

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2011 年 1 月 20 日 (20.01.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/006449 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/075217
- (22) 国际申请日: 2010 年 7 月 16 日 (16.07.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200910161204.2 2009 年 7 月 16 日 (16.07.2009) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 上海人类基因组研究中心 (CHINESE NATIONAL HUMAN GENOME CENTER AT SHANGHAI) [CN/CN]; 中国上海市碧波路 250 号 1 号楼, Shanghai 201203 (CN)。苏州大学 (SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 王升跃 (WANG, Shengyue) [CN/CN]; 中国上海市碧波路 250 号 1 号楼, Shanghai 201203 (CN)。夏超明 (XIA, Chaoming) [CN/CN]; 中国江苏省苏州工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。郑华军 (ZHENG, Huajun) [CN/CN]; 中国上海市碧波路 250 号 1 号楼, Shanghai 201203 (CN)。郭俊杰 (GUO, Junjie) [CN/CN]; 中国江苏省苏州工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。许静 (XU, Jing) [CN/CN]; 中国江苏省苏州工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: RETROTRANSPOSONS OF SCHISTOSOMA JAPONICUM AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 日本血吸虫的反转座子及其用途

(57) Abstract: Disclosed are retrotransposons of *Schistosoma japonicum* and uses thereof. Specifically, provided is a retrotransposon having any one of nucleotide sequences selected from sequences showed by SEQ ID NOs:1-25. The retrotransposon may act as marker for blood fluke detection. Also disclosed are primers/primer pairs which specifically amplify said retrotransposon sequences.

(57) 摘要: 本发明公开了日本血吸虫反转座子及其应用。具体地, 本发明提供了具有选自 SEQIDNO:1-25 中任一序列所示的核苷酸序列的反转座子。所述反转座子可作为血吸虫病检测标志物。本发明还提供了特异性扩增所述的反转座子序列的引物(对)。



WO 2011/006449 A1

日本血吸虫反转座子DNA靶序列在血吸虫病诊断中的应用

技术领域

本发明属于生物技术和遗传学领域，更具体地，本发明涉及血吸虫反转座子及其应用。

背景技术

血吸虫病在非洲、亚洲和南美洲发展中国家严重危害人类健康并造成巨大经济损失。日本血吸虫在生态学和生物学方面明显有别于其它血吸虫，是对人体健康危害最为严重、防治难度最大的血吸虫病之一，在中国已有 2100 多年的历史。解放初期，广泛流行于我国长江流域的 12 个省、直辖市和自治区，中间宿主钉螺分布面积 148 亿平方米。近年来，由于经济体制和长江流域生态环境的变化和流动人口的增加，使得钉螺滋生面积扩大，传染源扩散，我国的血吸虫病疫情出现上升趋势，局部地区明显回升，并向城市逐步蔓延。

血吸虫疫情的反复引起了国家的高度重视，国家卫生部已将其列为 4 个重大传染病之一。2004 年 2 月国务院成立国家血吸虫病防治工作领导小组，提出了“要抓住源头，综合治理，依靠科技进步，坚决遏制血吸虫病疫情回升势头”的要求。2004 年 5 月召开了全国血吸虫病防治会议中提出，“作好血吸虫病防治工作关系到人民的身体健康和生命安全，关系到社会经济发展和社会稳定。”

血吸虫病的诊断长期以来依赖病原体的直接检测，即检查粪便虫卵作为主要确诊手段之一。由于从粪便中排出的虫卵只占产卵总量的 17%，多数发生在晚期病人，虽然在虫卵的检查方法上有了许多的改良，但在流行疫区的实际操作中还是较为繁琐和不便，特别是其诊断的敏感性较差，对早期感染、轻度和反复化疗后的病人的漏检率较高。自上世纪 20 年代以来，免疫技术已应用到血吸虫病的诊断，例如，用皮内反应诊断血吸虫病，取得了较好的效果。随后，经过广泛的研究和不断的改进，目前已有了几十种免疫学检测方法，而且还发展了检测血吸虫循环抗原和循环免疫复合物的新方法，极大地推动了血吸虫免疫学检测方法的深入发展。

由于血吸虫感染宿主的免疫调节作用，导致感染宿主体内的循环抗原、循环抗原抗体免疫复合物和特异抗体的动态很不一致，到目前为止，还缺乏有效的血吸虫病现症感染诊断手段，特别是疗效考核的方法。

近年来，从日本血吸虫全基因组中发掘反转座子的研究越来越引起人们的重视，许多学者已经做了大量的研究。迄今为止，已知的日本血吸虫反转座子

极为有限。

发明内容

本发明的目的在于提供一类血吸虫反转座子。

- 5 本发明的另一目的在于提供对应于所述的血吸虫反转座子的引物对和试剂盒。

本发明的另一目的在于提供所述的血吸虫反转座子的应用。

- 10 在本发明的第一方面，提供一种分离的多核苷酸，所述的多核苷酸具有选自 SEQ ID NO: 1-25 中任一所示的核苷酸序列。在另一优选例中，所述的多核苷酸具有 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 10 所示的核苷酸序列。

本发明的第二方面，提供所述的多核苷酸的用途，其作为血吸虫病检测标志物，或者用于所述的多核苷酸作为血吸虫病检测标志物，或用于制备检测血吸虫的试剂盒或 DNA 芯片。

- 15 此外，本发明的反转座子还可用于：血吸虫遗传关系的确定；血吸虫基因的定位；血吸虫各种或各亚种间的保守性分析；血吸虫的进化分析；或血吸虫的品种或地域种群鉴定。

在另一优选例中，所述的血吸虫是日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)。

- 20 在本发明的第三方面，提供一种引物对，所述引物对扩增获得的扩增产物具有选自 SEQ ID NO: 1-25 中任一所示的反转座子序列。

在另一优选例中，所述的引物(对)是扩增 SEQ ID NO: 19 或 10 所示核苷酸序列或其片段的引物，更佳地，所示引物(对)具有选自 SEQ ID NO: 26-29 所示的序列或 SEQ ID NO: 30-31 所示的序列。

- 25 在本发明的第四方面，提供所述的引物对的用途，它们被用于制备检测血吸虫基因组中是否存在对应于本发明第一方面中所述的反转座子的多核苷酸的试剂盒。

在本发明的第五方面，提供一种确定两种或多种样品中血吸虫之间的遗传关系的方法，所述方法包括：

- 30 (1) 以所述的反转座子序列作为标记；
(2) 用特异性扩增(1)的反转座子序列的引物，分别对所述两种或多种样品中血吸虫的基因组 DNA 进行扩增，从而获得相应的扩增产物；
(3) 比较两种或多种样品中血吸虫的扩增产物的异同，从而确定两种或多种样品中血吸虫之间的遗传关系。

