATACGCAAGCAGTC-3’；

所述检测基因 CYP2C19*1/*3 型（即 636 G/A 位点）的两条反向引物以及一条正向引物的碱基序列如下所示：

反向引物：

CYP2C19 636G:5’-ACTTGGCCTTACCTGGATC-3’；

CYP2C19 636A:5’-ACTTGGCCTTACCTGGATT-3’；

正向引物：

CYP2C19 636F:5’-TAGCTTCACCCTGTGATCC-3’。

[0008] 上述技术方案中的有关内容解释如下：

1、上述方案中，所述正向引物的 3’端 -1 与 -2 位碱基之间采用耐 3’→ 5’核酸外切酶活性的修饰。

[0009] 2、上述方案中，所述耐 3’→ 5’核酸外切酶活性的修饰为硫代磷酸化修饰。

[0010] 3、上述方案中，所述反向引物的 3’端 -1 与 -2 位碱基之间采用耐 3’→ 5’核酸外切酶活性的修饰。

[0011] 4、上述方案中，所述耐 3’→ 5’核酸外切酶活性的修饰为硫代磷酸化修饰。

[0012] 5、上述方案中 :所述引物（primer）是 PCR（聚合酶链式反应）技术中重要的组成部分，它是一小段单链 DNA，作为 DNA 复制的起始点，在核酸合成反应时，作为每个多核苷酸链进行延伸的出发点而起作用的多核苷酸链，在引物的 3′ -OH 上，核苷酸以二酯键形式进行合成，因此引物的 3′ -OH 必须是游离的。

[0013] 6、上述方案中，所述硫代磷酸化修饰是指在普通引物合成的基础上，3′ 端两个单核苷酸之间磷酸二酯键上的 -OH 被 -SH 所取代，从而达到耐核酸外切酶消化的效果。

[0014] 7、本发明工作原理是 :PCR（polymerase chain reaction）扩增是一种体外扩增 DNA 片段的方法，即聚合酶链式反应方法。采用这种方法，在反应系统中只要有一个拷贝的待扩增 DNA 片段，在短时间内就能扩增出大量拷贝数的特异性 DNA 片段。该方法广泛应用于基因检测。PCR 扩增的基本原理是 :模仿细胞内发生的 DNA 复制过程，以 DNA 互补链聚合反应为基础，通过靶 DNA 变性、引物与模板 DNA（待扩增 DNA）一侧的互补序列退火复性、耐热性 DNA 聚合酶催化引物延伸等过程的多次循环，产生待扩增的特异性 DNA 片段。由于上一次循环合成的两条互补链均可作为下一次循环的模板 DNA 链，所以每循环一次，底物 DNA 的拷贝数增加一倍，因此 PCR 经过 n 次循环后，理论上，待扩增的特异性 DNA 片段可达到 2^n 个拷贝数。Touchdown PCR，即降落 PCR。是优化和改良后的一种 PCR 方法，指每一个（或 n 个）循环降低 1℃（或 n℃）退火温度，直至达到一个较低的退火温度（touchdown 退火温度）。然后以此温度进行多个循环。正确和非正确退火温度 1℃差异将造成 PCR 产物量 4 倍的差异，如果相差 n℃，就会产生 4 的 n 次方倍的优势，因此，相对于非正确产物，正确产物可以得到大量的富集。退火温度起始在高于计算的 Tm 值 15℃左右，再接下来的循环中，退火温度以每次 1-2℃逐渐降低，直到 Tm 值以下 5℃，当达到特异的引物 - 模板结合的 Tm 值时，扩增就会开始。当退火温度降到非特异扩增发生的水平时，特异产物会在与非特异扩增的竞争中胜出，成为主导的扩增产物避免非特异扩增产物的出现。此扩增方法有利于 PCR 产物的纯化和假阳性的降低。

[0015] 由于上述技术方案运用，本发明与现有技术相比具有下列优点和效果 :

1、本发明的试剂盒采用特殊设计的引物，并且在其引物的 3′ 端采用硫代磷酸化修饰，其 PCR 产物特异性非常高。利用本发明的系列检测引物，在 PCR 结束并进行凝胶电泳后，可通过直接观察产物的有无来快速判断 CYP2C19 的基因型，包含 CYP2C19 基因的第 5 外显子 G681A 和第 4 外显子 G636A 的点突变的碱基类型。

