



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102124126 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 200880122833. 8

(22) 申请日 2008. 10. 24

(30) 优先权数据

60/983, 085 2007. 10. 26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/081206 2008. 10. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02009/055732 EN 2009. 04. 30

(71) 申请人 生命技术公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 C·K·雷蒙德 C·阿穆尔

J·卡斯尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 49 页

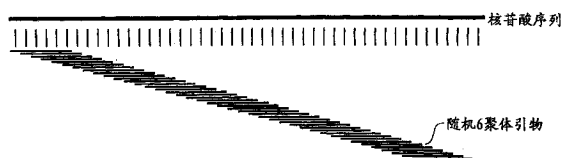
序列表 289 页 附图 15 页

(54) 发明名称

使用非随机引物的 CDNA 合成

(57) 摘要

本发明提供了选择性扩增 RNA 模板分子群中的靶核酸分子群的方法(例如,除了最高表达的 mRNA 种类以外,细胞类型中表达的所有 mRNA 分子)。本发明还提供了包括 SEQ ID NO:1-749 中所示的核酸序列的第一寡核苷酸群,和包括 SEQ ID NO:750-1498 中所示的核酸序列的第二寡核苷酸群。例如,第一寡核苷酸群可用于引发与从哺乳动物细胞分离的 mRNA 分子互补的第一链 cDNA 分子的合成,但不引发与核糖体 RNA 分子互补的 cDNA 分子的合成。第二寡核苷酸群可用于例如引发,与从哺乳动物细胞分离的 mRNA 分子互补的引物延伸产物(第一链 cDNA)的第二链合成,但不引发从核糖体 RNA 分子合成的引物延伸产物的第二链合成。



其中要求专有所有权或特权的本发明的实施方案定义如下：

1. 在 RNA 模板分子群中选择性扩增靶核酸分子群的方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 提供用逆转录酶和第一寡核苷酸引物群从分离自哺乳动物受试者的样品中的 RNA 模板分子群合成的单链引物延伸产物群，其中第一寡核苷酸引物群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分，其中 RNA 模板分子群包括靶核酸分子群和非靶核酸分子群；和

(b) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸引物群，从步骤 (a) 的单链引物延伸产物群合成双链 cDNA，其中第二寡核苷酸群中的每一寡核苷酸，包括由 6, 7 或 8 个核苷酸组成的杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分，其中杂交部分选自具有 6, 7 或 8 个核苷酸的长度，并且在确定的条件下与靶核酸分子群杂交，而在确定的条件下不与单链引物延伸产物群中的非靶核酸分子群杂交的所有可能的寡核苷酸。

2. 权利要求 1 的方法，其中第二寡核苷酸引物群的杂交部分经选择包括，在确定的条件下不与单链引物延伸产物群中的非靶核酸群杂交的、长度为 6 个核苷酸的所有可能的寡核苷酸。

3. 权利要求 1 的方法，其中非靶核酸分子群基本上由 RNA 模板分子群中最高丰度的核酸分子组成。

4. 权利要求 3 的方法，其中最高丰度的核酸分子选自核糖体 RNA，线粒体核糖体 RNA，及其组合。

5. 权利要求 1 的方法，其中第一寡核苷酸群的杂交部分由 6, 7, 8, 或 9 个随机核苷酸中的一种组成，并且所述确定序列部分包括用于 PCR 扩增的第一引物结合位点。

6. 权利要求 1 的方法，其中第一寡核苷酸引物群的杂交部分群选自，在确定的条件下不与 RNA 模板分子群中的非靶核酸分子杂交的、长度为 6 个核苷酸的所有可能的寡核苷酸。

7. 权利要求 1 的方法，其中样品包括总 RNA。

8. 权利要求 1 的方法，其中第一和第二寡核苷酸群中的每一寡核苷酸的确定序列部分，由长度范围在 10 个核苷酸至 20 个核苷酸的、用于 PCR 扩增的引物结合位点所组成。

9. 权利要求 8 的方法，其中第一或第二引物结合位点中的至少一个，包括转录启动子。

10. 权利要求 1 的方法，其中第二寡核苷酸群的每一寡核苷酸进一步包括，由 1-10 个随机核苷酸组成的间隔子序列部分，其中所述间隔子部分位于确定序列部分和杂交部分之间。

11. 权利要求 1 的方法，其中第二寡核苷酸群中的杂交部分群选自，包括 SEQ ID NO：750-1498 的寡核苷酸。

12. 权利要求 6 的方法，其中第一寡核苷酸群中的杂交部分群选自，包括 SEQ ID NO：1-749 的寡核苷酸。

13. 权利要求 8 的方法，进一步包括扩增双链 cDNA 的至少一个链。

14. 权利要求 13 的方法，进一步包括对 PCR 扩增的 DNA 进行测序。

15. 权利要求 8 的方法，其中第一群中每一寡核苷酸的确定序列部分包括至少 8 个连续核苷酸的区域，所述区域与第二群中每一寡核苷酸的确定序列部分中的至少 8 个连续核苷酸的区域相同。

16. 权利要求 8 的方法，其中第一或第二寡核苷酸群的至少一个的确定序列部分，包括

RNA 部分和 DNA 部分,其中 RNA 部分位于 DNA 部分的 5' 端。

17. 分析转录组特征谱的方法,包括:

(a) 用逆转录酶和第一寡核苷酸引物群,从分离自哺乳动物受试者的样品中的 RNA 模板分子群中的靶核酸分子群合成单链引物延伸产物群,所述第一寡核苷酸引物群包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的第一 PCR 引物结合位点,

(b) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸引物群,从步骤 (a) 生成的单链引物延伸产物群合成双链 cDNA,所述第二寡核苷酸引物群包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的第二 PCR 引物结合位点,其中杂交部分选自具有 6 个核苷酸的长度的,在确定的条件下与靶核酸分子群杂交,而在确定的条件下不与单链引物延伸产物群中的非靶核酸分子群杂交的所有可能的寡核苷酸,其中非靶核酸分子群基本上由与所述哺乳动物受试者相同物种的核糖体 RNA 和线粒体核糖体 RNA 所组成,和

(c) 使用与第一 PCR 引物结合位点结合的第一 PCR 引物和与第二 PCR 引物结合位点结合的第二 PCR 引物,PCR 扩增步骤 (b) 合成的双链 cDNA。

18. 权利要求 17 的方法,进一步包括将 PCR 产物克隆入载体,以产生样品分离时哺乳动物受试者的转录组的代表性文库。

19. 权利要求 17 的方法,进一步包括对至少一部分 PCR 产物测序。

20. 权利要求 17 的方法,其中 PCR 扩增使用退火温度在 40-50 度的至少 2 个扩增循环,之后用退火温度大于 50 度的额外的扩增循环来进行。

21. 权利要求 17 的方法,进一步包括标记至少一部分扩增的 PCR 产物。

22. 权利要求 17 的方法,其中第一群中每一寡核苷酸的第一 PCR 引物结合位点,包括至少 8 个连续核苷酸的区域,所述区域与第二寡核苷酸群中每一寡核苷酸的第二 PCR 引物结合位点中的至少 8 个连续核苷酸的区域相同。

23. 权利要求 17 的方法,其中第一或第二寡核苷酸群的至少一个的 PCR 引物结合位点,包括 RNA 部分和 DNA 部分,其中 RNA 部分位于 DNA 部分的 5' 端。

24. 用权利要求 17 的方法所产生的经扩增的核酸分子群。

25. 在较大的非靶核酸分子群中选择性扩增靶核酸分子群的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 用逆转录酶和第一寡核苷酸引物群,从分离自哺乳动物受试者的含总 RNA 的样品合成单链 cDNA,其中第一寡核苷酸引物群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO:1-749 的寡核苷酸群的成员;和

(b) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸引物群,从步骤 (a) 合成的单链 cDNA 合成双链 cDNA,其中第二寡核苷酸引物群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO:750-1498 的寡核苷酸群的成员。

26. 权利要求 25 的方法,其中第一寡核苷酸引物群的杂交部分群,包括包含 SEQ ID NO:1-749 的寡核苷酸的至少 10%。

27. 权利要求 25 的方法,其中第二寡核苷酸引物群的杂交部分群,包括包含 SEQ ID NO:750-1498 的寡核苷酸的至少 10%。

28. 权利要求 25 的方法,进一步包括对至少一部分 PCR 产物进行测序。

29. 权利要求 25 的方法,进一步包括标记至少一部分 PCR 产物。

30. 用于第一链 cDNA 的合成的包含 SEQ ID NO :1-749 的寡核苷酸群。
31. 用于第二链 cDNA 的合成的包含 SEQ ID NO :750-1498 的寡核苷酸群。
32. 用于选择性扩增靶核酸分子群的试剂,所述试剂包括包含 SEQ ID NO :1-749 的寡核苷酸的至少 10%。
33. 用于选择性扩增靶核酸分子群的试剂,所述试剂包括包含 SEQ ID NO :750-1498 的寡核苷酸的至少 10%。
34. 用于选择性扩增靶核酸分子群的试剂,所述试剂包括引发靶核酸分子群的扩增的寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO :1-749 的寡核苷酸群的成员。
35. 用于选择性扩增靶核酸分子群的试剂,所述试剂包括引发靶核酸分子群的扩增的寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO :750-1498 的寡核苷酸群的成员。
36. 用于选择性扩增靶核酸分子群的试剂盒,所述试剂盒包括包含用于第一链 cDNA 合成的第一寡核苷酸群的试剂,其中第一寡核苷酸群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO :1-749 的寡核苷酸群的成员。
37. 权利要求 36 的试剂盒,其中第一寡核苷酸群中的杂交部分群包括包含 SEQ ID NO :1-749 的寡核苷酸的至少 10%。
38. 权利要求 36 的试剂盒,进一步包括用于第二链 cDNA 合成的第二寡核苷酸群,其中第二寡核苷酸群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO :750-1498 的寡核苷酸群的成员。
39. 权利要求 38 的试剂盒,其中第二寡核苷酸群中的杂交部分群包括包含 SEQ ID NO :750-1498 的寡核苷酸的至少 10%。
40. 权利要求 38 的试剂盒,其中第一寡核苷酸群中的杂交部分群包括由 SEQ ID NO :1-749 所组成的寡核苷酸,并且其中第二寡核苷酸群中的杂交部分群包括由 SEQ ID NO :750-1498 所组成的寡核苷酸。
41. 权利要求 38 的试剂盒,进一步包括至少一种下列成分:逆转录酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶、RNA 酶 H、Tris 缓冲液、钾盐、镁盐、铵盐、还原剂、脱氧核苷三磷酸或核糖核酸酶抑制剂。
42. 用于在获自哺乳动物受试者的样品的 RNA 模板分子群中选择性扩增靶核酸分子群的试剂盒,所述试剂盒包括:
- (a) 包含由 6 个核苷酸组成的杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分的第一寡核苷酸引物群,所述杂交部分选自长度为 6 个核苷酸的,在确定的条件下不与 RNA 模板分子群中的非靶核酸分子群杂交的所有可能的寡核苷酸,其中所述非靶核酸分子群基本上由 RNA 模板分子群中的最高丰度的核酸分子所组成;
- (b) 包含由 6 个核苷酸组成的杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分的第二寡核苷酸引物群,所述杂交部分选自第一寡核苷酸引物群的杂交部分的核苷酸序列的反向互补序列;
- (c) 与第一寡核苷酸群的第一确定序列部分结合的第一 PCR 引物,和与第二寡核苷酸

群的第二确定序列部分结合的第二 PCR 引物。

43. 权利要求 42 的试剂盒,其中非靶核酸分子群基本上由与哺乳动物受试者相同物种的核糖体 RNA 和线粒体核糖体 RNA 所组成。

44. 权利要求 42 的试剂盒,其中第一和第二寡核苷酸群中的每一寡核苷酸的确定序列部分,由用于 PCR 扩增的、长度范围在 10 个核苷酸至 20 个核苷酸的引物结合位点所组成。

45. 权利要求 42 的试剂盒,其中第一群中的每一寡核苷酸的确定序列部分包括至少 8 个连续核苷酸的区域,所述区域与第二群中的每一寡核苷酸的确定序列部分中的至少 8 个连续核苷酸的区域相同。

46. 权利要求 42 的试剂盒,其中第一或第二寡核苷酸群的至少一个的确定序列部分,包括 RNA 部分和 DNA 部分,其中 RNA 部分位于 DNA 部分的 5' 端。

47. 选择性扩增靶核酸分子群以产生扩增的 DNA 分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供第一寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的第一 PCR 引物结合位点,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO:1-749 的寡核苷酸群的成员;

(b) 将第一寡核苷酸群与包含分离自哺乳动物受试者的 RNA 的样品退火;

(c) 用逆转录酶从 RNA 合成 cDNA;

(d) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸群合成双链 cDNA,其中每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的第二 PCR 结合位点,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO:750-1498 的寡核苷酸群的成员;

(e) 用热稳定 DNA 聚合酶,与第一 PCR 引物结合位点相结合的第一 PCR 引物,以及与第二 PCR 引物结合位点相结合的第二 PCR 引物来 PCR 扩增双链 cDNA 以产生扩增的双链 DNA,和

(f) 对扩增的双链 PCR 产物进行测序。

48. 选择性扩增的核酸分子的群,其由分离自哺乳动物受试者的细胞样品中的 RNA 模板分子群中的靶核酸分子群的代表所组成,其中每一扩增的核酸分子包括:

位于扩增的核酸序列的群的成员的侧翼的 5' 确定序列部分,和 3' 确定序列部分,其中选择性扩增的序列的群包括与哺乳动物细胞中表达的靶 RNA 分子相对应的扩增的核酸序列,并且就特定的哺乳动物物种而言,其特征在于具有下列性质:

(a) 具有超过 75% 的多聚腺苷酸化和非多聚腺苷酸化的转录本,且具有少于 10% 的核糖体 RNA。

49. 插入至克隆载体的权利要求 48 的群。

50. 权利要求 48 的群,其中所述群中的每一核酸分子被标记。

51. 与底物连接的权利要求 48 的群。

52. 权利要求 48 的群,其中第一或第二寡核苷酸群的至少一个的确定序列部分,包括 RNA 部分和 DNA 部分,其中 RNA 部分位于 DNA 部分的 5' 端。

使用非随机引物的 cDNA 合成

发明领域

[0001] 本发明涉及选择性扩增靶核酸分子的方法和用于引发靶核酸分子的扩增的寡核苷酸。

[0002] 发明背景

[0003] 基因表达分析通常涉及起始核酸分子的扩增。可以分别或联合应用逆转录 (RT)，体外转录 (IVT) 或聚合酶链式反应 (PCR)，进行核酸分子的扩增。起始核酸分子可以是 mRNA 分子，其可以通过首先合成互补 cDNA 分子，然后合成与第一 cDNA 分子互补的第二 cDNA 分子，从而产生双链 cDNA 分子来扩增。通常用逆转录酶进行第一链 cDNA 的合成，通常用 DNA 聚合酶进行第二链 cDNA 的合成。通过使用 RNA 聚合酶，双链 cDNA 分子可用于产生互补的 RNA 分子，从而扩增最初的起始 mRNA 分子。RNA 聚合酶需要启动子序列以指导 RNA 合成的起始。例如，互补的 RNA 分子可以用作模板来产生另外的互补 DNA 分子。可选地，例如双链 cDNA 分子可以通过 PCR 来扩增，扩增的 PCR 产物可以用作测序模板或者用于微阵列分析。

[0004] 核酸分子的扩增需要使用与起始材料中一个或多个靶核酸分子特异性杂交的寡核苷酸引物。每一寡核苷酸引物可以包括位于寡核苷酸的与靶核酸分子杂交的杂交部分的 5' 端的启动子序列。如果寡核苷酸的杂交部分太短，那么寡核苷酸将不能稳定地与靶核酸分子杂交，由此引发和随后的扩增将不能进行。同样，如果寡核苷酸的杂交部分太短，那么寡核苷酸将不能与一个或少数靶核酸分子特异性杂交，而是与大量的靶核酸分子非特异性杂交。

[0005] 不同靶核酸分子的复杂混合物（例如 RNA 分子）的扩增，通常需要使用具有不同核酸序列的多种寡核苷酸的群体。寡核苷酸的成本随着寡核苷酸的长度增加。为了控制成本，优选制备不长于确保寡核苷酸与靶序列特异性杂交所需的最小长度的寡核苷酸引物。

[0006] 通常不希望扩增高表达的 RNA（例如核糖体 RNA）。例如，在分析血细胞基因表达的基因表达试验中，对大量拷贝的高丰度球蛋白 mRNA 或者核糖体 RNA 的扩增，可能会使稀有 mRNA 的水平微小变化不明显。因此，需要一组寡核苷酸引物，其选择性地扩增核酸分子群内的期望的核酸分子（例如，选择性扩增在细胞中表达的、除最高表达的 RNA 以外的所有 mRNA 的寡核苷酸引物）。为了降低合成寡核苷酸的群体的成本，每个寡核苷酸的杂交部分应该不长于在确定条件下确保与期望的靶序列的特异性杂交所需的长度。

[0007] 发明概述

[0008] 在一个方面，本发明提供了在较大的非靶核酸分子群中，选择性扩增靶核酸分子群（例如，除了最高表达的 RNA 种类以外，在细胞类型中表达的所有 RNA 分子）的方法。本发明的该方面的方法均包括以下步骤：(a) 用逆转录酶和第一寡核苷酸引物群，从分离自哺乳动物受试者的样品中的 RNA 模板分子群合成单链引物延伸产物群，其中第一寡核苷酸引物群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分，其中 RNA 模板分子群包括靶核酸分子群和非靶核酸分子群；(b) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸引物群，从步骤 (a) 的单链引物延伸产物群合成双链 cDNA，其中第二寡核苷酸群中的每一寡核苷酸，包括由 6, 7 或 8 个核苷酸组成的杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列，其中杂交

部分选自具有 6,7 或 8 个核苷酸的长度,并且在确定的条件下不与合成的单链 cDNA 中的非靶核酸分子群杂交的所有可能的寡核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸群中的每一寡核苷酸包括随机杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列。

[0009] 另一方面,本发明提供了在较大的非靶核酸分子群中,选择性扩增靶核酸分子群的方法。这方面,本发明的方法包括以下步骤:(a) 用逆转录酶和第一寡核苷酸引物群,从分离自哺乳动物受试者的含总 RNA 的样品合成单链 cDNA,其中第一寡核苷酸引物群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO:1-749 的寡核苷酸群的成员;以及(b) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸引物群,从步骤(a) 合成的单链 cDNA 合成双链 cDNA,其中第二寡核苷酸引物群中的每一寡核苷酸,包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO:750-1498 的寡核苷酸群的成员。

[0010] 另一方面,本发明提供了用于转录组特征谱分析的方法。这方面,本发明的方法包括:(a) 用逆转录酶和第一寡核苷酸引物群,从分离自受试者的样品中的 RNA 模板分子群中的靶核酸分子群合成单链引物延伸产物群,其中所述第一寡核苷酸引物群包含杂交部分和位于杂交部分 5' 端的第一 PCR 引物结合位点,(b) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸引物群,从步骤(a) 的单链引物延伸产物群合成双链 cDNA,其中所述第二寡核苷酸引物群包含杂交部分和位于杂交部分 5' 端的第二 PCR 引物结合位点,以及(c) 用结合第一 PCR 引物结合位点的第一 PCR 引物和结合第二 PCR 引物结合位点的第二 PCR 引物,对步骤(b) 产生的双链 cDNA 进行 PCR 扩增,其中非靶核酸分子群基本上由与哺乳动物受试者相同物种的核糖体 RNA 和线粒体核糖体 RNA 组成。

[0011] 另一方面,本发明提供了包含 SEQ ID NO:1-749 的寡核苷酸群。例如,这些寡核苷酸可用于引发与分离自哺乳动物受试者的 RNA 分子互补的第一链 cDNA 分子的合成,而不引发与核糖体 RNA (18S, 28S) 或线粒体核糖体 RNA (12S, 16S) 分子互补的第一链 cDNA 分子的合成。在某些实施方案中,寡核苷酸群中的每一寡核苷酸进一步包括位于杂交部分 5' 端的确定序列部分。在一个实施方案中,确定序列部分包括转录启动子,其在 PCR 扩增中用作引物结合位点或用于体外转录。在另一实施方案中,确定序列部分包括其不是转录启动子的引物结合位点。例如,在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中转录启动子例如 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508),位于具有 SEQ ID NO:1-749 中所示的序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸由位于具有 SEQ ID NO:1-749 中所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508) 所组成。在进一步的实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中确定序列部分包括用于引发 PCR 合成反应但不包含 RNA 聚合酶启动子序列的至少一个引物结合位点。用于此类实施方案的确定序列部分的代表性实例为 5' TCCGATCTCT3' (SEQ ID NO:1499),其优选位于具有 SEQ ID NO:1-749 所示序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。

[0012] 另一方面,本发明提供了包含 SEQ ID NO:750-1498 的寡核苷酸群。例如,这些寡核苷酸可用于引发与从分离自哺乳动物受试者的 RNA 合成的第一链 cDNA 分子互补的第二链 cDNA 分子的合成,而不引发与逆转录自核糖体 RNA (18S, 28S) 或线粒体核糖体 RNA (12S, 16S) 分子的第一链 cDNA 互补的第二链 cDNA 分子的合成。在一些实施方案中,寡核苷酸群中的每一寡核苷酸进一步包括位于杂交部分 5' 端的确定序列部分。在一个实施方案中,确

定序列部分包括转录启动子,其可在 PCR 扩增中用作引物结合位点或用于体外转录。在另一实施方案中,确定序列部分包括其不是转录启动子的引物结合位点。例如,在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中转录启动子例如 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508),位于具有 SEQ ID NO:750-1498 中所示序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸由位于具有 SEQ ID NO:750-1498 中所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508) 所组成。在进一步的实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中确定序列部分包括用于引发 PCR 合成反应但不包含 RNA 聚合酶启动子序列的至少一个引物结合位点。用于此类实施方案的确定序列部分的代表性实例为 5' TCCGATCTGA3' (SEQ ID NO:1500),其优选位于具有 SEQ ID NO:750-1498 中所示序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。

[0013] 另一方面,本发明提供了在较大的非靶核酸分子群中,选择性扩增靶核酸分子群的试剂。在一个实施方案中,该试剂包括包含 SEQ ID NO:1-749 的寡核苷酸的至少 10%。在另一个实施方案中,该试剂包括包含 SEQ ID NO:750-1498 的寡核苷酸的至少 10%。

[0014] 另一方面,本发明提供了选择性扩增靶核酸分子群的试剂盒。这方面,本发明的试剂盒包括,包含用于第一链 cDNA 合成的第一寡核苷酸群的试剂,其中第一寡核苷酸群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO:1-749 的寡核苷酸群的成员。在一些实施方案中,试剂盒进一步包括用于第二链 cDNA 合成的第二寡核苷酸群,其中第二寡核苷酸群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中杂交部分为包含 SEQ ID NO:750-1498 的寡核苷酸群的成员。

[0015] 另一方面,本发明提供了经选择性扩增的核酸分子的群,其包括哺乳动物受试者的转录组的代表,所述代表包含 5' 确定序列,相应于哺乳动物受试者中表达的核酸的经扩增的序列群,以及 3' 确定序列,其中经扩增的序列群对于特定哺乳动物物种而言特征在于具有下列性质:(a) 具有大于 75% 的多聚腺苷酸化和非多聚腺苷酸转录本,并且具有少于 10% 的核糖体 RNA。

附图说明

[0016] 通过参考下列详细描述并结合参考附图,本发明的上述方面及许多随之而来的优点将会更容易并且更好地被理解,其中:

[0017] 附图 1A 显示了随机 6-聚体 (N6) 寡核苷酸对人 RefSeq 转录本数据库中的核苷酸序列的精确匹配的数量,如实施例 1 中所描述的;

[0018] 图 1B 显示了不那么随机的 (Not-So-Random, NSR) 6-聚体寡核苷酸对人 RefSeq 转录本数据库中的核苷酸序列的精确匹配的数量,如实施例 1 中所描述的;

[0019] 图 1C 显示了使用用于第一链 cDNA 合成的随机引物的混合物和用于第二链 cDNA 合成的反-NSR 6-聚体寡核苷酸的混合物,合成选择性扩增的 cDNA 分子的制备物的本发明方法的代表性实施方案,如实施例 2 所描述的;

[0020] 图 1D 显示了使用用于第一链 cDNA 合成的 NSR 6-聚体寡核苷酸的混合物和用于第二链 cDNA 合成的反-NSR 6-聚体寡核苷酸的混合物,然后 PCR 扩增,从而合成选择性扩增的 aDNA 分子的制备物的本发明方法的代表性实施方案,如实施例 2 和实施例 4 所描述

的；

[0021] 图 2 为举例说明受试者的全转录组分析的方法的流程图，其包括从分离自受试者的 RNA 选择性扩增核酸分子，之后对扩增的核酸分子进行序列分析或微阵列分析，如实施例 4 和实施例 5 所描述的；

[0022] 图 3A 为对数标尺上的柱形图，其显示了与使用随机引物 (N8 = 100%) 产生的第一链 cDNA 相比较，用不同 NSR-6 库合成的第一链 cDNA 分子群中 18S, 28S, 12S 和 16S (相对于基因和 N8 进行标准化) 的相对丰度，如实施例 3 所描述的。

[0023] 图 3B 图示了，与在第一链中使用 NSR 引物 (SEQ ID NO:1-749) 然后在第二链中使用随机引物 (N7) 扩增的 cDNA (NSR > N7 = 3.0% 18S, 3.4% 28S) 相比较，以及与在第一链中使用 NSR 引物 (SEQ ID NO:1-749) 然后在第二链中使用反-NSR 引物 (SEQ ID NO:750-1498) 扩增的 cDNA (NSR > 反-NSR = 0.1% 18S, 0.5% 28S) 相比较，在第一链和第二链合成中均使用随机引物 (N7) 扩增的 cDNA 中胞质 rRNA (18S 或 28S) 的相对丰度水平 (N7 > N7 = 100% 18S, 100% 28S)，如实施例 3 所描述的；

[0024] 图 3C 图示了，与在第一链中使用 NSR 引物 (SEQ ID NO:1-749) 然后在第二链中使用随机引物 (N7) 扩增的 cDNA (NSR > N7 = 27% 12S, 20.4% 16S) 相比较，以及与在第一链中使用 NSR 引物 (SEQ ID NO:1-749) 然后在第二链中使用反-NSR 引物 (SEQ ID NO:750-1498) 扩增的 cDNA (NSR > 反-NSR = 8.2% 12S, 3.5% 16S) 相比较，在第一链和第二链合成中均使用随机引物 (N7) 扩增的 cDNA 中线粒体 rRNA (12S 或 16S) 的相对丰度水平 (N7 > N7 = 100% 12S 或 16S)，如实施例 3 所描述的；

[0025] 图 4A 为柱形图，其显示了在第一链合成期间用不同 NSR 引物合成的 cDNA 中，代表性基因转录本的基因特异性 polyA 的含量，如实施例 3 所描述的；

[0026] 图 4B 为柱形图，其显示了在第一链 cDNA 合成期间用不同 NSR 引物，从 Jurkat-1 和 Jurkat-2 总 RNA 扩增的 cDNA 中，代表性非多聚腺苷酸化 RNA 的相对丰度水平，如实施例 3 所描述的；

[0027] 图 5 图示了，在用 NSR-6 聚体产生的 cDNA 中测量的 Jurkat/K562 mRNA 表达数据的对数比值 (x-轴) 对在用随机引物 (N8) 产生的 cDNA 中测量的 Jurkat/K562 mRNA 表达数据的对数比值，如实施例 3 所描述的；

[0028] 图 6A 图示了在 polyA 纯化后所通常获得的总 RNA 中 rRNA 与 mRNA 的比例，其显示即使从总 RNA 中去除 95% rRNA，剩余的 RNA 仍然由约 50% rRNA 和 50% mRNA 的混合物组成，如实施例 3 所描述的；

[0029] 图 6B 图示了在第一链 cDNA 合成期间用 NSR 引物且在第二链 cDNA 合成期间用反-NSR 引物而制备的 cDNA 样品中 rRNA 与 mRNA 的比例。如图所示，与 polyA 纯化相比，用 NSR 引物和反-NSR 引物从总 RNA 产生 cDNA 可有效去除 99.9% rRNA，从而产生富集超过 95% 的 mRNA 的 cDNA 群，如实施例 3 所描述的；

[0030] 图 7A 图示了跨越长转录本 ($\geq 4\text{kb}$) 的 NSR 引发的 (虚线) 或表达的序列标签 (EST) (实线) cDNA 中，polyA+RefSeq mRNA 的检测和位置分布，其举例说明从 5' 端开始的每一碱基位置上显示的 5,790 个转录本的综合阅读频率，如实施例 7 所描述的；

[0031] 图 7B 图示了跨越长转录本 ($\geq 4\text{kb}$) 的 NSR 引发的 (虚线) 或表达的序列标签 (EST) (实线) cDNA 中，polyA+RefSeq mRNA 的检测和位置分布，其举例说明从 3' 端开始的

每一碱基位置上显示的 5,790 个转录本的综合阅读频率,如实施例 7 所描述的;以及

[0032] 图 8 图示了相对于从分离自通用人类参照 (UHR) 细胞系的 RNA 产生的 NSR- 引发的 cDNA,从分离自全脑的 RNA 产生的 NSR- 引发的 cDNA 中,由第 15 号染色体 Prader-Willi 神经疾病基因座编码的小核 RNA (snoRNA) 的丰富程度,如实施例 7 所描述的。

[0033] 发明详述

[0034] 除非本文明确定义,本文所用的所有术语具有本领域技术人员通常理解的相关含义。对于本领域的定义和术语,请技术人员特别关注 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, New York; 和 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York, 1999。

[0035] 用于第一链 cDNA 合成的不那么随机的 (Not-So-Random, "NSR") 6- 聚体引物的使用描述于 2006 年 10 月 27 日提交的共同未决的美国专利申请系列号 11/589,322 中,其通过引用并入本文。在特定的实施方案中,共同未决的美国专利申请系列号 11/589,322 中描述的 NSR-6 聚体,包括与血细胞中表达的所有 mRNA 分子杂交,但不与球蛋白 mRNA (HBA1, HBA2, HBB, HBD, HBG1 和 HBG2) 或细胞核核糖体 RNA (18S 和 28S rRNA) 杂交的寡核苷酸群。在本申请中,提供了不同的 NSR 引物群 (SEQ ID NO:1-749),其包括与哺乳动物细胞中表达的所有 mRNA 分子杂交 (包括球蛋白 mRNA),而不与细胞核核糖体 RNA (18S 和 28S rRNA) 和线粒体核糖体 RNA (12S 和 16S mt-rRNA) 杂交的寡核苷酸。本申请进一步提供了在第二链 cDNA 合成期间使用的第二反-NSR 寡核苷酸群 (SEQ ID NO:750-1498)。反-NSR 寡核苷酸 (SEQ ID NO:750-1498) 经选择与从哺乳动物细胞中表达的 RNA 模板 (包括球蛋白 mRNA) 逆转录产生的所有第一链 cDNA 分子杂交,而不与从细胞核核糖体 RNA (18S 和 28S rRNA) 和线粒体核糖体 RNA (12S 和 16S mt-rRNA) 转录产生的第一链 cDNA 分子杂交。如实施例 1-4 所述,在第一链合成期间使用 NSR 引物 (SEQ ID NO:1-749) 进行第一轮选择性扩增接着在第二链合成期间使用反-NSR 引物 (SEQ ID NO:750-1498) 进行第二轮选择性扩增,可产生基本上代表细胞中表达的所有 polyA RNA 和非 polyA RNA 的双链 cDNA 群,并且所述 cDNA 群具有极低水平 (低于 10%) 的代表不期望的细胞核核糖体 RNA 和线粒体核糖体 RNA 的核酸分子。如图 2 所示,本发明也提供了分析本发明扩增方法的产物的方法,例如测序和基因表达特征谱分析 (例如微阵列分析)。

[0036] 如上文所述,一方面,本发明提供了在较大的非靶核酸分子群中,选择性扩增靶核酸分子群 (例如,除了最高表达的 RNA 种类以外,在细胞类型中表达的所有 RNA 分子) 的方法。这方面,本发明的方法均包括以下步骤: (a) 用逆转录酶和第一寡核苷酸引物群,从分离自哺乳动物受试者的样品中的 RNA 合成单链 cDNA,其中第一寡核苷酸引物群中的每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列部分,其中所述 RNA 包括在较大的非靶核酸分子群中的靶核酸分子群; 和 (b) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸引物群,从步骤 (a) 合成的单链 cDNA 合成双链 cDNA,其中第二寡核苷酸群中的每一寡核苷酸包括由 6,7 或 8 个核苷酸组成的杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列,其中杂交部分选自具有 6,7 或 8 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸,所述寡核苷酸在确定的条件下不与合成的单链 cDNA 中的非靶核酸分子群杂交。

[0037] 第二寡核苷酸群还可以包括位于杂交部分 5' 端的确定序列部分。在一个实施方

案中,确定序列部分包括也可用作引物结合位点的转录启动子。因此,在本发明的这方面的一些实施方案中,第二寡核苷酸群中的每一寡核苷酸,包括由 6 个核苷酸或 7 个核苷酸或 8 个核苷酸组成的杂交部分和位于杂交部分 5' 端的转录启动子部分。在另一个实施方案中,第二寡核苷酸群的确定序列部分包括用于 PCR 扩增反应的第二引物结合位点,其可以任选地包括转录启动子。例如,本发明提供的反-NSR 寡核苷酸群可用于实施本发明的这方面的方法。

[0038] 例如,在本发明的一个实施方案中,鉴定了各具有 6 个核苷酸的长度的寡核苷酸群 (SEQ ID NO:750-1498),其可用作引物来引发所有或基本上所有的从哺乳动物细胞的靶 RNA 分子群合成的第一链 cDNA 分子的第二链合成,但不引发从哺乳动物细胞的非靶核糖体 RNA (rRNA) 或线粒体 rRNA (mt-rRNA) 逆转录产生的第一链 cDNA 的第二链合成。所鉴定的第二寡核苷酸群 (SEQ ID NO:750-1498) 称为反-不那么随机的 (anti-Not-So-Random, 反-NSR) 引物。因此,该寡核苷酸群 (SEQ ID NO:750-1498) 可用于引发其为从哺乳细胞分离的 mRNA 分子起始群的代表的第一链核酸分子群 (例如, cDNA) 的第二链合成,但不引发相应于 rRNA 或 mt-rRNA 的 cDNA 分子的第二链合成。