在另一优选例中，通过电泳分析扩增产物的条带数目和/或位置情况，扩增

产物的条带数目和/或位置一致性越高,表示两种或多种血吸虫之间的遗传关系越近;扩增产物的条目数目和/或位置差异越大,表示两种或多种血吸虫之间的遗传关系越远。

在本发明的第六方面,提供一种检测试剂盒,所述的试剂盒中含有本发明
5 第三方面中所述的特异性引物对。

在另一优选例中,所述的试剂盒中还含有选自下组的材料:PCR 扩增试剂,电泳试剂,或序列分析软件。

在本发明的第七方面,提供一种用于遗传分析的多核苷酸集(set),所述的多核苷酸集包括 SEQ ID NO: 1-25 中任一序列所示的反转座子序列。

10 在另一优选例中,所述的多核苷酸集包括 SEQ ID NO: 1-25 中 25 种所示的反转座子序列。

在本发明的第八方面,提供了一种 DNA 芯片,所述 DNA 芯片具有基片以及固定于所述基片上的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1-25 中任一所示的反转座子或其特异性片段。

15 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。例如,就某一大范围(如 10-100)的上限可以与另一优选的较小范围(如 20-80)的下限 20 进行组合,从而构成另一范围(例如 20-100),反之亦然。限于篇幅,在此不再一一累述。

20 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图 1 显示了 SjCHGCS19.P1-P2 靶序列的示意图。

25 图 2 显示了 SjCHGCS19.P1-P2 靶序列检测敏感性。图中各泳道如下: M: 100bp DNA Ladder 分子量标准品; 1:未稀释的成虫模板 DNA; 2~9: 分别为 1:10~1:10⁸ 稀释后的虫体模板 DNA; 最高检测灵敏度为 1:10⁷(21.47fg/ul); 10. 空白对照。

图3显示了SjCHGCS19.P3-P4靶序列巢式PCR检测敏感性。图中各泳道如下: M:100bp DNA Ladder分子量标准品; 1~8:分别为1:10~1:10⁸稀释后的虫体模板DNA。最高检测灵敏度为1:10⁷(21.47fg/ul)。
30

图4显示了构建TA克隆质粒DNA检测敏感性。图中各泳道如下: M:100bp DNA Ladder分子量标准品; 1~14:为质粒经1:10~1:10¹⁴稀释后的DNA检测结果。结果表明,检测灵敏度为2.02个拷贝(对应于1:10¹¹的稀释度)。

图5显示了SjCHGCS19. P1-P2靶序列检测特异性。图中各泳道如下：M:100bp DNA Ladder分子量标准品；1：雄虫；2：肝组织；3：肝吸虫。结果表明，扩增条带的大小为303bp，并且与肝吸虫无交叉反应。

图6显示了SjCHGCS19. P1-P2靶序列检测50条尾蚴日本血吸虫感染兔血清DNA的结果。图中各泳道如下：M:100bp DNA Ladder分子量标准品；1:正常兔血清；2:感染3天；3~9:感染1周~7周；10~18:感染9周~24周（间隔1周检测）；19:阳性对照。

图7显示了SjCHGCS19. P1-P2靶序列检测日本血吸虫感染兔血清DNA的疗效考核结果。图中各泳道如下：M:100bp DNA Ladder分子量标准品；1:阴性对照（正常兔的血清）；2—18：依次为感染日本血吸虫尾蚴后8周—24周的外周血清；19-21:为吡喹酮治疗后第18周—20周（感染后25周—27周）血清DNA连续3周转阴；22:阳性对照(日本血吸虫成虫)。

图8显示了SjCHGCS10. P1—P3靶序列的检测敏感性。图中各泳道如下：M:100bp DNA Ladder分子量标准品；1未稀释的成虫模板DNA；2~7：分别为1:10~1:10⁷稀释后的虫体模板DNA；最高检测灵敏度为1:10⁶(214.7fg/u1) 8. 空白对照。

图9显示了基于SjCHGCS19. P1-P2靶序列通过巢式PCR法检测日本血吸虫病人血清DNA结果。图中各泳道如下：1~22:感染日本血吸虫不同病人血清的DNA模板(条带反应强度与感染度EPG成正相关)；P:阳性对照；N:阴性对照。

20

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，通过对日本血吸虫基因组和转录组的研究，发现了 25 种不同类型新的反转座子序列，其中包括 18 种 LTR 反转座子 (*SjCHGCS1*~*SjCHGCS18*)，4 种 Non-LTR 反转座子 (*SjCHGCS19*~*SjCHGCS22*) 和 3 种 Penelope 型的反转座子 (*Sj-penelope1*~*Sj-penelope3*)。研究表明，这 25 种新的反转座子在日本血吸虫基因组中的完整序列拷贝数从 1 个到 130 个不等，而不完整序列拷贝数(只有反转座子的部分序列)则从 15 个到 6384 个不等。如此众多的拷贝数，使得这 25 种新的反转座子占据整个日本血吸虫基因组的 17%。同时发现其中 21 种反转座子都具有表达活性。提示这些活动性反转座子 (mobile elements) 可能在血吸虫进化，致病性和寄生性方面起着重要的作用。在此基础上完成了本发明。

30

如本文所用，术语“含有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构

成”、“基本上由.....构成”、和“由.....构成”。

如本文所用，所述的“反转座子序列”和“反转座子”可互换使用，均是指具有选自 SEQ ID NO: 1-25 中任一所示的核苷酸序列。

如本文所用，所述的“多核苷酸集”是一种多核苷酸的集合，其中含有 SEQ ID NO: 1-25 中任一序列所示的多核苷酸。在用于遗传分析时，可以从所述的多核苷酸选出一条或多条所述的多核苷酸，作为反转座子标记物。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

