



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105838793 B

(45)授权公告日 2019.07.12

(21)申请号 201610254800.5

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2016.04.22

C12Q 1/6886(2018.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12Q 1/6848(2018.01)

申请公布号 CN 105838793 A

C12N 15/11(2006.01)

(43)申请公布日 2016.08.10

(56)对比文件

(73)专利权人 上海荻硕贝肯生物科技有限公司

CN 102533740 A, 2012.07.04,

地址 201318 上海市浦东新区紫萍路908弄
21号四层

CN 104178557 A, 2014.12.03,

专利权人 上海荻硕贝肯医学检验所有限公
司

WO 9824928 A3, 1999.03.25,

上海荻硕贝肯生物技术有限公司
深圳荻硕贝肯精准医学有限公司

肖恒等.白血病融合基因及检测方法研究进
展.《医学综述》.2015,第21卷(第22期),第4130-
4133页.

(72)发明人 郑仲征 杜金伟 张鹏 王宁娟
潘捷 杜可明

Niels Pallisgaard等.Multiplex Reverse
Transcription-Polymerase Chain Reaction
for Simultaneous Screening of 29
Translocations and Chromosomal
Aberrations in Acute Leukemia.《Blood》
.1998,第92卷(第2期),第574-588页.

(74)专利代理机构 北京迎硕知识产权代理事务
所(普通合伙) 11512

审查员 魏应亮

代理人 张群峰 吕良

权利要求书1页 说明书25页

序列表20页 附图4页

(54)发明名称

用于定性检测白血病融合基因的引物、试剂
盒及方法

(57)摘要

本发明属于基因工程技术领域,公开了一种
用于检测白血病融合基因的引物组合、含有该引
物组合的试剂盒以及采用该引物组合或试剂盒
进行白血病融合基因检测的多重巢式RT-PCR方
法。本发明基于多重巢式RT-PCR技术,因此简单、
快捷,灵敏度高。此外,本发明通过合理的引物搭
配,有效避免了多对引物之间的相互作用,减少
了检测误差。采用本发明的检测方法可以全面地
对43种白血病融合基因进行定性检测,不仅可以
节约试剂用量,降低检测成本,而且检测范围广,
适于对临幊上大批量样本进行检测。

1. 一种用于检测白血病融合基因的引物组合,其由SEQ ID NO.1-138所示的引物组成,其中SEQ ID NO.1-69所示的引物组成第一大组检测引物,SEQ ID NO.70-138所示的引物组成第二大组检测引物;第一大组检测引物进一步由SEQ ID NO.1-8、68、69所示的第一小组检测引物,SEQ ID NO.9-15、68、69所示的第二小组检测引物,SEQ ID NO.16-21、68、69所示的第三小组检测引物,SEQ ID NO.22-26、68、69所示的第四小组检测引物,SEQ ID NO.27-33、68、69所示的第五小组检测引物,SEQ ID NO.34-38、68、69所示的第六小组检测引物,SEQ ID NO.39-46、68、69所示的第七小组检测引物,SEQ ID NO.47-50、68、69所示的第八小组检测引物,SEQ ID NO.51-54、68、69所示的第九小组检测引物,SEQ ID NO.55-59、68、69所示的第十小组检测引物,SEQ ID NO.60-67、68、69所示的第十一小组检测引物组成;第二大组检测引物进一步由SEQ ID NO.70-77、137、138所示的第一小组检测引物,SEQ ID NO.78-84、137、138所示的第二小组检测引物,SEQ ID NO.85-90、137、138所示的第三小组检测引物,SEQ ID NO.91-95、137、138所示的第四小组检测引物,SEQ ID NO.96-102、137、138所示的第五小组检测引物,SEQ ID NO.103-107、137、138所示的第六小组检测引物,SEQ ID NO.108-115、137、138所示的第七小组检测引物,SEQ ID NO.116-119、137、138所示的第八小组检测引物,SEQ ID NO.120-123、137、138所示的第九小组检测引物,SEQ ID NO.124-128、137、138所示的第十小组检测引物,SEQ ID NO.129-136、137、138所示的第十一小组检测引物组成。

2. 一种用于检测白血病融合基因的试剂盒,其包含权利要求1所述的引物组合。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其中SEQ ID NO.1-67所示的引物浓度为2.5pmol/μl,SEQ ID NO.70-136所示的引物浓度为3.5pmol/μl,SEQ ID NO.68、69、137和138所示的引物浓度为2.5pmol/μl。

4. 根据权利要求2或3所述的试剂盒,其进一步包含5%的DMSO。

5. 权利要求1所述的引物组合在制备检测白血病融合基因试剂盒中的应用。

用于定性检测白血病融合基因的引物、试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,具体涉及用于定性检测白血病融合基因的引物、试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 白血病是儿童和青年中最常见的一种恶性克隆性疾病。多项研究表明大部分的白血病患者中存在某种染色体结构的畸变(缺失、重复、倒位、易位等),这些是导致白血病发生以及发展的重要原因。染色体结构的畸变,会导致原癌基因及抑癌基因的结构变异,使得癌基因、原癌基因突变激活,抑癌基因缺失或失活,产生新的融合基因,编码融合蛋白。因而不同的融合基因已经成为不同类型白血病的分子生物学特异性标志。如慢性髓细胞白血病(CML)中的BCR-ABL1融合基因,急性早幼粒细胞白血病(APL)中的PML-RARA融合基因已成为各自的分子标志并进一步成为治疗的靶标。2000年WHO关于白血病分型的标准中更是将其中一些常见的异常归纳为白血病基本诊断的标准之一。鉴于白血病相关融合基因的检测对于白血病诊断、分型、临床治疗选择、预后疗效评价以及微小残留病(MRD)检测上的临床价值,融合基因检测技术的开发具有极大的临床意义和市场价值。

[0003] 目前,融合基因的检测方法主要包括染色体核型分析、荧光原位杂交技术以及聚合酶链式反应(PCR)。与染色体核型分析和荧光原位杂交技术相比,PCR检测方法具有快速有效、灵敏度高等优点,在临幊上有较广的应用。多重PCR技术是指在同一个PCR体系中加入多对引物,能够同时扩增出多个DNA片段。作为PCR重要的衍生技术,多重PCR可以同时扩增多个目的基因,具有节省时间、降低成本、提高效率的优点。巢式PCR是一种变异的PCR技术,其使用两对引物扩增完整的片段。第一对引物扩增片段和普通PCR相似。第二对引物称为巢式引物,其结合在第一次PCR产物的内部,使得第二扩增片段短于第一次扩增。巢式PCR的优点在于,如果第一次扩增产生了错误片段,则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。因此,巢式PCR能够提高PCR的灵敏度以及减少非特异扩增。

[0004] 然而,多重巢式PCR技术需要在同一个PCR反应体系中加入多对引物,这样就增加了多对引物在反应体系中相互作用和形成引物二聚体的几率,从而降低了PCR反应的特异性和效率,甚至不能扩增出特异性目标产物。此外,随着人们对白血病研究的不断深入,越来越多的白血病融合基因已被发现,当前检测白血病融合基因的方法已经远远不能满足人们对于同时检测绝大部分融合基因的需求,亟需一种快速、有效且易于标准化的能同时定性检测绝大部分白血病融合基因的方法。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术中存在的上述缺陷,基于最新的白血病融合基因数据库,重新设计了用于检测白血病融合基因的检测引物以及多重巢式RT-PCR方法。本发明的检测方法快速、有效且易于对43种白血病融合基因进行标准化的定性检测。

[0006] 为此,本发明一方面提供了一种用于检测白血病融合基因的引物组合,其由SEQ

ID NO.1-138所示的引物组成。

[0007] 在本发明优选的实施方案中,该引物组合中SEQ ID NO.1-69所示的引物组成第一大组检测引物,SEQ ID NO.70-138所示的引物组成第二大组检测引物;第一大组检测引物进一步由SEQ ID NO.1-8、68、69所示的第一小组检测引物,SEQ ID NO.9-15、68、69所示的第二小组检测引物,SEQ ID NO.16-21、68、69所示的第三小组检测引物,SEQ ID NO.22-26、68、69所示的第四小组检测引物,SEQ ID NO.27-33、68、69所示的第五小组检测引物,SEQ ID NO.34-38、68、69所示的第六小组检测引物,SEQ ID NO.39-46、68、69所示的第七小组检测引物,SEQ ID NO.47-50、68、69所示的第八小组检测引物,SEQ ID NO.51-54、68、69所示的第九小组检测引物,SEQ ID NO.55-59、68、69所示的第十小组检测引物,SEQ ID NO.60-67、68、69所示的第十一小组检测引物组成;第二大组检测引物进一步由SEQ ID NO.70-77、137、138所示的第一小组检测引物,SEQ ID NO.78-84、137、138所示的第二小组检测引物,SEQ ID NO.85-90、137、138所示的第三小组检测引物,SEQ ID NO.91-95、137、138所示的第四小组检测引物,SEQ ID NO.96-102、137、138所示的第五小组检测引物,SEQ ID NO.103-107、137、138所示的第六小组检测引物,SEQ ID NO.108-115、137、138所示的第七小组检测引物,SEQ ID NO.116-119、137、138所示的第八小组检测引物,SEQ ID NO.120-123、137、138所示的第九小组检测引物,SEQ ID NO.124-128、137、138所示的第十小组检测引物,SEQ ID NO.129-136、137、138所示的第十一小组检测引物组成。