[0039] 在其他实施方案中,第一寡核苷酸群中的每一寡核苷酸,包括由 6, 7 或 8 个核苷酸组成的杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列,其中杂交部分选自具有 6, 7 或 8 个核苷酸的长度的、在确定的条件下不与哺乳动物受试者含 RNA 的样品中的非靶核酸分子群杂交的所有可能的寡核苷酸。

[0040] 第一寡核苷酸群还可以包括位于杂交部分 5' 端的确定序列部分。在一个实施方案中,确定序列部分包括也可用作第一引物结合位点的转录启动子。因此,在本发明这方面的一些实施方案中,第一寡核苷酸群中的每一寡核苷酸,包括由 6 个核苷酸或 7 个核苷酸或 8 个核苷酸组成的杂交部分和位于杂交部分 5' 端的转录启动子部分。在另一个实施方案中,第一寡核苷酸群的确定序列部分包括用于 PCR 扩增反应的第一引物结合位点,其可以任选地包括转录启动子。例如,本发明提供的 NSR 寡核苷酸群可用于实施本发明这方面的方法。

[0041] 例如,在本发明的一个实施方案中,鉴定了各具有 6 个核苷酸的长度的第一寡核苷酸群 (SEQ ID NO:1-749),其可用作引物,以引发所有或基本上所有的来自哺乳动物细胞的 mRNA 分子的第一链合成,但不引发来自哺乳动物细胞的非靶核糖体 RNA (rRNA) 或线粒体 rRNA (mt-rRNA) 的扩增。鉴定的第一寡核苷酸群 (SEQ ID NO:1-749) 称为不那么随机的 (Not-So-Random, NSR) 引物。因此,该寡核苷酸群 (SEQ ID NO:1-749) 可用于引发其为从哺乳细胞分离的 mRNA 分子起始群的代表的第一链核酸分子群 (例如, cDNA) 的第一链合成,但不引发相应于 rRNA 或 mt-rRNA 的 cDNA 分子的第一链合成。

[0042] 本发明也提供了用于引发第一链 cDNA 合成的第一寡核苷酸群,其中确定的序列,例如 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508) 或第一引物结合位点 (SEQ ID NO:1499) 位于具有 SEQ ID NO:1-749 中所示的序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,每一寡核苷酸可以包括与靶核酸分子 (例如 mRNA) 杂交的杂交部分 (选自 SEQ ID NO:1-749),和位于杂交部分 5' 端的确定序列,例如启动子序列或第一引物结合位点,可以将确定序列部分整合入使用寡核苷酸 (其包括 T7 启动子) 作为引物扩增的 DNA 分子,而后其可以促进 DNA 分子的转录。

[0043] 可选地,确定序列部分,例如转录启动子或第一引物结合位点,可以共价连接至 cDNA 分子,例如通过 DNA 连接酶。

[0044] 有用的转录启动子序列包括 T7 启动子 (5' AATTAATACGACTCACTATAGGGAGA 3' (SEQ ID NO :1508)), SP6 启动子 (5' ATTTAGGTGACACTATAGAAGNG3' (SEQ ID NO :1509)), 和 T3 启动子 (5' AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA3' (SEQ ID NO :1510))。

[0045] 靶核酸群例如可以包括, 细胞或组织中表达的除选择的非靶 mRNA 群以外 (例如最高丰度表达的 mRNA) 的所有 mRNA。高丰度表达的非靶 mRNA, 通常构成细胞或组织中表达的所有 mRNA 的至少 0.1% (例如可以构成细胞或组织中表达的所有 mRNA 的 50% 以上或 60% 以上或 70% 以上)。高丰度表达的非靶 mRNA 的实例, 为哺乳动物细胞中的核糖体 rRNA 或线粒体 rRNA。可以用本发明方法选择性消除的高丰度表达的非靶 RNA 的其他实例, 包括例如球蛋白 mRNA (来自血细胞) 或叶绿体 rRNA (来自植物细胞)。

[0046] 本发明的方法可用于分析生物细胞样品中总 RNA 的转录组特征谱, 其中期望减少扩增样品中的 RNA 群 (其不与 NSR 和 / 或反 -NSR 引物杂交), 例如高表达的 RNA (例如核糖体 RNA) 的存在。在一些实施方案中, 本发明的方法可用于在来自 RNA 样品的经扩增的核酸中减少不与 NSR 引物和 / 或反 -NSR 引物杂交的核酸分子群的量, 并且与和 NSR 和 / 或反 -NSR 引物杂交的经扩增的核酸分子的量相比, 减少至少 2 倍直至 1000 倍, 例如至少 10 倍, 50 倍, 100 倍, 500 倍或更高。

[0047] 用于实施本发明这方面的方法的寡核苷酸群可以选自更大的寡核苷酸群, 其中第一寡核苷酸群基于其在确定的杂件下与靶 RNA 群杂交, 但在确定的条件下不与非靶 RNA 群杂交的能力进行选择, 而且该第一寡核苷酸群包括具有 6 个核苷酸, 7 个核苷酸或 8 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸。

[0048] 第二寡核苷酸群基于其在确定的条件下与靶第一链 cDNA 群杂交, 但在确定的条件下不与非靶第一链 cDNA 群杂交的能力进行选择, 而且该第二寡核苷酸群包括具有 6 个核苷酸, 7 个核苷酸或 8 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸。在一个实施方案中, 第二寡核苷酸群可以通过合成第一寡核苷酸群的序列的反向互补序列来产生。

[0049] 第一寡核苷酸群的组成。在一些实施方案中, 第一寡核苷酸群包括具有 6 个核苷酸, 7 个核苷酸或 8 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸。第一寡核苷酸群可以只包括具有 6 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸, 或者具有 7 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸, 或者具有 8 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸。任选地, 除了具有 6 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸, 或者具有 7 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸, 或者具有 8 个核苷酸的长度的所有可能的寡核苷酸以外, 第一寡核苷酸群还可以包括其他寡核苷酸。通常, 第一寡核苷酸群的每一成员的长度不长于 30 个核苷酸。

[0050] 第一寡核苷酸群的序列。存在 4,096 种具有 6 个核苷酸长度的可能的寡核苷酸, 16,384 种具有 7 个核苷酸长度的可能的寡核苷酸, 65,536 种具有 8 个核苷酸的长度的可能的寡核苷酸。构成寡核苷酸群的寡核苷酸的序列, 可容易地通过计算机程序例如 Microsoft Word® 产生。

[0051] 第一寡核苷酸子群 (Subpopulation) 的选择。第一寡核苷酸子群基于第一寡核苷酸子群的成员在确定的条件下与靶核酸群杂交, 但在相同确定的条件下不与非靶群杂交的能力选自寡核苷酸群。扩增的样品包括将被扩增 (例如使用逆转录) 的靶核酸分子 (例如 RNA 或 DNA 分子), 也包括将不被扩增的非靶核酸分子。第一寡核苷酸子群由这样的寡核苷酸组成: 每一寡核苷酸在确定的条件下与在整个期望扩增的核酸分子群中分布的靶序列杂

交,但在相同确定的条件下不与非期望扩增的大多数(或任何的)非靶核酸分子杂交。第一寡核苷酸子群在确定的条件下,与靶核酸序列(除了刻意避免的核酸序列(非靶序列)之外)杂交。

[0052] 例如,细胞样品可以包括包含许多核糖体 RNA 分子(例如,5S,18S 和 28S 核糖体 RNA)和线粒体 rRNA 分子(例如,12S 和 16S 核糖体 RNA)在内的,哺乳动物细胞表达的所有 mRNA 分子的群。通常不期望扩增核糖体 RNA。例如,在分析细胞基因表达的基因表达试验中,对大量拷贝的高丰度核糖体 RNA 的扩增,可能使低丰度 mRNA 的水平微小变化不明显。因此,在本发明的实施中,选择第一寡核苷酸子群,其在确定的条件下不与大多数(或任何的)非靶核糖体 RNA 杂交,但在相同确定的条件下与细胞表达的大多数(优选所有的)其他靶 mRNA 分子杂交。

[0053] 为了选择在确定的条件下与靶核酸群杂交,但在确定的条件下不与非靶核酸群杂交的第一寡核苷酸子群,必须知道非靶核酸群的成员的完全或基本上完全的核酸序列。因此,例如必需知道 5S,18S,和 28S 核糖体 RNA(或者每一前述核糖体 RNA 种类的代表性成员)的核酸序列,和 12S 与 16S 核糖体线粒体 RNA 的核酸序列。从其获得细胞样品的哺乳动物物种的核糖体 RNA 的序列,可见于公众可获得的数据库。例如,表 1 提供了于 2007 年 9 月 5 日获取的人 12S,16S,18S 和 28S 核糖体 RNA 的 NCBI Genbank 标识符。

[0054] 然后合适的软件程序可用于将第一寡核苷酸群中的所有寡核苷酸序列(例如所有可能的 6 核酸寡核苷酸群)与核糖体 RNA 序列进行比较,以确定哪些寡核苷酸在确定的杂交条件下与任何部分的核糖体 RNA 杂交。只选择在确定的杂交条件下不与核糖体 RNA 的任何部分杂交的寡核苷酸。很容易写出允许比较核酸序列并且鉴定在确定的杂交条件下彼此杂交的序列的 Perl 脚本程序。

[0055] 因此,例如,如实施例 1 所更详细地描述的,鉴定了与任何核糖体 RNA 序列的任何部分不完全互补的所有可能的 6 核酸寡核苷酸子群。通常,寡核苷酸子群(其在确定的条件下与靶核酸群杂交但在确定的条件下不与非靶核酸群杂交)必须包含有具有足够差异性的寡核苷酸序列,以与 RNA 样品中的所有或基本上所有的核酸分子杂交。本文实施例 1 显示,具有 SEQ ID NO:1-749 中所示核酸序列的寡核苷酸群,可与 RefSeq 公众数据库中储存的基因转录本群的所有或基本上所有的核酸序列杂交。

[0056] 另外的确定核酸序列部分。选择的第一寡核苷酸子群(例如 SEQ ID NO:1-749),可用于引发靶 RNA 分子群的逆转录,以产生第一链 cDNA。可选地,第一寡核苷酸群可用作引物,其中每一寡核苷酸包括选择的寡核苷酸子群的一个成员的序列,并且还包括另外的确定核酸序列。所述另外的确定核酸序列,通常位于选择的寡核苷酸子群的成员的序列的 5' 端。通常,寡核苷酸群包括选择的寡核苷酸子群的所有成员的序列(例如,寡核苷酸群可以包括 SEQ ID NO:1-749 中所示的所有序列)。

[0057] 选择另外的确定核酸序列以使其不影响寡核苷酸与互补靶序列的杂交特异性。例如,如图 1D 所示,每一第一寡核苷酸可以包括转录启动子序列或第一引物结合位点(PBS#1),其位于选择的寡核苷酸子群的成员的序列的 5' 端。可将启动子序列整合入扩增的核酸分子,所述核酸分子从而可用作 RNA 合成的模板。任何 RNA 聚合酶启动子序列,可包括在寡核苷酸群的确定序列部分中。代表性实例包括 T7 启动子(SEQ ID NO:1508),SP6 启动子(SEQ ID NO:1509),和 T3 启动子(SEQ ID NO:1510)。

[0058] 在本发明这方面的一些实施方案中,如图 1C 所示,第一寡核苷酸群中的每一寡核苷酸包括随机杂交部分和位于杂交部分 5' 端的确定序列。如图 1C 所示,每一第一寡核苷酸可以包括位于随机杂交部分 5' 端的包含引物结合位点的确定序列。将引物结合位点整合入扩增的核酸,其从而可以作为 PCR 引物结合位点用于从 cDNA 产生双链扩增的 DNA 产物。引物结合位点可以是转录启动子序列的部分。

[0059] 第二寡核苷酸群的序列。第二寡核苷酸群的选择方法与如上所述的第一寡核苷酸群的选择方法类似,其区别在于选择由 6 个核苷酸,7 个核苷酸或 8 个核苷酸组成的杂交部分,以在确定的条件下与从靶 RNA 逆转录的第一链 cDNA 杂交,而在确定的条件下不与从非靶 RNA 逆转录的第一链 cDNA 杂交。利用上述方法,例如利用公众可获得的核糖体 RNA 序列,可选择第二寡核苷酸群。第二寡核苷酸群也可以作为第一寡核苷酸群的反向互补序列而产生(反-NSR)。

[0060] 因此例如,如实施例 1 所更详细描述,基于所有可能的 6 核酸寡核苷酸选择第二群,所述寡核苷酸与鉴定的任何核糖体 RNA 序列的任何部分都不完全互补。本文实施例 1 显示,具有如 SEQ ID NO:1-749 所示的核酸序列的寡核苷酸群,可与 RefSeq 公众数据库中储存的基因转录本群的所有或基本上所有的核酸序列杂交。第二群 SEQ ID NO:750-1498(反-NSR)由此产生,其是第一寡核苷酸群(SEQ ID NO:1-749, NSR)的反向互补序列。

[0061] 另外的确定核酸序列部分。选择的第二寡核苷酸子群(例如 SEQ IDNO:750-1498)可用于引发第一链 cDNA 分子靶群的第二链 cDNA 合成。可选地,第二寡核苷酸群可以用作引物,其中每一寡核苷酸包括选择的寡核苷酸子群的一个成员的序列,并且还包括另外的确定核酸序列。另外的确定核酸序列,通常位于选择的寡核苷酸子群的成员的序列的 5' 端。通常,寡核苷酸群包括选择的寡核苷酸子群的所有成员的序列(例如,寡核苷酸群可以包括 SEQ ID NO:750-1498 中所示的所有序列)。

[0062] 选择另外的确定核酸序列以使其不影响寡核苷酸与互补靶序列的杂交特异性。例如,如图 1D 所示,每一第一寡核苷酸可以包括转录启动子序列或第二引物结合位点(PBS#2),其位于选择的寡核苷酸子群的成员的序列的 5' 端。可将启动子序列整合入扩增的核酸分子,所述核酸分子从而可用作 RNA 合成的模板。任何 RNA 聚合酶启动子序列,可包括在寡核苷酸群的确定序列部分。代表性实例包括 T7 启动子(SEQ ID NO:1508),SP6 启动子(SEQ ID NO:1509),和 T3 启动子(SEQ ID NO:1510)。

[0063] 另一方面,本发明提供了第一寡核苷酸群,其中所述群的每一寡核苷酸包括:(a) 其为寡核苷酸子群成员的 6 核酸寡核苷酸序列(SEQ ID NO:1-749),其中所述寡核苷酸子群与哺乳动物细胞表达的所有或基本上所有的 RNA 杂交,但不与核糖体 RNA 杂交;和(b) 位于 6 核酸寡核苷酸序列 5' 端的引物结合位点(PBS#1)序列(SEQ ID NO:1499)。在一个实施方案中,第一寡核苷酸群包括如 SEQ ID NO:1-749 所示的所有 6 核苷酸序列。在另一实施方案中,第一寡核苷酸群包括 SEQ ID NO:1-749 中所示的 6 核苷酸序列的至少 10%(例如至少 20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,85%,90%,95%,或 99%)。

[0064] 任选地,间隔子部分位于第一寡核苷酸群的确定序列部分和杂交部分之间。间隔子部分的长度,通常为 1-12 个核苷酸(例如长度为 1-6 个核苷酸),并且可以包括任意组合的随机核苷酸(N=A, C, T, 或 G)。例如,间隔子部分可以由随机选择的核苷酸组成。间

隔子部分的全部或部分可以和与杂交部分相同的靶核酸序列杂交或不杂交。如果间隔子部分的全部或部分和与杂交部分相同的靶核酸序列杂交,那么结果将增强包括杂交部分和杂交间隔子部分的寡核苷酸所引发的 cDNA 合成的效率。在一些实施方案中,第一寡核苷酸群进一步包括位于引物结合位点和杂交部分之间的,由 1-10 个随机核苷酸 (A, C, T, 或 G) 组成的间隔子区。在另一实施方案中,第一寡核苷酸群包括如 SEQ ID NO:1-749 所示的所有 6 核苷酸序列,其中每一核苷酸序列在 5' 端进一步包括至少一个间隔子核苷酸。

[0065] 另一方面,本发明提供了第二寡核苷酸,其中所述群的每一寡核苷酸包括:(a) 其为寡核苷酸子群成员的 6 核苷酸寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:750-1498),其中所述寡核苷酸子群与从哺乳动物细胞表达的 RNA 逆转录的所有或基本上所有的第一链 cDNA 杂交,但不与从核糖体 RNA 逆转录的第一链 cDNA 杂交;和 (b) 位于 6 核苷酸寡核苷酸序列 5' 端的引物结合位点 (PBS#2) 序列 (SEQ ID NO:1500)。在一个实施方案中,第一寡核苷酸群包括如 SEQ ID NO:750-1498 所示的所有 6 核苷酸序列。在另一实施方案中,第一寡核苷酸群包括如 SEQ ID NO:750-1498 所示的 6 核苷酸序列的至少 10% (例如至少 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 或 99%)。

[0066] 任选地,间隔子部分位于第二寡核苷酸群的决定序列部分和杂交部分之间。间隔子部分的长度,通常为 1-12 个核苷酸 (例如长度为 1-6 个核苷酸),并且可以包括任意组合的随机核苷酸 (N = A, C, T, 或 G)。例如,间隔子部分可以由随机选择的核苷酸组成。间隔子部分的全部或部分可以和与杂交部分相同的靶核酸序列杂交或不杂交。如果间隔子部分的全部或部分和与杂交部分相同的靶核酸序列杂交,那么结果将增强包括杂交部分和杂交间隔子部分的寡核苷酸所引发的 cDNA 合成的效率。在一些实施方案中,第一寡核苷酸群进一步包括位于引物结合位点和杂交部分之间的,由 1-10 个随机核苷酸 (A, C, T, 或 G) 组成的间隔子区。在另一实施方案中,第一寡核苷酸群包括如 SEQ ID NO:750-1498 所示的所有 6 核苷酸序列,其中每一核苷酸序列在 5' 端进一步包括至少一个间隔子核苷酸。

[0067] 在一些实施方案中,第一寡核苷酸群的决定序列部分和第二寡核苷酸群的决定序列部分,各自自由范围在至少 10 个核苷酸直至 30 个核苷酸,例如 10-12 个核苷酸,10-14 个核苷酸,10-16 个核苷酸,10-18 个核苷酸,和 10-20 个核苷酸的长度组成。在一些实施方案中,第一和第二寡核苷酸群的每一寡核苷酸的决定序列部分由 10 个核苷酸组成,其中确定序列部分包括 PCR 引物结合位点,并且其中第一寡核苷酸群每一成员的 PCR 结合位点中的至少 8 个连续核苷酸,与第二寡核苷酸群每一成员的 PCR 结合位点中的至少 8 个核苷酸,具有相同的序列。在进一步的实施方案中,第一和第二寡核苷酸群的每一确定序列部分由 10 个核苷酸组成,其中确定序列部分包括 PCR 引物结合位点,并且其中第一寡核苷酸群每一成员的 PCR 结合位点中的至少 8 个连续核苷酸,与第二寡核苷酸群每一成员的 PCR 结合位点中的至少 8 个核苷酸,具有相同的序列,并且其中第一寡核苷酸群的决定序列部分的 3' 端剩余的两个核苷酸 (例如 C, T) 不同于第二寡核苷酸群的决定序列部分 3' 端的两个核苷酸 (例如 G, A),从而允许在序列分析之后、在序列阅读比对之前,鉴定转录链 (有义或反义)。

[0068] 在进一步的实施方案中,提供了杂合的 RNA/DNA 寡核苷酸,其中第一寡核苷酸群的决定序列部分包括 RNA 部分和 DNA 部分,其中 RNA 部分位于 DNA 部分的 5' 端。在一个实施方案中,杂合引物的 5' RNA 部分由至少 11 个 RNA 核苷酸的决定序列部分组成,而杂合

引物的 3' DNA 部分由至少 3 个 DNA 核苷酸组成。在特定的实施方案中,杂合 RNA/DNA 寡核苷酸包括与 NSR 引物 (SEQ ID NO :1-749) 的 5' 端共价连接的 SEQ ID NO :1558。用杂合 RNA/DNA 寡核苷酸产生的 cDNA 可用作模板,通过使用美国专利 6,946,251 描述的方法来产生单链扩增的 DNA,该专利通过引用并入本文,如实施例 6 进一步描述的。

[0069] 例如,包括杂合 RNA/DNA 的确定序列部分 (SEQ ID NO :1558) 和杂交部分 (SEQ ID NO :1-749) 的,用于第一链 cDNA 合成的第一寡核苷酸群形成了模板 RNA 中的靶核酸分子复制的基础。包含杂合 RNA/DNA 引物部分的第一寡核苷酸群与 RNA 模板中的靶 RNA 杂交,并且杂合 RNA/DNA 引物可被 RNA- 依赖性 DNA 聚合酶延伸以形成第一引物延伸产物 (第一链 cDNA)。在切割模板 RNA 之后,在第一引物延伸产物的复合物中形成第二链 cDNA。根据该实施方案,由于第一引物延伸产物中的杂合引物的存在,第一和第二引物延伸产物的双链复合物在一端由 RNA/DNA 杂合体组成。然后,双链复合物可与试剂,例如切割 RNA/DNA 杂合体中的 RNA 的酶 (例如 RNA 酶 H) 一起用于产生单链 DNA 扩增产物,所述酶切割杂交体的 RNA 序列,从而保留第二引物延伸产物上的序列以结合另一杂合引物,所述杂合引物与第一杂合引物可以相同或不相同。另一第一引物延伸产物由高进行性 DNA 聚合酶例如 phi29 产生,所述产物替换了先前被部分切割的第一引物延伸产物,从而产生了替换的切割的第一引物延伸产物。

[0070] 在可选的实施方案中,通过修饰双链 cDNA 产物 (所有 DNA) (用随机引物或者 NSR 与反-NSR 引物或者其组合产生),产生用于单链 DNA 扩增的双链复合物。将双链 cDNA 产物变性,将 RNA/DNA 杂合引物退火至第二链 cDNA 3' 末端部分上的预先确定的引物序列。然后用逆转录酶延伸杂合引物的 DNA 部分,以形成具有 RNA 杂合部分的双链复合物。通过先用 RNA 酶 H 处理以除去复合物的 RNA 部分,再加入 RNA/DNA 杂合引物和加入高进行性 DNA 聚合酶例如 phi29,将双链复合物用作单链 DNA 扩增的模板,以产生单链 DNA 扩增产物。

[0071] 杂交条件。在本发明的实施过程中,第一寡核苷酸群基于寡核苷酸群的成员在确定的条件下与靶核酸群杂交,但在相同确定的条件下不与非靶核酸群杂交的能力选自寡核苷酸群。确定的杂交条件允许第一寡核苷酸与存在于样品中的、除核糖体 RNA 以外的所有核酸分子特异性杂交。通常,杂交条件温度低于天然双链体的解链温度 (T_m) 不超过 25°C - 30°C (例如 10°C)。超过约 100 个碱基的核酸分子的 T_m ,可用公式 $T_m = 81.5 + 0.41\% (G+C) - \log(Na^+)$ 进行计算,其中 (G+C) 为核酸分子的鸟苷和胞苷含量。对于长度少于 100 个碱基的寡核苷酸分子,示例性杂交条件为低于 T_m 5°C - 10°C 。一般而言,减少短寡核苷酸双链体的 T_m 值大约 $(500 / \text{寡核苷酸长度})^{\circ}\text{C}$ 。在本发明的一些实施方案中,杂交温度在 40°C - 50°C 的范围内。合适的杂交条件也可以通过经验确定,而无需过多的试验。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,第一寡核苷酸群在约 40°C 的温度下与靶核酸分子群杂交。

[0073] 在本发明的一个实施方案中,第二寡核苷酸群在约 37°C 的温度下与单链引物延伸产物群中的靶核酸分子群杂交。

[0074] 扩增条件。在本发明的实施中,靶核酸群的第一子群的扩增在确定的扩增条件下进行。可以如上所述选择杂交条件。通常,确定的扩增条件包括用逆转录酶进行第一链 cDNA 合成。逆转录反应在确定浓度的脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 的存在下进行。在一些实施方案中,dNTP 浓度在约 1000- 约 2000 μM 的范围内,以富集靶基因的扩增产物,如在 2006 年 10

月 27 日提交的共同未决美国专利申请系列号 11/589,322 中所述,其通过引用并入本文。

[0075] 寡核苷酸的组成与合成。可用于本发明的实施的寡核苷酸引物可以是 DNA、RNA、PNA、嵌合混合物,或它们的衍生物或修饰物,只要它仍能够引发期望的反应。寡核苷酸引物可以在碱基部分,糖部分,或磷酸主链上进行修饰,并可以包括其他的附加基团或标记,只要其仍能够引发期望的扩增反应。

[0076] 例如,寡核苷酸引物可以包括至少一个修饰的碱基部分,所述碱基部分选自包括但不限于以下的组:5-氟尿嘧啶,5-溴尿嘧啶,5-氯尿嘧啶,5-碘尿嘧啶,次黄嘌呤,黄嘌呤,4-乙酰基胞嘧啶,5-(羧基羟甲基)尿嘧啶,5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷,5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶,二氢尿嘧啶, β -D-半乳糖基 Q 苷,肌苷,N6-异戊基腺嘌呤,1-甲基鸟嘌呤,1-甲基肌苷,2,2-二甲基鸟嘌呤,2-甲基腺嘌呤,2-甲基鸟嘌呤,3-甲基胞嘧啶,5-甲基胞嘧啶,N6-腺嘌呤,7-甲基鸟嘌呤,5-甲基氨基甲基尿嘧啶,5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶, β -D-甘露糖基 Q 苷,5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶,5-甲氧基尿嘧啶,2-甲基硫代-N6-异戊基腺嘌呤,尿嘧啶-5-氧乙酸,假尿嘧啶,Q 苷,2-硫代胞嘧啶,5-甲基-2-硫代尿嘧啶,2-硫代尿嘧啶,4-硫代尿嘧啶,5-甲基尿嘧啶,尿嘧啶-5-氧乙酸甲基酯,5-甲基-2-硫代尿嘧啶,3-(3-氨基-3-N-2-羟丙基)尿嘧啶和 2,6-二氨基嘌呤。

[0077] 例如,寡核苷酸引物可包括至少一个修饰的糖部分,所述糖部分选自包括但不限于以下的组:阿拉伯糖,2-氟阿位伯糖,木酮糖,和己糖。

[0078] 例如,寡核苷酸引物可以包括至少一个修饰的磷酸主链,所述磷酸主链选自:硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,硫代氨基磷酸酯,氨基磷酸酯,二氨基磷酸酯,甲基膦酸酯,烷基膦酸三酯,和甲酰乙缩醛(formacetal),或它们的类似物。

[0079] 用于本发明的方法的寡核苷酸引物,可以通过使用非特异性核酸切割化学剂或酶或者位点特异性限制性核酸内切酶切割较大的核酸片段获得,或者可以通过用本领域已知的标准方法合成而获得,例如通过使用自动化 DNA 合成仪(例如其可商购自 Biosearch, Applied Biosystems 等)和标准亚磷酰胺化学法。例如,硫代磷酸酯寡核苷酸可以使用 Stein 等人的方法来合成(Nucl. Acids Res. 16:3209-3221, 1988),甲基膦酸酯寡核苷酸可以使用受控的孔度玻璃聚合物支持物来制备(Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 85:7448-7451, 1988)。

[0080] 一旦合成期望的寡核苷酸,其将从固体支持物(寡核苷酸在其上合成)上切割下来,并且用本领域的已知方法进行处理,以除去存在的任何保护基团。然后寡核苷酸用本领域已知的任何方法进行纯化,包括萃取和凝胶纯化。寡核苷酸的浓度和纯度,可通过对在丙烯酰胺凝胶上分离的寡核苷酸进行检测而确定,或者通过使用分光光度计在 260nm 处测量光密度而确定。

[0081] 例如,本发明这方面的方法可用于选择性地扩增 mRNA 的编码区,内含子,基因的可变剪接形式,以及调节基因表达的非编码 RNA。

[0082] 另一方面,本发明提供了包括 SEQ ID NO:1-749 所示核酸序列的至少 10% (例如至少 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 或 99%) 的寡核苷酸群。例如,这些寡核苷酸(SEQ ID NO:1-749)可用于引发与从哺乳动物受试者分离的 RNA 分子互补的 cDNA 分子的第一链合成,但不引发与核糖体 RNA 分子互补的 cDNA 分子的第一链合成。事实上,例如,这些寡核苷酸(SEQ ID NO:1-749)可用于引发以任何 RNA 分子群作为模板的

cDNA 合成,但不扩增显著量的核糖体 RNA 或线粒体核糖体 RNA。例如,本发明提供了寡核苷酸群,其中确定序列部分,例如转录启动子如 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508),或引物结合位点 (PBS#1) (SEQ ID NO:1499) 位于具有如 SEQ ID NO:1-749 所示的序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO:1-749 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508) 组成。在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO:1-749 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的引物结合位点 SEQ ID NO:1499 和随机间隔子核苷酸 (A, C, T, 或 G) 组成。在一些实施方案中,寡核苷酸群包括 SEQ ID NO:1-749 所示的 6 核苷酸序列的至少 10% (例如 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 或 99%)。

[0083] 另一方面,本发明提供了包括 SEQ ID NO:750-1498 所示的核酸序列的至少 10% (例如至少 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 或 99%) 的寡核苷酸群。例如,这些寡核苷酸 (SEQ ID NO:750-1498) 可用于引发与从哺乳动物受试者分离的 RNA 分子互补的单链引物延伸产物的第二链合成,但不引发与核糖体 RNA 分子互补的 cDNA 分子的第二链合成。事实上,例如,这些寡核苷酸 (SEQ ID NO:750-1498) 可用于引发以任何单链引物延伸分子群作为模板的第二链 cDNA 合成,但不扩增显著量的与核糖体 RNA 或线粒体核糖体 RNA 互补的单链引物延伸分子。例如,本发明提供了寡核苷酸群,其中确定序列部分,例如转录启动子如 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508),或引物结合位点 (PBS#2) (SEQ ID NO:1500) 位于具有如 SEQ ID NO:750-1498 所示序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO:750-1498 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508) 组成。在一些实施方案中,本发明提供了寡核苷酸群,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO:750-1498 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的引物结合位点 (PBS#2) SEQ ID NO:1500 和随机间隔子核苷酸 (A, C, T, 或 G) 组成。在一些实施方案中,寡核苷酸群包括 SEQ ID NO:750-1498 所示的 6 核苷酸序列的至少 10% (例如 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 或 99%)。

[0084] 另一方面,本发明提供了从 RNA 模板分子群选择性合成单链引物延伸产物 (第一链 cDNA) 的试剂。例如,该试剂可用于引发与从哺乳动物受试者分离的样品中的靶 RNA 模板分子互补的第一链 cDNA 分子的合成,但不引发与核糖体 RNA 分子互补的第一链 cDNA 分子的合成。本发明的试剂包括,包含 SEQ ID NO:1-749 所示的核酸序列的至少 10% 的寡核苷酸群。在一些实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,所述寡核苷酸群包括 SEQ ID NO:1-749 所示的 6 核苷酸序列的至少 10% (例如 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 或 99%)。在一些实施方案中,选择寡核苷酸群以与样品中存在的、除核糖体 RNA 和线粒体 rRNA 以外的基本上所有的核酸分子杂交。在其他实施方案中,选择寡核苷酸群以与样品中存在的核酸分子的子集杂交,其中核酸分子的子集不包括核糖体 RNA。

[0085] 另一方面,本发明提供了从单链引物延伸产物群 (第一链 cDNA) 选择性合成双链 cDNA 的试剂。例如,该试剂可用于引发与从哺乳动物受试者分离的样品中的靶 RNA 模板分子互补的第二链 cDNA 分子的合成,但不引发与核糖体 RNA 分子互补的第二链 cDNA 分子的

合成。本发明这方面的试剂,可用于引发使用随机引物产生的第一链 cDNA 的合成,或者可用于引发使用 NSR 引物(例如 SEQ ID NO:1-749)产生的第一链 cDNA 的合成,以提供另外的选择靶分子的步骤。本发明这方面的试剂包括,包含 SEQ ID NO:750-1498 所示的核酸序列的至少 10% 的寡核苷酸群。在一些实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,所述寡核苷酸群包括 SEQ ID NO:750-1498 所示的 6 核苷酸序列的至少 10% (例如 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 或 99%)。在一些实施方案中,选择寡核苷酸群以与样品中存在的、除从核糖体 RNA 和线粒体 rRNA 合成的第一链 cDNA 以外的基本上所有的第一链 cDNA 分子杂交。在其他实施方案中,选择寡核苷酸群以与样品中存在的的第一链 cDNA 分子的子集杂交,其中第一链 cDNA 分子的子集不包括从核糖体 RNA 合成的 cDNA 分子。

[0086] 在另一实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,其中含转录启动子例如 T7 启动子的确定序列部分位于具有如 SEQ ID NO:1-749 所示序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,在一些实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO:1-749 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508) 组成。在另一实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,其中含引物结合位点(例如 PBS#1)的确定序列部分,位于具有如 SEQ ID NO:1-749 所示序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,在一些实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO:1-749 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的引物结合位点(例如 PBS#1) (SEQ ID NO:1499) 组成。在一些实施方案中,本发明提供了进一步包含至少一个随机核苷酸的间隔子区的试剂,所述间隔子区位于引物结合位点和具有如 SEQ ID NO:1-749 所示序列的寡核苷酸群的不同成员之间。