引物

根据本发明反转座子两端的序列，可设计一对特异引物，通过 PCR 技术将反转座子序列扩增出来，利用测序或电泳分析等技术就可获得其长度多态性。

因此，本发明提供了可用于扩增所述的反转座子的引物(对)。所述的引物(对)根据这些反转座子两端的保守序列进行设计。引物的设计方法为本领域技术人员所熟知的方法。通常，可以针对一个反转座子，根据其两端序列设计不同种引物，通过 PCR 试验确定最合适的引物。更特别的，在设计引物时，采用相近的 T_m 温度，以便使这些引物能够在高通量的扩增和检测中使用。此外，确保引物扩增的位点的唯一性是必要的。一般而言，18-26 bp 的寡核苷酸引物具有较好的特异性。

采用所述的引物，可扩增出血吸虫(特别是日本血吸虫)基因组中相应的反转座子。并且，采用相同的引物对，以不同来源的血吸虫的基因组 DNA 为模板，可获得包含多态性反转座子结构(如反转座子重复次数不同、或长度不同等)的多核苷酸。

应用

本发明的反转座子及其相应的引物具有多种用途，其中包括但不限于用于：血吸虫遗传关系的确定；血吸虫基因的定位；血吸虫各种或各亚种间的保守性分析；血吸虫的进化分析；或血吸虫的品种鉴定。

遗传分析方法

在得知了本发明提供的各反转座子或其对应的特异性引物后，本领域人员可采用多种本领域已知的技术来确定血吸虫的遗传关系(或亲缘关系)，定位血

吸虫的基因，对血吸虫各种或各亚种间进行保守性分析，进行血吸虫进化分析，或进行血吸虫的品种鉴定，或血吸虫地域种群鉴定。由于反转座子的 PCR 扩增是特异性扩增，其稳定性和重现性都较好。

检测 PCR 扩增后的产物的方法可以采用本领域人员熟知的技术，最常用最简便的方法是采用琼脂糖凝胶电泳技术。通过比较扩增条带的数目和/或大小来确定扩增产物的差异。该方法操作简单，成本低廉。

另一种更为精细的方法是通过测序仪的基因扫描，从而可很好地分辨出 PCR 产物大小上 1-2 碱基的差异。基因扫描可采用本领域人员已知的一些软件，例如 GenMapper 4.0 软件。

10

检测试剂盒或系统

本发明还提供了一种检测试剂盒或系统，所述的试剂盒或系统中含有：可特异性扩增选自 SEQ ID NO: 1-25 中任一所示的反转座子序列的引物(对)。

此外，所述的试剂盒中还含有各种分析血吸虫遗传关系、定位血吸虫基因、血吸虫各种或各亚种间保守性分析、血吸虫进化分析或血吸虫品种鉴定所需的其它材料。例如可以包含选自下组的材料：PCR 扩增试剂，电泳试剂，PCR 产物纯化试剂，或序列分析软件。这些试剂均可以是本领域人员常规使用的。

此外，所述的试剂盒中还可含有的使用说明书，以说明所述试剂盒的使用方法，给出较合适的使用条件。

20

本发明的优点和效果：

1. 开发出一类血吸虫特异的反转座子，所述的反转座子有助于阐明日本血吸虫种群之间的遗传差异。

2. 针对各反转座子的特异性引物(对)，所述引物扩增效果良好，扩增产物唯一。

25

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室指南(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

30

实施例1 反转座子的获得以及引物设计

1. 日本血吸虫成虫样本DNA的抽提

采用DNA的酚抽提和乙醇沉淀法:

- 1) 取单条虫置入200 μ l提取缓冲液洗涤虫体3次, 2 000 g 离心 2 min 分离洗液;
 - 2) 吸干洗液, 加入20 μ l 抽提缓冲液, 用RNAase-free 的灭菌小碾磨棒,
 - 5 碾磨虫体至匀浆;
 - 3) 加入提取缓冲液至终体积50 μ l;
 - 4) 加入0.5 μ l RNAase(10 ug/ μ l), 5 μ l SDS(10%), 0.5 μ l 蛋白质消化酶, 用枪反复混匀;
 - 5) 在复式水浴恒温振荡器中110转/分 56 $^{\circ}$ C 消化1 h;
 - 10 6) 加入等体积50 μ l苯酚: 氯仿: 异丙醇为25: 24: 1的混合液, 混匀, 10 000 g, 离心5 min;
 - 7) 取上清, 加入50 μ l氯仿: 异丙醇为24: 1的混合液, 混匀, 10000 g, 离心 5 min;
 - 8) 取上清, 加入80 μ l无水乙醇, 混匀, -30 $^{\circ}$ C过夜;
 - 15 9) 加入1 ml 70 %乙醇, 10000 g, 离心15 min;
 - 10) 取下层溶液加入10 μ l ddH₂O, 待用。
- 或采用蛋白酶K消化法:
- 1) 用200 μ l GNT 缓冲液 洗涤虫体3次, 2 000 g, 离心 2 min分离洗涤液;
 - 2) 吸干洗液, 加入20 μ l GNT 缓冲液, 用一根RNAase-free 的灭菌小碾
 - 20 磨棒, 碾磨虫体至匀浆;
 - 3) 加入40 μ l GNT 缓冲液, 旋转 10 s;
 - 14) 加入1 μ l蛋白酶消化酶, 用移液器反复混匀, 在复式水浴恒温振荡器中110转/分于56 $^{\circ}$ C消化1 h;
 - 5) 10000 g, 离心5 min, 室温放置, 转移上清至一只干净1.5 ml EP管中;
 - 25 6) 加入50 μ l NID缓冲液, 振荡30 s, 置室温3 min;
 - 7) 旋转混合 30 s, 95 $^{\circ}$ C 15 min灭活蛋白酶消化酶;
 - 8) 10000 g, 离心5 min, 取上清至一干净1.5 ml EP管中, 待用。

2. 反转座子的获得

- 30 对提取的 DNA 进行测序, 获得基因组序列数据。然后从基因组数据库获取初始数据, 经过进一步分析、实验和选择, 最后获得 25 个反转座子, 它们的序列依次如 SEQ ID NO: 1—25 所示。

基于 SEQ ID NO: 1—25 所示的序列, 采用 Primer 5.0 软件设计引物, 分别合成 25 对特异性引物。以日本血吸虫样本的全基因组 DNA 为模板, 扩增出相

应的对于 25 种反转座子的扩增产物。

PCR 循环条件为：95℃ 5 min；94℃ 45 s，55℃ 45 s，72℃ 45 s，30 个循环；72℃ 10 min。PCR 反应体系为：25 ng 基因组 DNA，2 个单位的 SBS Taq 聚合酶，双向引物各 10 pm，1.25 mM MgCl₂，1 μl 10× 反应缓冲液，0.5 μl dNTPs
5 (2.5 mM，TaKaRa)。