[0008] 本发明通过选择相关基因断裂位点上游序列和下游序列,来进行特异性多重PCR引物的设计。所设计的引物T_m值均在60℃附近,整合搭配各个引物,从而尽量避免了引物二聚体产生,提高了PCR扩增的特异性和效率。

[0009] 针对43种白血病融合基因,本发明设计的具体引物情况如表1所示。

[0010] 表1、本发明的引物情况表

[0011]

多重 PCR 编号	分离 PCR 编号	第1轮PCR引物			第2轮PCR引物		
		引物 名称	引物 编号	5'→3'序列	引物 名称	引物 编号	5'→3'序列
R1	AB	CBFB-1	R1-X1	TTTGAAGGCTCCATGATTCTG	CBFB-2	R1-Y1	TGGGCTGTCTGGAGTTGATG
	A	MYH11-1	R1-X2	AGGTCCCCCTCCAGCTTCTCT	MYH11 -2	R1-Y2	TGAGCGCCTGCATGTTGAC
	B	MYH11-3	R1-X3	GAGCTGGATGTTGAGAGTGGAG AT	MYH11 -4	R1-Y3	TCCTCGTCCAGCTGGTCTG
	CDE	MLL-1	R1-X4	CCGCCTCAGCCACCTACTAC	MLL-2	R1-Y4	GGACCGCCAAGAAAAGAAGT
	CDE	MLL-3	R1-X5	AGCACTCTCTCCAATGGCAATA GT	MLL-4	R1-Y5	AGCAGATGGAGTCCACAGGA TCAG
	C	AFX1-1	R1-X6	GGGTGACTGGCAGCACAGAT	AFX1-2	R1-Y6	GGTTTCTTCTGGGGGCTTA ACT
	D	AF6-1	R1-X7	CCGCTGACATGCACTTCATAG	AF6-2	R1-Y7	GAGGACAGCATTGCAATAC AG
	E	ELL-1	R1-X8	ACACCGTGATCTTGTCCGTATG	ELL-2	R1-Y8	TTCCCCATGACTGGAGACATA C
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCTCTACC	E2A-2		CTACGACGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTCTGCCGTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTTCGCACTT
R2	ABC DE	MLL-1	R1-X4	CCGCCTCAGCCACCTACTAC	MLL-2	R1-Y4	GGACCGCCAAGAAAAGAAGT
	ABC DE	MLL-3	R1-X5	AGCACTCTCTCCAATGGCAATA GT	MLL-4	R1-Y5	AGCAGATGGAGTCCACAGGA TCAG

[0012]

	A	AF1P-1	R2-X3	GGATACCTTGCCATCTGTGTC	AF1P-2	R2-Y3	TGTCGGCTAAATCCCAAATCT
	B	AF17-1	R2-X4	CCTCCAGGTCTGGCTCTGTGT	AF17-2	R2-Y4	GTAGAGCCAGCCAGAGAAAAA CAC
	C	AF10-1	R2-X5	CTGTTCTATGCTGGCTGCTACTG	AF10-2	R2-Y5	AACTGCTGTTGCCTGGTTGAT
	D	AF10-3	R2-X6	TTGCCCTCTGACCCTCTAGTCT	AF10-4	R2-Y6	TTCCACTAGAGGTGTGTCAG AG
	E	AF10-5	R2-X7	TGGACATTATCGGCACCATTAC	AF10-6	R2-Y7	GGCAAACTGAGCGCATGTTA C
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCTCTACC	E2A-2		CTACGACGGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTTCGCGTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTCGCACCT
R3	A	PBX1-1	R3-X1	GCCACGCCCTCCGCTAAC	PBX1-2	R3-Y1	CATGTTGTCAGCCGCATCAG
	D	SIL-1	R3-X2	CGACCCCAACGTCCCAGAG	SIL-2	R3-Y2	CCCGCTCCTACCCCTGCAAAC
	D	TAL1-1	R3-X3	CGGTCATCCTGGGGCATATT	TAL1-2	R3-Y3	AGACCGGCCCTCTGAATAG
	B	HLF-1	R3-X4	GCCCAGCTCCTCCTCAAGT	HLF-2	R3-Y4	CGCCTTGCCCAGTACTTGTC
	C	TEL-1	R3-X5	CACTCCGTGGATTCAAACAGT C	TEL-2	R3-Y5	CTCATGGGAAGACCTGGCTT AC
	C	AML1A-1	R3-X6	AGCCGAGTAGTTTCATGATTG C	AML1A -2	R3-Y6	AGCACGGAGCAGAGGAAGTT G
	AB	E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCTCTACC	E2A-2		CTACGACGGGGGTCTCCAC
	AB	E2A-3		TTTCCTCTTCGCGTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTCGCACCT
R4	AB	AML1A-3	R4-X1	GATGGCACTCTGGTCACTGTG	AML1A -4	R4-Y1	TGGCTGGCAATGATGAAAAC
	B	MDS-1	R4-X2	CGATCTCCTTTGGCCATATT C	MDS-2	R4-Y2	CCCCAGGCATATTGACTCTC
	A	ETO-1	R4-X5	TCTCCTATCTCGGGTGAAATGTC	ETO-2	R4-Y5	CGTTGTCGGTGTAAATGAAC G
	C	TLS-1	R4-X6	GGTGGCGGTTATGGCAATC	TLS-2	R4-Y6	CAGCGGTGGCTATGGACAG
	C	ERG-1	R4-X7	GTTCATGTTGGTTGCTCTTC	ERG-2	R4-Y7	GGTGCCTTCCCAGGTGATG
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCTCTACC	E2A-2		CTACGACGGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTTCGCGTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTCGCACCT
R5	ABC DE	MLL-1	R1-X4	CCGCCTCAGCCACCTACTAC	MLL-2	R1-Y4	GGACCGCCAAGAAAAGAAGT
	ABC DE	MLL-3	R1-X5	AGCACTCTCCAATGGCAATA GT	MLL-4	R1-Y5	AGCAGATGGAGTCCACAGGA TCAG
	A	AF4-1	R5-X3	GAATTTGAGTGAGTTTGAG ATGTATC	AF4-2	R5-Y3	GTTTTGGTTTGGGTACAG AACT
	D	AF9-1	R5-X4	CCAGATGTTCCAGGTAACCT GT	AF9-2	R5-Y4	GAGCAAAGATCAAAATCAA TGTT

[0013]