[0087] 在另一实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,其中含转录启动子例如 T7 启动子的确定序列部分,位于具有如 SEQ ID NO:750-1498 所示序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,在一些实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO:750-1498 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508) 组成。在另一实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,其中含引物结合位点(例如 PBS#2)的确定序列部分,位于具有如 SEQ ID NO:750-1498 所示序列的寡核苷酸群的成员的 5' 端。因此,在一些实施方案中,本发明提供了含寡核苷酸群的试剂,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO:750-1498 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的引物结合位点 (PBS#2) (SEQ ID NO:1500) 组成。在一些实施方案中,本发明提供了进一步包含至少一个随机核苷酸的间隔子区的试剂,所述间隔子区位于引物结合位点和具有如 SEQ ID NO:750-1498 所示序列的寡核苷酸群的不同成员之间。

[0088] 本发明的试剂可以以水性溶液,或去除了水的水性溶液,或冻干固体的形式提供。

[0089] 在进一步的实施方案中,本发明的试剂可以包括用于产生双链 cDNA 的一种或多种下列成分:逆转录酶,DNA 聚合酶,DNA 连接酶,RNA 酶 H,Tris 缓冲液,钾盐,镁盐,铵盐,还原剂,脱氧核苷三磷酸 (dNTP), [β]-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 ([β]-NAD⁺), 和核糖核酸酶抑制剂。例如,试剂可以包括经优化用于第一链 cDNA 合成的成分,例如具有减少的 RNA 酶 H 活性和增加的热稳定性的逆转录酶(例如 Superscript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen), 和终浓度范围在 50 5000 μM 的 dNTP, 或者更优选地,终浓度范围在 1000

2000 μ M 的 dNTP。

[0090] 另一方面,本发明提供了选择性扩增获自哺乳动物受试者的样品中的 RNA 模板分子群中的靶核酸分子群的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包括 (a) 含第一寡核苷酸引物群的第一试剂,其中确定序列部分例如引物结合位点 (PBS#1) 位于由 6 个核苷酸组成的杂交部分的 5' 端,所述杂交部分选自具有 6 个核苷酸的长度的、在确定的条件下不与 RNA 模板分子群中的非靶核酸分子群杂交的所有可能的寡核苷酸,其中所述非靶核酸分子群基本上由 RNA 模板分子群中的最高丰度的核酸分子组成, (b) 含第二寡核苷酸引物群的第二试剂,其中确定序列部分例如引物结合位点 (PBS#2) 位于由 6 个核苷酸组成的杂交部分的 5' 端,其中所述杂交部分选自第一寡核苷酸引物群的杂交部分的核苷酸序列的反向互补序列,和 (c) 与第一寡核苷酸群的第一确定序列部分结合的第一 PCR 引物以及与第二寡核苷酸群的第二确定序列部分结合的第二 PCR 引物。

[0091] 在一些实施方案中,第一试剂包括具有 SEQ ID NO :1-749 所示序列的寡核苷酸群的成员。因此,在一些实施方案中,本发明提供了包含含有第一寡核苷酸群的第一试剂的试剂盒,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO :1-749 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的第一引物结合位点 (PBS#1) (SEQ ID NO :1499) 组成。在一些实施方案中,本发明提供了包含含有第二寡核苷酸群的第二试剂的试剂盒,其中每一寡核苷酸由位于具有如 SEQ ID NO :750-1498 所示序列的寡核苷酸群的不同成员的 5' 端的第二引物结合位点 (PBS#2) (SEQ ID NO :1500) 组成。在一些实施方案中,本发明提供了包含第一 PCR 引物和第二 PCR 引物的试剂盒,其中所述第一 PCR 引物包含与第一寡核苷酸群的确定序列部分杂交的至少 10 个连续核苷酸,且任选地包括不与第一寡核苷酸群杂交的另外的序列尾部,所述第二 PCR 引物包含与第二寡核苷酸群的确定序列部分杂交的至少 10 个连续核苷酸,且任选地包括不与第二寡核苷酸群杂交的另外的序列尾部。在一个实施方案中,第一 PCR 引物由 SEQ ID NO :1501 组成,第二 PCR 引物由 SEQ ID NO :1502 组成。该实施方案的试剂盒可用于,从用本发明的 NSR 引物 (SEQ ID NO :1-749) 和反-NSR 引物 (SEQ ID NO :750-1498) 产生的 cDNA 产生扩增的 PCR 产物。

[0092] 根据本文描述的方法,本发明的试剂盒可设计用于检测任何靶核酸群,例如细胞或组织中表达的、除最高丰度表达的 RNA 以外的所有 RNA。示例性寡核苷酸引物的非限制性实例,包括 SEQ ID NO :1-749。引物结合区的非限制性实例示于 SEQ ID NO :1499 和 1500 中。

[0093] 间隔子部分可以包括核苷酸的任意组合,包括与靶 RNA 杂交的核苷酸。

[0094] 在一些实施方案中,试剂盒包括包含具有 6,7,或 8 个核苷酸的杂交部分的寡核苷酸引物的试剂。

[0095] 在一些实施方案中,试剂盒包括包含可用于检测多个哺乳动物 mRNA 靶的寡核苷酸引物群的试剂。

[0096] 在一些实施方案中,试剂盒包括在 40°C -50°C 的温度范围内杂交的寡核苷酸。

[0097] 在另一实施方案中,试剂盒包括不检测 rRNA 或线粒体 rRNA 的寡核苷酸子群。用于本实施方案的试剂盒的示例性寡核苷酸,提供于 SEQ ID NO :1-749 和 SEQ ID NO :750-1498。

[0098] 在一些实施方案中,试剂盒包括含寡核苷酸群的试剂,所述寡核苷酸群包含 SEQ ID NO :1-749 所示的 6 核苷酸序列的至少 10% (例如至少 20%,30%,40%,50%,60%,

70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 或 99%)。

[0099] 在一些实施方案中,试剂盒包括含寡核苷酸群的试剂,所述寡核苷酸群包含 SEQ ID NO:750-1498 所示的 6 核苷酸序列的至少 10% (例如至少 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 或 99%)。

[0100] 在一些实施方案中,试剂盒包含寡核苷酸,其中转录启动子包括 T7 启动子 (SEQ ID NO:1508), SP6 启动子 (SEQ ID NO:1509), 或 T3 启动子 (SEQ ID NO:1510)。

[0101] 在另一实施方案中,试剂盒可以包括寡核苷酸,所述寡核苷酸具有含有核苷酸的任意组合的 1-12 个核苷酸的间隔子部分。

[0102] 在本发明的一些实施方案中,试剂盒可进一步包括用于产生 cDNA 的一种或多种下列组分:逆转录酶, DNA 聚合酶, DNA 连接酶, RNA 酶 H, Tris 缓冲液, 钾盐 (例如氯化钾), 镁盐 (例如氯化镁), 铵盐 (例如硫酸铵), 还原剂 (例如二硫代苏糖醇), 脱氧核苷三磷酸 (dNTP), $[\beta]$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 ($[\beta]$ -NAD⁺), 和核糖核酸酶抑制剂。例如,试剂盒可以包括经优化用于第一链 cDNA 合成的组分,例如具有减少的 RNA 酶 H 活性和增加的热稳定性的逆转录酶 (例如 Superscript[™] III Reverse Transcriptase, Invitrogen), 和 dNTP 储备液以提供终浓度范围在 50 5000 μ M, 或者更优选地, 终浓度范围在 1000 2000 μ M 的 dNTP。

[0103] 在各种实施方案中,试剂盒可以包括检测剂,例如 SYBR 绿色染料或 BEBO 染料,其在 PCR 扩增步骤期间优先或专用地结合双链 DNA。在其他的实施方案中,试剂盒可以包括正向和 / 或反向引物,所述引物含荧光团和淬灭剂以检测 PCR 扩增产物的量。

[0104] 本发明的试剂盒还可提供用于扩增的 cDNA 的体外转录的试剂。例如,在一些实施方案中,试剂盒可以进一步包括一种或多种下列组分:RNA 聚合酶, IPPase (磷酸肌醇 1-磷酸酯酶) 酶, 转录缓冲液, Tris 缓冲液, 钠盐 (例如氯化钠), 镁盐 (例如氯化镁), 亚精胺, 还原剂 (例如二硫代苏糖醇), 核苷三磷酸 (ATP, CTP, GTP, UTP), 和氨基-烯丙基-UTP。

[0105] 在另一实施方案中,试剂盒可以包括使用 Cy3 或 Cy5 染料标记体外转录产物的试剂,其用于将标记的 cDNA 样品与微阵列杂交。

[0106] 在另一实施方案中,试剂盒可以包括用于标记双链 PCR 产物的试剂。例如,试剂盒可以包括用于在 PCR 期间掺入修饰碱基例如氨基-烯丙基 dUTP 的试剂,其随后可与胺反应性 Cy 染料化学偶联。在另一实例中,试剂盒可以包括用于将 Cy 染料与鸟嘌呤残基直接化学连接以标记 PCR 产物的试剂。

[0107] 在另一实施方案中,试剂盒可以包括用于测序双链 PCR 产物的一种或多种下列试剂:Taq DNA 聚合酶, T4 多核苷酸激酶, 核酸外切酶 I (大肠杆菌 (E. coli)), 测序引物, dNTP, 终止 (脱氮) 混合物 (混合物 G, 混合物 A, 混合物 T, 混合物 C), DTT 溶液, 和测序缓冲液。

[0108] 试剂盒任选地包括在选择性扩增 mRNA 靶中使用试剂盒的说明书。试剂盒还可任选地提供对扩增的 cDNA 分子进行体外转录的说明书, 和标记体外转录产物且将体外转录产物与微阵列杂交的说明书。试剂盒还可以提供标记和 / 或测序的说明书。试剂盒还可以提供, 将 PCR 产物克隆入表达载体以产生代表取样时样品的转录组的表达文库的说明书。

[0109] 另一方面, 本发明提供了选择性扩增靶核酸分子群以产生选择性扩增的 cDNA 分子的方法。本发明这方面的方法包括: (a) 提供第一寡核苷酸群, 其中每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的第一 PCR 引物结合位点, (b) 将第一寡核苷酸群与分离自

哺乳动物受试者的包含 RNA 模板的样品退火, (c) 用逆转录酶从 RNA 合成 cDNA, (d) 用 DNA 聚合酶和第二寡核苷酸群合成双链 cDNA, 其中每一寡核苷酸包括杂交部分和位于杂交部分 5' 端的第二 PCR 结合位点, 其中杂交部分为含 SEQ ID NO :750-1498 的寡核苷酸群的成员, 和 (e) 纯化双链 cDNA 分子。在一些实施方案中, 该方法进一步包括 PCR 扩增双链 cDNA 分子。图 1C 显示了本发明这方面的方法的代表性实施方案。如图 1C 所示, 在该方法的一个实施方案中, 第一引物混合物包括位于杂交部分 5' 端的第一 PCR 引物结合位点 (PBS#1), 其中杂交部分包括随机 9 聚体群。

[0110] 在另一实施方案中, 本发明提供了选择性扩增靶核酸分子群以产生选择性扩增的 aDNA 分子的方法。图 1D 显示了本发明这方面的方法的代表性实施方案。如图 1D 所示, 第一引物混合物包括位于杂交部分 5' 端的第一 PCR 引物结合位点 (PBS#1), 其中杂交部分为含 SEQ ID NO :1-749 的寡核苷酸群的成员。该方法进一步包括用热稳定 DNA 聚合酶、与第一 PCR 引物结合位点结合的第一 PCR 引物、以及与第二 PCR 引物结合位点结合的第二 PCR 引物, PCR 扩增双链 cDNA, 以产生扩增的双链 DNA (aDNA)。如图 1D 所示, 在一些实施方案中, 该方法进一步包括对至少一部分 aDNA 进行测序的步骤。

[0111] 本文描述的方法和试剂可用于实施本发明的这方面。根据本发明的这方面, 任何 DNA- 依赖性 DNA 聚合酶都可用于从第一链 cDNA 合成第二链 DNA 分子。例如, 可以使用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段合成第二链 DNA 分子。可以使用包含由 6-9 个核苷酸组成的杂交部分且进一步包含位于杂交部分 5' 端的确定序列部分的第二寡核苷酸群, 来引发第二链 DNA 分子的合成。

[0112] 确定序列部分可以包括任何合适的序列, 只要该序列与第一寡核苷酸群所包含的确定序列不相同。取决于选择的引物序列, 这些确定序列部分例如可用于选择性指导第二 DNA 分子的 DNA 依赖性 RNA 合成, 和 / 或通过 DNA 依赖性 DNA 合成来扩增双链 cDNA 模板。

[0113] 双链 DNA 分子的纯化。第二 DNA 分子的合成产生了双链 DNA 分子群, 其中第一 DNA 分子与第二 DNA 分子杂交, 如图 1D 所示。通常, 纯化双链 DNA 分子, 以除去基本上所有短于 50 个碱基对的核酸分子, 包括所有或基本上所有 (例如通常超过 99%) 的第二引物。优选地, 纯化方法选择性地纯化基本上为双链的 DNA 分子, 而除去基本上所有未配对的单链核酸分子, 例如单链引物。可以使用任何本领域已知的方法, 例如通过经由大小分级分离柱的洗脱来实现纯化。例如, 然后可沉淀纯化的第二 DNA 分子, 并将其溶解于合适的缓冲液, 以用于本发明这方面的方法的下一步。

[0114] 双链 DNA 分子的扩增。在本发明这方面的方法的实施中, 使用聚合酶链式反应将双链 DNA 分子用作酶扩增的模板。任何合适的引物可用于引发聚合酶链式反应。通常, 使用两种引物 -- 一种引物与第一引物序列的确定部分 (或其互补序列) 杂交, 和另一种引物与第二引物序列的确定部分 (或其互补序列) 杂交。

[0115] PCR 扩增条件。通常, 在聚合酶链式反应期间, 扩增循环的数目越大, 所获得的扩增的 DNA 的数量就越多。另一方面, 过多的扩增循环将导致双链 DNA 的随机偏倚扩增。因此, 在一些实施方案中, 期望的扩增循环数为 5-40 个扩增循环, 例如 5-35 个, 例如 10-30 个扩增循环。

[0116] 关于温度条件, 通常, 循环包括解链温度例如 95°C, 退火温度 (其在约 40°C -70°C 之间), 延伸温度 (通常约 72°C)。关于退火温度, 在一些实施方案中, 退火温度为约

55℃ -65℃,更优选约 60℃。

[0117] 在一个实施方案中,用于本发明该方面的扩增条件包括,10 个循环的 (95℃,30 秒 ;60℃,30 秒 ;72℃,60 秒),接着 20 个循环的 (95℃,30 秒 ;60℃,30 秒,72℃,60 秒 (每循环的延伸步骤 +10 秒))。

[0118] 关于用于本发明这方面的方法的 PCR 反应组分,dNTP 通常在反应中以 50 μ M-2000 μ M 的 dNTP,更优选地 800-1000 μ M 存在。MgCl₂ 通常在反应中以 0.25mM-10mM,更优选地约 4mM 存在。正向和反向 PCR 引物通常在反应中以约 50nM-2000nM 存在,更优选地以约 1000nM 的浓度存在。

[0119] DNA 标记。任选地,扩增的 DNA 分子可用染料分子进行标记,以易于在杂交试验中用作探针,例如用于筛选 DNA 芯片的探针。可以使用任何合适的染料分子,例如荧光团和化学发光剂。实施例 5 提供了将染料分子与扩增的 DNA 分子连接的示例性方法。

[0120] 例如,本发明这方面的方法可用于分析含总 RNA 的生物学样品的转录组特征谱。在一些实施方案中,根据本发明这方面的方法产生的、通过用 NSR 引发第一链 cDNA 并用反-NSR 引发第二链合成从 cDNA 产生的扩增的 aDNA,可被标记以用于基因表达试验中,从而提供了基于杂交的试剂,其与从 NSR- 引发的 cDNA 产生的扩增的 RNA 相比,通常产生较低水平的背景。

[0121] 在本发明这方面的一些实施方案中,第一和 / 或第二引物结合区的确定序列部分进一步包括一个或多个限制性酶切位点,从而产生具有一个或多个位于扩增部分侧翼的限制性酶切位点的扩增的双链 DNA 产物群。这些扩增产物可直接用于序列分析,或者可通过用限制性酶消化而释放并亚克隆入任何期望的载体,例如表达载体以用于进一步的分析。PCR 产物的测序分析可用任何 DNA 测序方法进行,例如 Sanger 双脱氧链终止法,染料终止子测序法,或美国专利 7,232,656 中记载的高通量测序方法 (Solexa),其通过引用并入本文。

[0122] 另一方面,本发明提供了选择性扩增的核酸分子群,其包括从哺乳动物受试者分离的样品中的 RNA 模板分子群中的靶核酸分子群的代表,其中每一扩增的核酸分子包括:位于扩增的核酸序列群的成员的侧翼的 5' 确定序列部分,以及 3' 确定序列,其中选择性扩增的序列群包括与哺乳动物受试者表达的靶 RNA 分子相对应的扩增的核酸序列,并且就特定的哺乳动物物种而言,其特征具有下列性质:(a) 具有超过 75% 的多聚腺苷酸化和非多聚腺苷酸化的转录本,和具有少于 10% 的核糖体 RNA (例如 rRNA (18S 或 28S) 和 mt-RNA)。

[0123] 本发明这方面的选择性扩增的核酸分子群,可用本文记载的本发明的方法产生。可将选择性扩增的核酸分子群克隆入表达载体以构建文库。可选地,可将选择性扩增的核酸分子群固定于基质上以制备扩增产物的微阵列。微阵列可以包括固定于固体或半固体基质上的至少一个扩增产物,所述基质由选自下列的材料制成:纸,玻璃,陶瓷,塑料,聚苯乙烯,聚丙烯,尼龙,聚丙烯酰胺,硝化纤维,硅,金属,和光学纤维。扩增产物可以固定于二维构型或三维构型的固体或半固体基质上,所述二维构型或三维构型包括针形,棒形,纤维形,带形,线形,珠形,颗粒形,微滴定孔形,毛细管形和圆柱体形。

[0124] 下列实施例仅用于举例说明目前预期实施本发明的最佳方式,而不应解释为对本发明的限制。

[0125] 实施例 1

[0126] 本实施例描述了 749 个 6-聚体寡核苷酸 (SEQ ID NO :1-749) 的第一群 (不那么随机的, "NSR") 的选择, 所述寡核苷酸与哺乳动物细胞表达的所有或基本上所有的 RNA 分子杂交, 但不与细胞核核糖体 RNA (18S 和 28S rRNA) 或线粒体核糖体 RNA (12S 和 16S mt-rRNA) 杂交。还产生了与 NSR 寡核苷酸反向互补的第二反-NSR 寡核苷酸群 (SEQ ID NO : 750-1498)。NSR 寡核苷酸群可用于引发第一链 cDNA 合成, 反-NSR 寡核苷酸群可用于引发第二链 cDNA 合成。

[0127] 基本原理:

[0128] 随机 6-聚体 (N6) 可在 RefSeq 数据库的转录本序列 (称为“核苷酸序列”) 的每一核苷酸位置上退火, 如图 1A 所示。在除去其反向互补序列与细胞核核糖体 RNA (18S 和 28S rRNA) 和线粒体核糖体 RNA (12S 和 16S mt-rRNA) 完美匹配的 6-聚体之后, 剩余的 NSR 寡核苷酸 (SEQ ID NO :1-749) 与 RefSeq 数据库的核酸序列 (称为“核苷酸序列”) 上的每 4-5 个核苷酸完美匹配, 如图 1B 所示。

[0129] 方法:

[0130] 对所有可能的 4,096 种 6-聚体寡核苷酸进行计算, 其中每一核苷酸为 A, T (或 U), C, 或 G。将每一 6-聚体寡核苷酸的反向互补序列, 与 18S 和 28S rRNA 的核苷酸序列及 12S 和 16S 线粒体 rRNA 的核苷酸序列进行比较, 如下文表 1 所示。

[0131] 表 1:核糖体 RNA

[0132]	基因符号	2007 年 9 月 5 日获取的 NCBI 参照序列转录本标识符	核苷酸位置
	12S	Genbank Ref # BJ01415.2	nt648-1601
	16S	Genbank Ref # BJ01415.2	nt1671-3229
	18S	Genbank Ref # BU13369.1	nt3657-5527
	28S	Genbank Ref # BU13369.1	nt7935-12969

[0133] 与表 1 所示的任何人细胞核 rRNA 转录本序列具有完美匹配的反向互补 6-聚体寡核苷酸被去除 (总计 2,781 个序列)。749 个 6-聚体 (SEQ ID NO :1-749) 的反向互补序列, 不与 rRNA 转录本的任何部分完美匹配。与线粒体 rRNA 匹配的也被去除 (566 个), 由此剩余 749 个寡核苷酸 6-聚体 (4096 (所有 6 聚体) - 2782 (与真核 -rRNA 匹配的) - 566 (与线粒体 -rRNA 匹配的)) = 总计 749 个。

[0134] 与 rRNA 基因和 mt-rRNA 基因的任何部分不具有完美匹配的 749 个 6-聚体寡核苷酸 (SEQ ID NO :1-749), 被称为不那么随机的 ("Not-So-Random", "NSR") 引物。因此, 749 个 6-聚体的群 (SEQ ID NO :1-749) 可以扩增除 18S, 28S, 和线粒体 rRNA (12S 和 16S) 以外的所有转录本。

[0135] 如实施例 2 所描述的, NSR 寡核苷酸群 (SEQ ID NO :1-749) 可用于引发第一链 cDNA 的合成, 然后可用随机引物或反-NSR 引物进行第二链的合成。

[0136] 如实施例 2 所进一步描述的, 反-NSR 寡核苷酸群 (SEQ ID NO :750-1498) 可用于引发第二链 cDNA 的合成。如图 1C 所示, 可用随机引物进行第一链 cDNA 的合成, 接着用反-NSR 引物进行第二链 cDNA 的合成。可选地, 如图 1D 所示, 可用 NSR 引物进行第一链 cDNA 的合成, 接着用反-NSR 引物进行第二链 cDNA 的合成。

[0137] 应用于其他类型的 RNA 样品。对于除人类以外的哺乳动物细胞 (例如大鼠, 小鼠)

的基因特征谱分析而言,可以通过从各哺乳动物物种,除去相应于 18S 和 28S 的基因的细胞核核糖体 rRNA,以及除去相应于 12S 和 16S 的基因的线粒体核糖体 rRNA,来进行类似的方法。

[0138] 植物细胞的基因特征谱分析也可以通过构建去除了叶绿体核糖体 RNA 的不那么随机的 (Not-So-Random, NSR) 引物群来进行。

[0139] 实施例 2

[0140] 本实施例显示,用 NSR 引物和反 -NSR 引物对总 RNA 的扩增,选择性地减少不期望的非靶核糖体序列的引发。

[0141] 方法:

[0142] 为构建新引物文库,如下单独地合成引物:

[0143] 如实施例 1 所述,产生第一 NSR-6 聚体引物群 (SEQ ID NO:1-749) 和第二反 -NSR-6 聚体引物群 (SEQ ID NO:750-1498)。

[0144] 用于第一链 cDNA 合成的 NSR。在一些实施方案中,用于第一链 cDNA 合成的 NSR 引物的第一引物组 (SEQ ID NO:1-749) 进一步包括下列 5' 引物结合序列:

[0145] 共价连接于 5' 端的 PBS#1:5' TCCGATCTCT 3' (SEQ ID NO:1499) (另称为"尾"),

[0146] 从而产生具有下列构型的寡核苷酸群:

[0147] 5' PBS#1 (SEQ ID NO:1499)+NSR-6 聚体 (SEQ ID NO:1-749) 3'。

[0148] 在另一实施方案中,产生寡核苷酸群,其中每一 NSR-6 聚体任选地包括至少一个间隔子核苷酸 (N) (其中每一个 N = A, G, C, 或 T), 其中 (N) 位于 5' PBS#1 与 NSR-6 聚体之间。间隔子区可以包括 1 个核苷酸直至 10 个或更多个核苷酸 (N = 1-10), 从而产生具有下列构型的寡核苷酸群:

[0149] 5' PBS#1 (SEQ ID NO:1499)+(N₁₋₁₀)+NSR-6 聚体 (SEQ ID NO:1-749) 3'。

[0150] 用于第二链 cDNA 合成的反 -NSR。在一些实施方案中,用于第二链 cDNA 合成的反 -NSR-6 聚体引物群 (SEQ ID NO:750-1498) 进一步包括下列 5' 引物结合序列:

[0151] 共价连接至反 -NSR-6 聚体引物的 5' 端的 PBS#2:5' TCCGATCTGA 3' (SEQ ID NO:1500) (另称为"尾"),

[0152] 从而产生下列构型:

[0153] 5' PBS#2 (SEQ ID NO:1500)+反 -NSR-6 聚体 (SEQ ID NO:750-1498) 3'。

[0154] 在另一实施方案中,产生寡核苷酸群,其中每一反 -NSR-6 聚体任选地包括至少一个间隔子核苷酸 (N) (其中每一个 N = A, G, C, 或 T), 其中 (N) 位于 5' PBS#2 与反 -NSR-6 聚体之间。

[0155] 间隔子区可以包括 1 个核苷酸直至 10 个或更多个核苷酸 (N = 1-10), 从而产生具有下列构型的寡核苷酸群:

[0156] 5' PBS#2 (SEQ ID NO:1500)+(N₁₋₁₀)+反 -NSR-6 聚体 (SEQ ID NO:750-1498) 3'。

[0157] 正向和反向引物 (用于 PCR 扩增)。合成下列正向和反向引物以扩增双链 cDNA, 所述 cDNA 用具有 PBS#1 (SEQ ID NO:1499) 尾的 NSR-6 聚体和具有 PBS#2 (SEQ ID NO:1500) 尾的反 -NSR-6 聚体产生。

[0158] NSR_F_SEQ 引物 1:5' N₍₁₀₎TCCGATCTCT-3' (SEQ ID NO:1501), 其中每一个 N =

G, A, C, 或 T。

[0159] NSR_R_SEQ 引物 1:5' N₍₁₀₎TCCGATCTGA-3' (SEQ ID NO:1502), 其中每一个 N = G, A, C, 或 T。

[0160] 在如上所述的实施方案中, 正向引物 (SEQ ID NO:1501) 和反向引物 (SEQ ID NO:1502) 的最 5' 末端区域各自包括 10 聚体 (N) 核苷酸序列。在另一实施方案中, 正向引物 (SEQ ID NO:1501) 和反向引物 (SEQ ID NO:1502) 的最 5' 末端区域各自包括多于 10 个的 (N) 核苷酸, 例如至少 20 个 (N) 核苷酸, 至少 30 个 (N) 核苷酸, 或至少 40 个 (N) 核苷酸, 以利于扩增的 PCR 产物的 DNA 测序。

[0161] 对照引物。下列引物用于扩增对照反应 (其用随机引物库扩增):

[0162] 将下列引物结合位点添加至随机引物:

[0163] Y4F:5' CCACTCCATTTGTTCGTGTG 3' (SEQ ID NO:1506)

[0164] Y4R:5' CCGAACTACCCACTTGCATT 3' (SEQ ID NO:1507)

[0165] 与随机引物 (N = 7 或 N = 9) 或 NSR 引物一起的下列引物结合位点:

[0166] Y4R-N7 (第一链 cDNA):

[0167] 5' CCGAACTACCCACTTGCATTNNNNNNN 3' (SEQ ID NO:1503) [其中 N = A, G, C, 或 T]

[0168] Y4R-NSR (第一链 cDNA):

[0169] 共价连接至 NSR 引物的 5' CCGAACTACCCACTTGCATTN 3' (SEQ ID NO:1504), 所述 NSR 引物包括 6-聚体 NSR 寡核苷酸的核心组, 与球蛋白 (α 或 β) 不完美匹配, 与 rRNA (18S, 28S) 不完美匹配。

[0170] Y4F-N9 (第二链 cDNA 合成):

[0171] 5' CCACTCCATTTGTTCGTGTGNNNNNNNNN 3' (SEQ ID NO:1505) [其中 N = A, G, C, 或 T]

[0172] Y4F 5' CCACTCCATTTGTTCGTGTG 3' (SEQ ID NO:1506)

[0173] Y4R 5' CCGAACTACCCACTTGCATT 3' (SEQ ID NO:1507)

[0174] 其他任选的引物库构型。将可用作引物结合位点的其他引物共价连接至 NSR 库, 以将转录启动子添加至扩增的 cDNA 产物:

[0175] T7:5' AATTAATACGACTCACTATAGGGAGA 3' (SEQ ID NO:1508)

[0176] SP6:5' ATTTAGGTGACACTATAGAAGNG 3' (SEQ ID NO:1509)

[0177] T3:5' AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA 3' (SEQ ID NO:1510)

[0178] 用于扩增 RNA 的引物库构型。如上所述分别合成引物, 并将其以下列构型进行混合, 然后将引物库用于从总 RNA 产生扩增的核酸的文库, 如下所述的。

[0179] 表 2: 引物库构型

[0180]

参照 ID	库组分(包括所有表达的 RNA, 除列出的那些以外)	库中个体序列的数目	库的描述	SEQ ID NO:	5' 引物结合序列 (共价连接的)
saNSR#1 库	NSR-6 聚体 -(R, M, G)	510	不与 rRNA (18S, 28S), mt-rRNA (12S, 16S) 或球蛋白 (α 或 β) 完美匹配的 6-聚体 NSR 寡核苷酸的核心组	SEQ ID NO: 1-510, 具有位于 PBS#1 和 NSR-6 聚体之间的间隔子 (N=A, G, C, 或 T)	PBS#1 (SEQ ID NO: 1499)
saNSR#2 库	NSR-6 聚体 -(G, R)	403	与 mt-rRNA 完美匹配, 但不与球蛋白或 rRNA 完美匹配的 6-聚体 NSR 寡核苷酸的核心组	对照组, (序列未提供)	SEQ ID NO: 1499
saNSR#3 库	NSR-6 聚体 -(M, R)	239	与球蛋白完美匹配, 但不与 mt-rRNA 或 rRNA 完美匹配的 6-聚体 NSR 寡核苷酸的核心组	SEQ ID NO: 511-749, 具有位于 PBS#1 和 NSR-6 聚体之间的间隔子 (N=A, G, C, 或 T)	PBS#1 (SEQ ID NO: 1499)
saNSR#4 库	NSR-6 聚体 -(R)	163	与 mt-rRNA 和球蛋白完美匹配, 但不与 rRNA 完美匹配的 6-聚体 NSR 寡核苷酸的核心组	对照组, (序列未显示)	SEQ ID NO: 1499
sa-反 NSR#5 库	反-NSR-6 聚体 -(R, M, G)	510	不与 rRNA (18S, 28S), mt-rRNA (12S, 16S) 或球蛋白 (α 或 β) 完美匹配的 6-聚体-NSR 寡核苷酸的核心组	SEQ ID NO: 750-1259, 具有位于 PBS#2 和反-NSR-6 聚体之间的间隔子 (N=A, G, C, 或 T)	PBS#2 (SEQ ID NO: 1500)
sa-反 NSR#6 库	反-NSR-6 聚体 -(G, R)	403	与 mt-rRNA 完美匹配, 但不与球蛋白或 rRNA 完美匹配的 6-聚体反-NSR 寡核苷酸的核心组	对照组, (序列未显示)	SEQ ID NO: 1500
sa-反 NSR#7 库	反-NSR-6 聚体	239	与球蛋白完美匹配, 但不与	SEQ ID NO: 1260-1499,	PBS#2 (SEQ ID

[0181]

库	-(M, R)		mt-rRNA 或 rRNA 完美匹配的 6-聚体反-NSR 寡核苷酸的核心组	具有位于 PBS#2 和反-NSR-6 聚体之间的间隔子 (N=A, G, C, 或 T)	NO: 1500)
sa-反 NSR#8 库	反-NSR-6 聚体 -(R)	163	与 mt-rRNA 和球蛋白完美匹配, 但不与 rRNA 完美匹配的 6-聚体反-NSR 寡核苷酸的核心组	对照组, (序列未显示)	SEQ ID NO: 1500

[0182] PM = 在引物最 3' - 末端 6nt 上完美匹配

[0183] R = rRNA (18S 或 28S)

[0184] M = mt-rRNA (12S 或 16S)

[0185] G = 球蛋白 (HBA1, HBA2, HBB, HBD, HBG1, HBG2)

[0186] 表 3: 用于 RNA 扩增试验的引物组

[0187]

参照 ID	过程	量 (μL)	描述	SEQ ID NO:
saNSR#1 库	第一链 cDNA 合成	总计 510 μL	仅 510 μL 的 saNSR#1 库	SEQ ID NO: 1-510, 具有位于 PBS#1 和 NSR-6 聚体之间的间隔子 (N=A, G, C, 或 T)
saNSR#1 库 + saNSR#2 库	第一链 cDNA 合成	总计 913 μL	510 μL saNSR#1 库与 403 μL saNSR#2 库相组合	对照组
saNSR#1 库 + saNSR#3 库	第一链 cDNA 合成	总计 749 μL	510 μL saNSR#1 库与 239 μL NSR#3 库相组合	SEQ ID NO: 1-749, 具有位于 PBS#1 和 NSR-6 聚体之间的间隔子 (N=A, G, C, 或 T)
saNSR#1 库 + saNSR#4 库	第一链 cDNA 合成	总计 673 μL	510 μL saNSR#1 库与 163 μL saNSR#4 库相组合	对照组
sa-反-NSR#5 库	第二链 cDNA 合成	总计 510 μL	仅 510 μL 的 sa-反-NSR#5 库	SEQ ID NO: 750-1259, 具有位于 PBS#2 和反-NSR-6 聚体之间的间隔子 (N=A, G, C, 或 T)
sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#6 库	第二链 cDNA 合成	总计 913 μL	510 μL sa-反-NSR#5 库与 403 μL sa-反-NSR#6 库相组合	对照组
sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#7 库	第二链 cDNA 合成	总计 749 μL	510 μL sa-反-NSR#5 库与 239 μL sa-反-NSR#7 库相组合	SEQ ID NO: 750-1499, 具有位于 PBS#2 和反-NSR-6 聚体之间的间隔子 (N=A, G, C, 或 T)
sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#8 库	第二链 cDNA 合成	总计 673 μL	510 μL sa-反-NSR#5 库与 163 μL sa-反-NSR#8 库相组合	对照组