用常规方法对 PCR 产物进行纯化，然后进行遗传学特征分析，遗传分析方法如下：

(1). 对 PCR 产物进行电泳鉴定

通过电泳分析扩增产物的条带数目和/或位置情况，扩增产物的条带数目和
10 /或位置一致性越高，表示两种血吸虫之间的遗传关系越近；扩增产物的条目数目和/或位置差异越大，表示两种血吸虫之间的遗传关系越远。

(2). 样本的基因扫描

PCR 产物用 ABI 3730 XL 自动测序仪分离，以 ABI Genescan-500 LIZ
15 (Applied Biosystems) 分子内标测定 PCR 产物的 DNA 片段的确切长度。并用 ABI 3730 XL 和 GenMapper 4.0 软件(Applied Biosystems)进行初始数据处理。

结果：

25 种不同类型新的反转座子序列(如表1所示)，其中包括18种LTR反转座子
20 (SjCHGCS1～SjCHGCS18)，4种Non-LTR反转座子(SjCHGCS19～SjCHGCS22)和3种Penelope型的反转座子(Sj-penelope1～Sj-penelope3)。研究表明，这25种新的反转座子在日本血吸虫基因组中的完整序列拷贝数从1个到130个不等，而不完整序列拷贝数(只有反转座子的部分序列)则从15个到6384个不等。如此众多的拷贝数，使得这25种新的反转座子占据整个日本血吸虫基因组的17%。同时发现其中21种反转座子都具有表达活性。提示这些活动性反转座子(mobile
25 elements)可能在血吸虫进化，致病性和寄生性方面起着重要的作用。

表 1 25 个日本血吸虫反转座子

反转座子名称	长度(bp)	LTR	Pol	Pro	RT	RNH	Int	完整拷贝的 数目	不完整拷贝 的数目	SEQ ID NO.
LTR 反转座子										
SjCHGCS1	5249	332	1360-4437	1360-1615	1876-2937	2695-3025	3265-3802	130	1650	1
SjCHGCS2	4945	361	430-4482	1480-1741	1939-2503	2758-3163	3442-3958	32	930	2
SjCHGCS3	4451	292	320-4201	1100-1349	1607-2168	2420-2735	3053-3590	17	646	3
SjCHGCS4	4710	312	325-4407	1153-1555	1741-2311	2563-2932	3214-3763	6	208	4
SjCHGCS5	2148	304	338-1870	1286-1574				19	762	5
SjCHGCS6	4839	353	379-4476	1327-1720	1891-2461	2713-3070	3394-3913	11	826	6
SjCHGCS7	4000	409	513-2870	513-666	816-1323	1539-1908	2145-2643	6	600	7
SjCHGCS8	4865		932-3817		1091-1655	1895-2255	2678-3281	2	662	8
SjCHGCS9	4779	308	316-4467	1213-1609	1795-2365	2617-2986	3268-3814	4	294	9
SjCHGCS10	5025		868-4065	988-1342	1513-2080	2335-2680	2914-3457	29	758	10
SjCHGCS11	6488	559	861-4898	1788-2139	2310-2874	3126-3480	3711-4251	5	542	11
SjCHGCS12	4965	415	438-4541	1401-1797	1965-2535	2787-3144	3474-3993	12	605	12
SjCHGCS13	5099	527	573-4478	1623-1887	2091-2655	2910-3315	3597-4113	9	628	13
SjCHGCS14	5211		399-4922	1383-1647	2295-2859	3129-3519	3801-4317	3	381	14
SjCHGCS15	4711	190	329-4378	1385-1649	1886-2450	2705-3110	3389-3905	5	479	15
SjCHGCS16	7232	1236	806-5830	2006-2438	2828-3647	3812-4277	4721-5309	1	515	16
SjCHGCS17	6960	995	940-5982	2140-2554	3241-3811	4057-4423	4855-5461	3	508	17
SjCHGCS18	5985	400	386-5626	1694-2108	2786-3356	3596-3965	4412-5018	7	532	18
Non-LTR 反转座子										
SjCHGCS19	3145		108-3131					82	2384	19
SjCHGCS20	3578		610-3366					16	1530	20
SjCHGCS21	4275		266-4039					1	15	21
SjCHGCS22	3768		不完整					1	386	22
Penelope 样元件(Penelope-like element)										
Sj-penelope1	3750		756-3215					2	700	23
Sj-penelope2	2734	137	405-2051					10	643	24
Sj-penelope3	2512		230-1732					2	528	25

本发明人对 LTR, Non-LTR 和 penelope 型的反转座子也进行了结构分析。在 18 种 LTR 反转座子中, 除 *SjCHGCS8*, *SjCHGCS10* 和 *SjCHGCS14* 外, 剩余 15 种 LTR 反转座子都在两端具有长末端重复序列(LTR), 长度从 190bp 到 1236bp 不等; 所有的 18 种 LTR 反转座子都具有完整的 polyprotein 编码框; 除 *SjCHGCS5* 和 *SjCHGCS8* 外, 剩余 16 种 LTR 反转座子在 polyprotein 编码框中, 都能区分出蛋白酶(Protease), 反转录酶(Reverse Transcriptase), RNA 酶 H(RNaseH) 和整合酶(Integrase)的编码基因; *SjCHGCS5* 中只能鉴定出蛋白酶的编码序列, *SjCHGCS8* 中则是无法鉴定出蛋白酶的编码序列。4 种 Non-LTR 和 3 种 penelope 型的反转座子中, 只有 *SjCHGCS22* 没有完整的 polyprotein 编码框, 而 *Sj-penelope2* 的两端则发现有一段长 137bp 的反向重复序列。

基于对这 25 种新的日本血吸虫反转座子序列的精确分析, 本发明人认为这些新发现的反转座子序列可作为潜在的血吸虫病检测标志物, 并且可从中寻找与日本血吸虫的致病性和免疫逃避等相关的靶点, 可利用这些反转座子作为基因治疗的载体, 帮助研究抗血吸虫病的疫苗以及药物。

15

实施例 2

基于反转座子 *SjCHGCS 19* 的检测方法和应用

诊断在血吸虫病防治活动中始终处于中心位置。迄今为止, 病原学检查, 即从流行区人的粪便中查见虫卵, 仍是血吸虫病惟一的确定诊断途径和手段。某种病原体感染机体时, 把它们的基因也带入人体, 理论上讲, 只要病原体存在, 机体内就会有其核酸物质存在。针对表 1 中所列出的日本血吸虫基因组中的 25 个反转座子, 在本实施例中选用反转座子 *SjCHGCS 19* (SEQ ID NO: 19) 作为代表进行深入研究。