	C	AF9-3	R5-X5	TTCGGCTGCCTCCTATTTAC	AF9-4	R5-Y5	CTCCATTTCAGAGTCATTGTC GTTAT
	E	AF1Q-1	R5-X6	GCTTGAGAGGGAAGACAATGAG	AF1Q-2	R5-Y6	TGCTGGCAATGGGAGCTCTC
	B	ENL-1	R5-X7	CACCATCCAGTCGTGAGTGAAC	ENL-2	R5-Y7	GCGATGCCAGCTCTAAC
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCCCTTACCC	E2A-2		CTACGACGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTCTCGCCGTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTCGCACTT
	A	BCR-1	R6-X1	CGCTCTCCCTCGCAGAACT	BCR-2	R6-Y1	ACTGCCGGTTGTCGTGTC
R6	B	BCR-3	R6-X2	GAGTCACTGCTGCTGCTTATGTC	BCR-4	R6-Y2	CACGTTCCCTGATCTCCTCTGA C
	ABC	ABL-1	R6-X3	TTTTGGTTGGGCTTCACAC	ABL-2	R6-Y3	ACACCATTCCCCATTGTGATT AT
	CD	TEL-3	R6-X4	GCTGCTGACCAAAGAGGACTT	TEL-4	R6-Y4	CCTCATTCAAGGTGATGTGCTC TAT
	D	PDGFR-1	R6-X5	CATAAGGGCTTGCTTCTCACTG	PDGFR -2	R6-Y5	CATGGGGTCCACGTAGATGTA C
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCCCTTACCC	E2A-2		CTACGACGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTCTCGCCGTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTCGCACTT
	A	DEK-1	R7-X1	TGCCAATGTTAAGAAAGCAGAT AG	DEK-2	R7-Y1	AGCAGCACCAAGAAGAA T
R7	AB	CAN-1	R7-X2	GGCAAGGATTGGGTGAGAT	CAN-2	R7-Y2	GTCTCTCGCTCTGGCACAAG
	B	SET-1	R7-X3	CACCGAAATCAAATGGAATCT G	SET-2	R7-Y3	TGAGGAACCAGAGAGCTTCTT TA
	C	STAT5B- 1	R7-X4	TGGGACCTTCCTCCTGAGATT	STAT5 B-2	R7-Y4	GCATCACCAATTGCTTGAAG
	D	BCOR-1	R7-X5	GCCTCTGCACGATGCTGTT	BCOR- 2	R7-Y5	CGATGCTGTTGAGAACGATCA
	E	NUMA1- 1	R7-X6	AGCGCCAACTCATCGTTCTAC	NUMA 1-2	R7-Y6	TTCTCCGATTATGGCAACTC
	F	FIP1L1-1	R10-X 1	ACCTGGTGCTGATCTTCTGAT	FIP1L1- 3	R7-Y7	ACTGCTCCACCTCTGATTCCA
	CDEF	RARA-1	R8-X4	AAGCCCTTGAGCCCCCAC	RARA- 2	R8-Y4	CCCATAGTGGTAGCCTGAGG AC
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCCCTTACCC	E2A-2		CTACGACGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTCTCGCCGTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTCGCACTT
	A	PLZF-1	R8-X1	CCACAAGGCTGACGCTGTATT	PLZF-2	R8-Y1	GTGGGCATGAAGTCAGAGAG C
R8	B	PML3-1	R8-X2	CAAGAAAGCCAGCCCCAGAG	PML3-2	R8-Y2	GCCAGTGTACGCCCTCTCCAT
	C	PML3-3	R8-X3	GTGCGCCAGGTGGTAGCTC	PML3-4	R8-Y3	CAGCGCGACTACGAGGAGAT
	ABC	RARA-1	R8-X4	AAGCCCTTGAGCCCCCAC	RARA- 2	R8-Y4	CCCATAGTGGTAGCCTGAGG AC

[0014]

		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCTTCTACC	E2A-2		CTACGACGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTTCGCGCTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTGCACCT
R9	ABC	NPM-1	R9-X1	ACGAAGGCAGTCCAATTAAAGT AAC	NPM-2	R9-Y1	GGTCAGGCCAGTGCATATT
	A	ALK-1	R9-X2	CACACTCAGGCAGCGTCTTC	ALK-2	R9-Y2	CTTGGGTCGTTGGGCATTC
	B	RARA-1	R8-X4	AAGCCCTTGCAAGCCCTCAC	RARA-2	R8-Y4	CCCATAGTGGTAGCCTGAGG AC
	C	MLF1-1	R9-X3	AGCTCTCCCTCTACCATCAGAG ATACT	MLF1-2	R9-Y3	AAAGGGTTCAGAAAAACTTC TTATCATC
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCTTCTACC	E2A-2		CTACGACGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTTCGCGCTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTGCACCT
R10	A	FIP1L1-1	R10-X1	ACCTGGTGCTGATCTTCTGAT	FIP1L1-2	R10-Y1	AGAGGATACGAATGGGACTT GAAG
	B	STRN-1	R10-X2	AACAAGGTCGACAACACTCAG ACA	STRN-2	R10-Y2	ATGGCACAGAGGCTGAAGTT AAA
	C	ETV6-1	R10-X3	GATA GTGGATCCAACGGACTG	ETV6-2	R10-Y3	CTCGACTGTGGGAAACCAT A
	ABC	PDGFRA-1	R10-X4	TGAGAGCTGTTTTCACTGGA	PDGFR-A-2	R10-Y4	CCGTGGGTTTAGCATCTTC C
	D	KIF5B-1	R10-X5	CAGCAGATCCAGAGCCATAGAG A	KIF5B-2	R10-Y5	ACAACCTGCGCAAACCTTTG
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCTTCTACC	E2A-2		CTACGACGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTTCGCGCTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTGCACCT
R11	ABC DEFG	NUP98-1	R11-X1	CCTGGACTCTTGAAGTGG	NUP98-2	R11-Y1	GCCTCTGGTACAGGAGCCT
	A	HOXA9-1	R11-X2	GTCCCTGGTGAGGTACATGTTG	HOXA9-2	R11-Y2	CCTTCGCTGGTTGTTTC
	B	HOXA11-1	R11-X3	TTCATTCTCCTGTTCTGAAACCA G	HOXA11-2	R11-Y3	TGAAGAAGAACTCCGTTCCA
	C	HOXA13-1	R11-X4	GATATCCGCCTCCGTTGTC	HOXA13-2	R11-Y4	ATAAGGCACGCGTTCTTC
	D	HOXC11-1	R11-X5	TCTGCAGGTTACAGCAGAGGA	HOXC11-2	R11-Y5	CAGCCGCTCTCTTGTGA
	E	HOXD13-1	R11-X6	CGCCGTTGCTCTGTTAAT	HOXD13-2	R11-Y6	GCACATGTCCGGCTGATTAA
	F	PMX1-1	R11-X7	TCTCGCACAAAAGCATCAGG	PMX1-2	R11-Y7	GCTCAAAGACACGCTCCAAA
	G	TOP1-1	R11-X8	AAACTTGACATTCTCGGAAGA GG	TOP1-2	R11-Y8	TCCACTTGATGCCTTCAGGA
		E2A-1		TTCTCGTCCAGCCCTTCTACC	E2A-2		CTACGACGGGGTCTCCAC
		E2A-3		TTTCCTCTTCGCGCTTCA	E2A-4		AGGTTCCGCTCTGCACCT

[0015] 本发明另一方面提供了一种用于检测白血病融合基因的试剂盒,其包含本发明所述的引物组合。

[0016] 在本发明优选的实施方案中,试剂盒中SEQ ID NO.1-67所示的引物浓度为2.5pmol/μl,SEQ ID NO.70-136所示的引物浓度为3.5pmol/μl,SEQ ID NO.68、69、137和138所示的引物浓度为2.5pmol/μl。

[0017] 在本发明进一步优选的实施方案中,试剂盒中进一步包含5%的DMSO。

[0018] 本发明另一方面提供了本发明所述的引物组合在制备检测白血病融合基因试剂盒中的应用。

[0019] 本发明再一方面提供了本发明所述的引物组合,或者本发明所述的试剂盒在检测白血病融合基因中的应用。

[0020] 本发明最后一方面提供了一种检测白血病融合基因的多重巢式RT-PCR方法,其包含以下步骤:

[0021] 1、获取待测样品的cDNA模板。

[0022] 2、采用本发明所述的引物SEQ ID N0.1-69,或采用本发明所述的试剂盒,以步骤1中获取的cDNA为模板,进行第一轮PCR扩增。

[0023] 第一轮PCR扩增的引物为外侧引物,分为11管,每管中均为多重引物,采用20 μ l的反应体系:去离子水8.18 μ l、10 \times Stanard Taq Reaction Buffer 2 μ l、2.5mM dNTPs 1.6 μ l、2.5mM MgCl₂ 0.12 μ l、2.5pmol/ μ l Primes 2 μ l、DMSO 1 μ l、cDNA Template 5 μ l、Hot Start Taq DNA聚合酶0.1 μ l,反应条件为:首先95°C 30s;其次95°C 30s,58°C 30s,68°C 50s,共25个循环。

[0024] 3、采用本发明所述的引物SEQ ID N0.70-138,或采用本发明所述的试剂盒,以步骤2中获得的扩增产物为模板,进行第二轮PCR扩增。

[0025] 第二轮PCR扩增的引物为内侧引物,同样地相对应分为11管,每管中也均为多重引物,同样采用20 μ l的反应体系:去离子水12.3 μ l、10 \times Stanard Taq Reaction Buffer 2 μ l、2.5mM dNTPs 1.6 μ l、3.5pmol/ μ l Primes 2 μ l、DMSO 1 μ l、第1轮PCR产物1 μ l、Hot Start Taq DNA聚合酶0.1 μ l,反应条件为:首先95°C 30s;其次95°C 30s,58°C 30s,68°C 50s,共20个循环。

[0026] 4、第二轮PCR扩增产物经电泳后,进行结果判读。

[0027] 本发明在多重巢式RT-PCR的检测中,内参对照引物针对人E2A基因,且第一轮和第二轮PCR扩增时,每管中均加入内参基因E2A引物,阴性对照(水)中则不添加任何cDNA模板。因此,在采用电泳进行检测时,只有当内参基因扩增出690bp的目的条带,且其中1管中能够扩增出相应的融合基因目的条带,无模板对照品无扩增信号时,待测样本的检测结果才有效且呈阳性。