[0188] cDNA 合成与 PCR 扩增。该方案涉及如下的三步扩增法：(1) 通过逆转录反应从 RNA 产生第一链 cDNA, 所述逆转录反应用含第一引物结合位点 (PBS#1) 的 NSR 引物引发, 以产生 NSR 引发的第一链 cDNA; (2) 用含第二引物结合位点 (PBS#2) 的反-NSR 引物, 引发第二链 cDNA 的合成; 和 (3) 用与第一和第二引物结合位点相结合的正向和反向引物, PCR 扩增合成的 cDNA, 以产生扩增的 DNA (adNA)。

[0189] 表 4: 用于第一和第二链合成的引物

[0190]

反应 ID	第一链引物库 (+逆转录酶) 100 μ M	第二链引物库 (+Klenow)	RNA 模板 (1 μ L 的 1 μ g/ μ L 总 RNA)	方法
1	saNSR#1 库	sa-反-NSR#5 库	Jurkat-1	RT-PCR
2	saNSR#1 库 + saNSR#2 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#6 库	Jurkat-1	RT-PCR
3	saNSR#1 库 + saNSR#3 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#7 库	Jurkat-1	RT-PCR
4	saNSR#1 库 + saNSR#4 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#8 库	Jurkat-1	RT-PCR
5	Y4R-NSR	Y4F-N9	Jurkat-1	RT-PCR
6	Y4R-NSR	Y4F-N9	Jurkat-1	RT-PCR
7	Y4-N7	Y4F-N9	Jurkat-1	RT-PCR
8	N8	无	Jurkat-1	RT
9	saNSR#1 库	sa-反-NSR#5 库	Jurkat-2	RT-PCR
10	saNSR#1 库 + saNSR#2 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#6 库	Jurkat-2	RT-PCR
11	saNSR#1 库 + saNSR#3 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#7 库	Jurkat-2	RT-PCR
12	saNSR#1 库 + saNSR#4 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#8 库	Jurkat-2	RT-PCR
13	Y4R-NSR	Y4F-N9	Jurkat-2	RT-PCR
14	Y4R-NSR	Y4F-N9	Jurkat-2	RT-PCR
15	Y4-N7	Y4F-N9	Jurkat-2	RT-PCR
16	N8	无	Jurkat-2	RT
17	saNSR#1 库	sa-反-NSR#5 库	K562	RT-PCR
18	saNSR#1 库 + saNSR#2 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#6 库	K562	RT-PCR
19	saNSR#1 库 + saNSR#3 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#7 库	K562	RT-PCR
20	saNSR#1 库 + saNSR#4 库	sa-反-NSR#5 库 + sa-反-NSR#8 库	K562	RT-PCR
21	Y4R-NSR	Y4F-N9	K562	RT-PCR
22	Y4R-NSR	Y4F-N9	K562	RT-PCR
23	Y4-N7	Y4F-N9	K562	RT-PCR
24	N8	无	K562	RT

[0191] 反应条件：

[0192] 细胞系 Jurkat (T 淋巴细胞, ATCC No. TIB-152) 和 K562 (慢性髓性白血病, ATCC No. CCL-243) 的总 RNA 获自 Ambion, Inc. (Austin, Texas)。

[0193] 第一链逆转录：

[0194] 如下进行第一链逆转录：

[0195] 组合：

[0196] -1 μ l 的 1 μ g/ μ l Jurkat 总 RNA 模板 (获自 Ambion, Inc. (Austin, Texas))

[0197] -2 μ l 的 100 μ M 储备 NSR 引物库 (如表 2 所述)

[0198] -7 μ l H₂O 至终体积 10 μ l。

[0199] 在 70°C 混合并温育 5 分钟, 在冰上迅速冷却。

- [0200] 加入含有下列成分的 10 μ l RT 混合物（在冰上制备）：
- [0201] -4 μ l 5X 第一链缓冲液（250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂）
- [0202] -1.6 μ l 25mM dNTP（高）或 1.0 μ l 10mM dNTP（低）
- [0203] -1 μ l H₂O
- [0204] -1 μ l 0.1M DTT
- [0205] -1 μ l RNase OUT (Invitrogen)
- [0206] -1 μ l MMLV 逆转录酶（200 单位 / μ l）(Superscript III™ (SSIII), Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)
- [0207] 将样品混合, 在 23℃ 温育 10 分钟, 然后转移至 40℃ 预热的热循环仪（以提供“热启动”）, 接着将样品在 40℃ 温育 30 分钟, 在 70℃ 温育 15 分钟, 并冷却至 4℃。
- [0208] 然后加入 1 μ l RNA 酶 H（1-4 单位 / μ l）, 之后将样品在 37℃ 温育 20 分钟, 然后加热至 95℃ 5 分钟, 之后在 4℃ 迅速冷却。
- [0209] 第二链合成：
- [0210] 如下制备第二链合成的混合物：
- [0211] -10 μ l 10X Klenow 缓冲液
- [0212] -4 μ l 反 -NSR 引物（100 μ M）
- [0213] -5.0 μ l 10mM dNTP
- [0214] -56.7 μ l H₂O
- [0215] -0.33 μ l Klenow 酶（5U / μ l）
- [0216] 将 80 μ l 的第二链合成混合物加入至 20 μ l 的第一链模板反应混合物中, 在 37℃ 混合和温育 30 分钟, 之后在 4℃ 迅速冷却。
- [0217] cDNA 扩增：
- [0218] 利用获自 Ambion 的 Spin Cartridges (Message Amp™ II aRNA Amplification Kit, Ambion Cat #AM1751) 和试剂盒中提供的缓冲液, 按照厂商说明书对所得到的双链 cDNA 进行纯化。从柱中洗脱 30 μ l 的总体积, 其中 20 μ l 用于后续 PCR。
- [0219] PCR 扩增：
- [0220] 在 1 μ l 纯化的 cDNA 模板（以 1 : 5 稀释）中加入下列混合物：
- [0221] -10 μ l 5X Roche Expand Plus PCR 缓冲液
- [0222] -2.5 μ l 10mM dNTP
- [0223] -2.5 μ l 正向 PCR 引物（10 μ M 储备液）(SEQ ID NO :1501)
- [0224] -2.5 μ l 反向 PCR 引物（10 μ M 储备液）(SEQ ID NO :1502)
- [0225] -0.5 μ l Taq DNA 聚合酶
- [0226] -27 μ l H₂O
- [0227] -4 μ l 25mM MgCl₂
- [0228] PCR 扩增条件：
- [0229] PCR 程序 #1：
- [0230] 94℃ 2 分钟
- [0231] 94℃ 10 秒
- [0232] 8 个循环的：

- [0233] -60℃ 10 秒
- [0234] -72℃ 60 秒
- [0235] -72℃ 60 秒
- [0236] -94℃ 15 秒
- [0237] 17 个循环的：
- [0238] -60℃ 30 秒
- [0239] -72℃ 60 秒 +10 秒 / 循环
- [0240] 72℃ 5 分钟以延伸完全，并在 4℃ 冷却。
- [0241] PCR 程序 #2：
- [0242] 94℃ 2 分钟
- [0243] 94℃ 10 秒
- [0244] 2 个循环的：
- [0245] -40℃ 10 秒
- [0246] -72℃ 60 秒
- [0247] -72℃ 60 秒
- [0248] -94℃ 10 秒
- [0249] 8 个循环的：
- [0250] -60℃ 30 秒
- [0251] -72℃ 60 秒
- [0252] -72℃ 60 秒
- [0253] -94℃ 15 秒
- [0254] 15 个循环的：
- [0255] -60℃ 30 秒
- [0256] -72℃ 60 秒 +10 秒 / 循环
- [0257] 72℃ 5 分钟以延伸完全，并在 4℃ 冷却。
- [0258] cDNA 合成的结果：

[0259] 根据下列方面分析结果：(1) 测量扩增的 DNA " aDNA " 的产量，(2) 在琼脂糖凝胶上评估 aDNA 的等份，以确定 cDNA 种类群体是否等同地表现，和 (3) 通过 qPCR 测量选择的报告基因的扩增水平（如实施例 3 所述）。

[0260] 在 2% 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物。观察利用 PCR 扩增程序 #2 的测试条件和对照反应的 100-1000bp 之间的 DNA 条带，其显示多个 RNA 种类的 cDNA 合成和 PCR 扩增获得成功。用 PCR 扩增程序 #1 成功进行对照反应，如通过 100-1000bp 之间的 DNA 条带的存在所确定的；然而，测试条件均没有扩增出 DNA 条带。相反地，观察到可能由引物二聚体产生的低分子量片段（未纯化的 PCR 产物）。因此，这些结果显示，对于具有短（10nt）扩增尾的 PCR 扩增而言，低温退火（40℃）是重要的。

[0261] 还确定，与低 dNTP 浓度（10mM）的 dNTP 相比，在第一链 cDNA 合成期间高 dNTP 浓度（25mM）增加 cDNA 产物的特异性（数据未显示）。

[0262] 还确定，在 NSR 引物库仅用于第一链 cDNA 合成、之后随机引发第二链合成的情形下，RNA 酶 H 处理减少了来自扩增的 rRNA 的污染的量。然而，在 NSR 引物用于引发第一链合

成、之后用反-NSR引物引发第二链合成的情形下,则未发现RNA酶处理影响得到的cDNA产物的特异性。虽然对于增加特异性不重要,然而将RNA酶加入至用反-NSR引物进行的第二链cDNA合成,以在Klenow反应期间通过使cDNA更易获得(作为模板)来提高反应效率。

[0263] 总之,已发现,在第二链合成期间使用反-NSR引物,可为靶核酸分子的选择性扩增提供数个出乎意料的优点。例如,出乎意料地发现,在使用反-NSR引物的第二链合成期间,rRNA消耗的量,与在逆转录期间用NSR引物观察到的rRNA消耗的量几乎相同。此外,出乎意料的是,在使用Klenow酶的标准反应条件下,获得了第二链合成期间的引发特异性。该结果显示,利用多种聚合酶和核酸模板,短寡核苷酸可用于特异性引发DNA的合成,然而,决定引发特异性的反应条件可能是酶特异性的。

[0264] 实施例 3

[0265] 本实施例显示,用于第一链cDNA合成的749个NSR 6-聚体(SEQ ID NO:1-749)(每一个具有共价连接于5'端的PBS#1(SEQ ID NO:1499+N间隔子)),然后749个反-NSR 6-聚体(SEQ ID NO:750-1498)(每一个具有共价连接于5'端的PBS#2(SEQ ID NO:1500+N间隔子)),引发存在于含总RNA的样品中的转录组的实质级分的扩增。

[0266] 方法:

[0267] 在实施例2描述的PCR扩增之后,每一PCR反应用Qiagen MinElute 旋柱进行纯化。用80%乙醇洗涤柱,用20 μ L洗脱缓冲液洗脱。用NanoDrop 仪通过UV/VIS分光计定量产量。然后将样品稀释并用下列测定通过定量PCR(qPCR)进行表征:

[0268] 使用7900HT PCR 仪(Applied Biosystems,Foster City,CA)在384-孔光学PCR板中,通过定量PCR(qPCR)在10 μ L终反应体积中,对2 μ L cDNA进行一式两份的测量。使用制造商推荐的条件,用表5和表6中所示的探针,使用ABI **TaqMan**[®]测定进行qPCR。

[0269]

表 5: JURKAT 细胞的报告基因测定

靶	ABI 测定探针	正向引物	反向引物	FAM 报告引物
STMN1 stathmin 1/ 癌蛋白 18	Hs01027516_g1	不相关的 (NR)	NR	NR
PPIA 肽基脯氨酰异构酶 A (亲环素 A)	Hs999999904_ml	NR	NR	NR
EIF3S3 真核翻译起始因子 3, 亚基 3 γ, 40 kDa	Hs00186779_ml	NR	NR	NR
NUCB2 核结合素 2	Hs00172851_ml	NR	NR	NR
SRP14 信号识别颗粒 14 kDa (同源 A1u RNA 结合 蛋白)	Hs01923965_ul	NR	NR	NR
TRIM63	Hs00761590	NR	NR	NR
DBN1	Hs00365623	NR	NR	NR
CDCA7	Hs00230589_ml	NR	NR	NR
GAPDH	Hs999999905	NR	NR	NR
肌动蛋白 (ACTB)	Hs999999903	NR	NR	NR
18s rRNA	Hs999999901_s1	NR	NR	NR

[0270]

靶	ABI 测定探针	正向引物	反向引物	FAM 报告引物
R28S_3-ANY	定制的	GGTTCGCCCCGAGAGA (SEQ ID NO:1511)	GGACGCCCGCGAA (SEQ ID NO:1512)	CCGCGACGCTTTCCAA (SEQ ID NO:1513)
28S.4-JUN	定制的	GTAGCCAAATGCCCTCGTCATC (SEQ ID NO:1514)	CAGTGGGAATCTCGTTTCATCC ATT (SEQ ID NO:1515)	ATGCGCGTCACTAATTA (SEQ ID NO:1516)
28S-7-ANY	定制的	CCGAAACGATCTCAACCTATT CTCA (SEQ ID NO:1517)	GCTCCACGCCAGCGA (SEQ ID NO:1518)	CCGGGCTTCTTACCC (SEQ ID NO:1519)
28S-8-ANY	定制的	GCGGGTGGTAAACTCCATCTA AG (SEQ ID NO:1520)	CCCTACGGTACTTGTGACT ATCG (SEQ ID NO:1521)	TCGTGCCGGTATTAG (SEQ ID NO:1522)
18S-1-ANY	定制的	GGTGACCACGGGTGACG (SEQ ID NO:1523)	GGATGTGGTAGCCGTTTCTCA (SEQ ID NO:1524)	TCCCTCTCCGGAATCG (SEQ ID NO:1525)
16S-1-ANY	定制的	ACCAAGCATAATATAGCAAG GACTAACC (SEQ ID NO:1526)	TGGCTCTCCTTGCAAAAGTTAT TTCT (SEQ ID NO:1527)	CCTTCTGCATAATGAATTAA (SEQ ID NO:1528)
12S-1-ANY	定制的	GACAAAGCATCAAGCACGCA (SEQ ID NO:1529)	CTAAAGGTAAATCACTGCTGT TTCCC (SEQ ID NO:1530)	CAATGCAGCTCAAAAACG (SEQ ID NO:1531)
12S-2-ANY	定制的	GTCGAAGGTGGATTTAGCAGT AAAC (SEQ ID NO:1532)	TGTACGCGCTTCAGGC (SEQ ID NO:1533)	CCTGTTCAACTAAGCACICTA (SEQ ID NO:1534)
hs16S-2	定制的	AAGCGTTCAAGCTCAACACC (SEQ ID NO:1535)	GGTCCCAATTGGGTATGAGGA (SEQ ID NO:1536)	
hs16S-3	定制的	GCATAAGCCTGCGTCAGATT (SEQ ID NO:1537)	GGTTGATTGTAGATATTGGGC TGT (SEQ ID NO:1538)	
hsHST1_H2AH	定制的	TACCTGACCGCTGAGATCCT (SEQ ID NO:1539)	AGCTTGTGAGCTCCTCGTC (SEQ ID NO:1540)	
hsNC_7SK	定制的	GACATCTGTCACCCCATIGA (SEQ ID NO:1541)	CTCCTCTATCGGGGATGGTC (SEQ ID NO:1542)	
hsNC_7SL1	定制的	GGAGTTCTGGGCTGTAGTGC (SEQ ID NO:1543)	GTTTGTACCTGCTCCGTTTC (SEQ ID NO:1544)	

[0271]

靶	ABI 测定探针	正向引物	反向引物	FAM 报告引物
hsNC_BC200	定制的	GCTAAGAGCGGGAGGATAG (SEQ ID NO:1545)	GGTTGTTGCTTTGAGGGAAG (SEQ ID NO:1546)	
hsNC_HY1	定制的	GCTGTCGCCGAAGGTAGTGAG (SEQ ID NO:1547)	ATGCCAGGAGAGTGGAACCT (SEQ ID NO:1548)	
hsNC_HY3	定制的	TCCGAGTGCAGTGGTGTTTA (SEQ ID NO:1549)	GTGGGAGTGGAGAAAGGAACA (SEQ ID NO:1550)	
hsNC_HY4	定制的	GGTCCGATGGTAGTGGGTTA (SEQ ID NO:1551)	AAAAAGCCAGTCAAAATTTAG CA (SEQ ID NO:1552)	
hsNC_U4B1	定制的	TGGCAGTATCGTAGCCCAATG (SEQ ID NO:1553)	CTGTCAAAAATTTGCCCAATGC (SEQ ID NO:1554)	
hsNC_U6A	定制的	CGCTTCGGCAGCACATATAC (SEQ ID NO:1555)	AAAAATATGGAACGCTTCACG A (SEQ ID NO:1556)	

[0272] 表 6 :报告基因探针

测定名称	报告子		1/df
	FAM	SYBR	
NUCB2	+		10
18s (Hs99999901_s1)	+		1000
18S-1	+		1000
18S-4	+		1000
28S-3	+		1000
28S-4	+		1000
28S-7	+		1000
28S-8	+		1000
12S-1	+		1000
12S-2	+		1000
16S-1	+		1000
hs16S-2		+	1000
hs16S-3		+	1000
hsHST1_H2AHfwd		+	1000
hsNC_7SKfwd		+	1000
hsNC_7SL1fwd		+	1000
NUCB2	+		10
PPIA	+		10
SRP14	+		10
STMN1	+		10
TRIM63	+		10
ACTB	+		10
CDCA7	+		10
DBN1	+		10
EIF3S3	+		10
GAPDH	+		10
hsNC_BC200fwd		+	10
hsNC_HY1fwd		+	10
hsNC_HY3fwd		+	1000
hsNC_HY4fwd		+	1000
hsNC_U4B1fwd		+	10
hsNC_U6Afwd		+	10

[0274] 在 qPCR 后,将结果表格输入到 Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA),根据原始数据回归样品的定量分析 (丰度 = $10^{[(Ct-5)/-3.4]}$)。

[0275] 结果:

[0276] 图 3A 为对数标尺上的柱形图,其显示,与用随机引物 (N8 = 100%) 产生的未扩增的 cDNA 相比较,用表 4 所示的各种 NSR 库产生的第一链 cDNA 合成的 18S, 28S, 12S 和 16S 的相对丰度 (相对于基因和 N8 标准化)。如图 3A 所示,与用随机 8- 聚体产生的 cDNA 相比较,用 NSR#1+NSR#3 引物库 (不与 mt-rRNA 或 rRNA 杂交的 NSR-6 聚体) 进行第一链 cDNA 合成,并且用反 -NSR#5 和反 -NSR#7 引物库进行第二链合成而产生的 cDNA,显示出 rRNA 丰度的实质减少 (0.086% 18S ;0.673% 28S) 以及减少的 mt-rRNA 丰度 (1.807% 12S ;8.512% 16S)。

[0277] 图 3B 图示了,与在第一链中使用 NSR-6 聚体引物 (SEQ ID NO :1-749) 然后在第二链中使用随机引物 (N7) 扩增的 cDNA (NSR-6 聚体 > N7 = 3.0% 18S, 3.4% 28S) 相比较,以及与在第一链中使用 NSR-6 聚体引物 (SEQ ID NO :1-749) 然后在第二链中使用反 -NSR-6

聚体引物 (SEQ ID NO :750-1498) 扩增的 cDNA (NSR-6 聚体 > 反 -NSR-6 聚体 = 0.1% 18S, 0.5% 28S) 相比较,在第一链和第二链合成中均使用随机引物 (N7) 扩增的对照 cDNA 中细胞核 rRNA (18S 或 28S) 的相对丰度水平 (N7 > N7 = 100% 18S, 100% 28S)。当测量线粒体 rRNA 时,图 3C 中的结果显示了相同的趋势, N7 > N7 = 100% 12S, 或 16S ; NSR-6 聚体 > N7 = 27% 12S, 20.4% 16S ; 以及 NSR-6 聚体 > 反 -NSR-6 聚体 = 8.2% 12S, 3.5% 16S。

[0278] 为了确定从用各种 NSR 和反 -NSR 库合成的 cDNA 产生的 PCR 扩增的 aDNA 是否保留了相应 cDNA 的靶基因表达特征谱,用 9 种随机选择的 TaqMan 试剂进行定量 PCR 分析,以检测下列基因 : PPIA, SRP14, STMN1, TRIM63, ACTB, DBN1, EIFS3, GAPDH, 和 NUCB2。如表 7 和图 4A 所示,在用 NSR 和反 -NSR 引发的 cDNA 以及由其产生的 aDNA 中,测量到了测定的 9 种基因的可测量的信号 (如从 10 μ l cDNA 模板输入确定的)。

[0279]

表 7: 定量 PCR 分析

样品 ID	ng/ul	第一链引物库 (+逆转录酶)	第二链引物库 (+Klenow)	RNA	输入校正的主座									
					NUCB2 ¹	18S ³	18S-1 ²	28S-3 ²	28S-4 ²	28S-7 ²	28S-8 ²	12S-1 ²	12S-2 ²	16S-1 ²
1	76.5	saNSR.1 库	sa.反-NSR#5 库	Jurkat 1	11.4	52.9	195.0	349.1	800.8	989.2	612.5	798.8	216.0	108.1
2	73.1	saNSR.1 库 + 2 库	sa.反-NSR#5 库 + sa.反-NSR#6 库	Jurkat 1	5.0	55.9	238.2	335.5	616.0	1066.5	715.2	1478.0	3671.0	863.7
3	72.8	saNSR.1 库 + 3 库	sa.反-NSR#5 库 + sa.反-NSR#7 库	Jurkat 1	17.6	29.2	125.6	169.3	551.5	964.3	1310.5	312.9	159.0	80.5
4	78.2	saNSR.1 库 + 4 库	sa.反-NSR#5 库 + sa.反-NSR#8 库	Jurkat 1	12.6	55.3	155.5	272.9	538.2	964.1	610.4	639.8	1041.1	787.1
5	77.1	saNSR.1	sa.反-NSR#5 库	Jurkat 2	11.5	51.0	183.5	331.2	922.5	1228.1	609.5	1210.9	221.1	126.6
6	46.2	saNSR.1+2	sa.反-NSR#5 库 + sa.反-NSR#6 库	Jurkat 2	7.4	34.7	180.6	405.1	364.3	1560.1	410.9	1799.2	4385.0	1007.9
7	45.2	saNSR.1+3	sa.反-NSR#5 库 + sa.反-NSR#7 库	Jurkat 2	20.9	30.6	107.6	234.1	378.8	1581.6	771.5	310.6	276.1	142.5
8	81.7	saNSR.1+4	sa.反-NSR#5 库 + sa.反-NSR#8 库	Jurkat 2	9.7	71.9	182.1	249.9	820.5	1059.7	886.2	933.7	1192.8	1075.4
9	72.5	saNSR.1	sa.反-NSR#5 库	K562	0.6	36.2	143.9	219.3	769.3	930.1	545.8	1275.9	152.3	279.2
10	69.1	saNSR.1+2	sa.反-NSR#5 库 + sa.反-NSR#6 库	K562	0.3	46.5	139.9	146.6	492.9	691.6	602.0	1562.6	3291.7	889.2
11	73.5	saNSR.1+3	sa.反-NSR#5 库 + sa.反-NSR#7 库	K562	1.1	24.1	108.4	138.1	586.9	914.5	1480.4	481.7	150.1	224.2

[0280]

样品 ID	ng/ul	第一链引物库 (+逆转录酶)	第二链引物库 (+ Klenow)	RNA	输入校正的丰度									
					NUCB2 ¹	18S ³	18S-1 ²	28S-3 ²	28S-4 ²	28S-7 ²	28S-8 ²	12S-1 ²	12S-2 ²	16S-1 ²
12	75.9	saNSR.1+4	sa反-NSR#5库 + sa反-NSR#8库	K562										
13	43.6	Y4R-NSR	Y4F-N9	Jurkat 1	6.7	126.1	1830.6	3675.6	874.0	5637.9	904.2	293.6	1437.9	1644.5
14	59.0	Y4-N7	Y4F-N9	Jurkat 1	7.0	562.9	5317.4	19201.8	2489.9	23678.1	2463.8	355.5	1243.7	1751.5
15	47.5	Y4R-NSR	Y4F-N9	Jurkat 2	7.7	253.5	2669.7	6898.6	1716.2	7254.4	1396.9	457.5	2184.7	3482.8
16	59.0	Y4-N7	Y4F-N9	Jurkat 2	7.1	286.6	2948.3	11437.4	1977.7	18794.7	1857.7	282.7	1119.2	1528.5
17	50.2	Y4R-NSR	Y4F-N9	K562	0.4	139.2	1939.0	3940.1	939.7	4801.4	614.6	420.6	1423.4	3997.5
18	54.1	Y4-N7	Y4F-N9	K562	0.5	517.5	4292.3	14486.7	1673.4	15459.0	1590.5	285.6	849.2	1870.3
19	44.8	N8	无 - 仅 RT, 无 第二链合成	Jurkat 1	0.4	648.0	3626.8	341.3	1778.6	7321.5	1183.5	299.8	323.8	95.4
20	46.5	N8	无 - 仅 RT, 无 第二链合成	Jurkat 2	0.4	758.9	4521.8	513.6	2302.5	9776.5	1396.9	321.6	327.5	104.3
21	44.6	N8	无 - 仅 RT, 无 第二链合成	K562	0.0	734.6	3460.3	496.4	2191.6	8023.3	1344.0	286.5	298.8	139.1

1= FAM 10

2= FAM1000

3= Hs999999901

[0281] 图4A图示了,在第一链合成期间用各种NSR引物并且在第二链合成期间用反-NSR引物或随机引物而扩增的cDNA的基因特异性polyA的含量,如使用针对PPIA, SRP14,

STMN1, TRIM63, ACTB, DBN1, EIF3S3, GAPDH 和 NUCB2 的代表性基因特异性测定组所确定的。

[0282] 通过首先将单独的 rRNA 转录测定的输入校正的原始丰度值组合,来计算图 4A 所示的 polyA 含量的相对丰度。将下降的 rRNA 转录本丰度值相对于在每一样品制备物中测量的 NUCB2 基因水平进行标准化,以使基因含量等于 1.0。接着将针对扩增样品计算的 rRNA/基因的比,相对于从未扩增的对照 (N8) 获得的值标准化,以便对于每一 rRNA 转录本, N8 都等于 100。因此, N8 用作每一基因的丰度水平的标准值。

[0283] 关于图 4A 和图 4B 的图例,参照表 2 和表 3, saNSR. 1 是指在第一链合成期间使用 NSR#1 引物库,并且在第二链合成期间使用反 -NSR#5 引物库而扩增的 cDNA (即,在第一链和第二链合成期间,除去了 rRNA, mt-rRNA 和球蛋白)。saNSR. 1+2 是指在第一链合成期间使用 NSR#1+#2 引物库,并且在第二链合成期间使用反 -NSR#5+#6 引物库而扩增的 cDNA (即,在第一链和第二链合成期间,除去了 rRNA 和球蛋白,但没有除去 mt-rRNA)。saNSR. 1+3 是指在第一链合成期间使用 NSR#1+#3 引物库,并且在第二链合成期间使用反 -NSR#5+#7 引物库而扩增的 cDNA (即,在第一链和第二链合成期间,除去了 rRNA 和 mt-rRNA,但没有除去球蛋白)。saNSR. 1+4 是指在第一链合成期间使用 NSR#1+#4 引物库,并且在第二链合成期间使用反 -NSR#5+#8 引物库而扩增的 cDNA (即,在第一链和第二链合成期间,除去了 rRNA,但没有除去 mt-rRNA 和球蛋白)。Y4R-NSR 是指使用与球蛋白 (α 或 β) 不完美匹配并且与 rRNA (18S, 28S) 不完美匹配的、包括 6-聚体 NSR 寡核苷酸的核心组的 NSR 引物进行第一链合成,并且使用随机 9-聚体引物进行第二链合成而扩增的 cDNA (即,在第一链合成期间除去了球蛋白和 rRNA 但没有除去 mt-rRNA,并且在第二链合成期间没有除去任何序列)。Y4-N7 是指在第一链和第二链合成期间,用随机 7-聚体引物扩增的 cDNA。最后, N8 是指使用随机 8 聚体的第一链合成 (没有第二链合成)。

[0284] 如图 4A 所示,除了基因 TRIM63 以外,引发第一链合成的 NSR 至少与随机引物同样有效地扩增基因特异性转录本。

[0285] 图 4B 图示,在第一链 cDNA 合成期间用各种 NSR 引物从 Jurkat-1 和 Jurkat-2 总 RNA 扩增的 cDNA 中,非多聚腺苷酸化 RNA 转录本的相对丰度水平。如图 4B 所示,用 NSR 和反 -NSR 引物扩增的 cDNA 中,基因特异性含量被富集,而 rRNA 和 mt-rRNA 的含量减少。这显示,NSR-依赖性 rRNA 消除不是普遍效果,而是特异于要去除的靶转录本。该结果还显示,使用 NSR-PCR, polyA- 和 polyA+ 转录本都可以再现地扩增。

[0286] 图 5 图示,用 NSR#1+#3 引物库产生的 cDNA 中测量的 Jurkat/K562 mRNA 表达数据的对数比值 (x-轴),对用随机引物库 N8 (未扩增) 产生的 cDNA 中测量的 Jurkat/K562 mRNA 表达数据的对数比值。该结果显示,NSR 引发和 PCR 扩增保持不同样品中的信使 RNA 的相对丰度。

[0287] 图 6A 图示,用常规方法 polyA 纯化之后通常所获得的总 RNA 中 rRNA 与 mRNA 的比例。如图 6A 所示,在 polyA 纯化之前,分离自哺乳动物细胞的总 RNA,包括大约 98% 的 rRNA 和大约 2% 的 mRNA 及其他 (非 -polyA RNA)。如图所示,即使从总 RNA 中去除 95% 的 rRNA (使用 polyA 纯化),剩余的 RNA 仍然由大约 50% 的 rRNA 和 50% 的 mRNA 的混合物组成。

[0288] 图 6B 图示,在第一链 cDNA 合成期间用 NSR 引物并且在第二链 cDNA 合成期间用反 -NSR 引物而制备的 cDNA 样品中, rRNA 与 mRNA 的比例。如图 6B 所示,用 NSR 引物和

反-NSR引物从总RNA产生cDNA,可有效去除99.9%的rRNA(包括细胞核和线粒体rRNA),从而产生富集超过95% mRNA的cDNA群。这是相当显著的结果,因为以下几个理由。首先,使用polyA纯化或者依赖于与mRNA的polyA尾相结合的引物的策略,可排除含非-polyA的RNA分子,例如miRNA和其他感兴趣的分子,从而排除促成转录组丰富度的核酸分子。与之相比,在cDNA合成期间使用NSR引物和反-NSR引物的本发明的方法,不需要polyA选择,从而可保持转录组的丰富度。其次,在cDNA合成期间用NSR和反-NSR引物,可有效产生去除了99.9% rRNA的cDNA,从而产生具有少于10% rRNA污染的cDNA,如图6B所示。这与polyA纯化的mRNA和用随机引物进行的cDNA合成(其仅去除了98%的rRNA,从而产生具有大约50% mRNA和50% rRNA污染的cDNA)形成了对比,如图6A所示。

[0289] 结论:

[0290] 这些结果显示,NSR#1+#3引物库(SEQ ID NO:1-749)和反-NSR引物库(SEQ ID NO:750-1498),对于第一链和第二链cDNA合成分别相当有效,从而产生了具有低水平(少于10%)的不想要的rRNA和mt-rRNA的、对于靶基因(包括多聚腺苷酸化和非-多聚腺苷酸化RNA)基本富集的双链cDNA产物。

[0291] 实施例4

[0292] 本实施例显示,使用749个NSR-6聚体(SEQ ID NO:1-749)(每一个在5'端共价连接有间隔子N和PBS#1(SEQ ID NO:1499))进行第一链cDNA合成,且使用749个反-NSR-6聚体(SEQ ID NO:750-1498)(每一个在5'端共价连接有间隔子N和PBS#2(SEQ ID NO:1500)),可引发转录组的实质级分(polyA⁺和polyA⁻)的扩增,但不引发总RNA中存在的不期望的非靶序列,如扩增的cDNA的序列分析所确定的。

[0293] 方法:

[0294] 用实施例2中描述的方法,用表8中显示的各种引物库,使用用于第一链cDNA合成的749个NSR-6聚体(SEQ ID NO:1-749)(每一个在5'端共价连接有间隔子N和PBS#1(SEQ ID NO:1499))且使用749个反-NSR-6聚体(SEQ ID NO:750-1498)(每一个在5'端共价连接有间隔子N和PBS#2(SEQ ID NO:1500)),产生cDNA。

[0295] 表8:用于选择性扩增cDNA的方案

[0296]

方案参考号	第一链cDNA引物	第二链cDNA合成引物	描述	输出数
NSR-V1	NSR 引物 (不与 rRNA 完美匹配, 无球蛋白, + mt rRNA)	N7 随机	反应条件: 用 Y4 引物尾 (SEQ ID NO: 1504) 运行 RT, 高 dNTP (25mM), 在 40°C 2 小时, 30 分钟 RNA 酶 H 处理, 和 95°C 变性步骤	n=170
NSR-V2	NSR 引物 (不与 rRNA 完美匹配, 无球蛋白, + mt rRNA)	N7 随机	反应条件: 除了 RNA 酶处理 10 分钟和去除 95°C 变性步骤以外, 引物和条件与上述的 NSR-V1 相同	n=130
NSR-V3	NSR 引物 (不与 rRNA 完美匹配, 无球蛋白, + mt rRNA)	N7 随机	反应条件: 除了去除 RNA 酶处理以外, 引物和条件与上述的 NSR-V2 相同	n=187
NSR-V4	NSR 引物 (不与 rRNA 完美匹配, 无 mt-rRNA, + 球蛋白) (SEQ ID NO: 1-749)	反 -NSR (SEQ ID NO: 750-1499)	反应条件: 使用引物 (SEQ ID NO: 1501); 反应条件如实施例 2 所述	n=187
NSR-V5	NSR (不与 rRNA 完美匹配, 无 mt-rRNA, + 球蛋白) (SEQ ID NO: 1-749)	反 -NSR (SEQ ID NO: 750-1499)	反应条件: 引物和条件与 NSR-V4 相同, 且在第一链和第二链合成之间增加了另外的清除步骤	n=187
N7	N7 随机	N7 随机	反应条件: 条件与 NSR-V5 相同, 但使用随机 N7 引物	n=171