结果表明, 反转座子 *SjCHGCS 19* 多核苷酸适合作为血吸虫病检测标志物, 也适合用于制备检测血吸虫的试剂盒或 DNA 芯片。

例如, 将 *SjCHGCS 19* P1—P2 片段 (303bp) 及其 *SjCHGCS19* P3—P4 片段 (607bp) (*SjCHGCS 19* P1 引物: AAGGCGTTTGACAGCGTAG (SEQ ID NO: 26); *SjCHGCS 19* P2 引物: ATCATCCGCGAAGTCCAG (SEQ ID NO: 27); *SjCHGCS 19* P3 引物: CCAAATCGCAACACTACGC (SEQ ID NO: 28); *SjCHGCS 19* P4 引物: ATCGGATTCTCCTTGTTTCAT (SEQ ID NO: 29)) 作为靶序列(图 1), 应用巢式 PCR 法检测日本血吸虫特异性 DNA 显示出极高的敏感性和特异性, 其中敏感性可提高至 2 拷贝(图 2、图 3 和图 4), 并且与肝吸虫无交叉反应(图 5)。

进一步对感染日本血吸虫动物模型血清 DNA 检测结果表明, 从感染 50 条尾蚴日本血吸虫后 3 天的家兔血清中即可扩增出分子量为 303bp 的日本血吸虫

特异性 DNA 片段(图 6)。此外,还检测了感染 1500 条,500 条,200 条,100 条和 30 条尾蚴日本血吸虫感染的兔的血清 DNA,均获得了与图 6 一致的结果。因此,本发明方法非常适用于早期检测。

此外,对经吡喹酮治疗后的血清样本检测结果显示,本发明的反转座子具有较好的疗效考核价值,血清中日本血吸虫 DNA 于治疗后 17 周转阴而其特异性抗体仍维持在高水平(图 7)。

此外,应用 SjCHGCS19.P1—P2 靶序列对日本血吸虫病慢性病人的血清进行 DNA 检测,结果如表 1 和图 9 所示。

表 1 巢式 PCR 法对日本血吸虫病病人血清 DNA 检测结果

方法	病人血清样本	阳性数	阳性检出率	正常人血清样本	阳性数	阳性检出率
巢式 PCR	100	96	96.0%	20	0	0%

注:100 例病人血清来自湖南省血吸虫病疫区,均为 EPG 检测阳性。

令人特别感兴趣的是,如图 9 所示,感染日本血吸虫不同病人血清的 DNA 的扩增条带反应强度与感染度 EPG 成正相关。

15 实施例 3

基于反转座子 SjCHGCS 10 的检测方法和应用

与实施例 2 类似,在本实施例中选用反转座子 SjCHGCS 10 (SEQ ID NO: 10) 作为代表进行深入研究。

日本血吸虫反转座子 SjCHGCS10.P1—P3 靶序列检测敏感性结果如图 8 所示,其最高检测灵敏度为 $1:10^6$ (214.7 fg/ul)。其中引物为 SjCHGCS10.P1: GCCAGTGGGCATCTCCTT (SEQ ID NO: 30); SjCHGCS10.P3: CGGGCTGGCAATCAGTAA (SEQ ID NO: 31)。

此外,应用 SjCHGCS10.P1—P3 靶序列对日本血吸虫病慢性病人的血清进行 DNA 检测。与实施例 2 的检测结果类似,阳性检出率也高达 92% 以上,并且 DNA 的扩增条带反应强度也与感染度 EPG 成正相关。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种分离的多核苷酸，其特征在于，所述的多核苷酸具有选自 SEQ ID NO: 19、1-18 和 20-25 中任一所示的核苷酸序列。
- 5 2. 权利要求 1 所述的多核苷酸的用途，其特征在于，所述的多核苷酸作为血吸虫病检测标志物，或用于制备检测血吸虫的试剂盒或 DNA 芯片。
3. 一种引物对，其特征在于，所述引物对扩增获得的扩增产物具有选自 SEQ ID NO: 1-25 中任一所示的反转座子序列。
4. 如权利要求 3 所述的引物对的用途，其特征在于，用于制备检测血吸虫
- 10 基因组中是否存在对应于权利要求 1 所述的反转座子的多核苷酸的试剂盒。
5. 一种确定两种或多种样品中血吸虫之间的遗传关系的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：
 - (1) 以权利要求 1 所述的反转座子序列作为标记；
 - (2) 用特异性扩增(1)的反转座子序列的引物，分别对所述两种或多种样品
 - 15 中血吸虫的基因组 DNA 进行扩增，从而获得相应的扩增产物；和
 - (3) 比较两种或多种样品中血吸虫的扩增产物的异同，从而确定两种或多种样品中血吸虫之间的遗传关系。
6. 一种检测试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒中含有权利要求 3 所述的引物对。
- 20 7. 如权利要求 6 所述的检测试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒中还含有选自下组的材料：PCR 扩增试剂，电泳试剂，或序列分析软件。
8. 一种用于遗传分析的多核苷酸集，其特征在于，所述的多核苷酸集包括 SEQ ID NO: 1-25 中任一序列所示的反转座子序列。
9. 如权利要求 8 所述的多核苷酸集，其特征在于，所述的多核苷酸集包括
- 25 SEQ ID NO: 1-25 中 25 种所示的反转座子序列。
10. 一种 DNA 芯片，其特征在于，所述 DNA 芯片具有基片以及固定于所述基片上的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1-25 中任一所示的反转座子或其特异性片段。