[0028] 在本发明优选的实施方案中,SEQ ID N0.1-67所示的引物浓度为2.5pmol/ μ l,SEQ ID N0.70-136所示的引物浓度为3.5pmol/ μ l,SEQ ID N0.68、69、137和138所示的引物浓度为2.5pmol/ μ l。

[0029] 在本发明进一步优选的实施方案中,在第一轮和第二轮PCR扩增时,体系内均加入终体积为5%的DMSO,以提高PCR扩增效率及特异性。

[0030] 由上述描述可知,与现有技术相比,本发明具备如下优点。

[0031] 1、与现有的染色体核型分析和荧光原位杂交技术相比,本发明的检测方法基于多重巢式RT-PCR技术,因此方法简单、快捷,灵敏度高。

[0032] 2、本发明的检测方法通过合理的引物搭配,可以有效避免多对引物之间的相互作用,从而减少了检测误差。

[0033] 3、本发明的检测方法可以全面地对43种白血病融合基因进行定性检测,不仅可以节约试剂用量,降低检测成本,而且检测范围广,适于对临幊上大批量样本进行检测。

附图说明

- [0034] 图1:43种白血病融合基因巢式RT-PCR的工作原理示意图。
- [0035] 图2:实施例1中采用白血病融合基因阳性细胞系和阴性细胞系检测本发明检测体系特异性的PCR反应产物结果图。
- [0036] 图3:实施例2中采用白血病融合基因阳性细胞系和阴性细胞系检测本发明检测体系灵敏性的PCR反应产物结果图。
- [0037] 图4:实施例3中采用本发明检测体系进行临床样本检测的结果图。

具体实施方式

[0038] 下面通过实施例对本发明作进一步的详细说明,旨在用于说明本发明而非限定本发明。应当指出,对于本领域技术人员而言,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也同样落入本发明的保护范围之内。

[0039] 实施例1:利用融合基因阳性细胞系和阴性细胞系检测本发明检测体系的特异性

[0040] 本实施例以确定含有BCR-ABL1融合基因的K562阳性细胞系、AML1-ETO融合基因的Kasumi细胞系以及不含融合基因的HL60阴性细胞系来验证本发明检测方法的可行性及特异性。其中K562细胞系、Kasumi细胞系、HL60细胞系均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

[0041] 本实施例的具体检测方法如下:

[0042] 1、细胞培养

[0043] 按照细胞培养的标准操作培养K562细胞系、Kasumi细胞系以及HL60细胞系,置于37℃、5%CO₂培养箱内培养。

[0044] 2、核酸提取

[0045] 建议使用TIANGEN RNAPrep Pure Blood Kit试剂盒,按照试剂盒说明书操作来提取细胞系中的RNA,之后立即进行逆转录。

[0046] 3、逆转录

[0047] 建议使用Promega GoScript™ Reverse Transcriptase试剂盒,按照试剂盒说明书操作来获得cDNA。逆转录的cDNA用Nuclease-Free Water进行相应地稀释(根据总RNA浓度进行计算),稀释后的cDNA用来进行巢式RT-PCR检测。

[0048] 4、多重巢式RT-PCR检测

[0049] (1) 巢式PCR第1轮反应

[0050] 20ul的反应体系中依次加入去离子水8.18ul、10×Standard Taq Reaction Buffer 2ul、2.5mM dNTPs 1.6ul、25mM MgCl₂ 0.12ul、2.5pmol/ul Primers 2ul、DMSO 1ul、cDNA Template 5ul、Hot Start Taq DNA聚合酶0.1ul。

[0051] PCR反应条件为:95℃预变性30s;95℃变性30s,58℃退火30s,68℃延伸50s,共25个循环。PCR结束的产物作为第2轮反应的模板。

[0052] (2) 巢式PCR第2轮反应

[0053] 20ul的反应体系中依次加入去离子水12.3ul、10×Standard Taq Reaction Buffer 2ul、2.5mM dNTPs 1.6ul、3.5pmol/ul Primers 2ul、DMSO 1ul、第1轮PCR产物1ul、Hot Start Taq DNA聚合酶0.1ul。

[0054] PCR反应条件为:95℃预变性30s;95℃变性30s,58℃退火30s,68℃延伸50s,共20个循环;最后68℃充分延伸5min。

[0055] (3) 电泳检测

[0056] 用2%的琼脂糖凝胶电泳检测第2轮扩增产物,检测结果参见说明书附图2。其中图2A为K562阳性细胞系的融合基因检测结果;图2B为Kasumi阳性细胞系的融合基因检测结果;图2C为HL60阴性细胞系的融合基因检测结果;图2D为阴性对照(水)的检测结果。泳道1-11分别代表第1-11管(R1-R11)中的反应产物,M为500bp标准分子量。

[0057] 从附图2可以看出,图2A、2B和2C中,R1-R11每个泳道中都扩增出690bp的内参基因E2A。K562阳性细胞系中含有BCR-ABL1的融合基因,R6泳道中可以扩增出BCR-ABL1的目的条带,如图2A所示;Kasumi阳性细胞系中含有AML1-ETO的融合基因,R4泳道中可以扩增出AML1-ETO的目的条带,如图2B所示;HL60阴性细胞系中不含融合基因,R1-R11泳道中都扩增不出目的条带,如图2C所示;阴性对照无模板扩增不出内参基因E2A和融合基因,如图2D所示。

[0058] 由此可见,本实施例的检测结果与融合基因阳性细胞系及阴性细胞系的特性相一致,表明利用本发明的检测体系可以特异地进行白血病融合基因的定性检测。

[0059] 实施例2:利用融合基因阳性细胞系和阴性细胞系检测本发明检测体系的灵敏度

[0060] 本实施例同样以确定含有BCR-ABL1融合基因的K562阳性细胞系、AML1-ETO融合基因的Kasumi细胞系以及不含融合基因的HL60阴性细胞系来验证本发明检测体系的灵敏性。具体检测方法如下:

[0061] 以HL-60细胞系(不含融合基因的阴性细胞系)分别对K562细胞系(含有BCR-ABL1融合基因的阳性细胞系)和Kasumi细胞系(含有AML-ETO融合基因的阳性细胞系)进行100%、10%、1%、1‰、0.5‰、0.25‰、0.125‰(稀释后阳性细胞系与阴性细胞系的比例)的稀释,用稀释好的混合细胞系提取RNA并逆转录成cDNA,进行巢式RT-PCR检测。

[0062] 采用与实施例1相同的巢式PCR反应体系和反应条件,第二轮PCR扩增后产物的琼脂糖凝胶电泳结果参见说明书附图3。图3A中泳道1-7分别代表100%K562、10%K562、1%K562、1‰K562、0.5‰K562、0.25‰K562和0.125‰K562;图3B中泳道1-7分别代表100%Kasumi、10%Kasumi、1%Kasumi、1‰Kasumi、0.5‰Kasumi、0.25‰Kasumi和0.125‰Kasumi,M为500bp标准分子量。图3A和3B中每个泳道中都扩增出690bp的内参基因E2A,图3A的泳道1-6都扩增出472bp的BCR-ABL1融合基因,图3B的泳道1-6都扩增出353bp的AML1-ETO融合基因。

[0063] 由此可见,当达到0.125‰K562或0.125‰Kasumi细胞(8000个HL60细胞中含有1个K562或1个Kasumi细胞)时,本发明的多重巢式RT-PCR方法检测不到相应的融合基因,表明本发明的多重巢式RT-PCR检测体系的检测灵敏度介于1/4000-1/8000(癌细胞与正常细胞个数比)之间。

[0064] 实施例3:采用本发明的检测体系进行临床样本的检测

[0065] 本实施例采集临床白血病患者外周血或骨髓血样本150例,按照本发明的检测体系进行43种融合基因的定性检测。其中25例临床样本经本发明的多重巢式RT-PCR检测为融合基因阳性,125例为融合基因阴性。

[0066] 利用本发明的多重巢式RT-PCR检测体系检测临床样本,操作步骤包括血液样本中

白细胞RNA提取、RNA逆转录为cDNA、巢式PCR第1轮反应、巢式PCR第2轮反应、分离PCR反应产物、琼脂糖凝胶电泳。具体的操作方法同本发明实施例1。第2轮PCR扩增后产物的琼脂糖凝胶电泳结果参见说明书附图4。其中图4A为采用本发明的多重巢式RT-PCR检测到的5种融合基因异构体的电泳结果；图4B为采用本发明的多重巢式RT-PCR检测到的另外4种融合基因异构体的电泳结果。图4A中泳道1、3、5、7、9依次代表的融合基因分别为CBFB-MYH11 (A型)、E2A-PBX1、SIL-TAL1、AML1-ETO和BCR-ABL1 (p190型)，泳道2、4、6、8、10依次代表相对应的阴性对照。图4B中泳道1、3、5、7依次代表的融合基因分别为BCR-ABL1 (p210型)、PML-RARA (L型)、PML-RARA (S型) 和DEK-CAN，泳道2、4、6、8依次代表相对应的阴性对照。M1为2000bp标准分子量，M2为500bp标准分子量。图4A和4B中阴性对照中扩增不出内参基因E2A和融合基因，阳性样本中可以扩增出内参基因E2A。