[0297] PCR 扩增并柱纯化 cDNA 产物, 如实施例 2 所述。接着用 pCR-XL TOPO 试剂盒 (Invitrogen), 将柱纯化的 PCR 产物克隆入 TOPO 载体。用 1 μ l 的 PCR 产物, 4 μ l 的水和 1 μ l 的载体, 进行 TOPO 连接反应。对化学感受态 TOP 10 One Shot 细胞 (Invitrogen) 进行转化, 将其涂板至 LB+Kan (50 μ g/mL) 上, 并在 37°C 生长过夜。用 PCR 扩增, 就插入物筛选克隆。通过 2% 琼脂糖凝胶分析确定, 所有克隆都具有至少 100bp 的插入物 (数据未显示)。

[0298] 然后将克隆用作模板, 以进行 DNA 序列分析。对所得的序列进行公众数据库检索, 以确定与 rRNA 种类和基因组的同源性。

[0299] 结果:

[0300] 表 9 提供, 从用表 8 所示的各种引物库合成的 cDNA 产生的 PCR 产物的序列分析的结果。

[0301] 表 9: 从选择性扩增的 cDNA 产生的 aDNA 的 DNA 序列分析的结果

[0302]

用于cDNA合成的引物	rRNA (总数的%) (18S 或 28S rRNA)	mt-RNA (总数的%) (12S 或 16S rRNA)	基因特异性 RNA ¹ (总数的%)	其他 ² (总数的%)
N7	77.2	8.2	13.5	1.2
NSR-V1	44.7	19.4	28.8	7.1
NSR-V2	17.0	20.0	51.0	12.0
NSR-V3	2.0	17.0	64.0	17.0
NSR-V4	10.7	5.3	67.4	16.6
NSR-V5	3.7	3.2	78.6	14.4

[0303] 1 = 被确定与任何已知基因或 mRNA 包括外显子、内含子和 UTR 区有交叠, 如通过与公众数据库进行序列比对而确定的。

[0304] 2 = 被确定与重复元件或基因间区域比对序列有交叠, 如通过与公众数据库进行序列比对而确定的。

[0305] 结论:

[0306] 该结果显示, 从用实施例 2 描述的 NSR 6-聚体 (SEQ ID NO:1-749) 和反-NSR6-聚体 (SEQ ID NO:750-1498) 产生的双链 cDNA 模板扩增得到的 aDNA (PCR 产物), 保持了靶基因的富集 (相对于细胞核核糖体 RNA 和线粒体核糖体 RNA)。

[0307] 实施例 5

[0308] 本实施例描述了可用于标记 aDNA (PCR 产物), 以随后用于基因表达监控应用的方法。

[0309] 1、荧光标记至 PCR 产物的直接化学偶联。

[0310] Cy3 和 Cy5 直接标记试剂盒获自 Mirus (Madison, Wisconsin, kit MIR Product Numbers 3625 和 3725)。

[0311] 如制造商所述, 将如实施例 2 所述获得的 10 μ g PCR 产物 (aDNA) 与标记试剂一起温育。标记试剂将 Cy3 或 Cy5 共价连接至核酸样品, 其随后可用于几乎任何分子生物学应用, 例如基因表达监控。然后纯化标记的 aDNA, 并相对于起始标记测量其荧光。

[0312] 结果:

[0313] 如上所述, 标记四种 aDNA 样品, 并测量荧光。在四种标记的 aDNA 样品中观察到 0.9-1.5% 的保留标记, (也可称作标记效率为 0.9-1.5%)。这些结果落入对于 aaUTP 标记的, 体外翻译的, 扩增的 RNA 通常观察到的 1% -3% 的标记效率的范围内。

[0314] 2、在 PCR 期间用一种引物 (正向或反向) 将氨基烯丙基修饰的 dUTP (aadUTP) 掺入 aDNA 模板, 以产生 aa- 标记的单链 aDNA。

[0315] 方法:

[0316] 将用实施例 2 所述的 NSR 和反-NSR 引物库产生的 1 μ g aDNA PCR 产物, 加入至如下的 PCR 反应混合物中:

[0317] -100-1000 μ M aadUTP+dCTP+cATP+dGTP+dUTP (aadUTP 对 dUTP 的最佳平衡可使用常规试验依经验确定)

[0318] -4mM $MgCl_2$

[0319] -400-1000nM 的仅正向或反向引物,而不是两者。

[0320] PCR 反应:5-20 个 PCR 循环 (94℃ 30 秒,60℃ 30 秒,72℃ 30 秒),在此期间,仅合成双链 PCR 模板的一条链。预期每一 PCR 循环产生一个拷贝的 aa- 标记的单链 aDNA。然后纯化该 PCR 产物,并通过标准化学偶联,掺入 Cy3 或 Cy5 标记。

[0321] 3、在 PCR 期间用正向和反向引物将氨基烯丙基修饰的 dUTP(aadUTP) 掺入 aDNA 模板,以产生 aa- 标记的双链 aDNA。

[0322] 方法:

[0323] 将用实施例 11 所述的 NSR7 引物库产生的 1 μ g aDNA PCR 产物,加入至如下的 PCR 反应混合物中:

[0324] -100-1000 μ M aadUTP+dCTP+cATP+dGTP+dUTP(aadUTP 对 dUTP 的最佳平衡可使用常规试验依经验确定)

[0325] -4mM $MgCl_2$

[0326] -400-1000nM 的正向和反向引物(例如,正向:SEQ ID NO:1501;或反向:SEQ ID NO:1502)

[0327] PCR 反应:5-20 个 PCR 循环 (94℃ 30 秒,60℃ 30 秒,72℃ 30 秒),在此期间,合成双链 PCR 模板的双链。然后纯化双链的、aa- 标记的 aDNA PCR 产物,并通过标准化学偶联,掺入 Cy3 或 Cy5 标记。

[0328] 实施例 6

[0329] 本实施例描述了,使用与 NSR-6 聚体共价连接的杂合 RNA/DNA 引物产生扩增的核酸分子,所述核酸分子可用于产生单链 DNA 分子以用于基因表达分析。

[0330] 基本原理:在本发明的选择性扩增方法的一个实施方案中,用于第一链 cDNA 合成的第一寡核苷酸群的确定序列部分(例如, PBS#1),和 / 或用于第二链 cDNA 合成的第二寡核苷酸群的确定序列部分(例如, PBS#2),包括 RNA 部分以产生适合于通过使用链置换来产生多拷贝的 DNA 产物的扩增的核酸模板,如美国专利 6,946,251 中所描述的,其通过引用并入本文。杂合 NSR 引物 (PBS#1 (RNA/DNA)/NSR) 可用于合成第一链 cDNA,从而产生适合于用作模板用于合成单链 DNA 的产物,所述单链 DNA 具有与模板 RNA 互补的序列。可选地,可在第二链合成之后添加 RNA/DNA 杂合引物尾,如下文所更详细描述。

[0331] 本方法的一个优点是,能够产生许多起始 cDNA 序列的单链扩增产物,而不扩增扩增产物本身。

[0332] 方法:

[0333] 1、用于第一链 cDNA 合成的 RNA:DNA 杂合 NSR

[0334] 在一些实施方案中,在第一链 cDNA 合成期间使用的 NSR 引物群 (SEQ ID NO: 1-749),可进一步包括 5' 引物结合序列 (RMA),例如杂合 PBS#1:

[0335] 共价连接于 NSR 引物的 5' 端的杂合 PBS#1 (RNA) 5' GACGGAUGCGGUCU 3' (SEQ ID NO:1557),

[0336] 从而产生 RNA 确定序列部分位于 DNA 杂交部分的 5' 端的 RNA:DNA 杂合寡核苷酸群,其具有下列构型:

[0337] 5' 杂合 PBS#1 (RNA) (SEQ ID NO:1557)+NSR6- 聚体 (DNA) (SEQ ID NO:1-749) 3'

[0338] 在另一实施方案中,可以产生寡核苷酸群,其中每一 NSR6- 聚体任选地包括至少一个 DNA 间隔子核苷酸 (N) (其中每一个 N = A, G, C, 或 T), 其中 (N) 位于 5' 杂合 PBS#1 (RNA) 与 NSR6 聚体 (DNA) 之间。间隔子区可以包括 1 个核苷酸直至 10 个或更多个核苷酸 (N = 1 至 10), 从而产生具有下列构型的寡核苷酸群:

[0339] 5' 杂合 PBS#1 (RNA) (SEQ ID NO:1557)+(N1-10) (DNA)+NSR6- 聚体 (SEQID NO: 1-749) (DNA) 3'

[0340] 制备第一链 cDNA 的方法基本上如实施例 2 中所述进行:用杂合 PBS#1 (SEQID NO: 1557) (RNA) 替换 PBS#1 (SEQ ID NO:1499) (DNA), 使用 RNA 酶 H- 逆转录酶, 并且在第二链 cDNA 合成之前不添加 RNA 酶 H, 以产生用于扩增单链 DNA 产物的双链底物。

[0341] 用于单链扩增的底物优选地由双链模板组成, 所述模板的第一链由 RNA/DNA 杂合分子组成, 第二链全部由 DNA 组成。为构建该双链模板, 用 RNA 酶 H- 逆转录酶进行第二链合成。可选地, 用 Klenow 酶, 接着使用 RNA 酶 H- 逆转录酶的完善步骤进行第二链合成, 因为 Klenow 酶不使用 RNA 作为模板。

[0342] 可用随机引物或反-NSR 引物进行第二链 cDNA 的合成。在第一链 cDNA 合成期间使用 RNA 杂合 /NSR 引物群, 可导致将杂合引物的 RNA 部分的独特序列掺入至合成的单链 cDNA 产物中。

[0343] 然后, 在高进行性链置换 DNA 聚合酶, 例如 phi29 存在的情况下, 通过变性、RNA 酶 H 处理变性底物以除去底物的 RNA 部分、以及添加杂合 RNA/DNA 单链扩增引物, 例如 5' GACGGAUGCGGTGT 3' (SEQ ID NO:1558), 可以从如上所述的双链模板制备与靶 RNA 序列相同的单链 DNA 扩增产物, 其中所述引物的 5' 部分由与第一链 cDNA 上的预先确定的序列杂交的至少 11 个 RNA 核苷酸 (下划线标示的) 组成, 其 3' 部分由与底物杂交的至少 3 个 DNA 核苷酸组成。

[0344] 在可选的实施方案中, 可以通过用 DNA 引物 (例如, NSR 或随机引物) 进行第一链 cDNA 合成, 接着再用 DNA 引物 (例如, 反-NSR 或随机引物) 和 Klenow 进行第二链的合成, 来制备用于单链 DNA 扩增的底物。然后通过下列来修饰双链 DNA 模板以产生用于单链 DNA 扩增的底物: 变性, 和与第二链 cDNA 杂交的 RNA/DNA 杂合寡核苷酸退火, 以及用逆转录酶延伸杂合 RNA/DNA 寡核苷酸以产生双链模板, 其中一个链由 RNA/DNA 杂合分子组成, 且另一个链全部由 DNA 组成。

[0345] 然后通过变性, 以及 RNA 酶 H 处理变性底物以除去底物的 RNA 部分, 可从双链底物产生与靶 RNA 序列互补的单链 DNA 扩增产物。然后将杂合 RNA/DNA 单链扩增引物与第二链退火, 其中所述杂合引物的 5' 部分由与第二链 cDNA 上的预先确定的序列杂交的至少 11 个 RNA 核苷酸组成, 所述杂合引物的 3' 部分由至少 3 个 DNA 核苷酸组成。然后使用高进行性链置换 DNA 聚合酶, 例如 phi29 来产生单链 DNA 产物。

[0346] 实施例 7

[0347] 本实施例描述了使用 NSR 引物强有力地检测从总 RNA 扩增的 cDNA 中的 polyA+ 和 poly A- 转录本。

[0348] 基本原理:

[0349] 全转录组, 即在某一给定瞬间在细胞和组织中存在的 RNA 分子的整个集合, 携带有收集 RNA 之时所述样品生物学状态的丰富标签。然而, 总 RNA 的生物化学实际情形是, 压

倒性多数的 RNA 编码细胞质和线粒体的核糖体的结构亚基,其提供相对较少的关于细胞活性的信息。因此,已经开发出了富集更能提供信息的低拷贝转录本的分子技术,以用于大规模转录研究,例如使用 3' 多聚腺苷酸化序列作为非-核糖体 RNA 的亲亲和标签。对 poly A+RNA 转录本的靶向测序,已提供了 cDNA 片段的丰富基础,其形成目前基因模式的基础(参见例如,Hsu F. et al., *Bioinformatics* 22:1036-1046(2006))。从 polyA 序列引发 cDNA 合成,也已用于最通常使用的、基因组范围的 RNA 特征谱分析方法。

[0350] 虽然这些方法已非常成功地用于分析信使 RNA 的表达,然而严格关注于 polyA+ 转录本的方法,对全局转录活性不能提供完全的视角。PolyA 引发通常不能俘获远离 3' polyA 位置的信息,例如可变剪接事件和可选的转录起始位点。传统的方法也不能监控非多聚腺苷酸化转录本(包括编码组蛋白脱乙酰基酶的蛋白亚基的转录本和许多非编码 RNA) 的表达。虽然已开发出特异性靶向多种 RNA 子群的替代方法(Johnson J. M. et al., *Science* 302:2141-2144(2003); Shiraki T. et al., *PNAS* 100:15776-15781(2003); Vitali P. et al., *Nucleic Acids Res.* 31:6543-6551(2003)),然而仅少数研究试图平行监控所有的转录事件。已使用基因组嵌合阵列(tiling array)进行全转录组内容的最全面分析(Cheng J. et al., *Science* 308:1149-1154(2005); Kapranov P. et al., *Science* 316:1484-1488(2007))。然而,这些试验的复杂性以及对后续验证(通过补充方法)的需要,限制了嵌合阵列在常规全转录组特征谱分析中的应用。DNA 测序的新进展,为表达分析的新方法提供了机会,其允许在单个平台上定量评估 RNA 丰度和试验确认转录本发现(Mortazavi A. et al., *Nat. Methods* 5:621-628(2008))。因此,需要提供对已知和新转录本的无偏研究的方法,其可利用众多样品的高通量特征谱分析。

[0351] 方法:

[0352] 概述:

[0353] 如上所述,本发明人开发出了样品制备方法,其依赖于“不那么随机的”(“NSR”)引发文库,其中与核糖体 RNA(rRNA) 序列完美匹配的所有六聚体都被去除。由于 NSR 选择性引发将用作全转录组特征谱分析技术,所以其必须忠实地检测非核糖体 RNA 转录本。为检测 NSR- 引发的性能,构建出全转录组 cDNA 文库。合成反义 NSR 六聚体(“NSR”引物)以引发第一链的合成,所述六聚体具有通用尾序列以促进 PCR 扩增和下游测序(利用 Illumina 1G Genome Analyzer)。构建与第一组 NSR 引物互补的第二组加尾的 NSR 六聚体(“反-NSR”引物),以引发第二链的合成。在第一链和第二链 NSR 引物中使用的独特尾序列使得能够在扩增和测序期间保持链的取向。在本研究中,对于模板 RNA,所有序列阅读以 3' 至 5' 的方向进行,尽管通过修饰通用的 PCR 扩增引物,可以容易地产生相反的链阅读。

[0354] 为评估 NSR- 引发的文库中的全转录组内容,通过测序,对从分离自全脑的 RNA 和分离自通用参照(UHR)细胞系(Stratagene)的 RNA 产生的 NSR- 引发的 cDNA 文库进行研究,如下所述。

[0355] 用于构建文库的寡核苷酸:

[0356] 如实施例 1 所述,(SEQ ID NO:1499)5' 共价连接至(SEQ ID NO:1-749)的每一个的第一 NSR-6 聚体引物群用于第一链的扩增,且(SEQ ID NO:1500)共价连接至(SEQ ID NO:750-1498)的每一个的第二反-NSR-6 聚体引物群用于第二链 cDNA 合成。在混合之前,

将寡核苷酸脱盐,并以 100 μ M 重悬于水中。

[0357] 也合成具有尾序列 SEQ ID NO :1499 和 SEQ ID NO :1500 的随机 6 聚体的集合,以构建对照文库。

[0358] 文库构建:

[0359] 概述: NSR- 引发选择性地俘获非核糖体 RNA 级分,包括 poly A⁺ 和 poly A⁻ 转录本。在文库构建期间,应用两轮 NSR 引发选择。首先, NSR 寡核苷酸(反义)在不那么随机的模板位点起始逆转录。在用核糖核酸酶处理以除去 RNA 模板之后,将反-NSR 寡核苷酸(有义)在不那么随机的模板位点上与单链 cDNA 退火,并指导 Klenow- 介导的第二链合成。使用非对称正向和反向引物的 PCR 扩增,可保持链的取向,并且添加末端位点以用于下游末端测序。然后用正向扩增引物的一部分,从 cDNA 片段的 3' 端进行反义标签测序。然后,利用配对比对,将标签序列的反向互补序列与人类基因组进行匹配。

[0360] 方法:

[0361] 全脑总 RNA 获自 **FirstChoice®** Human Total RNA Survey Panel(Ambion, Inc.)。通用参照(UHR)细胞系 RNA 购自 Stratagene Corp.。用 Superscript[™]III 逆转录试剂盒(Invitrogen Corp)将总 RNA 转化为 cDNA。用 3' -5' 外切-Klenow 片段(New England Biolabs Inc.)进行第二链合成。用 Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System(Roche Diagnostics Corp.)对 DNA 进行扩增。

[0362] 对于 NSR 引发的 cDNA 合成,将 2 μ l 100 μ M NSR 引物混合物(SEQ ID NO :1499+SEQ ID NO :1-749)与 1 μ l 模板 RNA 和 7 μ l 水组合于 PCR 去帽管中(Genesee Scientific Corp.)。将引物-模板混合物在 65 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟,在添加 10 μ l 高 dNTP 逆转录酶主混合物(3 μ l 水,4 μ l 5X 缓冲液,1 μ l 100mM DTT,1 μ l 40mM dNTP 和 1.0 μ l SuperScript[™] III 酶)之前在冰上迅速冷却。将 20 μ l 逆转录酶反应物在 45 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟,在 70 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟,然后冷却至 4 $^{\circ}$ C。通过添加 1 μ l RNA 酶 H(Invitrogen Corp.),然后在 37 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟,在 75 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟,然后冷却至 4 $^{\circ}$ C 来除去 RNA 模板。随后用 **QIAquick®** PCR 纯化试剂盒纯化 DNA,用 30 μ l 洗脱缓冲液(Qiagen, Inc. USA)将其从旋柱洗脱。

[0363] 对于第二链合成,将 25 μ l 纯化的 cDNA 添加至 65 μ l Klenow 主混合物(46 μ l 水,10 μ l 10X NE 缓冲液 2,5 μ l 10mM dNTP,4 μ l 5 单位/ μ l 外切-Klenow 片段, New England Biolabs, Inc.)和 10 μ l 100 μ M 反-NSR 引物混合物中(SEQ ID NO :1500+SEQ ID NO :750-1498)。将 100 μ l 反应物在 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟,然后冷却至 4 $^{\circ}$ C。用 QIAquick 旋柱纯化 DNA,用 30 μ l 洗脱缓冲液(Qiagen, Inc. USA)洗脱。

[0364] 对于 PCR 扩增,将 25 μ l 纯化的第二链合成反应物与 75 μ l PCR 主混合物(19 μ l 水,20 μ l 5X 缓冲液 2,10 μ l 25mM MgCl₂,5 μ l 10mM dNTP,10 μ l 10 μ M 正向引物,10 μ l 10 μ M 反向引物,1 μ l ExpandPLUS 酶, RocheDiagnostics Corp.)混合。

[0365] 正向 PCR 引物:

[0366] (5' ATGATACGGCGACCACCGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCT3' (SEQ ID NO :1559))

[0367] 反向 PCR 引物:

[0368] (5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGATCTGA3' (SEQ ID NO :1560))

[0369] 将样品在 94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟;之后进行 2 个循环的:94 $^{\circ}$ C 10 秒,40 $^{\circ}$ C 2 分钟,72 $^{\circ}$ C 1

分钟;8个循环的:94℃ 10秒,60℃ 30秒,72℃ 1分钟;15个循环的:94℃ 15秒,60℃ 30秒,72℃ 1分钟(每一循环增加额外的10秒);72℃ 5分钟以完善末端,然后冷却至4℃。用QIAquick 旋柱纯化双链DNA。

[0370] 用相同的方法利用随机引物构建对照文库,除了在最后的反转录反应中dNTP的浓度为0.5mM(而不是2.0mM)。用PCR引物SEQ ID NO:1559和SEQ ID NO:1560,扩增随机引发的对照文库。

[0371] 定量PCR:

[0372] 用**TaqMan®** Gene Expression Assays(Applied Biosystems),通过qPCR定量单独的rRNA和mRNA转录本。用表10所示的试剂,进行qPCR测定。

[0373] 表10:用于qPCR测定的引物

靶	ABI测定探针	正向引物	反向引物	FAM报告引物
PPIA 肽基脯氨酰异构酶A(亲环素A)	Hs99999904_m1	NR	NR	NR
STMN1 stathmin 1/ 癌蛋白18	Hs01027516_g1	NR	NR	NR
EIF3S3 真核翻译起始因子3, 亚基3γ, 40 kDa	Hs00186779_m1	NR	NR	NR
18S rRNA	Hs99999901_s1	NR	NR	NR
12S rRNA	定制的	SEQ ID NO:1532	SEQ ID NO:1533	SEQ ID NO:1534
16S rRNA	定制的	SEQ ID NO:1526	SEQ ID NO:1527	SEQ ID NO:1528
28S rRNA	定制的	SEQ ID NO:1511	SEQ ID NO:1512	SEQ ID NO:1513

[0375] 用7900HT PCR仪(Applied Biosystems)在384-孔光学PCR板中,在10 μl终反应体积中,对每一测定进行稀释的文库DNA的一式三份测量。PCR之后,将结果表格输出至Excel(Microsoft Corp.),生成标准曲线,从原始数据回归样品的定量分析。然后将丰度水平相对于输入cDNA量进行标准化。

[0376] qPCR分析的结果:

[0377] 用NSR-引发或随机序列(具有尾的七聚体)的非选择性引发对照,从全脑总RNA产生的cDNA文库的比较显示,在NSR-引发的文库中,rRNA显著消除并且伴随靶mRNA的富集。特别地,在所有四种rRNA转录本(包括在用于NSR引物设计的计算化滤器中)的丰度中,观察到>95%的减少(数据未显示)。

[0378] 序列和阅读分类:

[0379] 为获得对NSR引发的文库中rRNA消除的详细认识,用Illumina 1G Genome Analyzer(Illumina, Inc.),将来自NSR-引发的(260万)和随机-引发的(380万)cDNA文库的标签序列生成36个核苷酸的反义阅读。为表征序列标签,将每一阅读5'端的二核苷酸条形码(CT)去除,并用ELAND绘图程序将碱基2-34的反向互补序列与多个序列数

数据库进行比对,所述比对允许多至 2 个错配每 32nt 的比对 (Illumina, Inc.)。

[0380] 为产生 RefSeq mRNA 和非编码 RNA 转录本的表达特征谱,允许每一标签序列与多个转录本进行比对。然后通过计算转录本长度每 1000 个核苷酸的频率,将阅读计数转化为表达值。将样品标准化因子 (nf) 用于就从每一文库产生的阅读的总数进行校正。对于每一文库,这来源于与基因组匹配的非核糖体 RNA 阅读的总数 (脑 1 :1770 万个阅读,1.0nf ; 脑 2 :1930 万个阅读,1.087nf ;UHR :1760 万个阅读,0.995nf)。

[0381] 对于全局分类,首先将测序阅读与非编码 RNA 和重复序列数据库进行比对,其中允许与多个参照序列进行比对。然后将剩余的标签序列与人基因组序列的 March 2006hg18 集进行匹配 (<http://genome.ucsd.edu/>)。用 UCSC Known Genes (<http://genome.ucsc.edu>) 定义的坐标,将与单个基因组位点匹配的阅读分类为 mRNA,内含子和基因间区域类别。将与多个基因组序列 (不包括重复序列或非编码 RNA) 匹配的序列,归为“其他”类别。核糖体 RNA 序列获自 RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) 和 Genbank (NC_001807)。非编码 RNA 序列收集自 Sanger RFAM (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/>), Sanger miRBASE (<http://microrna.sanger.ac.uk>), snoRNAbase (<http://www-snorna.biotoul.fr>) 和 RepeatMasker。重复元件获自 RepeatMasker。

[0382] 结果:与非-rRNA 基因组区比对的、超过 5400 万个的高质量 32-核苷酸标签序列阅读,获自 2 个独立制备的全脑文库和 1 个 UHR 文库。这些阅读中 77% 与单个基因组位点匹配。在 RefSeq mRNA 数据库的 22,785 个模型转录本中 (Pruitt K.D. et al, Nucleic Acids Res. 33 :D501-504 (2005)), 超过 87% 的转录本在至少一些探询的样品中由 10 个或多个序列标签阅读表示,而 69% 的转录本在所有三个文库中由 10 个或多个阅读表示。

[0383] 表 11 :来自 NSR- 引发的 (260 万) 和随机-引发的 (380 万) 文库的 32 核苷酸标签序列阅读的比对结果

[0384]

靶	NSR 引发的文库(第一链和第二链 NSR)	随机引发的文库
大亚基 rRNA (包括 5S, 5.8S 和 28S rRNA 转录本)	10.3%	47.2%
小亚基 rRNA (包括 18S rRNA 转录本)	0.8%	18.0%
线粒体 rRNA (包括 12S 和 16S rRNA)	2.2%	12.6%
非核糖体 RNA (包括与一个或多个基因组位点匹配的所有其他序列)	86.7%	22.2%

[0385] 如表 11 所示,来自 NSR 引发的文库的序列标签中仅 13%,与相应于核糖体 RNA 的人基因组匹配,而随机引发的 cDNA 中 78% 与 rRNA 序列匹配。这些结果显示,NSR- 引发导致几乎完全消除小亚基 18S rRNA 并且大量减少线粒体 rRNA 转录本。虽然大亚基 rRNA 的丰度的减少不如其他 rRNA 转录本有效,但 28S RNA 的相对适度的消除,可对最终的文库组成具有重大影响,因为其具有较高的初始摩尔浓度和转录长度。此外,超过 86% 的 NSR- 引发的序列与非-rRNA 基因组区匹配,而与之相比,22% 的随机-引发的 cDNA 与非-rRNA 基因组区匹配。来自任一文库的全部序列阅读中仅 5% 不与任何基因组序列匹配,这表明,该文库构建方法产生了极少的不依赖于模板的人工假象。在从 UHR 总 RNA (其分离自多种细胞系混合物) 产生的 NSR- 引发和随机-引发的文库中,观察到相似的结果 (数据未显示)。

[0386] 为检测 NSR- 引发的文库中的 polyA+RefSeq mRNA, 可以对 RefSeq 转录本中的测序比对进行定量分析, 并将其用于产生基于序列的数字表达特征谱。在从相同全脑总 RNA 制备的两个独立的 NSR 文库之间观察到, NSR- 引发的 cDNA 扩增具有良好的再现性, 在重复 #1 和重复 #2 中, 由至少 10 个 NSR 标签序列表示的转录本的 log₁₀ 比值的相关系数 $r = 0.997 (n = 17,526)$ 。

[0387] 为评估获自 NSR 文库的 mRNA 特征谱的准确性, 将 NSR- 引发的脑特征谱和 UHR 表达特征谱, 与为 MicroArray Quality Control Study (MAQC Consortium) 产生的“金标准”**TaqMan®** qPCR 特征谱 (Shi L. et al., Nat. Biotechnol. 24 :1151-1161 (2006)) 进行比较。

[0388] 还评估通过 NSR 标签测序和**TaqMan®**定量 PCR 获得的基因表达特征谱的相关性。将通过 NSR 标签测序获得的脑和 UHR 转录水平的 log₁₀ 比值对获自 MAQC Consortium 的 **TaqMan®**测量值作图, 相关系数 $r = 0.930 (n = 609)$ 。

[0389] 如下进行 NSR- 引发的文库中的 poly A+Ref Seq mRNA 的检测。跨越转录本长度检查 NSR 标签序列的位置分布。图 7A 显示, 对于跨越长转录本 ($\geq 4\text{kb}$) 的 NSR (虚线) 或 EST (实线) cDNA, 从 5' 端开始的每一碱基位置上显示的 5,790 个转录本的综合阅读频率。图 7B 显示, 对于跨越长转录本 ($\geq 4\text{kb}$) 的 NSR (虚线) 或 EST (实线) cDNA, 从 3' 端开始的每一碱基位置上显示的 5,790 个转录本的综合阅读频率。将图 7A 和 7B 所示数据针对每一数据组中的最大值进行标准化。如图 7A 和 7B 所示, NSR- 引发的 cDNA 片段显示出对大转录本的全长覆盖, 其与传统的 EST 相比, 具有更高的内部位点代表性。这是全转录组特征谱分析的重要特征, 因为该技术优选俘获可变剪接信息。测序覆盖在已知转录本的极 5' 末端显示出了中度的不足, 因为所有测序阅读都是从 cDNA 片段的 3' 端产生。如果在 NSR cDNA 产物的两端进行测序, 那么该效应将会减轻。总之, 这些结果显示, 基于 NSR 的选择性引发, 作为分析全转录组表达特征谱的技术, 是强有力的。

[0390] 全转录组特征谱分析的另一要求是, 其必须有效地俘获 poly A- 转录本。如下确定 poly A- 非编码 RNA 在 NSR- 引发的 cDNA 中的代表性。将来自 NSR- 引发的文库的序列标签, 与已知的 poly A- 非编码 RNA (ncRNA) 序列的综合数据库进行比对。针对在至少一个样品中以 5 个或更多个拷贝存在的小核仁 RNA (" snoRNA") (286/665) 和小核 RNA (" snRNA") (7/19) 的实质级分, 广泛检测代表多种功能分类的转录本。有趣的是, 只有一小部分的 miRNA 发夹和 tRNA 种类, 以可检测的水平被观察到。如表 12 所示, 在宽范围的表达水平上观察到个体转录本, snRNA 和 snoRNA 家族的成员具有最高丰度。

[0391] 表 12 : 全脑中由至少两个 NSR 标签序列表示的非编码 (ncRNA) 转录本的按等级排列的表达水平

[0392]

ncRNA 转录本 / 类型	Log ₁₀ 表达水平	脑表达等级 (总数 200)
HBII-52 (脑特异性 C/D 盒 snoRNA)	6.5	第 1
HBII-85 (脑特异性 C/D 盒 snoRNA)	6	第 2

U2 (snRNA)	5.8	第 3
U1 (snRNA)	5.3	第 5
U3 (snRNA)	5	第 8
U4 (snRNA)	4.8	第 10
U13 (snRNA)	3.7	第 28
U6 (snRNA)	3.5	第 33
HBII-436 (脑特异性 C/D 盒 snoRNA)	3.4	第 40
HBII-437 (脑特异性 C/D 盒 snoRNA)	3.1	第 60
HBII-438A (脑特异性 C/D 盒 snoRNA)	2.8	第 85
HBII-13 (脑特异性 C/D 盒 snoRNA)	2.7	第 90
U5 (snRNA)	2.3	第 105
U8 (snRNA)	2	第 140

[0393] 如表 13 所示,含 poly A- 转录本的 NSR- 引发的文库,包括 snRNA 和 snoRNA 家族的成员以及相应于其他已知转录本 (例如 7SK, 7SL 和小卡哈尔体 (smallcajal body) 特异性 RNA 家族的成员) 的 RNA。

[0394] 表 13 :从全脑总 RNA 构建的 NSR 引发的文库中主要非编码 (ncRNA) 类别的代表

[0395]

NSR 引发的文库中的 polyA- 转录本	文库的 %
snoRNA	60.4 %
snRNA	22.1 %
7SL	13.8 %
7SK	4.7 %
scRNA	1.3 %
miRNA	0.7 %
tRNA	0.1 %

[0396] 与从 UHR 构建的 NSR 引发的文库相比,在从全脑总 RNA 构建的 NSR 引发的文库中

发现,许多转录本被富集,包括与Prader-Willi 神经综合征相关的、位于第 15 号染色体 q11 区的 C/D 盒 snoRNA 簇 (Cavaile J. et al, J. Biol. Chem. 276 :26374-26383(2001) ;Cavaile J. et al, PNAS 97 :14311-14316(2000))。图 8 图示,相对于 UHR NSR 引发的文库,在全脑 NSR 引发的文库中,由第 15 号染色体 Prader-Willi 神经疾病基因座编码的 snoRNA 被富集。

[0397] 有趣地注意到,在本研究中检测到的显著比例的已知 ncRNA 转录本,长度少于 100 核苷酸,并且预测其具有广泛的二级结构,由此也表明, NSR- 引发可以捕获这样的模板,其被认为用传统方法难以捕获。

[0398] 转录活性的综述

[0399] 使用 NSR 引发产生的全转录组 cDNA 序列的集合,可汇编成全脑和 UHR 的全局表达图。为了汇编这样的全局表达图,基于目前的基因组注释,将所有非核糖体 RNA 标签序列,分配入六个不重叠的种类,如表 14 所示。

[0400] 表 14 :与非核糖体 RNA 基因组区匹配的 NSR- 引发的 cDNA 标签中的全转录组表达的分类

[0401]

类别	NSR 引发的全脑文库	NSR 引发的 UHR 文库
mRNA	46%	35%
内含子	19%	30%
基因间区域	12%	13%
ncRNA	4%	1%
重复序列	3%	6%
其他	16%	15%