[0016] 2、本发明的试剂盒采用特殊的“降落 PCR”程序，大大减少了由于 Tm 值太低而导致的引物与模板在错误位点的结合，从而提高了 PCR 效率和灵敏度，为准确检测 CYP2C19 的基因型提供了技术支持。

[0017] 3、本发明的试剂盒的核心成分（检测引物）价格低廉，而且在实验过程中不需测序，在节省了检测成本的同时，大大缩短了检测周期，提高了检测的效率。

[0018] 4、本发明的试剂盒和实时荧光定量 PCR 结合，可以实现高通量检测 CYP2C19 的基因型。

附图说明

[0019] 附图 1 为采用试剂盒中的检测基因 CYP2C19 *1/*2 型(即 681 G/A 位点)的两条正向引物以及一条反向引物检测三个人类基因组 DNA 样品得到的琼脂糖凝胶电泳图。

[0020] 附图 2 为附图 1 中所示的样品 1 (左侧) 的 DNA 测序图。

[0021] 附图 3 为附图 1 中所示的样品 2 (中间) 的 DNA 测序图。

[0022] 附图 4 为附图 1 中所示的样品 3 (右侧) 的 DNA 测序图。

[0023] 附图 5 为采用试剂盒中的检测基因 CYP2C19 *1/*3 型(即 636 G/A 位点)的两条反向引物以及一条正向引物检测两个人类基因组 DNA 样品得到的琼脂糖凝胶电泳图。

[0024] 附图 6 为附图 5 中所示的样品 4 (左侧) 的 DNA 测序图。

[0025] 附图 7 为附图 5 中所示的样品 5 (右侧) 的 DNA 测序图。

[0026] 附图 8 为 PCR 温度循环条件。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述：

实施例一：一种用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒

一种用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒包含：

10×PCR Buffer；

dNTP (2.5mM)；

Pfu DNA 聚合酶(2.5U/μl)；

引物(各 10mM)；

检测基因 CYP2C19 *1/*2 型(即 681 G/A 位点)的两条正向引物以及一条反向引物的碱基序列如下所示：

正向引物：

CYP2C19 681G: 5’－TCCCACTATCATTGATTATTTCTCG－3’；

CYP2C19 681A: 5’－TCCCACTATCATTGATTATTTCTCA－3’；

反向引物：

CYP2C19 681R: 5’－TGAATCACAAATACGCAAGCAGTC－3’；

上述正向引物的 3’端 -1，-2 位碱基之间硫代磷酸化修饰。

[0028] 检测基因 CYP2C19 *1/*3 型(即 636 G/A 位点)的两条反向引物以及一条正向引物如下所示：

反向引物：

CYP2C19 636G: 5’－ACTTGGCCTTACCTGGATC－3’；

CYP2C19 636A: 5’－ACTTGGCCTTACCTGGATT－3’；

正向引物：

CYP2C19 636F: 5’－TAGCTTCACCCTGTGATCC－3’；

上述反向引物的 3’端 -1，-2 位碱基之间硫代磷酸化修饰。

[0029] 采用该试剂盒进行实验包括下列步骤：

第一步：准备 DNA

(1)、从待检测者抽取血液样本，得到样品 1 ～ 5。

[0030] (2)、从血液样本中获取 DNA，我们采用上海生工生产的 UNIQ-10 试剂盒进行提取。

[0031] 从待检测者的血样中获取 DNA 过程：

a. 取 500ul 已加入 ACD（0.48%Citric Acid（柠檬酸）;1.32%SodiumCitrate（柠檬酸钠）;1.47%Glucose（葡萄糖））抗凝剂的血样。

[0032] b. 500ul 血样中加入 1ml 无菌水，5000 转 / 分，离心两分钟去上清，用 200ul TE 将白细胞悬浮起来。

[0033] c. 在 b 步骤制备的 200ul 样品中，加入 200ul Digestion Buffer 混匀，再加入 20ul 的 Proteinase K（蛋白酶 K）(10mg/ml)，混匀，55℃保存 30 分钟。