[0067] 由此可见，利用本发明的多重巢式RT-PCR检测体系，检测出的白血病融合基因与临床诊断相一致，表明本发明的多重巢式RT-PCR检测体系完全可以应用于临床检测。

[0068] 以上结果表明，本发明的多重巢式RT-PCR检测体系可以全面地进行白血病43种融合基因的定性筛查。本发明的检测体系不仅节约试剂和样本的用量，同时降低了检测成本，具有临床应用价值。

序列表

<110>	上海荻硕贝肯生物科技有限公司	
<120>	用于定性检测白血病融合基因的引物、试剂盒及方法	
<160>	138	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	tttgaaggct cccatgattc tg	22
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	aggccccctt ccagcttctt ct	22
<210>	3	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	gagctggatg ttgagagtgg agat	24
[0069]		
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
	ccgcctcagc cacctactac	20
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
	agcacatctc ccaatggcaa tagt	24
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	6	
	gggtgactgg cagcacagat	20
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	7	
	ccgctgacat gcacttcata g	21
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<400> 8 acaccgtat cttgcctgt atg	23
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 9 ccgcctcagc cacctactac	20
<210> 10 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 10 agcactctct ccaatggcaa tagt	24
<210> 11 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 11 ggataccctt gccatctgtc tc	22
<210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 12 cctccaggtc tggctctgtc t	21
[0070] <210> 13 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 13 ctgttctatgc ctggctgcta ctg	23
<210> 14 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 14 ttgccctctgc accctctagt ct	22
<210> 15 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 15 tggacattat cggcaccatt ac	22
<210> 16 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 16 gccacgcctt ccgctaac	18
<210> 17 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 <400> 17 cgaccccaac gtccccagag	19

<210> 18		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 18		
cggtcatcct gggcatatt t	21	
<210> 19		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 19		
gccccatcc ttcctcaagt	20	
<210> 20		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 20		
cactccgtgg attcaaaca gtc	23	
<210> 21		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 21		
agccgagtag tttcatgat tgc	23	
<210> 22		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 22		
[0071] gatggcactc tggtcactgt g	21	
<210> 23		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 23		
cgtatcttcc ttgtccat attc	24	
<210> 24		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 24		
tctcctatct cgggtgaaat gtc	23	
<210> 25		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 25		
ggggcggtt atggcaatc	19	
<210> 26		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 26		
gttcatgttg gtttgctct tc	22	
<210> 27		
<211> 20		
<212> DNA		

<213> 人工序列		
<400> 27		
ccgcctcagc cacctactac		20
<210> 28		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 28		
agcactctct ccaatggcaa tagt		24
<210> 29		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 29		
gaatttgagt gagttttga agatgtatc		29
<210> 30		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 30		
ccagatgttt ccaggtact ctgt		24
<210> 31		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 31		
ttcggctgcc tcctctattt ac		22
[0072] <210> 32		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 32		
gcttgagagg gaagacaatg ag		22
<210> 33		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 33		
caccatccag tcgtgagtga ac		22
<210> 34		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 34		
cgcctccct cgcagaact		19
<210> 35		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 35		
gagtcaactgc tgctgcttat gtc		23
<210> 36		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 36		
ttttggtttg ggcttcacac		20

<210> 37		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 37		
gctgctgacc aaagaggact t	21	
<210> 38		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 38		
cataagggct tgcttctcac tg	22	
<210> 39		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 39		
tgccaatgtt aagaaagcag atag	24	
<210> 40		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 40		
ggcaaggatt tggtgtgaga t	21	
<210> 41		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 41		
[0073] caccgaaatc aatggaaat ctg	23	
<210> 42		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 42		
tgggaccttc ctcctgagat t	21	
<210> 43		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 43		
gcctctgcac gatgctgtt	19	
<210> 44		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 44		
agcgccaact catcggtcta c	21	
<210> 45		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 45		
acctggtgct gatctttctg at	22	
<210> 46		
<211> 19		

<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 46		
aagcccttgc agccctcac		19
<210> 47		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 47		
ccacaaggct gacgctgtat t		21
<210> 48		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 48		
caagaaagcc agcccagag		19
<210> 49		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 49		
gtgcgccagg tggtagctc		19
<210> 50		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 50		
aagcccttgc agccctcac		19
[0074]		
<210> 51		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 51		
acgaaggcag tccattaaa gtaac		25
<210> 52		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 52		
cacacttcag gcagcgttt c		21
<210> 53		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 53		
aagcccttgc agccctcac		19
<210> 54		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 54		
agctctccct taccatcag agatact		27
<210> 55		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 55		

acctggtgct gatcttctg at	22
<210> 56	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 56	
aacaaggctcg acaactactc agaca	25
<210> 57	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 57	
gatagtggat cccaacggac tg	22
<210> 58	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 58	
tgagagctg ttttcactg ga	22
<210> 59	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 59	
cagcagatcc agagccatag aga	23
<210> 60	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 60	
cctgggactc ttggaactgg	20
<210> 61	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 61	
gtccctggtg aggtacatgt tg	22
<210> 62	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 62	
ttcattctcc tggctgaaa ccag	24
<210> 63	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 63	
gatatccgcc tccgttgtc	20
<210> 64	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 64	
tctgcagggtt acagcagagg a	21
<210> 65	

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 65	
cgccgcttgt ccttgttaat	20
<210> 66	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 66	
tctcgaccaa aagcatcagg	20
<210> 67	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 67	
aaacttgaca ttctctggaa gagg	24
<210> 68	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 68	
ttctcgcca gcccttctac c	21
<210> 69	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 69	
[0076] ttcccttctt ctgcggcgtt ca	22
<210> 70	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 70	
tggcgtgtct ggagttgat g	21
<210> 71	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 71	
tgagcgctg catgttgac	19
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 72	
tcctcgcca gctggcttg	20
<210> 73	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 73	
ggaccggccaa gaaaagaagt	20
<210> 74	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<400> 74	24
agcagatgga gtccacagga tcag	
<210> 75	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 75	
ggttcttct tggggcctt aact	24
<210> 76	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 76	
gaggacagca ttgcataatc ag	22
<210> 77	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 77	
ttccccatga ctggagacat ac	22
<210> 78	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 78	
ggaccgccaa gaaaagaagt	20
<210> 79	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 79	
agcagatgga gtccacagga tcag	24
<210> 80	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 80	
tgtcgctaa atcccaaatc t	21
<210> 81	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 81	
gtagagccag ccagagaaaa cac	23
<210> 82	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 82	
aactgctgtt gcctgggtga t	21
<210> 83	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 83	
ttccactaga ggtgtgtgca gag	23

<210> 84		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 84		
ggcaaactga gcgcgttta c		21
<210> 85		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 85		
catgtgtcc agccgcatca g		21
<210> 86		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 86		
cccgcttcta ccctgcaaac		20
<210> 87		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 87		
agaccggccc ctctgaatag		20
<210> 88		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 88		
[0078] cgccttggcc agtacttgtc		20
<210> 89		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 89		
ctcatcggtt agacctggct tac		23
<210> 90		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 90		
agcacggagc agaggaagt g		21
<210> 91		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 91		
tggctggcaa tggatggaaac		20
<210> 92		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 92		
ccccaggcat atttgactct c		21
<210> 93		
<211> 23		
<212> DNA		

<213> 人工序列		
<400> 93		
cgttgtcggtgtaaatgaa ctg	23	
<210> 94		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 94		
cagcggtggc tatggacag	19	
<210> 95		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 95		
gggtgcctcc caggtgtatg	19	
<210> 96		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 96		
ggaccgccaa gaaaagaagt	20	
<210> 97		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 97		
agcagatgga gtccacagga tcag	24	
[0079] <210> 98		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 98		
gtttttggtt ttgggttaca gaact	25	
<210> 99		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 99		
gagcaaagat caaaatcaaa tgtt	24	
<210> 100		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 100		
ctccatttca gagtcattgt cgttat	26	
<210> 101		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 101		
tgctggcaat gggagctctc	20	
<210> 102		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 102		
gcgatgcccc agctctaacc	19	

<210> 103		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 103		
actgccccgt tgctgtgtc	19	
<210> 104		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 104		
cacgttcctg atctcctctg ac	22	
<210> 105		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 105		
acaccattcc ccatttgtat tat	23	
<210> 106		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 106		
cctcatttcag gtgatgtgct ctat	24	
<210> 107		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 107		
[0080] catggggtcc acgttagatgt ac	22	
<210> 108		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 108		
agcagcacca ccaagaagaa t	21	
<210> 109		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 109		
gtctctcgct ctggcacaag	20	
<210> 110		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 110		
tgaggaacca gagagttct tta	23	
<210> 111		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 111		
gcatcacat tgcttggaaag	20	
<210> 112		
<211> 21		