[0402] 表 14 所示的 mRNA,内含子和基因间区域类别,由 UCSC Known Genes 的基因组坐标定义,并且仅包括与唯一位置匹配的 cDNA。与编码外显子或 UTR 的任何部分重叠的测序标签阅读,都被认为是 mRNA。与多个基因组位点匹配的测序标签阅读,被归为 ncRNA,重复序列或其他类别。

[0403] 如表 14 所示,已确定,组织和细胞系 RNA 群显示相似的总表达模式。例如,65% 的标签序列发生在已知的蛋白编码基因的界限内,而仅 12-13% 的标签序列与基因间区域匹配,这显著低于先前报道的值 (Cheng J. et al., Science 308 :1149-1154(2005))。相应于假基因和其他冗余序列的 cDNA 级分,例如基因家族内共有的基序 (表 14 中的“其他”类别),在两种样品中也相似。然而,某些类别的代表,在全脑和 UHR 之间显著不同。虽然内含子的表达在两个 RNA 群中都存在,但 UHR 中的内含子的转录活性比全脑中的高 60%。重复元件的表达,在 UHR 中也比在全脑中高。相比之下,已知 ncRNA 的累积丰度,在脑中比在 UHR 中高 3 倍。不希望受任何特定理论束缚,这些结果可反映出细胞系和组织之间的剪接活性的总体差异。可选地,这些发现可表明,转录在细胞系中通常更加普遍,并且这可能是放松的调控限制的结果。

[0404] 为了评估被归为未注释区的独特转录位点的数目,将交叠的 NSR 标签序列装配入连续转录单位。当至少一个核苷酸在任一链上交叠时,将与单个基因组位点匹配的多个测序阅读装配入单个转录本。总的来说,鉴定了超过 250 万个的转录活性区,其未被目前的转录本模型覆盖。其中,只有 21%在公众EST 数据库中得到序列的支持 (Benson,D. A. et al., Nucleic Acids Res 32-.D23-26(2004))。未注释的转录位点,长度平均为 36.9 个核苷酸,范围在 32-1003bp 之间,其中接近 5%的转录位点超过 100bp。本文鉴定的许多转录元件,可能代表新的非编码 RNA。它们也可能是之前未鉴定的已知基因的区段,包括可变剪接外显子和非翻译区的延伸序列。

[0405] 接着,通过将序列标签与已知的蛋白编码基因的功能元件进行比对,检查 NSR 引发的链特异性。与蛋白编码外显子匹配的 cDNA 序列中,超过 99%取向为有义方向,这显示出本方法监控链特异性表达的辨别力。该辨别力允许确定新转录本的取向,并评估已知基因的功能元件中反义转录的流行程度。如表 15 所示,在 5' UTR 和内含子中检测到特别高水平的反义转录,其构成了这些区域的转录事件的大约 20%。

[0406] 表 15 :获自 NSR 引发的全脑和 UHR 文库的序列阅读中,取向为有义或反义方向的 NSR 标签序列的相对频率比值

[0407]

已知基因的元件	有义阅读的相对频率比值	反义阅读的相对频率比值
5' UTR	0. 80	0. 20
编码外显子	0. 99	0. 01
3' UTR	0. 95	0. 05
内含子	0. 80	0. 20

[0408] 表 15 所示的序列类别由 UCSC 已知基因的非编码和编码区的基因组坐标定义。

[0409] 有趣地注意到,其他的组也被证实在人类和几种模式生物中具有广泛的反义表达 (Katayama S. et al.,Science 309 :1564-1566(2005) ;Ge X. et al.,Bioinformatics 22 : 2475-2479(2006) ;Zhang Y. et al., Nucleic Acid Res34 :3465-3475(2006))。在许多基因中观察到的有义和反义表达的复杂模式表明,至少一些内含子和 UTR 转录事件具有功能意义。

[0410] 讨论 :

[0411] 如本实施例所证明的,将超高通量测序应用于 NSR- 引发的 cDNA 文库,可以允许无偏地探询全局转录内容,其超过了常规方法所产生的信息范围。通过测序进行的转录本发现提供了用基因组嵌合阵列不能获得的特别的信息,所述基因组嵌合阵列往往具有不利的交叉杂交效应,其使大量的数据处理和后续的试验验证成为必须 (参见例如,Royce T. E. et al., Trends Genet 21 :466-475(2005))。然而,在高复杂的全转录组文库中获得稀有转录本的充足覆盖所需的样品深度,限制了测序迅速研究大量组织的能力。相比之下,分析表达特征谱的微阵列促进了许多样品中的转录本水平的定量分析,只要存在特征序列信息以指导探针选择。

[0412] NSR 选择性引发提供了优于传统方法的多个优点。例如, NSR 选择性引发, 在信息学测序和高通量阵列试验之间建立了直接的联系。用 NSR 选择性引发的 cDNA 文库获得的序列信息, 允许鉴定未注释的转录特征。用 NSR- 引发的文库鉴定的未注释的转录特征的功能表征, 有助于阐明广泛的生物学过程和疾病状态。

[0413] 获得自高通量测序的信息可用于教导设计全转录组阵列, 其用于与 NSR- 引发的 cDNA 杂交。例如, 定制的分析全转录组特征谱的阵列, 可用于评估在已知的转录本的背景中和彼此关联的新特征的表达模式。大规模的特征谱研究也可用于将个别转录本与人类疾病状态相关联, 并且可以扩展可用于临床研究的生物标记的库 (参见例如, van 't Veer, L.J. et al., *Nature* 415 :530-536 (2002))。此外, 将全转录组表达特征谱数据与基因连锁分析综合, 可以用于揭示由新转录元件调节的生物学活性。

[0414] 根据本发明的各种实施方案, 本实施例描述的标签测序方法的各种变化形式可用于全转录组分析。在一个实施方案中, 将配对的末端测序用于全转录组分析。配对的末端测序提供了个体 cDNA 片段的 5' 和 3' 末端之间的直接物理关联 (Ng P. et al., *Nucleic Acids Res* 34 e84 (2006); 和 Campbell, P.J. et al., *Nat Genet* 40 :722-729 (2008))。因此, 配对的末端测序允许将来自远端位点的剪接外显子毫无疑问地分配入单个转录本, 而不需要任何额外的信息。一旦确定了全转录本的结构, 便可将大规模的计算分析用于确定, 这些基因是否代表蛋白编码或非编码 RNA 实体 (Frith M.C. et al., *RNA Biol.* 3 :40-48 (2006))。

[0415] 如上所述, NSR 引发是 cDNA 消减的基本形式, 其优点是, 可简单且可重复地应用于广泛的样品。可设计 NSR 引物库以避免任何可导致混乱的、高丰度的转录本的群。例如, 可设计 NSR 引物库以避免编码球蛋白 α 和 β 亚基的 mRNA, 所述 RNA 构成了直至 70% 的全血总 RNA 量, 且可不利地影响血液特征谱分析实验的灵敏度和准确度 (参见 Li L. et al., *Physiol. Genomics* 32 :190-197 (2008))。也可设计 NSR 引物库以减少其他生物中的 rRNA 含量, 从而允许全转录组表达模式的跨物种比较。本方法可用于在原核物种中进行常规的表达特征谱分析试验, 其中不能使用 RNA 子群的 polyA 选择。

[0416] 总之, 超过 5400 万个 32- 核苷酸的标签序列的分析显示, 与常规的随机引发相比, 在第一和第二链 cDNA 合成中使用 NSR- 引发, 可产生这样的 cDNA 文库, 其广泛代表已知的 poly A+ 和 poly A- 转录本, 并且 rRNA 含量显著减少。对 NSR- 引发的文库的测序可以提供对转录的全局认识, 其包括来自先前未注释的基因组序列的反义表达和转录的广泛信息。因此, NSR 引发技术的简单性和灵活性, 使其在跨越广泛试验设置的转录组研究中, 成为超高通量测序的理想伴侣。

[0417] 虽然已解释和描述了举例说明性实施方案, 但应当理解, 其中可以进行各种变化, 而不偏离本发明精神和范围。

[0001]

序列表

<110>	Raymond, C. Armour, C. Castle, J.	
<120>	使用非随机引物的cDNA合成	
<130>	ROSA-1-31937	
<150>	US 60/983,085	
<151>	2007-10-26	
<160>	1560	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1	
	acgttt	6
<210>	2	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	2	
	ccggtt	6
<210>	3	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	3	
	gtcgtt	6
<210>	4	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	4	
	tacgtt	6

[0002]

<210> 5
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 5
aacgtt 6

<210> 6
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 6
tgtctt 6

<210> 7
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 7
gatctt 6

<210> 8
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 8
cccctt 6

<210> 9
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 9
ctactt 6

<210> 10
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0003]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	10	
cgtatt		6
<210>	11	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	11	
agtatt		6
<210>	12	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	12	
catatt		6
<210>	13	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	13	
atgatt		6
<210>	14	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	14	
gcgatt		6
<210>	15	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	15	
acgatt		6
[0004]		

<210> 16
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 16
cagatt 6

<210> 17
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 17
gtcatt 6

<210> 18
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 18
agcatt 6

<210> 19
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 19
accatt 6

<210> 20
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 20
gcaatt 6

<210> 21
<211> 6
<212> DNA

[0005]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

acaatt

6

<210> 22

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

aaaatt

6

<210> 23

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 23

tgttgt

6

<210> 24

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 24

cgttgt

6

<210> 25

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

gcgtgt

6

<210> 26

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0006]

<400> 26 gactgt	6
<210> 27 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 27 gtatgt	6
<210> 28 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 28 ctatgt	6
<210> 29 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 29 cgatgt	6
<210> 30 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 30 agatgt	6
<210> 31 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 31 taatgt	6
<210> 32	

[0007]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 32
caatgt

6

<210> 33
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 33
gctggt

6

<210> 34
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 34
gtcggg

6

<210> 35
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 35
accggt

6

<210> 36
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 36
cttcgt

6

<210> 37
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0008]

<223> 合成的	
<400> 37 cgtcgt	6
<210> 38 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 38 agtcgt	6
<210> 39 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 39 ttgcgt	6
<210> 40 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 40 ccgcgt	6
<210> 41 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 41 acgcgt	6
<210> 42 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 42 ctccgt	6
[0009]	

<210> 43
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 43
atccgt

6

<210> 44
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 44
aaccgt

6

<210> 45
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 45
gtacgt

6

<210> 46
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 46
atacgt

6

<210> 47
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 47
ggacgt

6

<210> 48
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0010]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	48	
caacgt		6
<210>	49	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	49	
aaacgt		6
<210>	50	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	50	
tgtagt		6
<210>	51	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	51	
aatagt		6
<210>	52	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	52	
atgagt		6
<210>	53	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	53	
[0011]		

cggagt	6
<210> 54	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 54	
tcgagt	6
<210> 55	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 55	
acgagt	6
<210> 56	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 56	
tacagt	6
<210> 57	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 57	
gtaagt	6
<210> 58	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 58	
ataagt	6
<210> 59	
<211> 6	

[0012]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 59
gcaagt

6

<210> 60
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 60
cgatct

6

<210> 61
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 61
catgct

6

<210> 62
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 62
ttgcct

6

<210> 63
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 63
accctt

6

<210> 64
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0013]

<400> 64
gtacct

6

<210> 65
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 65
atacct

6

<210> 66
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 66
caacct

6

<210> 67
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 67
agtact

6

<210> 68
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 68
actact

6

<210> 69
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 69
gtgact

6

[0014]

<210> 70
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 70
gagact 6

<210> 71
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 71
ctaact 6

<210> 72
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 72
cgaact 6

<210> 73
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 73
aattat 6

<210> 74
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 74
gtgtat 6

<210> 75
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0015]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	75	6
tcgtat		
<210>	76	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	76	6
gcgtat		
<210>	77	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	77	6
acgtat		
<210>	78	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	78	6
cagtat		
<210>	79	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	79	6
aactat		
<210>	80	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	80	6
atatat		

[0016]

<210> 81
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 81
cgatat 6

<210> 82
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 82
tcatat 6

<210> 83
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 83
ccatat 6

<210> 84
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 84
acatat 6

<210> 85
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 85
caatat 6

<210> 86
<211> 6
<212> DNA

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 86

aaatat

6

<210> 87

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 87

cgtgat

6

<210> 88

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 88

tatgat

6

<210> 89

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 89

gtggat

6

<210> 90

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 90

gaggat

6

<210> 91

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0018]

<400> 91 gtcgat	6
<210> 92 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 92 agcgat	6
<210> 93 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 93 tccgat	6
<210> 94 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 94 tacgat	6
<210> 95 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 95 gacgat	6
<210> 96 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 96 cacgat	6
<210> 97	

[0019]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 97
ggagat 6

<210> 98
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 98
agagat 6

<210> 99
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 99
gcagat 6

<210> 100
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 100
tgtcat 6

<210> 101
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 101
cgtcat 6

<210> 102
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0020]

<223> 合成的	
<400> 102 gctcat	6
<210> 103 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 103 gtgcat	6
<210> 104 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 104 gcgcat	6
<210> 105 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 105 tcccat	6
<210> 106 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 106 gaccat	6
<210> 107 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 107 ttacat	6

[0021]

<210> 108
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 108
gtacat 6

<210> 109
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 109
atacat 6

<210> 110
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 110
cgtaat 6

<210> 111
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 111
cctaata 6

<210> 112
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 112
gataat 6

<210> 113
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0022]

<220>

<223> 合成的

<400> 113

atgaat

6

<210> 114

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 114

ccgaat

6

<210> 115

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 115

ggcaat

6

<210> 116

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 116

agcaat

6

<210> 117

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 117

cccaat

6

<210> 118

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 118

[0023]

accaat 6

<210> 119
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 119
tacaat 6

<210> 120
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 120
gacaat 6

<210> 121
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 121
taaaat 6

<210> 122
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 122
aaaaat 6

<210> 123
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 123
atgttg 6

<210> 124
<211> 6

[0024]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 124
cggttg

6

<210> 125
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 125
cgattg

6

<210> 126
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 126
gaattg

6

<210> 127
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 127
actgtg

6

<210> 128
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 128
tatgtg

6

<210> 129
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0025]

<400> 129
aatgtg

6

<210> 130
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 130
tcggtg

6

<210> 131
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 131
taggtg

6

<210> 132
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 132
gtcgtg

6

<210> 133
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 133
tgagtg

6

<210> 134
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 134
agagtg

6

[0026]

<210> 135
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 135
ccagtg 6

<210> 136
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 136
taagtg 6

<210> 137
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 137
actctg 6

<210> 138
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 138
catctg 6

<210> 139
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 139
atgctg 6

<210> 140
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0027]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	140	
ttcctg		6
<210>	141	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	141	
tacctg		6
<210>	142	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	142	
agactg		6
<210>	143	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	143	
gaactg		6
<210>	144	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	144	
tgtatg		6
<210>	145	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	145	
cgtatg		6

[0028]

<210> 146
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 146
agtatg

6

<210> 147
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 147
tctatg

6

<210> 148
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 148
cctatg

6

<210> 149
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 149
cggatg

6

<210> 150
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 150
aggatg

6

<210> 151
<211> 6
<212> DNA

[0029]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 151	
tcgatg	6
<210> 152	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 152	
ccgatg	6
<210> 153	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 153	
acgatg	6
<210> 154	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 154	
cgcatg	6
<210> 155	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 155	
tacatg	6
<210> 156	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
[0030]	

<400> 156
gtaatg 6

<210> 157
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 157
ctaatg 6

<210> 158
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 158
tgaatg 6

<210> 159
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 159
gcaatg 6

<210> 160
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 160
ggatgg 6

<210> 161
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 161
cgatgg 6

<210> 162

[0031]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 162
taatgg

6

<210> 163
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 163
aagcgg

6

<210> 164
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 164
aaccgg

6

<210> 165
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 165
atacgg

6

<210> 166
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 166
tgtagg

6

<210> 167
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0032]

<223> 合成的	
<400> 167 tgaagg	6
<210> 168 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 168 atttcg	6
<210> 169 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 169 tgttcg	6
<210> 170 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 170 aattcg	6
<210> 171 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 171 ctgtcg	6
<210> 172 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 172 tagtcg	6
[0033]	

<210> 173
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 173
gagtcg 6

<210> 174
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 174
atatcg 6

<210> 175
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 175
tcatcg 6

<210> 176
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 176
gatgcg 6

<210> 177
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 177
aacgcg 6

<210> 178
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0034]

<220>
<223> 合成的

<400> 178
catccg

6

<210> 179
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 179
aatccg

6

<210> 180
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 180
atgccg

6

<210> 181
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 181
aggccg

6

<210> 182
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 182
ataccg

6

<210> 183
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 183

[0035]

agaccg	6
<210> 184	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 184	
taaccg	6
<210> 185	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 185	
attacg	6
<210> 186	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 186	
agtacg	6
<210> 187	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 187	
gatacg	6
<210> 188	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 188	
catacg	6
<210> 189	
<211> 6	

[0036]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 189
tcgacg 6

<210> 190
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 190
gtcacg 6

<210> 191
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 191
tacacg 6

<210> 192
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 192
acaacg 6

<210> 193
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 193
gaaacg 6

<210> 194
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0037]

<400> 194 cttttag	6
<210> 195 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 195 cgtttag	6
<210> 196 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 196 ctgtag	6
<210> 197 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 197 ccgtag	6
<210> 198 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 198 gtctag	6
<210> 199 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 199 cgctag	6

[0038]

<210> 200
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 200
agctag

6

<210> 201
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 201
gcctag

6

<210> 202
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 202
ttatag

6

<210> 203
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 203
cgatag

6

<210> 204
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 204
ttcgag

6

<210> 205
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0039]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	205	
ctcgag		6
<210>	206	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	206	
aacgag		6
<210>	207	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	207	
gtagag		6
<210>	208	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	208	
atagag		6
<210>	209	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	209	
tgagag		6
<210>	210	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	210	
acagag		6

[0040]

<210> 211
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 211
aatcag

6

<210> 212
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 212
gcgcag

6

<210> 213
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 213
taccag

6

<210> 214
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 214
ctacag

6

<210> 215
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 215
cgacag

6

<210> 216
<211> 6
<212> DNA

[0041]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 216

gcacag

6

<210> 217

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 217

gttaag

6

<210> 218

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 218

tgtaag

6

<210> 219

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 219

cgtaag

6

<210> 220

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 220

cctaag

6

<210> 221

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0042]

<400> 221
tataag 6

<210> 222
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 222
gataag 6

<210> 223
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 223
aataag 6

<210> 224
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 224
tggaag 6

<210> 225
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 225
tagaag 6

<210> 226
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 226
gagaag 6

<210> 227

[0043]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 227
gtaaag

6

<210> 228
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 228
gatttc

6

<210> 229
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 229
atattc

6

<210> 230
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 230
cgattc

6

<210> 231
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 231
tacgtc

6

<210> 232
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0044]

<223> 合成的

<400> 232
ctagtc

6

<210> 233
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 233
cgagtc

6

<210> 234
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 234
caagtc

6

<210> 235
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 235
aaagtc

6

<210> 236
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 236
attctc

6

<210> 237
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 237
cgtctc

6

[0045]

<210> 238
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 238
tatctc

6

<210> 239
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 239
agcctc

6

<210> 240
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 240
gtactc

6

<210> 241
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 241
tgactc

6

<210> 242
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 242
taactc

6

<210> 243
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0046]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	243	
attatc		6
<210>	244	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	244	
tgtatc		6
<210>	245	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	245	
agtatc		6
<210>	246	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	246	
catatc		6
<210>	247	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	247	
gtcatc		6
<210>	248	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	248	
[0047]		

ctcatc	6
<210> 249	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 249	
tccatc	6
<210> 250	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 250	
tacatc	6
<210> 251	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 251	
cgaatc	6
<210> 252	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 252	
tgttgc	6
<210> 253	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 253	
ctgtgc	6
<210> 254	
<211> 6	

[0048]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 254
tagtgc 6

<210> 255
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 255
gtatgc 6

<210> 256
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 256
ctatgc 6

<210> 257
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 257
caatgc 6

<210> 258
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 258
gttggc 6

<210> 259
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0049]

<400> 259 aatggc	6
<210> 260 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 260 taaggc	6
<210> 261 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 261 agtcgc	6
<210> 262 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 262 aagcgc	6
<210> 263 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 263 ctacgc	6
<210> 264 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 264 gctagc	6

[0050]

<210>	265	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	265	
actagc		6
<210>	266	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	266	
gatagc		6
<210>	267	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	267	
catagc		6
<210>	268	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	268	
tcgagc		6
<210>	269	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	269	
atcagc		6
<210>	270	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0051]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	270	
tacagc		6
<210>	271	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	271	
cacagc		6
<210>	272	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	272	
gtaagc		6
<210>	273	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	273	
ataagc		6
<210>	274	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	274	
gcttcc		6
<210>	275	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	275	
acgtcc		6

[0052]

<210> 276
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 276
aagtcc

6

<210> 277
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 277
gatgcc

6

<210> 278
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 278
ctagcc

6

<210> 279
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 279
atagcc

6

<210> 280
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 280
acagcc

6

<210> 281
<211> 6
<212> DNA

[0053]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 281

agtccc

6

<210> 282

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 282

gtaccc

6

<210> 283

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 283

ctaccc

6

<210> 284

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 284

cgtacc

6

<210> 285

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 285

agtacc

6

<210> 286

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0054]

<400> 286 cctacc	6
<210> 287 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 287 gatacc	6
<210> 288 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 288 aatacc	6
<210> 289 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 289 tggacc	6
<210> 290 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 290 gtaacc	6
<210> 291 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 291 tattac	6
<210> 292	

[0055]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 292
cattac

6

<210> 293
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 293
ttgtac

6

<210> 294
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 294
tagtac

6

<210> 295
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 295
gagtac

6

<210> 296
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 296
aagtac

6

<210> 297
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0056]

<223> 合成的

<400> 297

atctac

6

<210> 298

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 298

ccctac

6

<210> 299

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 299

ggatac

6

<210> 300

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 300

cgatac

6

<210> 301

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 301

agatac

6

<210> 302

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 302

gcatac

6

[0057]

<210> 303
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 303
gaatac

6

<210> 304
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 304
aaatac

6

<210> 305
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 305
agtgac

6

<210> 306
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 306
cctgac

6

<210> 307
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 307
catgac

6

<210> 308
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0058]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	308	
tgggac		6
<210>	309	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	309	
gtcgac		6
<210>	310	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	310	
atcgac		6
<210>	311	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	311	
tgcgac		6
<210>	312	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	312	
aacgac		6
<210>	313	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	313	

[0059]

ctagac	6
<210> 314	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 314	
taagac	6
<210> 315	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 315	
tcgcac	6
<210> 316	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 316	
aaccac	6
<210> 317	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 317	
agacac	6
<210> 318	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 318	
gttaac	6
<210> 319	
<211> 6	

[0060]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 319
tctaac 6

<210> 320
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 320
gctaac 6

<210> 321
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 321
tataac 6

<210> 322
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 322
ccgaac 6

<210> 323
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 323
cgcaac 6

<210> 324
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0061]

<400> 324 cacaac	6
<210> 325 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 325 ataaac	6
<210> 326 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 326 tgaaac	6
<210> 327 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 327 gcaaac	6
<210> 328 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 328 atttta	6
<210> 329 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 329 tgttta	6

[0062]

<210> 330
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 330
acgtta

6

<210> 331
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 331
gagtta

6

<210> 332
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 332
aactta

6

<210> 333
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 333
agatta

6

<210> 334
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 334
gttgta

6

<210> 335
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0063]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	335	
cttgta		6
<210>	336	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	336	
cgtgta		6
<210>	337	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	337	
tatgta		6
<210>	338	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	338	
gatgta		6
<210>	339	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	339	
gaggta		6
<210>	340	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	340	
agcgta		6

[0064]

<210> 341
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 341
cccgta

6

<210> 342
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 342
accgta

6

<210> 343
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 343
gacgta

6

<210> 344
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 344
aacgta

6

<210> 345
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 345
ctagta

6

<210> 346
<211> 6
<212> DNA

[0065]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 346

ggagta

6

<210> 347

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 347

cgagta

6

<210> 348

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 348

acagta

6

<210> 349

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 349

taagta

6

<210> 350

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 350

gtgcta

6

<210> 351

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0066]

<400> 351 gcgcta	6
<210> 352 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 352 aagcta	6
<210> 353 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 353 atccta	6
<210> 354 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 354 tgccta	6
<210> 355 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 355 gcacta	6
<210> 356 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 356 acacta	6
<210> 357 [0067]	

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 357
tttata 6

<210> 358
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 358
attata 6

<210> 359
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 359
tgtata 6

<210> 360
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 360
cgtata 6

<210> 361
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 361
gatata 6

<210> 362
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0068]

<223> 合成的

<400> 362
catata

6

<210> 363
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 363
aggata

6

<210> 364
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 364
tcgata

6

<210> 365
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 365
gcgata

6

<210> 366
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 366
ccgata

6

<210> 367
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 367
acgata

6

[0069]

<210> 368
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 368
gagata 6

<210> 369
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 369
aagata 6

<210> 370
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 370
ctcata 6

<210> 371
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 371
atcata 6

<210> 372
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 372
tgcata 6

<210> 373
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0070]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	373	
cgcata		6
<210>	374	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	374	
gacata		6
<210>	375	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	375	
aacata		6
<210>	376	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	376	
cgaata		6
<210>	377	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	377	
ccaata		6
<210>	378	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	378	

[0071]

acaata	6
<210> 379	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 379	
taaata	6
<210> 380	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 380	
caaata	6
<210> 381	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 381	
gattga	6
<210> 382	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 382	
atgtga	6
<210> 383	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 383	
cgggtga	6
<210> 384	
<211> 6	

[0072]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 384
ccgtga 6

<210> 385
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 385
acgtga 6

<210> 386
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 386
gagtga 6

<210> 387
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 387
acctga 6

<210> 388
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 388
cactga 6

<210> 389
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0073]

<400> 389 ggatga	6
<210> 390 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 390 cgatga	6
<210> 391 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 391 tcatga	6
<210> 392 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 392 gcatga	6
<210> 393 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 393 acatga	6
<210> 394 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 394 gaatga	6
[0074]	

<210> 395
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 395
tgtgga 6

<210> 396
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 396
ctggga 6

<210> 397
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 397
attcga 6

<210> 398
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 398
cgtcga 6

<210> 399
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 399
agtcga 6

<210> 400
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0075]

<220>
<223> 合成的

<400> 400
gctcga

6

<210> 401
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 401
actcga

6

<210> 402
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 402
gatcga

6

<210> 403
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 403
ttgcga

6

<210> 404
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 404
atgcga

6

<210> 405
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 405
acgcga

6

[0076]

<210> 406
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 406
gtccga

6

<210> 407
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 407
cgacga

6

<210> 408
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 408
agacga

6

<210> 409
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 409
acacga

6

<210> 410
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 410
taacga

6

<210> 411
<211> 6
<212> DNA

[0077]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 411

gaacga

6

<210> 412

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 412

caacga

6

<210> 413

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 413

cgtaga

6

<210> 414

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 414

cctaga

6

<210> 415

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 415

tataga

6

<210> 416

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0078]

<400> 416
gtgaga 6

<210> 417
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 417
atgaga 6

<210> 418
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 418
acgaga 6

<210> 419
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 419
tagaga 6

<210> 420
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 420
cagaga 6

<210> 421
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 421
cgcaga 6

<210> 422

[0079]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 422
aacaga 6

<210> 423
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 423
ataaga 6

<210> 424
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 424
cgaaga 6

<210> 425
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 425
acaaga 6

<210> 426
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 426
taaaga 6

<210> 427
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0080]

<223> 合成的

<400> 427

gattca

6

<210> 428

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 428

ccctca

6

<210> 429

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 429

tactca

6

<210> 430

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 430

gtatca

6

<210> 431

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 431

tgatca

6

<210> 432

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 432

caatca

6

[0081]

<210> 433
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 433
gttgca 6

<210> 434
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 434
tgtgca 6

<210> 435
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 435
ccggca 6

<210> 436
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 436
gtcgca 6

<210> 437
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 437
tgcgca 6

<210> 438
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0082]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	438	
agcgca		6
<210>	439	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	439	
tacgca		6
<210>	440	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	440	
gtagca		6
<210>	441	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	441	
atagca		6
<210>	442	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	442	
ggagca		6
<210>	443	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	443	

[0083]

aaagca	6
<210> 444	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 444	
gtccca	6
<210> 445	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 445	
gtacca	6
<210> 446	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 446	
atacca	6
<210> 447	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 447	
cttaca	6
<210> 448	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 448	
ggtaca	6
<210> 449	
<211> 6	

[0084]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 449
actaca

6

<210> 450
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 450
tataca

6

<210> 451
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 451
gataca

6

<210> 452
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 452
aataca

6

<210> 453
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 453
gtgaca

6

<210> 454
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0085]

<400> 454 atgaca	6
<210> 455 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 455 tcgaca	6
<210> 456 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 456 gcgaca	6
<210> 457 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 457 acgaca	6
<210> 458 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 458 aagaca	6
<210> 459 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 459 tgcaca	6

[0086]

<210> 460
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 460
gacaca 6

<210> 461
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 461
ttaaca 6

<210> 462
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 462
cgaaca 6

<210> 463
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 463
caaaca 6

<210> 464
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 464
gtttaa 6

<210> 465
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0087]

<220>
<223> 合成的

<400> 465
tattaa

6

<210> 466
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 466
ttgtaa

6

<210> 467
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 467
atgtaa

6

<210> 468
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 468
cggtaa

6

<210> 469
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 469
aggtaa

6

<210> 470
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 470
ccgtaa

6

[0088]

<210> 471
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 471
acgtaa 6

<210> 472
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 472
gagtaa 6

<210> 473
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 473
cgctaa 6

<210> 474
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 474
gcctaa 6

<210> 475
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 475
ccctaa 6

<210> 476
<211> 6
<212> DNA

[0089]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 476	
cgataa	6
<210> 477	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 477	
agataa	6
<210> 478	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 478	
gcataa	6
<210> 479	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 479	
acataa	6
<210> 480	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 480	
caataa	6
<210> 481	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
[0090]	

<400> 481 cgtgaa	6
<210> 482 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 482 gatgaa	6
<210> 483 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 483 catgaa	6
<210> 484 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 484 ttggaa	6
<210> 485 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 485 tgcgaa	6
<210> 486 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 486 agcgaa	6
<210> 487	

[0091]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 487
ttagaa

6

<210> 488
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 488
cctcaa

6

<210> 489
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 489
catcaa

6

<210> 490
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 490
ctgcaa

6

<210> 491
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 491
atgcaa

6

<210> 492
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0092]

<223> 合成的	
<400> 492 cggcaa	6
<210> 493 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 493 tcgcaa	6
<210> 494 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 494 ccgcaa	6
<210> 495 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 495 tagcaa	6
<210> 496 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 496 atacaa	6
<210> 497 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 497 tgacaa	6

[0093]

<210> 498
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 498
cgacaa 6

<210> 499
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 499
gcacaa 6

<210> 500
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 500
acacaa 6

<210> 501
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 501
taacaa 6

<210> 502
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 502
aaacaa 6

<210> 503
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0094]

<220>
<223> 合成的

<400> 503
tgtaaa

6

<210> 504
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 504
cctaaa

6

<210> 505
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 505
cataaa

6

<210> 506
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 506
gcgaaa

6

<210> 507
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 507
cgcaaa

6

<210> 508
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 508

[0095]

ggaaaa	6
<210> 509	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 509	
gcaaaa	6
<210> 510	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 510	
taaaaa	6
<210> 511	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 511	
acattt	6
<210> 512	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 512	
tctgtt	6
<210> 513	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 513	
ttgctt	6
<210> 514	
<211> 6	

[0096]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 514	
gacctt	6
<210> 515	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 515	
gaactt	6
<210> 516	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 516	
cacatt	6
<210> 517	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 517	
atttgt	6
<210> 518	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 518	
tggtgt	6
<210> 519	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	

[0097]

<400> 519 gagtgt	6
<210> 520 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 520 aagtgt	6
<210> 521 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 521 ctctgt	6
<210> 522 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 522 ttatgt	6
<210> 523 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 523 ctgggt	6
<210> 524 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 524 aagggt	6

[0098]

<210>	525	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	525	6
	tgtcgt	
<210>	526	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	526	6
	tggcgt	
<210>	527	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	527	6
	cagcgt	
<210>	528	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	528	6
	tgacgt	
<210>	529	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	529	6
	ctgagt	
<210>	530	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0099]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	530	
tgcagt		6
<210>	531	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	531	
ggcagt		6
<210>	532	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	532	
ggaagt		6
<210>	533	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	533	
acttct		6
<210>	534	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	534	
gtgtct		6
<210>	535	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	535	
tggtct		6

[0100]

<210> 536
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 536
aggtct 6

<210> 537
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 537
gcgtct 6

<210> 538
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 538
cagtct 6

<210> 539
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 539
gcatct 6

<210> 540
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 540
gttgct 6

<210> 541
<211> 6
<212> DNA

[0101]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	541	
ggtgct		6
<210>	542	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	542	
acggct		6
<210>	543	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	543	
catcct		6
<210>	544	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	544	
gagcct		6
<210>	545	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	545	
cagcct		6
<210>	546	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
[0102]		

<400> 546 aagcct	6
<210> 547 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 547 taccct	6
<210> 548 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 548 gatact	6
<210> 549 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 549 accact	6
<210> 550 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 550 ttttat	6
<210> 551 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 551 atttat	6
<210> 552	

[0103]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 552
tccttat

6

<210> 553
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 553
ttgtat

6

<210> 554
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 554
attgat

6

<210> 555
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 555
tgtgat

6

<210> 556
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 556
catgat

6

<210> 557
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0104]

<223> 合成的

<400> 557
ccagat

6

<210> 558
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 558
gatcat

6

<210> 559
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 559
tggcat

6

<210> 560
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 560
cagcat

6

<210> 561
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 561
gtccat

6

<210> 562
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 562
tgccat

6

[0105]

<210> 563
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 563
gaacat

6

<210> 564
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 564
agtaat

6

<210> 565
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 565
gtgaat

6

<210> 566
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 566
ctgaat

6

<210> 567
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 567
cagaat

6

<210> 568
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0106]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	568	
tgaaat		6
<210>	569	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	569	
gcgttg		6
<210>	570	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	570	
acgttg		6
<210>	571	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	571	
cagttg		6
<210>	572	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	572	
gccttg		6
<210>	573	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	573	