[0034] d. 加入 200ul BD Buffer，70℃孵育 10 分钟。

[0035] e. 加入 200ul 无水乙醇，混匀，然后用 1-ml Tip 头将样品全部转移到 UNIQ-10 柱，柱子放入 2.0-ml Collection Tube。

[0036] f. 用台式离心机，10000 转 / 分，室温离心 1 分钟。

[0037] g. 取下 UNIQ-10 柱，弃去 Collection Tube 中的废液。将柱子放回同一根 Collection Tube 中，加入 500ul PW Solution，10000 转 / 分，室温离心 1 分钟。

[0038] h. 取下 UNIQ-10 柱，弃去 Collection Tube 中的废液。将柱子放回同一根 Collection Tube 中，加入 500ul Wash Solution，10000 转 / 分，室温离心 1 分钟。

[0039] i. 取下 UNIQ-10 柱，弃去 Collection Tube 中的全部废液。将柱子放回同一根 Collection Tube 中，10000 转 / 分，室温离心 1 分钟以除去残留的 Wash Solution。

[0040] j. 将柱子放入新的无菌的 1.5ml 离心管中，在柱子中央加入 50ul 60 度预热的 Elution Buffer，室温放置 5 分钟。

[0041] k. 10000 转 / 分，室温离心 1 分钟，离心管中的液体即为血液中基因组 DNA。

[0042] 第二步：对 DNA 进行扩增

PCR 扩增进行两次，分别采用检测基因 CYP2C19 *1/*2 型（即 681 G/A 位点）和 / 或 CYP2C19 *1/*3 型（即 636 G/A 位点）的引物，PCR 扩增的程序相同：

采用 40ng/50ul 的反应体系，具体操作为：

1、将上述一系列检测引物分别与获取的六个样品的基因组 DNA、4 种脱氧核糖核苷酸、PCR 反应缓冲液、高保真 Pfu DNA 聚合酶、去离子水按一定比例混合构成单独的反应体系，具体见下表：

ddH_2O	To 50μl
10×PCR Buffer	5μl
dNTP（2.5mM）	4.0μl
引物（各 10mM）	各 1μl
Pfu DNA 聚合酶（2.5U/μl）	0.2μl
7 个样品的基因组 DNA（约 80ng/μl）	0.5μl

2、对上述反应体系进行 PCR 温度循环，PCR 温度循环条件见附图 8：

第三步：凝胶电泳

采用凝胶电泳系统对上述 DNA 扩增后的体系做凝胶电泳，得到的凝胶电泳图如附图 1、

附图 5、附图 8 所示。

[0043] 第四步：观测结果

（1）采用检测基因 CYP2C19 *1/*2 型（即 681 G/A 位点）的引物检测样品 1 ～ 3 的基因组 DNA 得到的凝胶电泳如附图 1 所示。

[0044] 附图 1 中第 1 泳道有产物，而第 2 泳道无产物，显示该样本的 CYP2C19 基因的 681 位点是 AA 突变纯合子，该结果与该样本直接 DNA 测序结果（附图 2）相一致。

[0045] 附图 1 中第 3 泳道、第 4 泳道均有产物，显示该样本的 CYP2C19 基因的 681 位点是 AG 突变杂合子，该结果与该样本直接 DNA 测序结果（附图 3）相一致。

[0046] 附图 1 中第 5 泳道无产物，而第 6 泳道有产物，显示该样本的 CYP2C19 基因的 681 位点是 GG 正常纯合子，该结果与该样本直接 DNA 测序结果（附图 4）相一致。

[0047] （2）采用检测基因 CYP2C19 *1/*3 型（即 636 G/A 位点）的引物检测样品 4 ～ 5 基因组 DNA 得到的凝胶电泳如附图 5 所示。

[0048] 附图 5 中第 1 泳道无产物，而第 2 泳道有产物，显示该样本的 CYP2C19 基因的 636 位点是 GG 正常纯合子，该结果与该样本直接 DNA 测序结果（附图 6）相一致。