<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 112		
cgatgctgtt gagaacgatc a	21	
<210> 113		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 113		
ttctcccgat tatggcaact c	21	
<210> 114		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 114		
actgctccac ctctgattcc a	21	
<210> 115		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 115		
cccatagtg tagcctgagg ac	22	
<210> 116		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 116		
gtgggcatga agtcagagag c	21	
[0081]		
<210> 117		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 117		
gccagtgac gccttctcca t	21	
<210> 118		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 118		
cagcgcgact acgaggagat	20	
<210> 119		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 119		
cccatagtg tagcctgagg ac	22	
<210> 120		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 120		
ggttcaggc cagtgcata t	21	
<210> 121		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 121		

cttgggtcgt tggcattc	19
<210> 122	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 122	
cccatagtg tagcctgagg ac	22
<210> 123	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 123	
aaagggttca gaaaaacttc ttatcatc	28
<210> 124	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 124	
agaggatacg aatgggactt gaag	24
<210> 125	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 125	
atggcacaga ggctgaagtt aaa	23
<210> 126	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 126	
[0082] ctcgactgtg gggaaaccat a	21
<210> 127	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 127	
ccgtgggtt tagcatcttc ac	22
<210> 128	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 128	
acaacctgcg caaactcttt g	21
<210> 129	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 129	
gcctcttggt acaggagcct	20
<210> 130	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 130	
ccttcgctgg gttgttttc	20
<210> 131	

<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 131		
tgaagaagaa ctcccggtcc a		21
<210> 132		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 132		
ataaggcacg cgcttctttc		20
<210> 133		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 133		
cagccgccttc tctttgttga		20
<210> 134		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 134		
gcacatgtcc ggctgattta		20
[0083]		
<210> 135		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 135		
gctcaaagac acgctccaaa		20
<210> 136		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 136		
tccacttgat gccttcagga		20
<210> 137		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 137		
ctacgacggg ggtctccac		19
<210> 138		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 138		
aggttccgct ctgcactt		19

序列表

<110>	上海荻硕贝肯生物科技有限公司	
<120>	用于定性检测白血病融合基因的引物、试剂盒及方法	
<160>	138	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	tttgaaggct cccatgattc tg	22
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	aggtccccc ttccagttttt ct	22
<210>	3	
[0001]	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 3	
	gagctggatg ttgagatgg agat	24
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
	ccgcctcagc cacctactac	20
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
	agcactctct ccaatggcaa tagt	24
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	6	

gggtgactgg cagcacagat	20
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
ccgctgacat gcacttcata g	21
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
acaccgtgat cttgtcctgt atg	23
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
ccgcctcagc cacctactac	20
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
[0002] <213> 人工序列	
<400> 10	
agcactctct ccaatggcaa tagt	24
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
ggataccctt gccatctgtg tc	22
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	
cctccaggc tggctctgtg t	21
<210> 13	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	

ctgttctatg ctggctgcta ctg	23
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
ttgccctctg accctctagt ct	22
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 15	
tggacattat cggcaccatt ac	22
<210> 16	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
gccacgcctt ccgctaac	18
<210> 17	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
cgaccccaac gtcccagag	19
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 18	
cggtcatcct gggcatatt t	21
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 19	
gcccagctcc ttccctcaagt	20
<210> 20	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 20	

cactccgtgg	atttcaaaca	gtc	23
<210>	21		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	21		
agcccgagtag	ttttcatgat	tgc	23
<210>	22		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	22		
gatggcactc	tggtaactgt	g	21
<210>	23		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	23		
cgatcttcct	tttggtccat	attc	24
<210>	24		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	24		
tctccttatct	cgggtgaaat	gtc	23
<210>	25		
<211>	19		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	25		
ggtggcggtt	atggcaatc		19
<210>	26		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	26		
gttcatgttg	ggtttgctct	tc	22
<210>	27		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	27		

ccgcctcagc cacctactac	20
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 28	
agcactctct ccaatggcaa tagt	24
<210> 29	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 29	
gaatttgagt gagttttga agatgtatc	29
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 30	
ccagatgttt ccaggttaact ctgt	24
<210> 31	
<211> 22	
[0005] <212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 31	
ttcggctgcc tcctctattt ac	22
<210> 32	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 32	
gcttgagagg gaagacaatg ag	22
<210> 33	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 33	
caccatccag tcgtgagtga ac	22
<210> 34	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 34	

cgctctccct	cgcagaact	19
<210>	35	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	35	
gagtcactgc	tgctgcttat gtc	23
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	36	
tttggttg	ggttcacac	20
<210>	37	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	37	
gctgctgacc	aaagaggact t	21
<210>	38	
[0006]	<211> 22	
[0006]	<212> DNA	
[0006]	<213> 人工序列	
<400>	38	
cataaggcgt	tgcttctcac tg	22
<210>	39	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	39	
tgc当地	atgtt aagaaggcag atag	24
<210>	40	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	40	
ggcaaggatt	tggttgaga t	21
<210>	41	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	41	

caccgaaatc aaatggaaat ctg	23
<210> 42	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 42	
tgggacccatc ctcctgagat t	21
<210> 43	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 43	
gcctctgcac gatgctgtt	19
<210> 44	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 44	
agcgccaaact catcggttcta c	21
<210> 45	
<211> 22	
[0007] <212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 45	
acctggtgct gatctttctg at	22
<210> 46	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 46	
aagcccttgc agccctcac	19
<210> 47	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 47	
ccacaaggct gacgctgtat t	21
<210> 48	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 48	

caagaaaagcc agcccagag	19
<210> 49	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 49	
gtgcgccagg tggtagctc	19
<210> 50	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 50	
aagcccttgc agccctcac	19
<210> 51	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 51	
acgaaggcag tccaaataaa gtaac	25
<210> 52	
<211> 21	
<212> DNA	
[0008] <213> 人工序列	
<400> 52	
cacacttcag gcagcgtctt c	21
<210> 53	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 53	
aagcccttgc agccctcac	19
<210> 54	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 54	
agctctccct ctaccatcag agatact	27
<210> 55	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 55	

acctggtgct gatctttctg at	22
<210> 56	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 56	
aacaaggctcg acaactactc agaca	25
<210> 57	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 57	
gatagtgat cccaacggac tg	22
<210> 58	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 58	
tgagagcttg ttttcactg ga	22
<210> 59	
<211> 23	
<212> DNA	
[0009] <213> 人工序列	
<400> 59	
cagcagatcc agagccatag aga	23
<210> 60	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 60	
cctgggactc ttggaactgg	20
<210> 61	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 61	
gtccctggtg aggtacatgt tg	22
<210> 62	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 62	

ttcattctcc	tgttctgaaa	ccag	24
<210>	63		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	63		
gatataccgcc	tccgttgtc		20
<210>	64		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	64		
tctgcaggtt	acagcagagg	a	21
<210>	65		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	65		
cggcgcttgt	ccttgtaat		20
<210>	66		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	66		
tctcgcacaa	aagcatcagg		20
<210>	67		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	67		
aaacttgaca	ttctctggaa	gagg	24
<210>	68		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	68		
ttctcggtcca	gcccttctac	c	21
<210>	69		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	69		

tttcctctt ctgcgcgtt ca	22
<210> 70	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 70	
tggcgtgtc ggagttgtat g	21
<210> 71	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 71	
tgagcgccgt catgttgac	19
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 72	
tcctcggtcca gctgggttttg	20
<210> 73	
<211> 20	
<212> DNA	
[0011] <213> 人工序列	
<400> 73	
ggaccgccaa gaaaagaagt	20
<210> 74	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 74	
agcagatgga gtccacagga tcag	24
<210> 75	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 75	
gtttttttct tgggggcttt aact	24
<210> 76	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 76	

gaggacagca ttgcgcata tc ag	22
<210> 77	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 77	
ttccccatga ctggagacat ac	22
<210> 78	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 78	
ggaccgccaa gaaaagaagt	20
<210> 79	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 79	
agcagatgga gtccacagga tcag	24
<210> 80	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 80	
tgtcggctaa atcccaaatc t	21
<210> 81	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 81	
gtagagccag ccagagaaaa cac	23
<210> 82	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 82	
aactgctgtt gcctgggttga t	21
<210> 83	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 83	

ttccactaga ggtgtgtgca gag	23
<210> 84	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 84	
ggcaaactga gcgcatgtta c	21
<210> 85	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 85	
catgttgtcc agccgcata g	21
<210> 86	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 86	
cccgcttctt ccctgcaaac	20
<210> 87	
<211> 20	
<212> DNA	
[0013] <213> 人工序列	
<400> 87	
agaccggccc ctctgaatag	20
<210> 88	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 88	
cgcccttggccc agtacttgtc	20
<210> 89	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 89	
ctccatcgggaa agacacctggct tac	23
<210> 90	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 90	