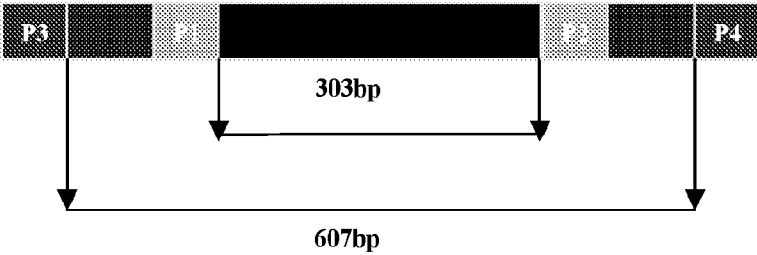


图 1

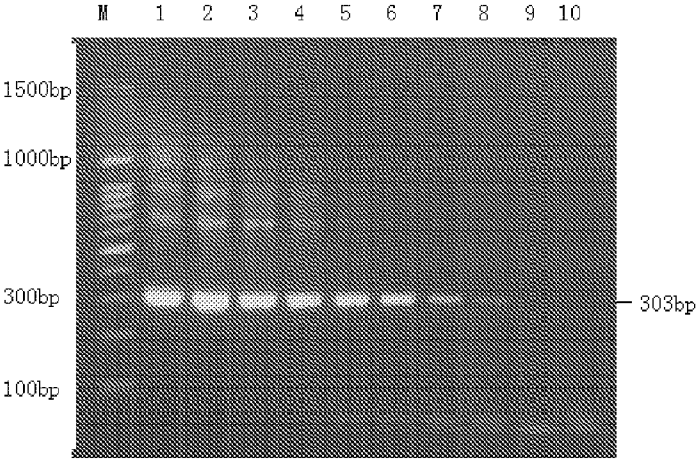


图 2

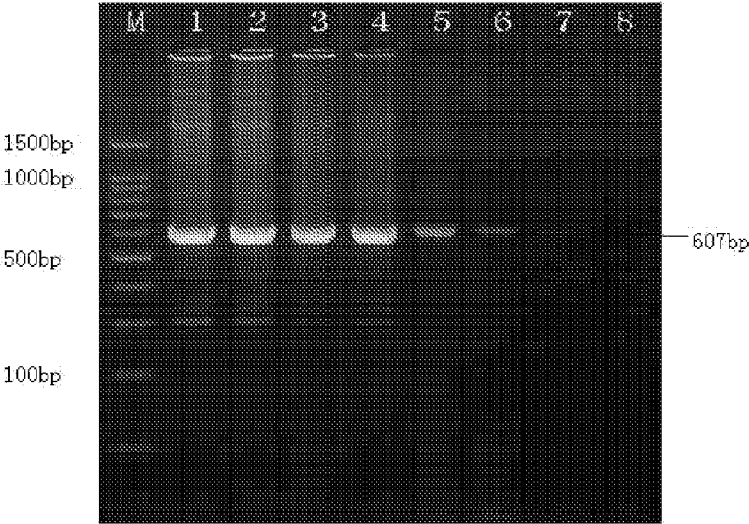


图 3

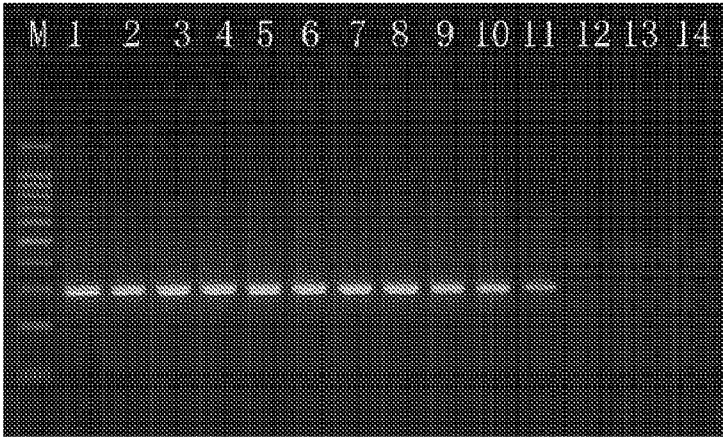


图 4

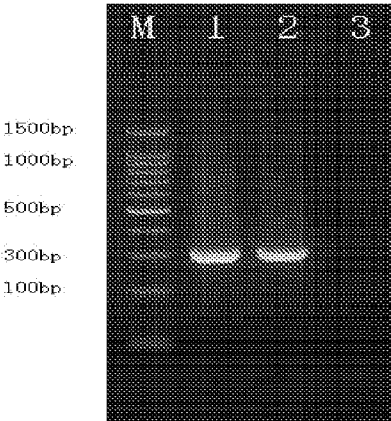


图 5

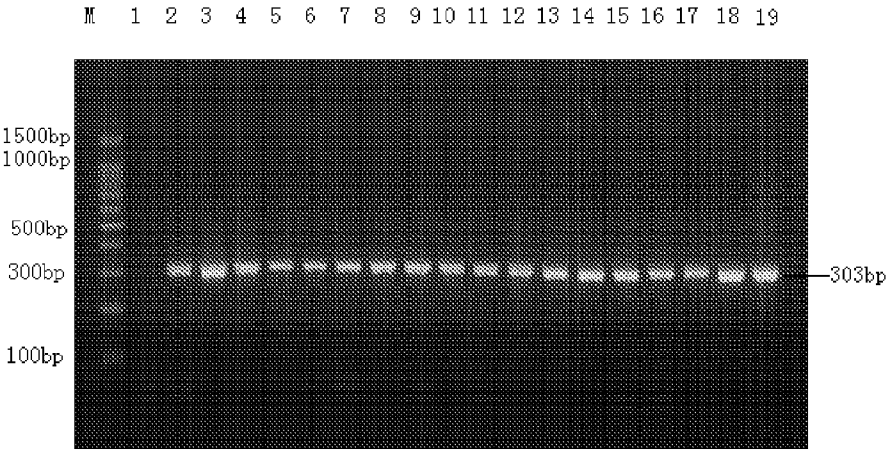


图 6

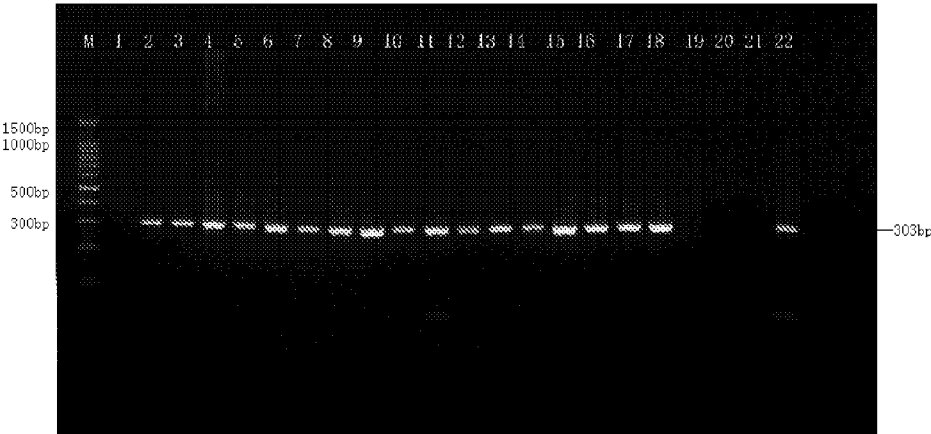


图 7

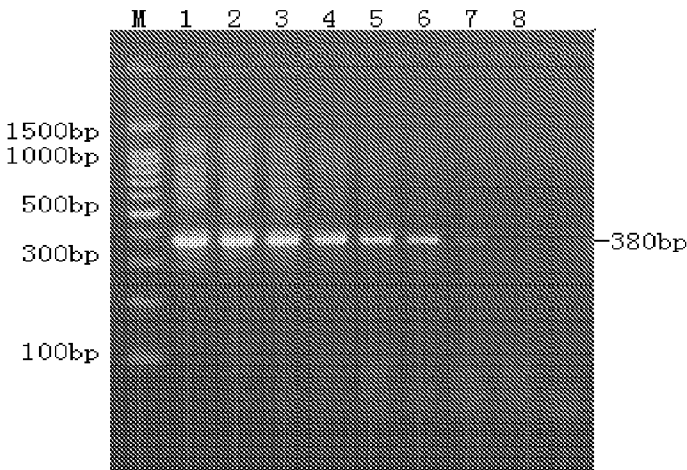


图 8

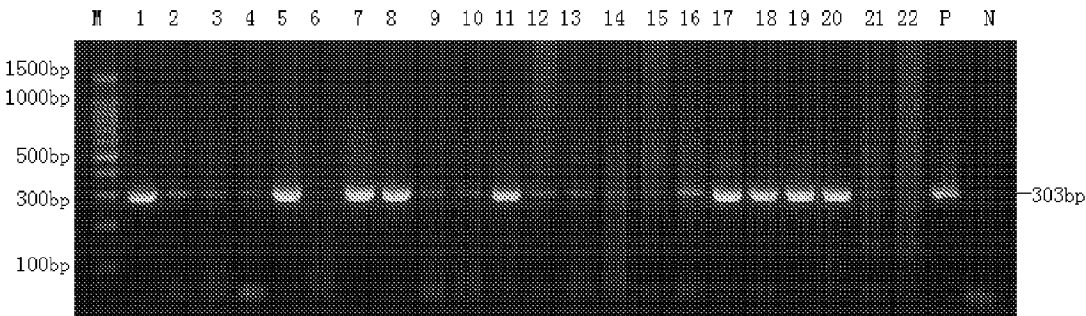


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075217

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N; C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; MEDLINE and keywords: blood fluke, *Schistosoma*, *Schistosoma japonicum*, retrotransposon, long terminal repeat, LTR, non-LTR, primer, diagnosis, detect, test, assay, kit, dna chip, etc.

GENBANK: the sequence of SEQ ID NO:19

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAHA, T. et al., Reverse transcriptase activity and untranslated region sharing of a new RTE-like, non-long terminal repeat retrotransposon from the human blood fluke, <i>Schistosoma japonicum</i> . International Journal for Parasitology. August 2002, vol. 32, No. 9, pages 1163-1174. the whole document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
12 Oct. 2010 (12.10.2010)

Date of mailing of the international search report
28 Oct. 2010 (28.10.2010)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
YANG, Zhenyu
Telephone No. (86-10)62411111

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075217

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. a sequence listing filed or furnished

☐ on paper

☒ in electronic form

b. time of filing or furnishing

☒ contained in the applicant as filed

☐ filed together with the application in electronic form

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075217

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims No.: 2
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The use of the polynucleotide of claim 1 as a marker for blood fluke detection relates to diagnostic methods in Rule 39.1(iv).