[0049] 附图 5 中第 3 泳道有产物，而第 4 泳道有产物，显示该样本的 CYP2C19 基因的 636 位点是 AG 突变杂合子，该结果与该样本直接 DNA 测序结果（附图 7）相一致。

[0050] （3）采用检测基因 CYP2C19 *1/*3 型（即 636 G/A 位点）的引物检测人工突变质粒样本得到的凝胶电泳如附图 8 所示。

[0051] 附图 8 中第 1 泳道无产物，而第 2 泳道有产物，显示该样本的 CYP2C19 基因的 636 位点是 GG 正常纯合子，该结果与该样本直接 DNA 测序结果（附图 9）相一致。

[0052] 附图 8 中第 3 泳道有产物，而第 4 泳道无产物，显示该样本的 CYP2C19 基因的 636 位点是 AA 突变纯合子，该结果与该样本直接 DNA 测序结果（附图 10）相一致。

[0053] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点，其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施，并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

序列表

OrganizationApplicant

Street: 工业园区仁爱路 199 号苏州大学医学部药理学系

City: 苏州市

State: 江苏省

Country: 中国

PostalCode:215123

PhoneNumber:0512-65882071

FaxNumber:

EmailAddress:

<110>OrganizationName: 苏州大学

ApplicationProject

<120>Title: 一种用于检测 CYP2C19 基因分型的 PCR 试剂盒

<130>AppFileReference:

<140>CurrentAppNumber:

<141>CurrentFilingDate:2010-12-16

Sequence

<210>SEQIDNo.1

<213>OrganismName: 人类(Homosapiens)

<400>PreSequenceString:

TCCCACTATCATTGATTATTTCTCG 25

<212>Type:DNA

<211>Length:25

SequenceName: 检测基因 CYP2C19*1/*2 型的正向引物 1

SequenceDescription:

Sequence

<210>SEQIDNo.2

<213>OrganismName: 人类(Homosapiens)

<400>PreSequenceString:

TCCCACTATCATTGATTATTTCTCA 25

<212>Type:DNA

<211>Length:25
SequenceName: 检测基因 CYP2C19*1/*2 型的正向引物 2
SequenceDescription:

Sequence

<210>SEQIDNo.3
<213>OrganismName: 人类(Homosapiens)
<400>PreSequenceString:
TGAATCACAAATACGCAAGCAGTC 24
<212>Type:DNA
<211>Length:24
SequenceName: 检测基因 CYP2C19*1/*2 型的反向引物
SequenceDescription:

Sequence

<210>SEQIDNo.4
<213>OrganismName: 人类(Homosapiens)
<400>PreSequenceString:
ACTTGGCCTTACCTGGATC 19
<212>Type:DNA
<211>Length:19
SequenceName: 检测基因 CYP2C19*1/*3 型的反向引物 1
SequenceDescription:

Sequence

<210>SEQIDNo.5
<213>OrganismName: 人类(Homosapiens)
<400>PreSequenceString:
ACTTGGCCTTACCTGGATT 19
<212>Type:DNA
<211>Length:19
SequenceName: 检测基因 CYP2C19*1/*3 型的反向引物 2
SequenceDescription:

Sequence

<210>SEQIDNo.6

<213>OrganismName: 人类(Homosapiens)

<400>PreSequenceString:

TAGCTTCACCCTGTGATCC 19

<212>Type:DNA

<211>Length:19

SequenceName: 检测基因 CYP2C19*1/*3 型的正向引物

SequenceDescription:

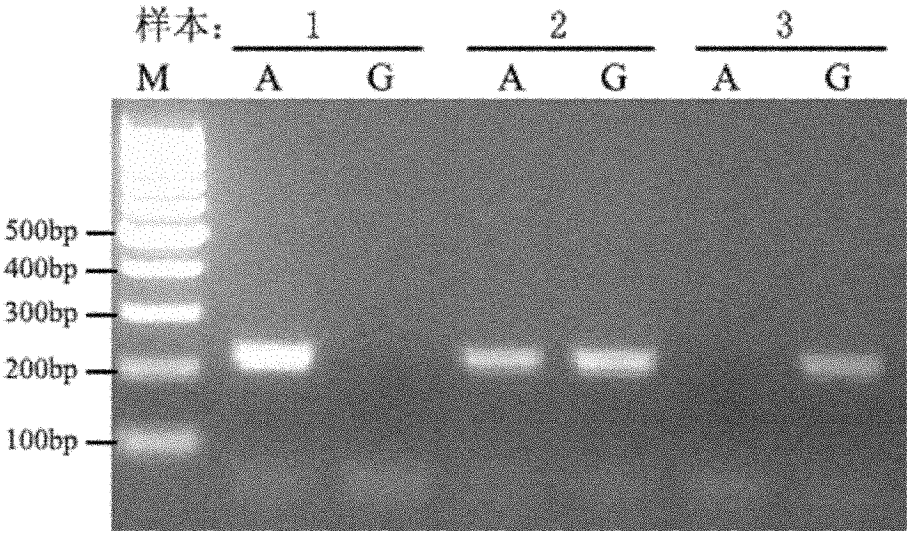

样本：
1
2
3
M
A
G
A
G
A
G
500bp
400bp
300bp
200bp
100bp

图 1

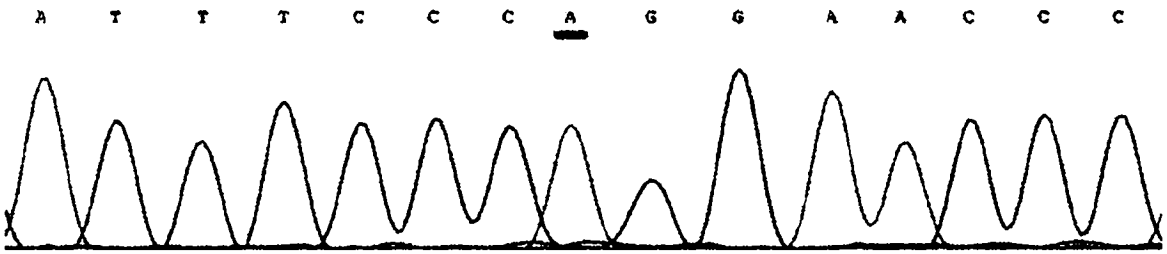

A T T T C C C A G G A A C C C

图 2

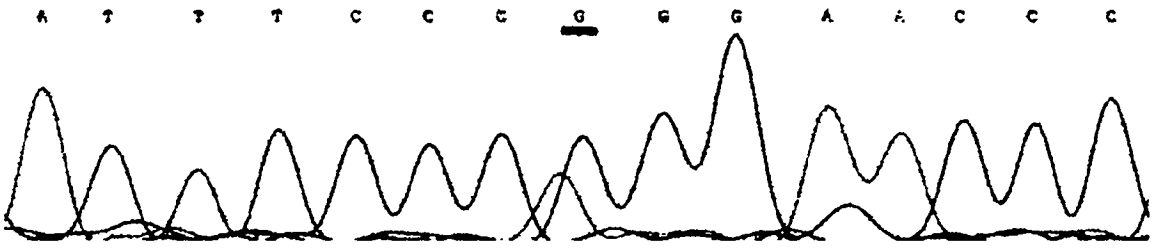

A T T T C C C G G G A A C C C

图 3

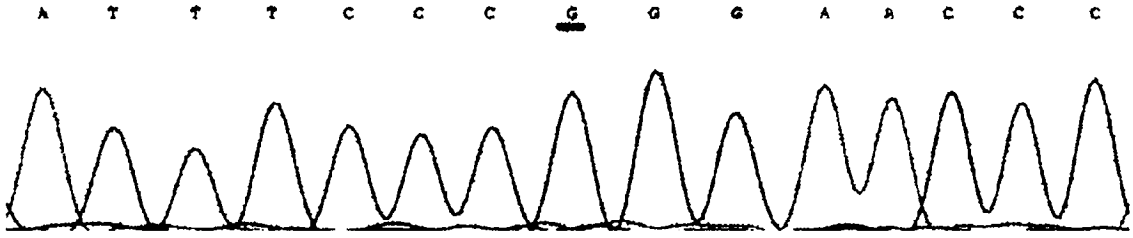

A T T T C C C G G G A A C C C

图 4

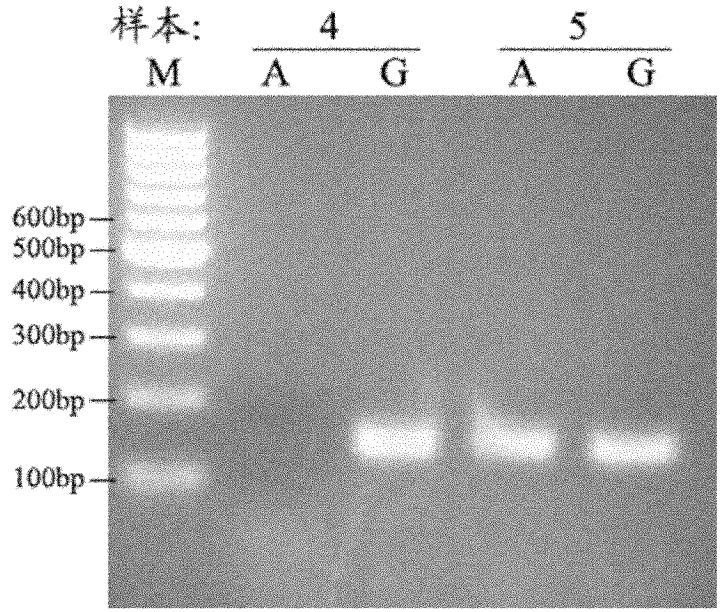