agcacggagc agaggaagtt g	21
<210> 91	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 91	
tggctggcaa tcatgaaaac	20
<210> 92	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 92	
ccccaggcat atttgactct c	21
<210> 93	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 93	
cgttgtcggt tgtaaatgaa ctg	23
<210> 94	
<211> 19	
<212> DNA	
[0014] <213> 人工序列	
<400> 94	
cagcgggtggc tatggacag	19
<210> 95	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 95	
ggtgcccttcc caggtgatg	19
<210> 96	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 96	
ggaccgccaa gaaaagaagt	20
<210> 97	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 97	

agcagatgga	gtccacagga	tcag	24
<210>	98		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	98		
gtttttgggtt	ttgggttaca	gaact	25
<210>	99		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	99		
gagcaaagat	caaaatcaaa	tgtt	24
<210>	100		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	100		
ctccatttca	gagtcattgt	cgttat	26
<210>	101		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	101		
tgctggcaat	gggagctctc		20
<210>	102		
<211>	19		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	102		
gcgatgcccc	agctctaac		19
<210>	103		
<211>	19		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	103		
actgccccgg	tgtcggtc		19
<210>	104		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	104		

cacgttcctg atctcctctg ac	22
<210> 105	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 105	
acaccattcc ccatttgtat tat	23
<210> 106	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 106	
cctcatttcag gtgatgtgct ctat	24
<210> 107	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 107	
catggggtcc acgttagatgt ac	22
<210> 108	
<211> 21	
[0016] <212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 108	
agcagcacca ccaagaagaa t	21
<210> 109	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 109	
gtctctcgct ctggcacaag	20
<210> 110	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 110	
tgaggaacca gagagttct tta	23
<210> 111	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 111	

gcatcaccat tgcttggaaag	20
<210> 112	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 112	
cgatgttgtt gagaacgatc a	21
<210> 113	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 113	
ttctcccgat tatggcaact c	21
<210> 114	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 114	
actgctccac ctctgattcc a	21
<210> 115	
<211> 22	
[0017] <212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 115	
cccatagtggtt tagcctgagg ac	22
<210> 116	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 116	
gtgggcatga agtcagagag c	21
<210> 117	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 117	
gccagtgta c gccttctcca t	21
<210> 118	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 118	

cagcgcgact acgaggagat	20
<210> 119	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 119	
cccatagtg tagcctgagg ac	22
<210> 120	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 120	
ggttcaggc cagtgcata t	21
<210> 121	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 121	
cttgggtcgt tggcattc	19
<210> 122	
<211> 22	
[0018] <212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 122	
cccatagtg tagcctgagg ac	22
<210> 123	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 123	
aaagggttca gaaaaacttc ttatcatc	28
<210> 124	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 124	
agaggatacg aatggactt gaag	24
<210> 125	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 125	

atggcacaga ggctgaagtt aaa	23
<210> 126	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 126	
ctcgactgtg gggaaaccat a	21
<210> 127	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 127	
ccgtgggtt tagcatcttc ac	22
<210> 128	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 128	
acaacacctgcg caaactcttt g	21
<210> 129	
<211> 20	
<212> DNA	
[0019] <213> 人工序列	
<400> 129	
gcctcttgggt acaggaggct	20
<210> 130	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 130	
ccttcgctgg gttgttttc	20
<210> 131	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 131	
tgaagaagaaa ctcccggttcc a	21
<210> 132	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 132	

ataaggcacg cgcttcttcc	20
<210> 133	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 133	
cagccgcttc tctttgttga	20
<210> 134	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 134	
gcacatgtcc ggctgattta	20
<210> 135	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 135	
[0020] gctcaaagac acgctccaaa	20
<210> 136	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 136	
tccacttgat gccttcagga	20
<210> 137	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 137	
ctacgacggg ggtctccac	19
<210> 138	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 138	
agttccgct ctgcactt	19