[0107]

gttgtg 6

<210> 574
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 574
agtgtg 6

<210> 575
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 575
atggtg 6

<210> 576
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 576
acggtg 6

<210> 577
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 577
agcgtg 6

<210> 578
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 578
gcagtg 6

<210> 579
<211> 6

[0108]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 579
gaagtg

6

<210> 580
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 580
agtctg

6

<210> 581
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 581
tctctg

6

<210> 582
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 582
agcctg

6

<210> 583
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 583
ccactg

6

<210> 584
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0109]

<400> 584
acactg 6

<210> 585
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 585
atgatg 6

<210> 586
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 586
tcaatg 6

<210> 587
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 587
ttgtgg 6

<210> 588
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 588
atctgg 6

<210> 589
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 589
tgatgg 6

[0110]

<210> 590
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 590
gatggg

6

<210> 591
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 591
cagggg

6

<210> 592
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 592
tgcggg

6

<210> 593
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 593
tgtcgg

6

<210> 594
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 594
aaacgg

6

<210> 595
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0111]

<220>
<223> 合成的

<400> 595
attagg

6

<210> 596
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 596
tctagg

6

<210> 597
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 597
cacagg

6

<210> 598
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 598
atgtcg

6

<210> 599
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 599
aactcg

6

<210> 600
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 600
gttgcg

6

[0112]

<210> 601
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 601
tgtgcg 6

<210> 602
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 602
agtgcg 6

<210> 603
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 603
acagcg 6

<210> 604
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 604
ttgacg 6

<210> 605
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 605
agcacg 6

<210> 606
<211> 6
<212> DNA

[0113]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 606

accacg

6

<210> 607

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 607

gtaacg

6

<210> 608

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 608

acctag

6

<210> 609

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 609

tgtgag

6

<210> 610

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 610

catgag

6

<210> 611

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0114]

<400> 611 caggag	6
<210> 612 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 612 aaggag	6
<210> 613 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 613 gcagag	6
<210> 614 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 614 gctcag	6
<210> 615 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 615 tatcag	6
<210> 616 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 616 ttgcag	6
<210> 617	

[0115]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 617
aggcag

6

<210> 618
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 618
tagcag

6

<210> 619
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 619
cagcag

6

<210> 620
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 620
gaccag

6

<210> 621
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 621
acacag

6

<210> 622
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0116]

<223>	合成的	
<400>	622	
ctcaag		6
<210>	623	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	623	
tgcaag		6
<210>	624	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	624	
ataaag		6
<210>	625	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	625	
tgaaag		6
<210>	626	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	626	
ggtgtc		6
<210>	627	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	627	
tatgtc		6

[0117]

<210> 628
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 628
taggtc

6

<210> 629
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 629
ggcgtc

6

<210> 630
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 630
ggagtc

6

<210> 631
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 631
gcagtc

6

<210> 632
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 632
gatctc

6

<210> 633
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0118]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	633	
atgctc		6
<210>	634	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	634	
cctatc		6
<210>	635	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	635	
aatatc		6
<210>	636	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	636	
tgcac		6
<210>	637	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	637	
agaatc		6
<210>	638	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	638	
[0119]		

ggttgc	6
<210> 639	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 639	
cgttgc	6
<210> 640	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 640	
agttgc	6
<210> 641	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 641	
ttgtgc	6
<210> 642	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 642	
atgtgc	6
<210> 643	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 643	
aggtgc	6
<210> 644	
<211> 6	

[0120]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 644
cagtgc 6

<210> 645
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 645
agatgc 6

<210> 646
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 646
tatggc 6

<210> 647
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 647
gtgagc 6

<210> 648
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 648
ggcagc 6

<210> 649
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0121]

<400> 649 agcagc	6
<210> 650 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 650 aacagc	6
<210> 651 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 651 cgaagc	6
<210> 652 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 652 gaaagc	6
<210> 653 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 653 atttcc	6
<210> 654 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 654 atatcc	6
[0122]	

<210> 655
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 655
acatcc

6

<210> 656
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 656
gttgcc

6

<210> 657
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 657
attgcc

6

<210> 658
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 658
tgtgcc

6

<210> 659
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 659
agtgcc

6

<210> 660
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0123]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	660	
tctgcc		6
<210>	661	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	661	
ctggcc		6
<210>	662	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	662	
caggcc		6
<210>	663	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	663	
aaggcc		6
<210>	664	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	664	
gaagcc		6
<210>	665	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	665	
tacccc		6

[0124]

<210> 666
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 666
cataacc

6

<210> 667
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 667
tagacc

6

<210> 668
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 668
ataacc

6

<210> 669
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 669
tggtag

6

<210> 670
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 670
tgatac

6

<210> 671
<211> 6
<212> DNA

[0125]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 671

gtagac

6

<210> 672

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 672

tcagac

6

<210> 673

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 673

attcac

6

<210> 674

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 674

tagcac

6

<210> 675

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 675

cagcac

6

<210> 676

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0126]

<400> 676 gaccac	6
<210> 677 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 677 agtaac	6
<210> 678 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 678 gataac	6
<210> 679 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 679 caaaac	6
<210> 680 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 680 ttatta	6
<210> 681 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 681 gcagta	6
<210> 682	

[0127]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 682
aatcta

6

<210> 683
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 683
agccta

6

<210> 684
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 684
gccata

6

<210> 685
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 685
cccata

6

<210> 686
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 686
gaaata

6

<210> 687
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0128]

<223> 合成的

<400> 687
ctgtga

6

<210> 688
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 688
tagtga

6

<210> 689
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 689
ctctga

6

<210> 690
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 690
gcctga

6

<210> 691
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 691
ccatga

6

<210> 692
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 692
aatga

6

[0129]

<210> 693
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 693
gttgga 6

<210> 694
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 694
tctgga 6

<210> 695
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 695
acagga 6

<210> 696
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 696
caagga 6

<210> 697
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 697
ggtcga 6

<210> 698
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0130]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	698	6
taccga		
<210>	699	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	699	6
caccga		
<210>	700	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	700	6
ctgaga		
<210>	701	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	701	6
agcaga		
<210>	702	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	702	6
gacaga		
<210>	703	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	703	

[0131]

agaaga	6
<210> 704	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 704	
acttca	6
<210> 705	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 705	
tattca	6
<210> 706	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 706	
atgtca	6
<210> 707	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 707	
cggcca	6
<210> 708	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 708	
aagtca	6
<210> 709	
<211> 6	

[0132]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 709	
atctca	6
<210> 710	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 710	
cgctca	6
<210> 711	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 711	
ttatca	6
<210> 712	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 712	
gaatca	6
<210> 713	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 713	
ggtgca	6
<210> 714	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	

[0133]

<400> 714 cctgca	6
<210> 715 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 715 gatgca	6
<210> 716 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 716 gtggca	6
<210> 717 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 717 acggca	6
<210> 718 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 718 ctagca	6
<210> 719 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 719 tcagca	6

[0134]

<210> 720
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 720
ccagca

6

<210> 721
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 721
acagca

6

<210> 722
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 722
agtcca

6

<210> 723
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 723
actcca

6

<210> 724
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 724
ctgcca

6

<210> 725
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0135]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	725	
tagcca		6
<210>	726	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	726	
agacca		6
<210>	727	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	727	
gtcaca		6
<210>	728	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	728	
tccaca		6
<210>	729	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	729	
cacaca		6
<210>	730	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	730	
ataaca		6

[0136]

<210> 731
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 731
gaaaca

6

<210> 732
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 732
cagtaa

6

<210> 733
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 733
aaataa

6

<210> 734
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 734
cctgaa

6

<210> 735
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 735
caggaa

6

<210> 736
<211> 6
<212> DNA

[0137]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 736

gtcgaa

6

<210> 737

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 737

gccgaa

6

<210> 738

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 738

gaagaa

6

<210> 739

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 739

attcaa

6

<210> 740

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 740

tctcaa

6

<210> 741

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0138]

<400> 741 actcaa	6
<210> 742 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 742 gtgcaa	6
<210> 743 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 743 tgccaa	6
<210> 744 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 744 gcccaa	6
<210> 745 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 745 ttgaaa	6
<210> 746 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 746 aggaaa	6
<210> 747	

[0139]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 747
ctcaaa

6

<210> 748
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 748
agcaaa

6

<210> 749
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 749
gccaaa

6

<210> 750
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 750
aaacgt

6

<210> 751
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 751
aaccgg

6

<210> 752
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0140]

<223> 合成的

<400> 752
aacgac

6

<210> 753
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 753
aacgta

6

<210> 754
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 754
aacgtt

6

<210> 755
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 755
aagaca

6

<210> 756
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 756
aagatc

6

<210> 757
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 757
aagggg

6

[0141]

<210> 758
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 758
aagtag

6

<210> 759
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 759
aatacgc

6

<210> 760
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 760
aatact

6

<210> 761
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 761
aatatgc

6

<210> 762
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 762
aatcat

6

<210> 763
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0142]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	763	
aatcgc		6
<210>	764	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	764	
aatcgt		6
<210>	765	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	765	
aatctg		6
<210>	766	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	766	
aatgac		6
<210>	767	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	767	
aatgct		6
<210>	768	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	768	

[0143]

aatggt	6
<210> 769	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 769	
aattgc	6
<210> 770	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 770	
aattgt	6
<210> 771	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 771	
aatttt	6
<210> 772	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 772	
acaaca	6
<210> 773	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 773	
acaacg	6
<210> 774	
<211> 6	

[0144]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 774
acacgc

6

<210> 775
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 775
acagtc

6

<210> 776
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 776
acatac

6

<210> 777
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 777
acatag

6

<210> 778
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 778
acatcg

6

<210> 779
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0145]

<400> 779 acatct	6
<210> 780 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 780 acatta	6
<210> 781 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 781 acattg	6
<210> 782 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 782 accagc	6
<210> 783 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 783 accgac	6
<210> 784 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 784 accggt	6

[0146]

<210>	785	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	785	
acgaag		6
<210>	786	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	786	
acgacg		6
<210>	787	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	787	
acgact		6
<210>	788	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	788	
acgcaa		6
<210>	789	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	789	
acgcgg		6
<210>	790	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0147]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	790	
acgcgt		6
<210>	791	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	791	
acggag		6
<210>	792	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	792	
acggat		6
<210>	793	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	793	
acggtt		6
<210>	794	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	794	
acgtac		6
<210>	795	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	795	
acgtat		6

[0148]

<210> 796
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 796
acgtcc

6

<210> 797
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 797
acgttg

6

<210> 798
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 798
acgttt

6

<210> 799
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 799
actaca

6

<210> 800
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 800
actatt

6

<210> 801
<211> 6
<212> DNA

[0149]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 801

actcat

6

<210> 802

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 802

actccg

6

<210> 803

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 803

actcga

6

<210> 804

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 804

actcgt

6

<210> 805

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 805

actgta

6

<210> 806

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0150]

<400> 806 acttac	6
<210> 807 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 807 acttat	6
<210> 808 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 808 acttgc	6
<210> 809 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 809 agatcg	6
<210> 810 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 810 agcatg	6
<210> 811 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 811 aggcaa	6
<210> 812	

[0151]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 812
aggggt 6

<210> 813
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 813
aggtac 6

<210> 814
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 814
aggtat 6

<210> 815
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 815
aggttg 6

<210> 816
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 816
agtact 6

<210> 817
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0152]

<223> 合成的

<400> 817
agtagt

6

<210> 818

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 818
agtcac

6

<210> 819

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 819
agtctc

6

<210> 820

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 820
agttag

6

<210> 821

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 821
agttcg

6

<210> 822

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 822
ataatt

6

[0153]

<210> 823
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 823
atacac

6

<210> 824
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 824
atacga

6

<210> 825
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 825
atacgc

6

<210> 826
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 826
atacgt

6

<210> 827
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 827
atactg

6

<210> 828
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0154]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	828	
atagtt		6
<210>	829	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	829	
atatat		6
<210>	830	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	830	
atatcg		6
<210>	831	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	831	
atatga		6
<210>	832	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	832	
atatgg		6
<210>	833	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	833	

[0155]

atatgt	6
<210> 834	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 834	
atattg	6
<210> 835	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 835	
atattt	6
<210> 836	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 836	
atcacg	6
<210> 837	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 837	
atcata	6
<210> 838	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 838	
atccac	6
<210> 839	
<211> 6	

[0156]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 839	
atcctc	6
<210> 840	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 840	
atcgac	6
<210> 841	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 841	
atcgct	6
<210> 842	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 842	
atcgga	6
<210> 843	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 843	
atcgta	6
<210> 844	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	

[0157]

<400> 844 atcgtc	6
<210> 845 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 845 atcgtg	6
<210> 846 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 846 atctcc	6
<210> 847 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 847 atctct	6
<210> 848 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 848 atctgc	6
<210> 849 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 849 atgaca	6

[0158]

<210> 850
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 850
atgacg

6

<210> 851
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 851
atgagc

6

<210> 852
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 852
atgcac

6

<210> 853
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 853
atgcgc

6

<210> 854
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 854
atggga

6

<210> 855
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0159]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	855	
atggtc		6
<210>	856	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	856	
atgtaa		6
<210>	857	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	857	
atgtac		6
<210>	858	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	858	
atgtat		6
<210>	859	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	859	
attacg		6
<210>	860	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	860	
attagg		6

[0160]

<210> 861
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 861
attatc

6

<210> 862
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 862
attcat

6

<210> 863
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 863
attcgg

6

<210> 864
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 864
attgcc

6

<210> 865
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 865
attgct

6

<210> 866
<211> 6
<212> DNA

[0161]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 866

attggg

6

<210> 867

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 867

attggt

6

<210> 868

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 868

attgta

6

<210> 869

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 869

attgtc

6

<210> 870

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 870

atttta

6

<210> 871

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0162]

<400> 871 attttt	6
<210> 872 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 872 caacat	6
<210> 873 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 873 caaccg	6
<210> 874 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 874 caatcg	6
<210> 875 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 875 caattc	6
<210> 876 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 876 cacagt	6
<210> 877	

[0163]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 877
cacata

6

<210> 878
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 878
cacatt

6

<210> 879
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 879
caccga

6

<210> 880
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 880
caccta

6

<210> 881
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 881
cacgac

6

<210> 882
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0164]

<223> 合成的

<400> 882
cactca

6

<210> 883

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 883
cactct

6

<210> 884

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 884
cactgg

6

<210> 885

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 885
cactta

6

<210> 886

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 886
cagagt

6

<210> 887

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 887
cagatg

6

[0165]

<210> 888
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 888
cagcat

6

<210> 889
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 889
caggaa

6

<210> 890
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 890
caggta

6

<210> 891
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 891
cagtct

6

<210> 892
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 892
cagttc

6

<210> 893
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0166]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	893	
cataca		6
<210>	894	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	894	
catacg		6
<210>	895	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	895	
catact		6
<210>	896	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	896	
cataga		6
<210>	897	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	897	
catagg		6
<210>	898	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	898	

[0167]

catccg	6
<210> 899	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 899	
catcct	6
<210> 900	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 900	
catcga	6
<210> 901	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 901	
catcgg	6
<210> 902	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 902	
catcgt	6
<210> 903	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 903	
catgcg	6
<210> 904	
<211> 6	

[0168]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 904
catgta

6

<210> 905
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 905
cattac

6

<210> 906
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 906
cattag

6

<210> 907
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 907
cattca

6

<210> 908
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 908
cattgc

6

<210> 909
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0169]

<400> 909 ccatcc	6
<210> 910 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 910 ccatcg	6
<210> 911 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 911 ccatta	6
<210> 912 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 912 ccgctt	6
<210> 913 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 913 ccggtt	6
<210> 914 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 914 ccgtat	6

[0170]

<210> 915
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 915
cctaca 6

<210> 916
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 916
ccttca 6

<210> 917
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 917
cgaaat 6

<210> 918
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 918
cgaaca 6

<210> 919
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 919
cgaatt 6

<210> 920
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0171]

<220>
<223> 合成的

<400> 920
cgacag

6

<210> 921
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 921
cgacta

6

<210> 922
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 922
cgactc

6

<210> 923
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 923
cgatat

6

<210> 924
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 924
cgatga

6

<210> 925
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 925
cgcatc

6

[0172]

<210> 926
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 926
cgcggtt 6

<210> 927
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 927
cggatg 6

<210> 928
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 928
cggatt 6

<210> 929
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 929
cggcatt 6

<210> 930
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 930
cggcct 6

<210> 931
<211> 6
<212> DNA

[0173]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 931

cggtat

6

<210> 932

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 932

cggctc

6

<210> 933

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 933

cggtta

6

<210> 934

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 934

cgtaat

6

<210> 935

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 935

cgtact

6

<210> 936

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0174]

<400> 936 cgtatc	6
<210> 937 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 937 cgtatg	6
<210> 938 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 938 cgtcga	6
<210> 939 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 939 cgtgac	6
<210> 940 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 940 cgtgta	6
<210> 941 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 941 cgttgt	6
<210> 942	

[0175]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 942
cgtttc

6

<210> 943
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 943
ctaaag

6

<210> 944
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 944
ctaacg

6

<210> 945
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 945
ctacag

6

<210> 946
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 946
ctacgg

6

<210> 947
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0176]

<223> 合成的

<400> 947
ctagac

6

<210> 948
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 948
ctagcg

6

<210> 949
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 949
ctagct

6

<210> 950
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 950
ctaggc

6

<210> 951
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 951
ctataa

6

<210> 952
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 952
ctatcg

6

[0177]

<210> 953
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 953
ctcgaa 6

<210> 954
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 954
ctcgag 6

<210> 955
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 955
ctcggt 6

<210> 956
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 956
ctctac 6

<210> 957
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 957
ctctat 6

<210> 958
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0178]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	958	
ctctca		6
<210>	959	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	959	
ctctgt		6
<210>	960	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	960	
ctgatt		6
<210>	961	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	961	
ctgcgc		6
<210>	962	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	962	
ctggta		6
<210>	963	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	963	

[0179]

ctgtag	6
<210> 964	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 964	
ctgtcg	6
<210> 965	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 965	
ctgtgc	6
<210> 966	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 966	
cttaac	6
<210> 967	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 967	
cttaca	6
<210> 968	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 968	
cttacg	6
<210> 969	
<211> 6	

[0180]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 969	
cttagg	6
<210> 970	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 970	
cttata	6
<210> 971	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 971	
cttatac	6
<210> 972	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 972	
cttatt	6
<210> 973	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 973	
cttcca	6
<210> 974	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	

[0181]

<400> 974 cttcta	6
<210> 975 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 975 cttctc	6
<210> 976 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 976 ctttac	6
<210> 977 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 977 gaaatc	6
<210> 978 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 978 gaatat	6
<210> 979 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 979 gaatcg	6
[0182]	

<210> 980
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 980
gacgta 6

<210> 981
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 981
gactag 6

<210> 982
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 982
gactcg 6

<210> 983
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 983
gacttg 6

<210> 984
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 984
gacttt 6

<210> 985
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0183]

<220>
<223> 合成的

<400> 985
gagaat

6

<210> 986
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 986
gagacg

6

<210> 987
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 987
gagata

6

<210> 988
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 988
gaggct

6

<210> 989
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 989
gagtac

6

<210> 990
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 990
gagtca

6

[0184]

<210> 991
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 991
gagtta

6

<210> 992
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 992
gataat

6

<210> 993
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 993
gataca

6

<210> 994
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 994
gatact

6

<210> 995
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 995
gatatg

6

<210> 996
<211> 6
<212> DNA

[0185]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	996	
gatgac		6
<210>	997	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	997	
gatgag		6
<210>	998	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	998	
gatgga		6
<210>	999	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	999	
gatgta		6
<210>	1000	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1000	
gattcg		6
<210>	1001	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	

[0186]

<400> 1001 gcaaca	6
<210> 1002 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1002 gcacag	6
<210> 1003 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1003 gcacta	6
<210> 1004 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1004 gcatac	6
<210> 1005 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1005 gcatag	6
<210> 1006 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1006 gcattg	6
<210> 1007	
[0187]	

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1007
gccaac

6

<210> 1008
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1008
gccatt

6

<210> 1009
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1009
gcctta

6

<210> 1010
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1010
gcgact

6

<210> 1011
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1011
gcgctt

6

<210> 1012
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0188]

<223>	合成的	
<400>	1012	
gcgtag		6
<210>	1013	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1013	
gctagc		6
<210>	1014	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1014	
gctagt		6
<210>	1015	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1015	
gctatc		6
<210>	1016	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1016	
gctatg		6
<210>	1017	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1017	
gctcga		6

[0189]

<210> 1018
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1018
gctgat

6

<210> 1019
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1019
gctgta

6

<210> 1020
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1020
gctgtg

6

<210> 1021
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1021
gcttac

6

<210> 1022
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1022
gcttat

6

<210> 1023
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0190]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1023	
ggaagc		6
<210>	1024	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1024	
ggacgt		6
<210>	1025	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1025	
ggactt		6
<210>	1026	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1026	
ggcatc		6
<210>	1027	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1027	
ggctag		6
<210>	1028	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1028	

[0191]

ggctat	6
<210> 1029	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1029	
ggctgt	6
<210> 1030	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1030	
gggact	6
<210> 1031	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1031	
gggtac	6
<210> 1032	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1032	
gggtag	6
<210> 1033	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1033	
ggtacg	6
<210> 1034	
<211> 6	

[0192]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1034
ggtact

6

<210> 1035
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1035
ggtagg

6

<210> 1036
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1036
ggtatc

6

<210> 1037
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1037
ggtatt

6

<210> 1038
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1038
ggtcca

6

<210> 1039
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0193]

<400> 1039
ggttac 6

<210> 1040
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1040
gtaata 6

<210> 1041
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1041
gtaatg 6

<210> 1042
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1042
gtacaa 6

<210> 1043
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1043
gtacta 6

<210> 1044
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1044
gtactc 6

[0194]

<210> 1045
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1045
gtactt 6

<210> 1046
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1046
gtagat 6

<210> 1047
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1047
gtaggg 6

<210> 1048
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1048
gtatcc 6

<210> 1049
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1049
gtatcg 6

<210> 1050
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0195]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1050	
gtatct		6
<210>	1051	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1051	
gtatgc		6
<210>	1052	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1052	
gtattc		6
<210>	1053	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1053	
gtattt		6
<210>	1054	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1054	
gtcact		6
<210>	1055	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1055	
gtcagg		6

[0196]

<210> 1056
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1056
gtcatg 6

<210> 1057
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1057
gtccca 6

<210> 1058
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1058
gtcgac 6

<210> 1059
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1059
gtcgat 6

<210> 1060
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1060
gtcgca 6

<210> 1061
<211> 6
<212> DNA

[0197]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1061

gtcgtt

6

<210> 1062

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1062

gtctag

6

<210> 1063

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1063

gtctta

6

<210> 1064

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1064

gtgcga

6

<210> 1065

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1065

gtggtt

6

<210> 1066

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0198]

<400> 1066 gtgtct	6
<210> 1067 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1067 gttaac	6
<210> 1068 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1068 gttaga	6
<210> 1069 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1069 gttagc	6
<210> 1070 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1070 gttata	6
<210> 1071 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1071 gttcgg	6
<210> 1072 [0199]	

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1072
gttgcg

6

<210> 1073
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1073
gttgtg

6

<210> 1074
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1074
gtttat

6

<210> 1075
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1075
gtttca

6

<210> 1076
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1076
gtttgc

6

<210> 1077
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0200]

<223> 合成的

<400> 1077
taaaat

6

<210> 1078
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1078
taaaca

6

<210> 1079
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1079
taacgt

6

<210> 1080
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1080
taactc

6

<210> 1081
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1081
taagtt

6

<210> 1082
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1082
taatct

6

[0201]

<210> 1083
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1083
tacaac

6

<210> 1084
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1084
tacaag

6

<210> 1085
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1085
tacacg

6

<210> 1086
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1086
tacata

6

<210> 1087
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1087
tacatc

6

<210> 1088
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0202]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1088	
tacctc		6
<210>	1089	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1089	
tagcgt		6
<210>	1090	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1090	
tacggg		6
<210>	1091	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1091	
tacggt		6
<210>	1092	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1092	
tacgtc		6
<210>	1093	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1093	

[0203]

tacgtt	6
<210> 1094	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1094	
tactag	6
<210> 1095	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1095	
tactcc	6
<210> 1096	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1096	
tactcg	6
<210> 1097	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1097	
tactgt	6
<210> 1098	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1098	
tactta	6
<210> 1099	
<211> 6	
[0204]	

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1099
tagcac 6

<210> 1100
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1100
tagcgc 6

<210> 1101
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1101
tagctt 6

<210> 1102
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1102
taggat 6

<210> 1103
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1103
taggca 6

<210> 1104
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0205]

<400> 1104 tagtgc	6
<210> 1105 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1105 tagtgt	6
<210> 1106 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1106 tataaa	6
<210> 1107 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1107 tataat	6
<210> 1108 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1108 tataca	6
<210> 1109 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1109 tatacg	6

[0206]

<210> 1110
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1110
tatatc

6

<210> 1111
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1111
tatatg

6

<210> 1112
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1112
taccct

6

<210> 1113
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1113
taccga

6

<210> 1114
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1114
taccgc

6

<210> 1115
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0207]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1115	
tatcgg		6
<210>	1116	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1116	
tatcgt		6
<210>	1117	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1117	
tatctc		6
<210>	1118	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1118	
tatctt		6
<210>	1119	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1119	
tatgag		6
<210>	1120	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1120	
tatgat		6

[0208]

<210> 1121
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1121
tatgca

6

<210> 1122
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1122
tatgcg

6

<210> 1123
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1123
tatgtc

6

<210> 1124
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1124
tatgtt

6

<210> 1125
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1125
tattcg

6

<210> 1126
<211> 6
<212> DNA

[0209]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1126 tattgg	6
<210> 1127 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1127 tattgt	6
<210> 1128 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1128 tattta	6
<210> 1129 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1129 tatttg	6
<210> 1130 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1130 tcaatc	6
<210> 1131 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
[0210]	

<400> 1131 tcacat	6
<210> 1132 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1132 tcaccg	6
<210> 1133 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1133 tcacgg	6
<210> 1134 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1134 tcacgt	6
<210> 1135 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1135 tcactc	6
<210> 1136 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1136 tcaggt	6
<210> 1137	

[0211]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1137
tcagtg 6

<210> 1138
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1138
tcatcc 6

<210> 1139
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1139
tcatcg 6

<210> 1140
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1140
tcatga 6

<210> 1141
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1141
tcatgc 6

<210> 1142
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0212]

<223>	合成的	
<400>	1142	
tcatgt		6
<210>	1143	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1143	
tcattc		6
<210>	1144	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1144	
tccaca		6
<210>	1145	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1145	
tcccag		6
<210>	1146	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1146	
tcgaat		6
<210>	1147	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1147	
tcgacg		6

[0213]

<210> 1148
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1148
tcgact

6

<210> 1149
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1149
tcgagc

6

<210> 1150
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1150
tcgagt

6

<210> 1151
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1151
tcgatac

6

<210> 1152
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1152
tcgcaa

6

<210> 1153
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0214]

<220>
<223> 合成的

<400> 1153
tcgcat

6

<210> 1154
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1154
tcgcgt

6

<210> 1155
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1155
tcggac

6

<210> 1156
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1156
tcgtcg

6

<210> 1157
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1157
tcgtct

6

<210> 1158
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1158

[0215]

tcgtgt	6
<210> 1159	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1159	
tcgtta	6
<210> 1160	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1160	
tcgttc	6
<210> 1161	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1161	
tcgttg	6
<210> 1162	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1162	
tctacg	6
<210> 1163	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1163	
tctagg	6
<210> 1164	
<211> 6	

[0216]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1164
tctata

6

<210> 1165
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1165
tctcac

6

<210> 1166
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1166
tctcat

6

<210> 1167
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1167
tctcgt

6

<210> 1168
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1168
tctcta

6

<210> 1169
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0217]

<400> 1169
tctctg 6

<210> 1170
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1170
tctgcg 6

<210> 1171
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1171
tctggt 6

<210> 1172
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1172
tcttat 6

<210> 1173
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1173
tcttcg 6

<210> 1174
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1174
tcttgt 6

[0218]

<210> 1175
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1175
tcttta

6

<210> 1176
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1176
tgaatc

6

<210> 1177
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1177
tgaggg

6

<210> 1178
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1178
tgagta

6

<210> 1179
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1179
tgatac

6

<210> 1180
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0219]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1180	6
	tgatca	
<210>	1181	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1181	6
	tgattg	
<210>	1182	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1182	6
	tgcaac	
<210>	1183	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1183	6
	tgcaaca	
<210>	1184	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1184	6
	tgccgg	
<210>	1185	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1185	6
	tgcgac	

[0220]

<210> 1186
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1186
tgcgca

6

<210> 1187
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1187
tgcgct

6

<210> 1188
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1188
tgcgta

6

<210> 1189
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1189
tgctac

6

<210> 1190
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1190
tgctat

6

<210> 1191
<211> 6
<212> DNA

[0221]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1191

tgctcc

6

<210> 1192

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1192

tgcttt

6

<210> 1193

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1193

tgggac

6

<210> 1194

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1194

tggtac

6

<210> 1195

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1195

tggtat

6

<210> 1196

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0222]

<400> 1196 tgtaag	6
<210> 1197 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1197 tgtacc	6
<210> 1198 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1198 tgtagt	6
<210> 1199 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1199 tgtata	6
<210> 1200 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1200 tgtatc	6
<210> 1201 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1201 tgtatt	6
<210> 1202 [0223]	

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1202
tgtcac

6

<210> 1203
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1203
tgtcat

6

<210> 1204
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1204
tgtcga

6

<210> 1205
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1205
tgtcgc

6

<210> 1206
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1206
tgtcgt

6

<210> 1207
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0224]

<223>	合成的	
<400>	1207	
tgtcctt		6
<210>	1208	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1208	
tgtgca		6
<210>	1209	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1209	
tgtgtc		6
<210>	1210	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1210	
tgttaa		6
<210>	1211	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1211	
tgttcg		6
<210>	1212	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1212	
tgtttg		6

[0225]

<210> 1213
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1213
ttaaac 6

<210> 1214
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1214
ttaata 6

<210> 1215
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1215
ttacaa 6

<210> 1216
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1216
ttacat 6

<210> 1217
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1217
ttaccg 6

<210> 1218
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0226]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1218	
ttacct		6
<210>	1219	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1219	
ttacgg		6
<210>	1220	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1220	
ttacgt		6
<210>	1221	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1221	
ttactc		6
<210>	1222	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1222	
ttagcg		6
<210>	1223	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1223	
[0227]		

ttaggc	6
<210> 1224	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1224	
ttaggg	6
<210> 1225	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1225	
ttatcg	6
<210> 1226	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1226	
ttatct	6
<210> 1227	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1227	
ttatgc	6
<210> 1228	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1228	
ttatgt	6
<210> 1229	
<211> 6	

[0228]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1229
ttattg 6

<210> 1230
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1230
ttcacg 6

<210> 1231
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1231
ttcatc 6

<210> 1232
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1232
ttcatg 6

<210> 1233
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1233
ttccaa 6

<210> 1234
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0229]

<400> 1234 ttcgca	6
<210> 1235 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1235 ttcgct	6
<210> 1236 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1236 ttctaa	6
<210> 1237 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1237 ttgagg	6
<210> 1238 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1238 ttgatg	6
<210> 1239 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1239 ttgcag	6
[0230]	

<210> 1240
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1240
ttgcat

6

<210> 1241
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1241
ttgccg

6

<210> 1242
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1242
ttgcga

6

<210> 1243
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1243
ttgcgg

6

<210> 1244
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1244
ttgcta

6

<210> 1245
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0231]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1245	
ttgtat		6
<210>	1246	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1246	
ttgtca		6
<210>	1247	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1247	
ttgtcg		6
<210>	1248	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1248	
ttgtgc		6
<210>	1249	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1249	
tttgt		6
<210>	1250	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1250	
ttgtta		6

[0232]

<210> 1251
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1251
ttgttt 6

<210> 1252
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1252
tttaca 6

<210> 1253
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1253
tttagg 6

<210> 1254
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1254
tttatg 6

<210> 1255
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1255
tttcgc 6

<210> 1256
<211> 6
<212> DNA

[0233]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1256

tttgcg

6

<210> 1257

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1257

ttttcc

6

<210> 1258

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1258

ttttgc

6

<210> 1259

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1259

ttttta

6

<210> 1260

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1260

aaatgt

6

<210> 1261

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0234]

<400> 1261 aacaga	6
<210> 1262 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1262 aagcaa	6
<210> 1263 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1263 aaggtc	6
<210> 1264 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1264 aagttc	6
<210> 1265 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1265 aatgtg	6
<210> 1266 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1266 acaaat	6
<210> 1267	

[0235]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1267
acacca 6

<210> 1268
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1268
acactc 6

<210> 1269
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1269
acactt 6

<210> 1270
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1270
acagag 6

<210> 1271
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1271
acataa 6

<210> 1272
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0236]

<223> 合成的

<400> 1272
accag

6

<210> 1273
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1273
accctt

6

<210> 1274
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1274
acgaca

6

<210> 1275
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1275
acgcca

6

<210> 1276
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1276
acgctg

6

<210> 1277
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1277
acgtca

6

[0237]

<210>	1278	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1278	
actcag		6
<210>	1279	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1279	
actgca		6
<210>	1280	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1280	
actgcc		6
<210>	1281	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1281	
acttcc		6
<210>	1282	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1282	
agaagt		6
<210>	1283	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0238]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1283	
agacac		6
<210>	1284	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1284	
agacca		6
<210>	1285	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1285	
agacct		6
<210>	1286	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1286	
agacgc		6
<210>	1287	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1287	
agactg		6
<210>	1288	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1288	

[0239]

agatgc	6
<210> 1289	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1289	
agcaac	6
<210> 1290	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1290	
agcacc	6
<210> 1291	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1291	
agccgt	6
<210> 1292	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1292	
aggatg	6
<210> 1293	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1293	
aggctc	6
<210> 1294	
<211> 6	