样本:
4
5
M
A
G
A
G
600bp
500bp
400bp
300bp
200bp
100bp

图 5

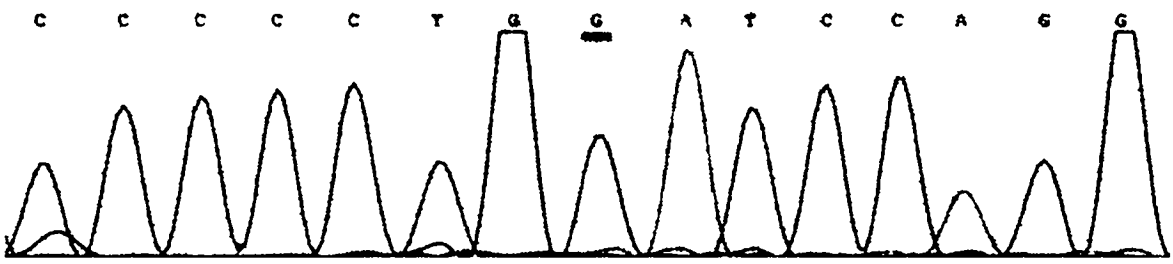

C C C C C T G G A T C C A G G

图 6

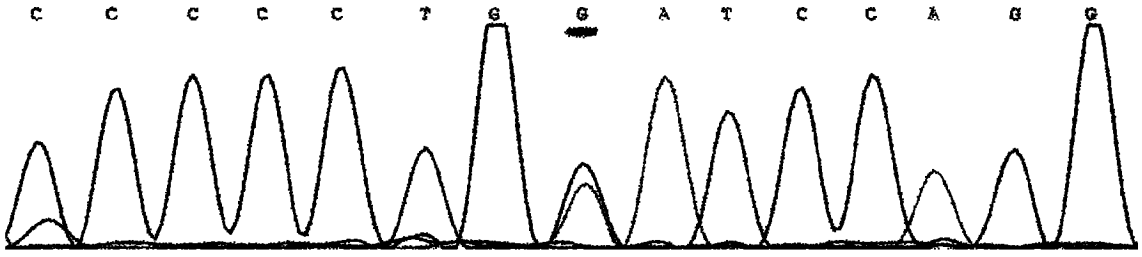


图 7

步骤			温度	时间
基因组 DNA 变性			95℃	5 分钟
循环	15 次	变性	95℃	30 秒
		退火	起始温度为 68℃，每一次循环温度递减 1℃，直到循环结束	30 秒
		延伸	72℃	30 秒
	25 次	变性	95℃	30 秒
		退火	58℃	30 秒
		延伸	72℃	30 秒
延伸			72℃	2 分钟
保存			4℃	……

图 8