The international search report is based on the subject-matter that could reasonably be expected to be claimed, i.e., the use of the polynucleotide of claim 1 for the preparation of a kit or a DNA chip for blood fluke detection.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-10 (partially), directed to polynucleotide having the sequence of SEQ ID NO:19, use of said polynucleotide, corresponding primers and use thereof, method for determining genetic relationship of blood-flukes, corresponding detection kit, set of polynucleotides and DNA chip.

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075217

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101457258 A (JIANGSU INST OF PARASITIC DISE) 17 Jun. 2009 (17.06.2009) the whole document	1-10
A	LAHA, T. et al. pido, a non-long terminal repeat retrotransposon of the chicken repeat 1 family from the genome of the Oriental blood fluke, <i>Schistosoma japonicum</i>. Gene. 06 Feb. 2002 (06.02.2002), vol. 284, No. 1-2, pages 149-159. the whole document	1-10
A	WO 0175148 A1 (FUNDACÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ) 11 Oct. 2001 (11.10.2001) the whole document	1-10
PX	GenBank Accession number FN356221, 22 Jun. 2009 (22.07.2009), [retrieved on 12.10.2010], Retrieved from NCBI [online]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/254587305>, the sequence	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/075217

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101457258 A	17.06.2009	none	
WO 0175148 A1	11.10.2001	BR0001536 A	04.12.2001
		AU4397101 A	15.10.2001
		EP1208241 A1	29.05.2002
		CN1366553 A	28.08.2002
		US2003096244 A1	22.05.2003
		JP2003529373 T	07.10.2003
		US6818402 B2	16.11.2004
		EP1208241 B1	12.01.2005
		DE60108337 E	17.02.2005
		ES2237562 T	01.08.2005
		DE60108337 T	22.12.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075217

Continuation of: Box No. III

This Authority considers that there are 25 inventions covered by the claims 1-10. The common or corresponding technical feature of inventions 1-25 is the retrotransposon from *Schistosoma japonicum*, the said technical feature has been disclosed by the document (see e.g., Thewarach Laha, et al., Gene, Volume 264, Issue 1, 7 Feb. 2001, pages 59-68). It follows that the same technical feature of inventions 1-25 does not make a contribution over the prior art and can not be considered as a special technical feature within the meaning of Rule 13.2 PCT. The application, hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 PCT.