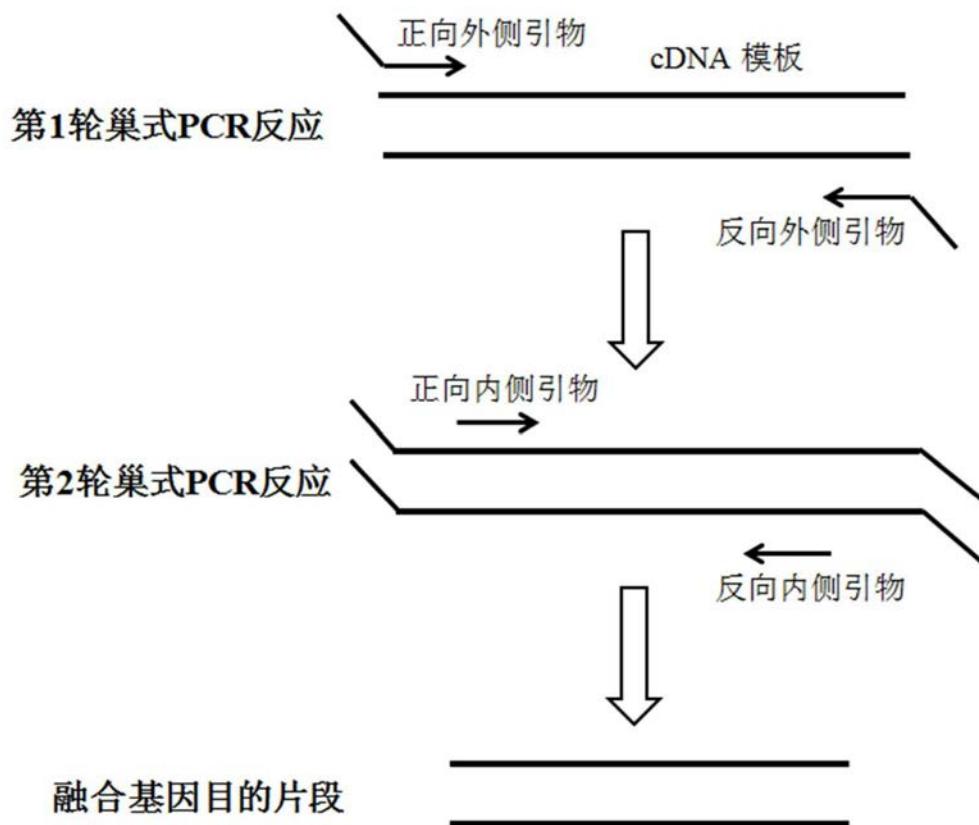


图1

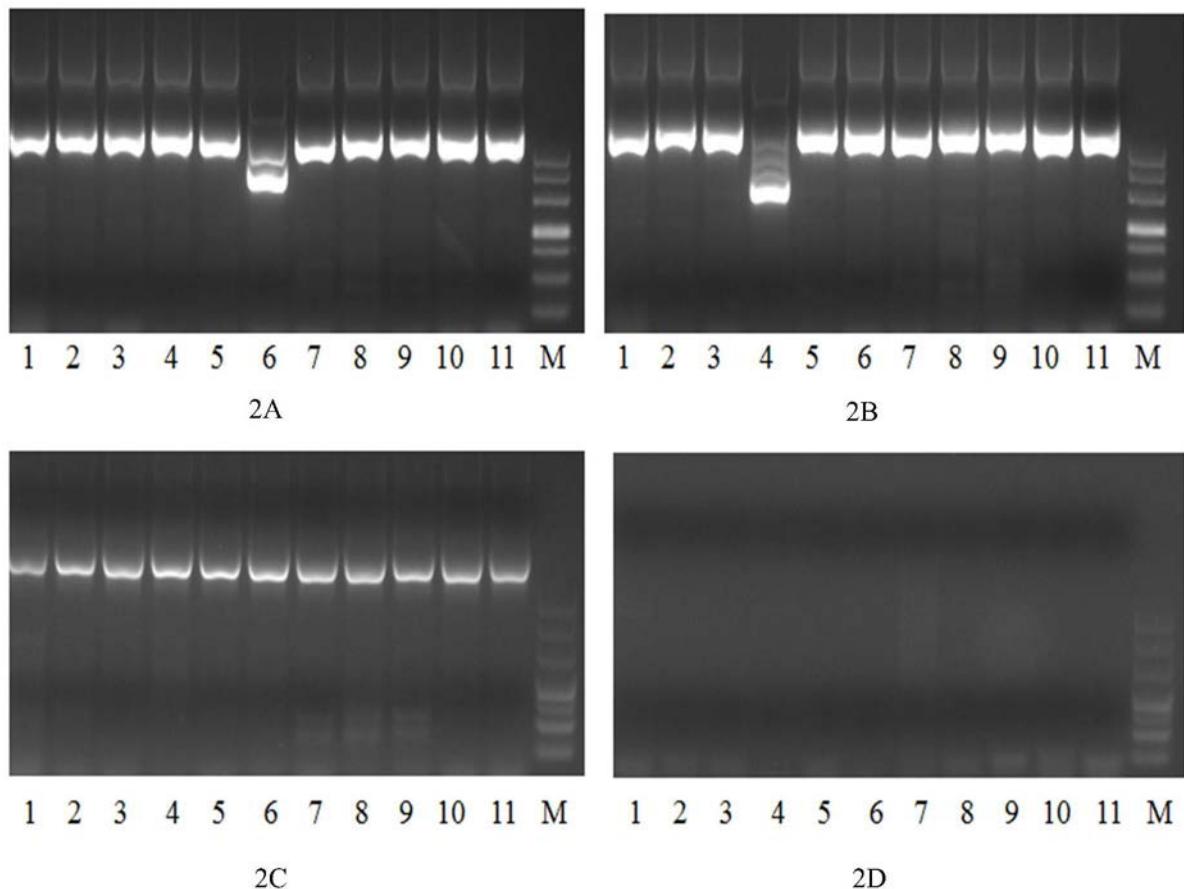


图2

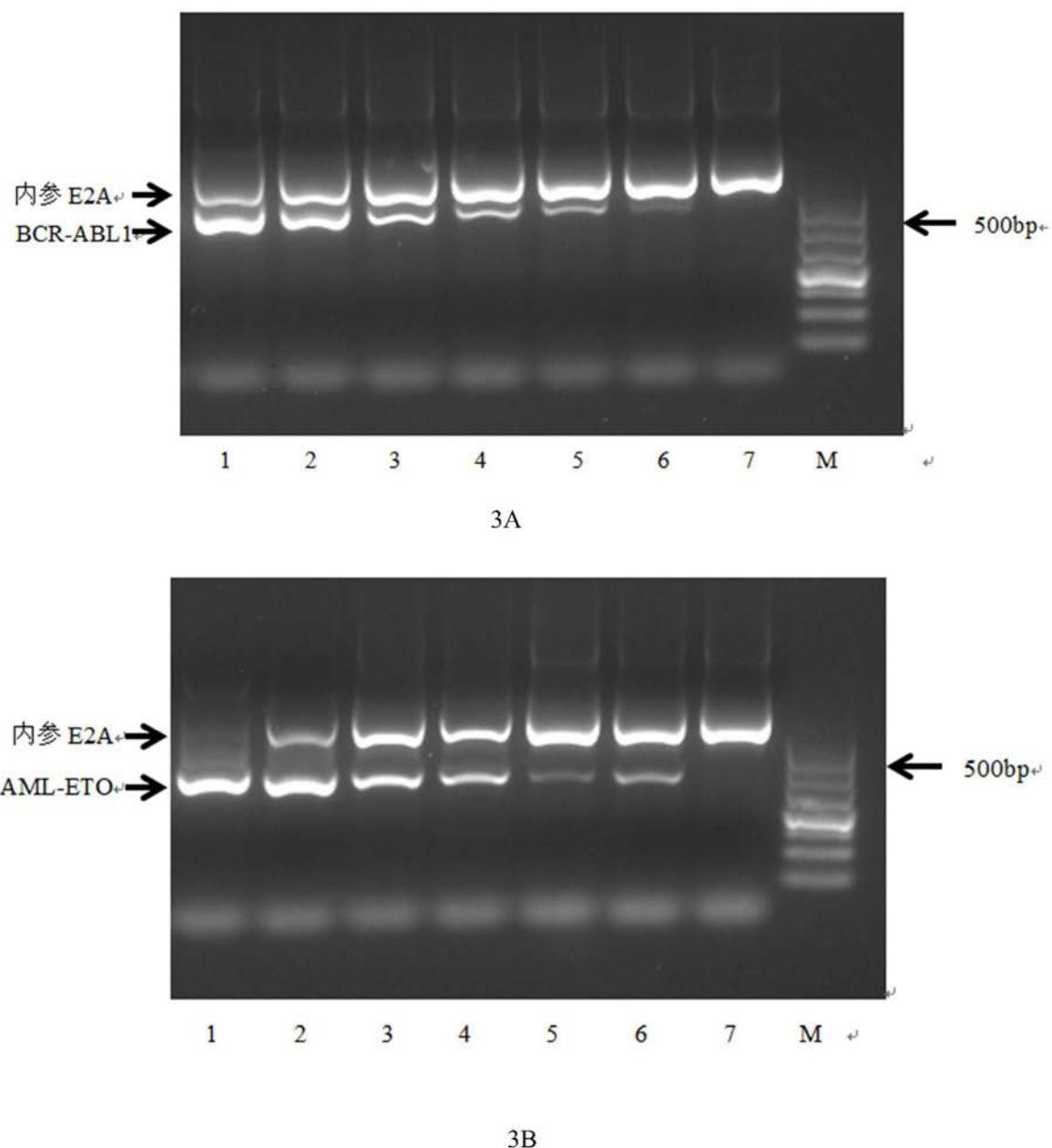
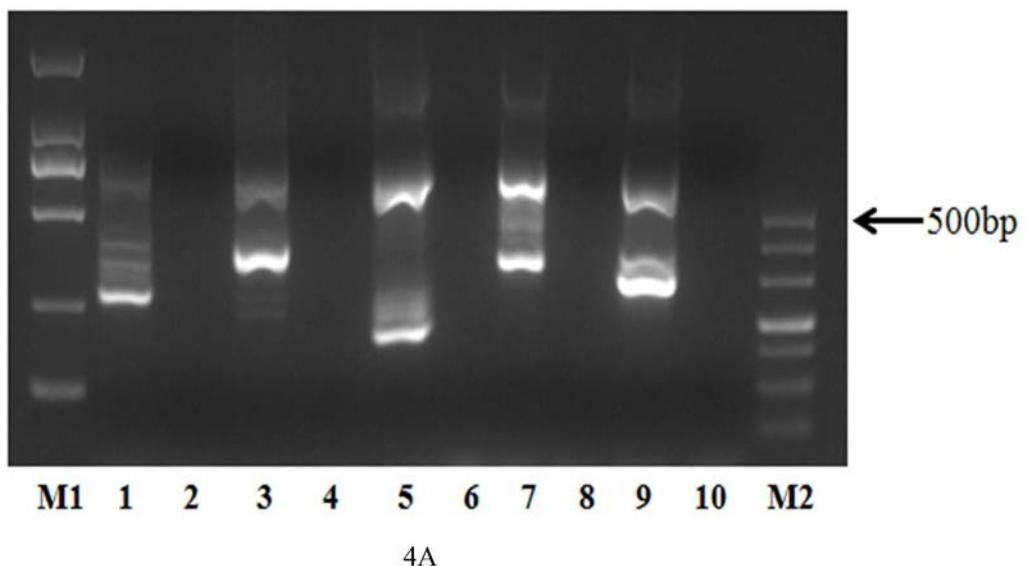
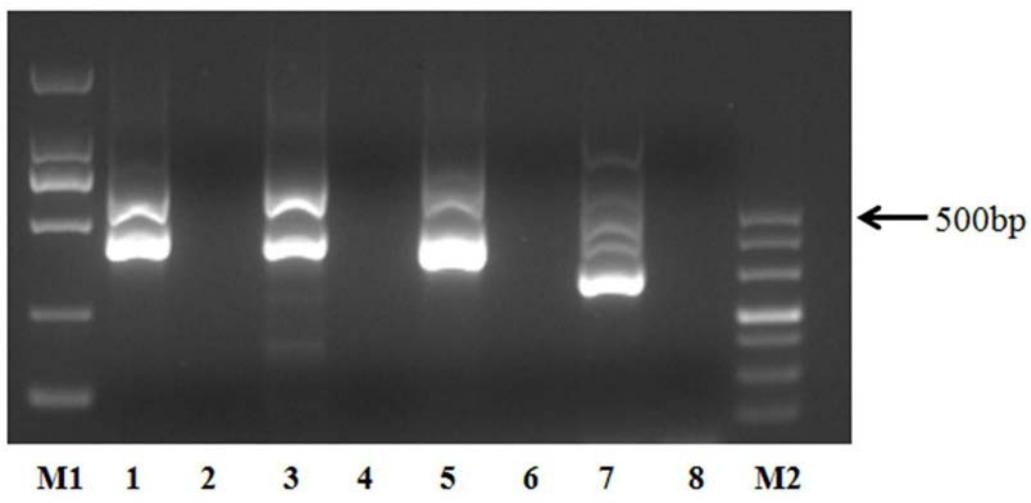


图3



4A



4B

图4