These 25 inventions are:

invention 1, claims 1-10 (partially), directed to polynucleotide having the sequence of SEQ ID NO:19, use of said polynucleotide, corresponding primers and use thereof, method for determining genetic relationship of blood-flukes, corresponding detection kit, set of polynucleotides and DNA chip;

invention 2, claims 1-10 (partially), directed to polynucleotide having the sequence of SEQ ID NO:1, use of said polynucleotide, corresponding primers and use thereof, method for determining genetic relationship of blood-flukes, corresponding detection kit, set of polynucleotides and DNA chip;

invention 3, claims 1-10 (partially), directed to polynucleotide having the sequence of SEQ ID NO:2, use of said polynucleotide, corresponding primers and use thereof, method for determining genetic relationship of blood-flukes, corresponding detection kit, set of polynucleotides and DNA chip;

inventions 4-19, claims 1-10 (partially), respectively, directed to polynucleotide having the sequence of SEQ ID NOs:3-18, use of said polynucleotide, corresponding primers and use thereof, method for determining genetic relationship of blood-flukes, corresponding detection kit, set of polynucleotides and DNA chip;

inventions 20-25, claims 1-10 (partially), respectively, directed to polynucleotide having the sequence of SEQ ID NOs:20-25, use of said polynucleotide, corresponding primers and use thereof, method for determining genetic relationship of blood-flukes, corresponding detection kit, set of polynucleotides and DNA chip.

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/11 (2006.01) i

C12Q 1/68 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/075217**A. 主题的分类**

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N; C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS; CNKI 和关键词: 血吸虫、反转座子、LTR、长末端重复、NON-LTR、引物、诊断、检测、分析、试剂盒、DNA 芯片, 等

WPI; EPODOC; MEDLINE 和关键词: blood fluke, Schistosoma, Schistosoma japonicum, retrotransposon, long terminal repeat, LTR, non-LTR, primer, diagnosis, detect, test, assay, kit, dna chip, etc.

GENBANK: SEQ ID NO:19 的序列

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	LAHA, T. 等, Reverse transcriptase activity and untranslated region sharing of a new RTE-like, non-long terminal repeat retrotransposon from the human blood fluke, <i>Schistosoma japonicum</i> . International Journal for Parasitology. 8 月 2002, 第 32 卷, 第 9 期, 第 1163-1174 页 全文	1-10

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

12.10 月 2010 (12.10.2010)

国际检索报告邮寄日期

28.10 月 2010 (28.10.2010)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

杨振宇

电话号码: (86-10) 62411111

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第 1 页第 1.c 项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的**核苷酸和/或氨基酸序列**, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☒ 包含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2、☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2010/075217

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：2

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

所述多核苷酸作为血吸虫病检测标志物的用途涉及诊断方法—细则39.1(iv)。国际检索将针对以下合理预期修改的主题：权利要求1所述的多核苷酸的用途，用于制备检测血吸虫的试剂盒或DNA芯片。

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

参见附加页

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

权利要求1-10的部分，涉及SEQ ID NO: 19的多核苷酸、所述多核苷酸的用途、相关的引物对及其用途、利用所述多核苷酸确定血吸虫之间的遗传关系的方法、相关的检测试剂盒、多核苷酸集和DNA芯片。

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101457258 A (江苏省血吸虫病防治研究所) 17.6 月 2009 (17.06.2009) 全文	1-10
A	LAHA, T. 等, pido, a non-long terminal repeat retrotransposon of the chicken repeat 1 family from the genome of the Oriental blood fluke, <i>Schistosoma japonicum</i> . Gene. 06.2 月 2002 (06.02.2002), 第 284 卷, 第 1-2 期, 第 149-159 页 全文	1-10
A	WO 0175148 A1 (FUNDACÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ) 11.10 月 2001 (11.10.2001) 全文	1-10
PX	GenBank 登录号 FN356221, 22.7 月 2009 (22.07.2009), [检索于 12.10.2010], 检索自 NCBI [联机]: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/254587305 > 序列	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/075217

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101457258 A	17.06.2009	无	
WO 0175148 A1	11.10.2001	BR0001536 A	04.12.2001
		AU4397101 A	15.10.2001
		EP1208241 A1	29.05.2002
		CN1366553 A	28.08.2002
		US2003096244 A1	22.05.2003
		JP2003529373 T	07.10.2003
		US6818402 B2	16.11.2004
		EP1208241 B1	12.01.2005
		DE60108337 E	17.02.2005
		ES2237562 T	01.08.2005
		DE60108337 T	22.12.2005

续：第 III 栏

本国际单位认为，权利要求书包括权利要求 1-10 所要求保护的 25 组发明。这 25 组发明的相同或相应的技术特征为“来自日本血吸虫的反转座子”，这一技术特征已经被现有技术公开（参见，例如，Thewarach Laha, et al., Gene, Volume 264, Issue 1, 7 Feb. 2001, pages 59-68）。因此，这 25 组发明不具有相同或相应的体现发明对现有技术作出贡献的特定技术特征，不属于一个总的发明构思，因而不满足发明单一性的要求，不符合《PCT 实施细则》13.1 的规定。这 25 组发明如下：

第 1 组：权利要求 1-10 的部分，涉及 SEQ ID NO: 19 的多核苷酸、所述多核苷酸的用途、相关的引物对及其用途、利用所述多核苷酸确定血吸虫之间的遗传关系的方法、相关的检测试剂盒、多核苷酸集和 DNA 芯片；

第 2 组：权利要求 1-10 的部分，涉及 SEQ ID NO: 1 的多核苷酸、所述多核苷酸的用途、相关的引物对及其用途、利用所述多核苷酸确定血吸虫之间的遗传关系的方法、相关的检测试剂盒、多核苷酸集和 DNA 芯片；

第 3 组：权利要求 1-10 的部分，涉及 SEQ ID NO: 2 的多核苷酸、所述多核苷酸的用途、相关的引物对及其用途、利用所述多核苷酸确定血吸虫之间的遗传关系的方法、相关的检测试剂盒、多核苷酸集和 DNA 芯片；

第 4-19 组：权利要求 1-10 的部分，分别涉及 SEQ ID NO: 3-18 的多核苷酸、所述多核苷酸的用途、相关的引物对及其用途、利用所述多核苷酸确定血吸虫之间的遗传关系的方法、相关的检测试剂盒、多核苷酸集和 DNA 芯片；

第 20-25 组：权利要求 1-10 的部分，分别涉及 SEQ ID NO: 20-25 的多核苷酸、所述多核苷酸的用途、相关的引物对及其用途、利用所述多核苷酸确定血吸虫之间的遗传关系的方法、相关的检测试剂盒、多核苷酸集和 DNA 芯片。

主题的分类

C12N 15/11 (2006.01) i

C12Q 1/68 (2006.01) i