[0240]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1294
aggctg 6

<210> 1295
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1295
aggctt 6

<210> 1296
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1296
agggta 6

<210> 1297
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1297
agtatc 6

<210> 1298
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1298
agtggc 6

<210> 1299
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0241]

<400> 1299 ataaaa	6
<210> 1300 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1300 ataaat	6
<210> 1301 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1301 ataaga	6
<210> 1302 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1302 atacaa	6
<210> 1303 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1303 atcaat	6
<210> 1304 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1304 atcaca [0242]	6

<210> 1305
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1305
atcatg 6

<210> 1306
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1306
atctgg 6

<210> 1307
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1307
atgatc 6

<210> 1308
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1308
atgccca 6

<210> 1309
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1309
atgctg 6

<210> 1310
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0243]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1310	
atggac		6
<210>	1311	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1311	
atggca		6
<210>	1312	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1312	
atgttc		6
<210>	1313	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1313	
attact		6
<210>	1314	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1314	
attcac		6
<210>	1315	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1315	
attcag		6

[0244]

<210> 1316
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1316
attctg

6

<210> 1317
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1317
atttca

6

<210> 1318
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1318
caacgc

6

<210> 1319
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1319
caacgt

6

<210> 1320
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1320
caactg

6

<210> 1321
<211> 6
<212> DNA

[0245]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1321

caaggc

6

<210> 1322

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1322

cacaac

6

<210> 1323

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1323

cacact

6

<210> 1324

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1324

caccat

6

<210> 1325

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1325

caccgt

6

<210> 1326

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0246]

<400> 1326 cacgct	6
<210> 1327 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1327 cactgc	6
<210> 1328 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1328 cacttc	6
<210> 1329 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1329 cagact	6
<210> 1330 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1330 cagaga	6
<210> 1331 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1331 caggct	6
<210> 1332	

[0247]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1332
cagtgg

6

<210> 1333
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1333
cagtgt

6

<210> 1334
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1334
catcat

6

<210> 1335
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1335
cattga

6

<210> 1336
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1336
ccacaa

6

<210> 1337
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0248]

<223> 合成的	
<400> 1337 ccagat	6
<210> 1338 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1338 ccatca	6
<210> 1339 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1339 cccatc	6
<210> 1340 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1340 cccctg	6
<210> 1341 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1341 cccgca	6
<210> 1342 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1342 ccgaca	6

[0249]

<210> 1343
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1343
ccgttt

6

<210> 1344
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1344
cctaata

6

<210> 1345
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1345
cctaga

6

<210> 1346
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1346
cctgtg

6

<210> 1347
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1347
cgacat

6

<210> 1348
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0250]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1348	
cgagtt		6
<210>	1349	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1349	
cgcaac		6
<210>	1350	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1350	
cgcaca		6
<210>	1351	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1351	
cgcact		6
<210>	1352	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1352	
cgctgt		6
<210>	1353	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1353	

[0251]

cgtcaa	6
<210> 1354	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1354	
cgtgct	6
<210> 1355	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1355	
cgtggt	6
<210> 1356	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1356	
cgttac	6
<210> 1357	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1357	
ctaggt	6
<210> 1358	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1358	
ctcaca	6
<210> 1359	
<211> 6	

[0252]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1359	
ctcatg	6
<210> 1360	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1360	
ctcctg	6
<210> 1361	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1361	
ctcctt	6
<210> 1362	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1362	
ctctgc	6
<210> 1363	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1363	
ctgagc	6
<210> 1364	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
[0253]	

<400> 1364 ctgata	6
<210> 1365 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1365 ctgcaa	6
<210> 1366 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1366 ctgcct	6
<210> 1367 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1367 ctgcta	6
<210> 1368 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1368 ctgctg	6
<210> 1369 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1369 ctggtc	6

[0254]

<210> 1370
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1370
ctgtgt

6

<210> 1371
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1371
cttgag

6

<210> 1372
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1372
cttgca

6

<210> 1373
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1373
ctttat

6

<210> 1374
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1374
ctttca

6

<210> 1375
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0255]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1375	
gacacc		6
<210>	1376	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1376	
gacata		6
<210>	1377	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1377	
gaccta		6
<210>	1378	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1378	
gacgcc		6
<210>	1379	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1379	
gactcc		6
<210>	1380	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1380	
gactgc		6

[0256]

<210> 1381
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1381
gagatc

6

<210> 1382
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1382
gagcat

6

<210> 1383
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1383
gatagg

6

<210> 1384
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1384
gatatt

6

<210> 1385
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1385
gatgca

6

<210> 1386
<211> 6
<212> DNA

[0257]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1386	
	gattct	6
<210>	1387	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1387	
	gcaacc	6
<210>	1388	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1388	
	gcaacg	6
<210>	1389	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1389	
	gcaact	6
<210>	1390	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1390	
	gcacaa	6
<210>	1391	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
[0258]		

<400> 1391 gcacat	6
<210> 1392 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1392 gcacct	6
<210> 1393 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1393 gcactg	6
<210> 1394 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1394 gcatct	6
<210> 1395 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1395 gccata	6
<210> 1396 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1396 gctcac	6
<210> 1397	

[0259]

<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1397	
	gctgcc	6
<210>	1398	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1398	
	gctgct	6
<210>	1399	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1399	
	gctgtt	6
<210>	1400	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1400	
	gcttcg	6
<210>	1401	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1401	
	gctttc	6
<210>	1402	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

[0260]

<223> 合成的

<400> 1402
ggaaat

6

<210> 1403
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1403
ggatat

6

<210> 1404
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1404
ggatgt

6

<210> 1405
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1405
ggcaac

6

<210> 1406
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1406
ggcaat

6

<210> 1407
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1407
ggcaca

6

[0261]

<210> 1408
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1408
ggcact

6

<210> 1409
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1409
ggcaga

6

<210> 1410
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1410
ggccag

6

<210> 1411
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1411
ggcctg

6

<210> 1412
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1412
ggcctt

6

<210> 1413
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0262]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1413	
ggcttc		6
<210>	1414	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1414	
ggggta		6
<210>	1415	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1415	
ggtatg		6
<210>	1416	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1416	
ggtcta		6
<210>	1417	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1417	
ggttat		6
<210>	1418	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1418	
[0263]		

gtacca	6
<210> 1419	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1419	
gtatca	6
<210> 1420	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1420	
gtctac	6
<210> 1421	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1421	
gtctga	6
<210> 1422	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1422	
gtgaat	6
<210> 1423	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1423	
gtgcta	6
<210> 1424	
<211> 6	

[0264]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1424
gtgctg

6

<210> 1425
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1425
gtggtc

6

<210> 1426
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1426
gttact

6

<210> 1427
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1427
gttatc

6

<210> 1428
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1428
gttttg

6

<210> 1429
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0265]

<400> 1429 taataa	6
<210> 1430 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1430 tactgc	6
<210> 1431 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1431 tagatt	6
<210> 1432 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1432 taggct	6
<210> 1433 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1433 tatggc	6
<210> 1434 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1434 tatggg	6

[0266]

<210> 1435
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1435
tatttc 6

<210> 1436
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1436
tcacag 6

<210> 1437
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1437
tcacta 6

<210> 1438
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1438
tcagag 6

<210> 1439
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1439
tcaggc 6

<210> 1440
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0267]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1440	
tcatgg		6
<210>	1441	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1441	
tcattt		6
<210>	1442	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1442	
tccaac		6
<210>	1443	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1443	
tccaga		6
<210>	1444	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1444	
tcctgt		6
<210>	1445	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1445	
tccttg		6

[0268]

<210> 1446
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1446
tcgacc

6

<210> 1447
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1447
tcggta

6

<210> 1448
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1448
tcggtg

6

<210> 1449
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1449
tctcag

6

<210> 1450
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1450
tctgct

6

<210> 1451
<211> 6
<212> DNA

[0269]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1451

tctgtc

6

<210> 1452

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1452

tcttct

6

<210> 1453

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1453

tgaagt

6

<210> 1454

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1454

tgaata

6

<210> 1455

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1455

tgacat

6

<210> 1456

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0270]

<400> 1456 tgaccg	6
<210> 1457 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1457 tgactt	6
<210> 1458 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1458 tgagat	6
<210> 1459 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1459 tgagcg	6
<210> 1460 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1460 tgataa	6
<210> 1461 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1461 tgattc	6
<210> 1462	

[0271]

<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1462
tgcacc

6

<210> 1463
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1463
tgcagg

6

<210> 1464
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1464
tgcatac

6

<210> 1465
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1465
tgccac

6

<210> 1466
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1466
tgccgt

6

<210> 1467
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0272]

<223> 合成的	
<400> 1467 tgctag	6
<210> 1468 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1468 tgctga	6
<210> 1469 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1469 tgctgg	6
<210> 1470 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1470 tgctgt	6
<210> 1471 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1471 tggact	6
<210> 1472 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1472 tggagt	6

[0273]

<210> 1473
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1473
tggcag

6

<210> 1474
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1474
tggcta

6

<210> 1475
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1475
tggctc

6

<210> 1476
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1476
tgtgac

6

<210> 1477
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1477
tgtgga

6

<210> 1478
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

[0274]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1478	
tgtgtg		6
<210>	1479	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1479	
tgttat		6
<210>	1480	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1480	
tgtttc		6
<210>	1481	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1481	
ttactg		6
<210>	1482	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1482	
ttattt		6
<210>	1483	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1483	
[0275]		

ttcagg	6
<210> 1484	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1484	
ttcctg	6
<210> 1485	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1485	
ttcgac	6
<210> 1486	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1486	
ttcggc	6
<210> 1487	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1487	
ttcttc	6
<210> 1488	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1488	
ttgaat	6
<210> 1489	
<211> 6	

[0276]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1489
ttgaga

6

<210> 1490
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1490
ttgagt

6

<210> 1491
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1491
ttgcac

6

<210> 1492
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1492
ttggca

6

<210> 1493
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1493
ttgggc

6

<210> 1494
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0277]

<400> 1494 tttcaa	6
<210> 1495 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1495 tttcct	6
<210> 1496 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1496 tttgag	6
<210> 1497 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1497 tttgct	6
<210> 1498 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1498 tttggc	6
<210> 1499 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1499 tccgatctct	10

[0278]

<210> 1500	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1500	
tccgatctga	10
<210> 1501	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(1)	
<223> N = A, C, G 或 T	
<400> 1501	
ntccgatctc t	11
<210> 1502	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(1)	
<223> N = A, C, G 或 T	
<400> 1502	
ntccgatctg a	11
<210> 1503	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (21)..(27)	
<223> N = A, C, G 或 T	
<400> 1503	
ccgaactacc cacttgcat nnnnnnn	27

[0279]

<210> 1504
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> N = A, C, G 或 T

<400> 1504
ccgaactacc cacttgcat n

21

<210> 1505
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(29)
<223> N = A, C, G 或 T

<400> 1505
ccactccatt tgttcgtgtg nnnnnnnnn

29

<210> 1506
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1506
ccactccatt tgttcgtgtg

20

<210> 1507
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1507
ccgaactacc cacttgcat

20

<210> 1508
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

[0280]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1508	
	aattaatacg actcactata gggaga	26
<210>	1509	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(22).. (22)	
<223>	N = A, C, G 或 T	
<400>	1509	
	atttaggtga cactatagaa gng	23
<210>	1510	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1510	
	aattaaccct cactaaaggg aga	23
<210>	1511	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1511	
	ggttcgcccc gagaga	16
<210>	1512	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1512	
	ggacgccgcc ggaa	14
<210>	1513	
<211>	16	
<212>	DNA	

[0281]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1513

ccgcgacgct ttccaa

16

<210> 1514

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1514

gtagccaaat gcctcgtcat c

21

<210> 1515

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1515

cagtgggaat ctcgttcac c att

24

<210> 1516

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1516

atgcgcgtca ctaatta

17

<210> 1517

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1517

ccgaaacgat ctcaacctat tctca

25

<210> 1518

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0282]

<400> 1518 gctccacgcc agcga	15
<210> 1519 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1519 ccgggcttct taccc	15
<210> 1520 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1520 gcgggtggta aactccatct aag	23
<210> 1521 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1521 cccttacgggt acttggtgac tatcg	25
<210> 1522 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1522 tcgtgccgggt atttag	16
<210> 1523 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1523 ggtgaccacg ggtgacg	17
<210> 1524	
[0283]	

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1524
ggatgtggta gccgtttctc a

21

<210> 1525
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1525
tccctctccg gaatcg

16

<210> 1526
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1526
accaagcata atatagcaag gactaacc

28

<210> 1527
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1527
tggctctcct tgcaaagtta ttctt

25

<210> 1528
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1528
ccttctgcat aatgaattaa

20

<210> 1529
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0284]

<223> 合成的		
<400> 1529		19
gacaagcatc aagcacgca		
<210> 1530		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 1530		26
ctaaaggtta atcactgctg tttccc		
<210> 1531		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 1531		17
caatgcagct caaaacg		
<210> 1532		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 1532		25
gtcgaaggtg gatttagcag taaac		
<210> 1533		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 1533		17
tgtacgcgct tcagggc		
<210> 1534		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 1534		21
cctgttcaac taagcactct a		
[0285]		

<210>	1535	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1535	
	aagcgttcaa gctcaacacc	20
<210>	1536	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1536	
	ggtccaattg ggtatgagga	20
<210>	1537	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1537	
	gcataagcct gcgtcagatt	20
<210>	1538	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1538	
	ggttgattgt agatattggg ctgt	24
<210>	1539	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1539	
	tacctgaccg ctgagatcct	20
<210>	1540	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0286]

<220>		
<223>	合成的	
<400>	1540	
	agcttggtga gctcctcgtc	20
<210>	1541	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1541	
	gacatctgtc accccattga	20
<210>	1542	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1542	
	ctcctctatc ggggatggtc	20
<210>	1543	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1543	
	ggagttctgg gctgtagtgc	20
<210>	1544	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1544	
	gttttgacct gctccgtttc	20
<210>	1545	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1545	
[0287]		

gctaagaggc gggaggatag	20
<210> 1546	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1546	
ggttggtgct ttgagggaag	20
<210> 1547	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1547	
gctggtccga aggtagttag	20
<210> 1548	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1548	
atgccaggag agtggaact	20
<210> 1549	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1549	
tccgagtgca gtggtgttta	20
<210> 1550	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1550	
gtgggagtgga agaaggaaca	20
<210> 1551	
<211> 20	
[0288]	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1551	
ggtccgatgg tagtgggtta	20
<210> 1552	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1552	
aaaaagccag tcaaatttag ca	22
<210> 1553	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1553	
tggcagtatc gtagccaatg	20
<210> 1554	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1554	
ctgtcaaaaa ttgccaatgc	20
<210> 1555	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 1555	
cgcttcggca gcacatatatc	20
<210> 1556	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
[0289]	

<400> 1556 aaaatatgga acgcttcacg a	21
<210> 1557 <211> 14 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1557 gacggaugcg gucu	14
<210> 1558 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> RNA/DNA 杂合体 合成的	
<400> 1558 gacggaugcg gtgt	14
<210> 1559 <211> 53 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1559 atgatacggc gaccaccgac actcttttccc tacacgacgc tcttcgatc tct	53
<210> 1560 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的	
<400> 1560 caagcagaag acggcatacg agctcttccg atctga	36

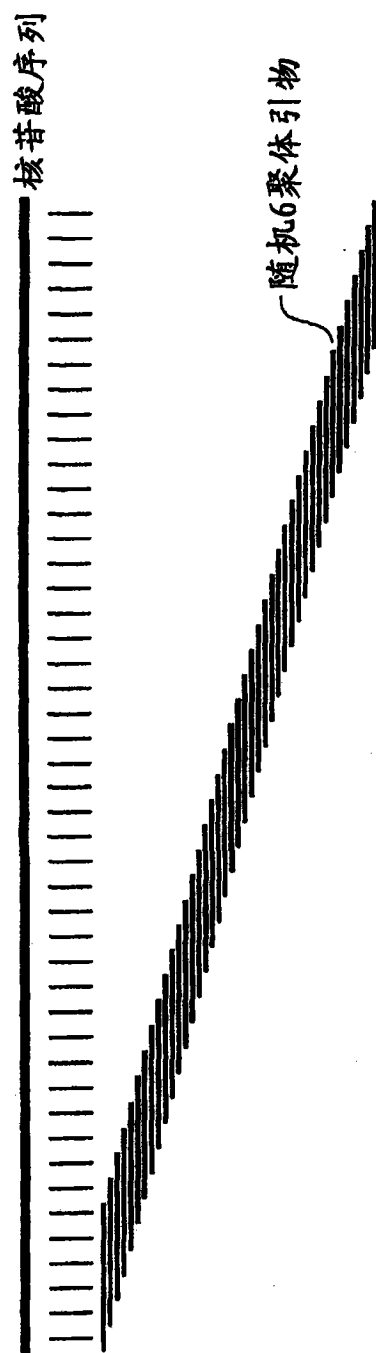


图 1A

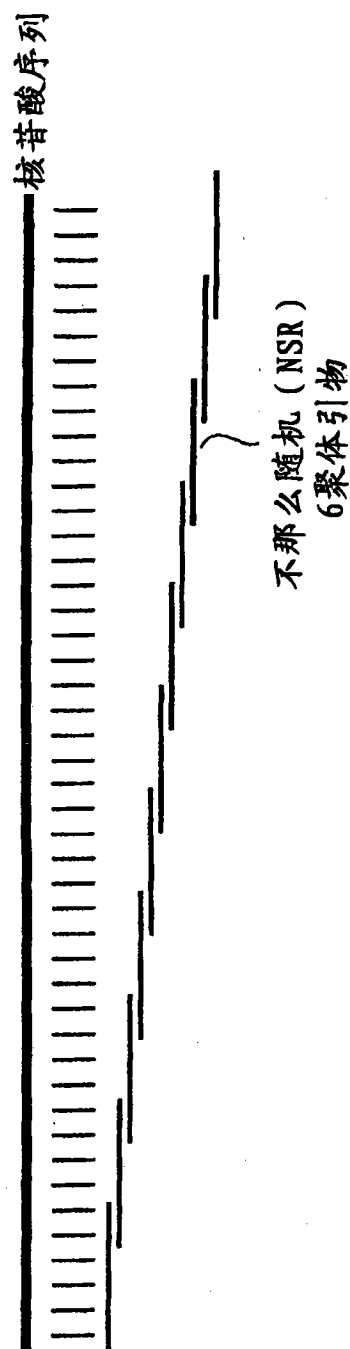


图 1B

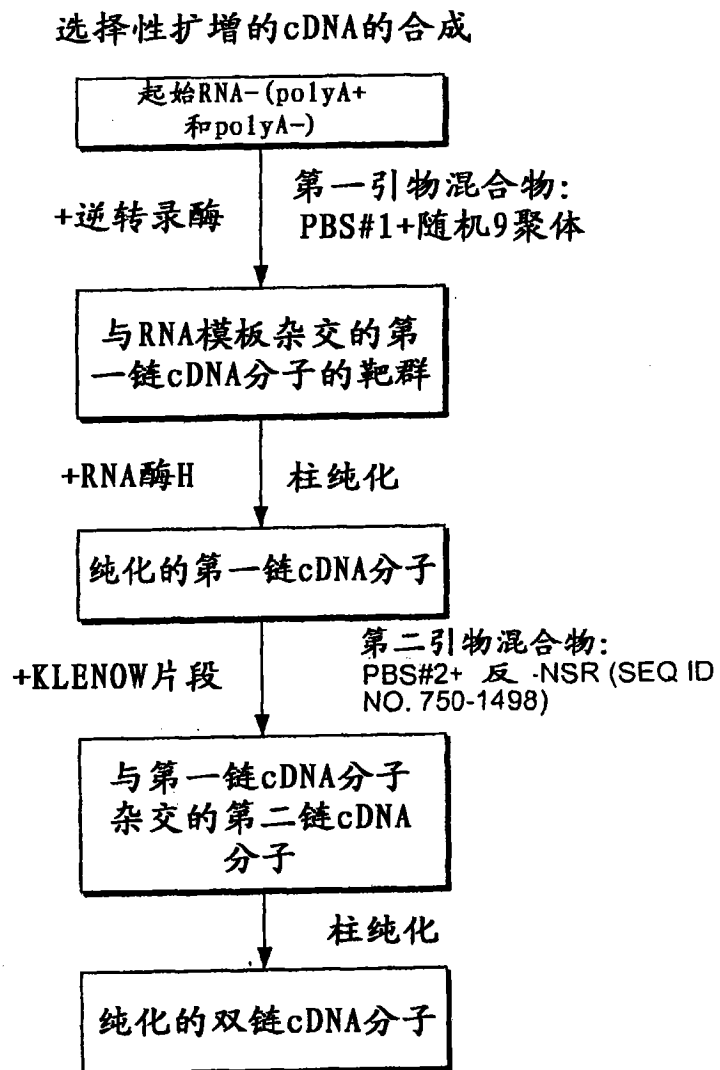


图 1C

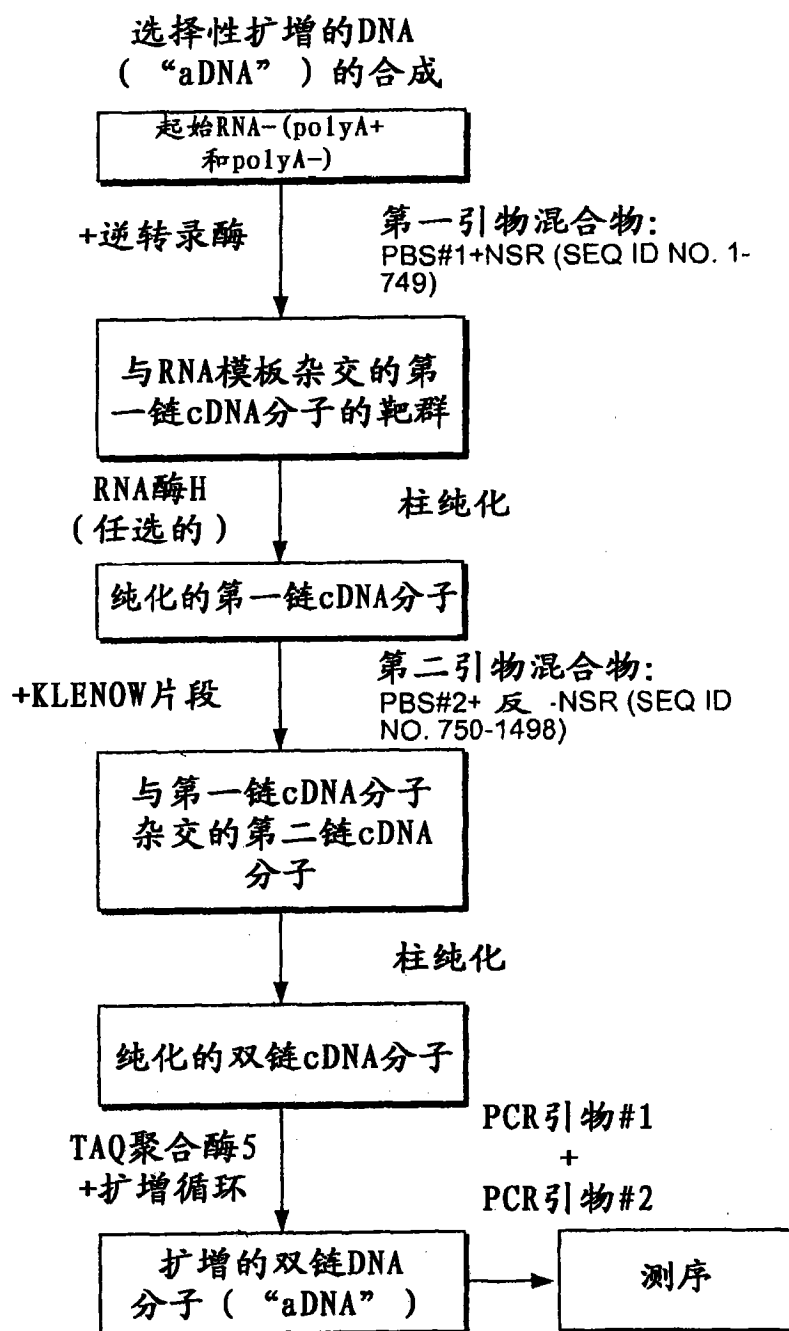


图 1D

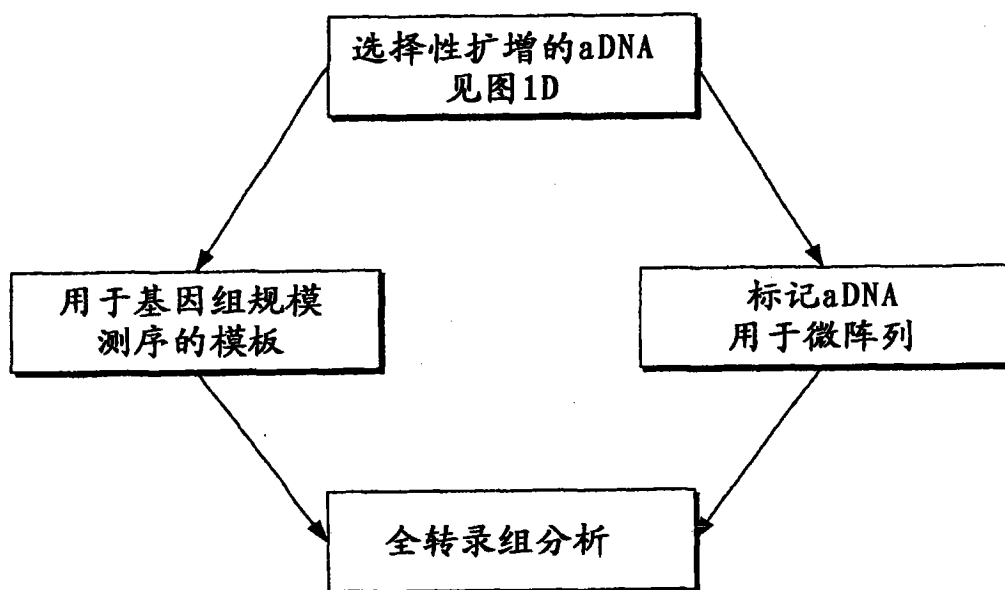


图 2

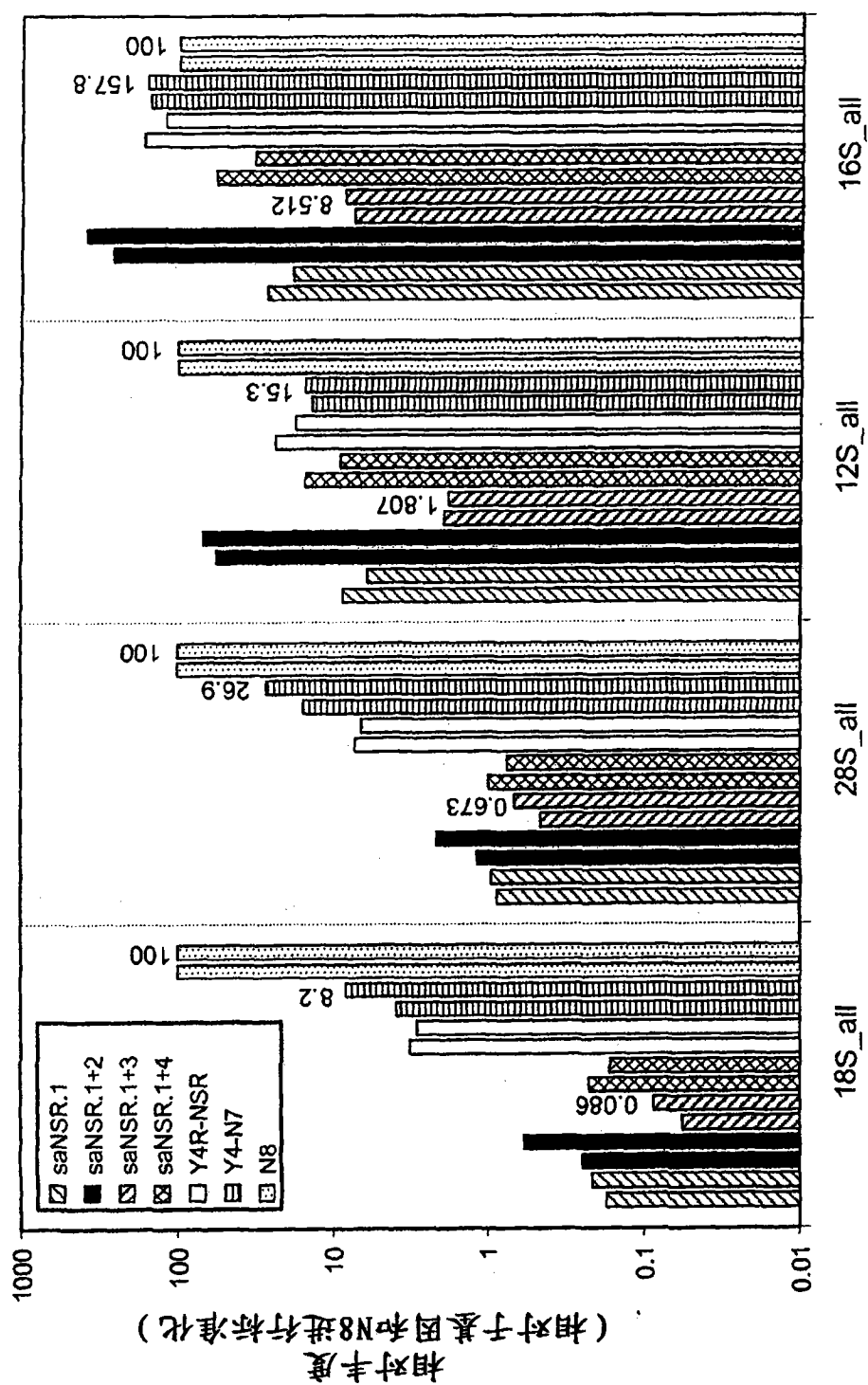


图 3A

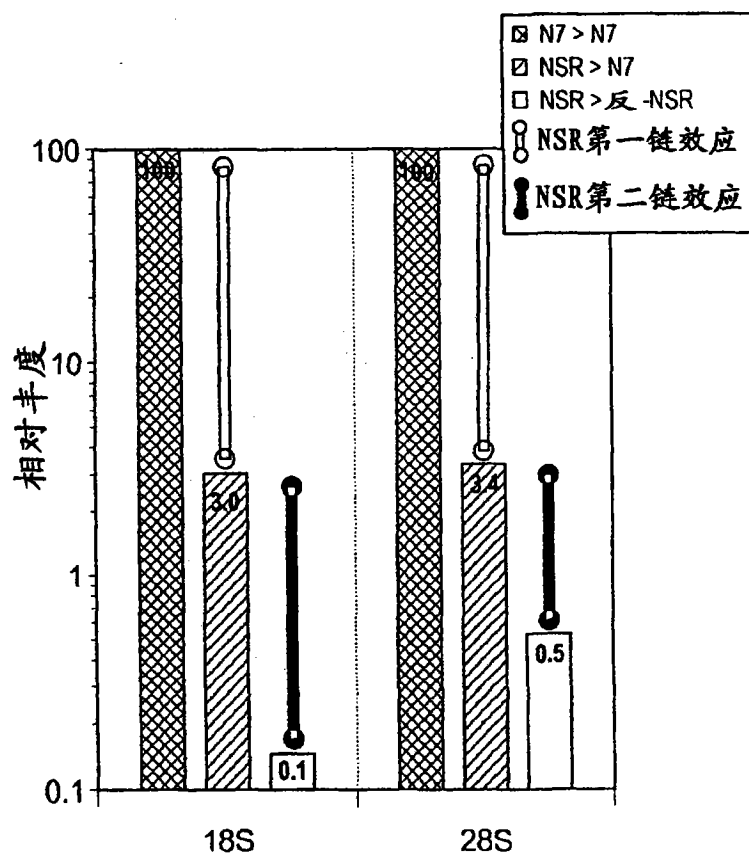


图 3B

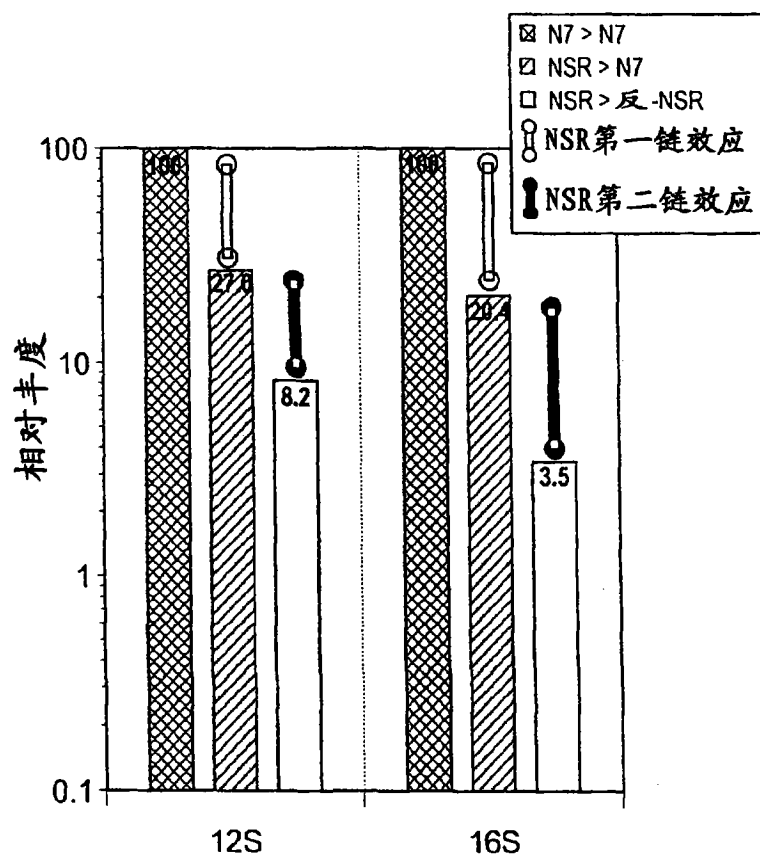


图 3C

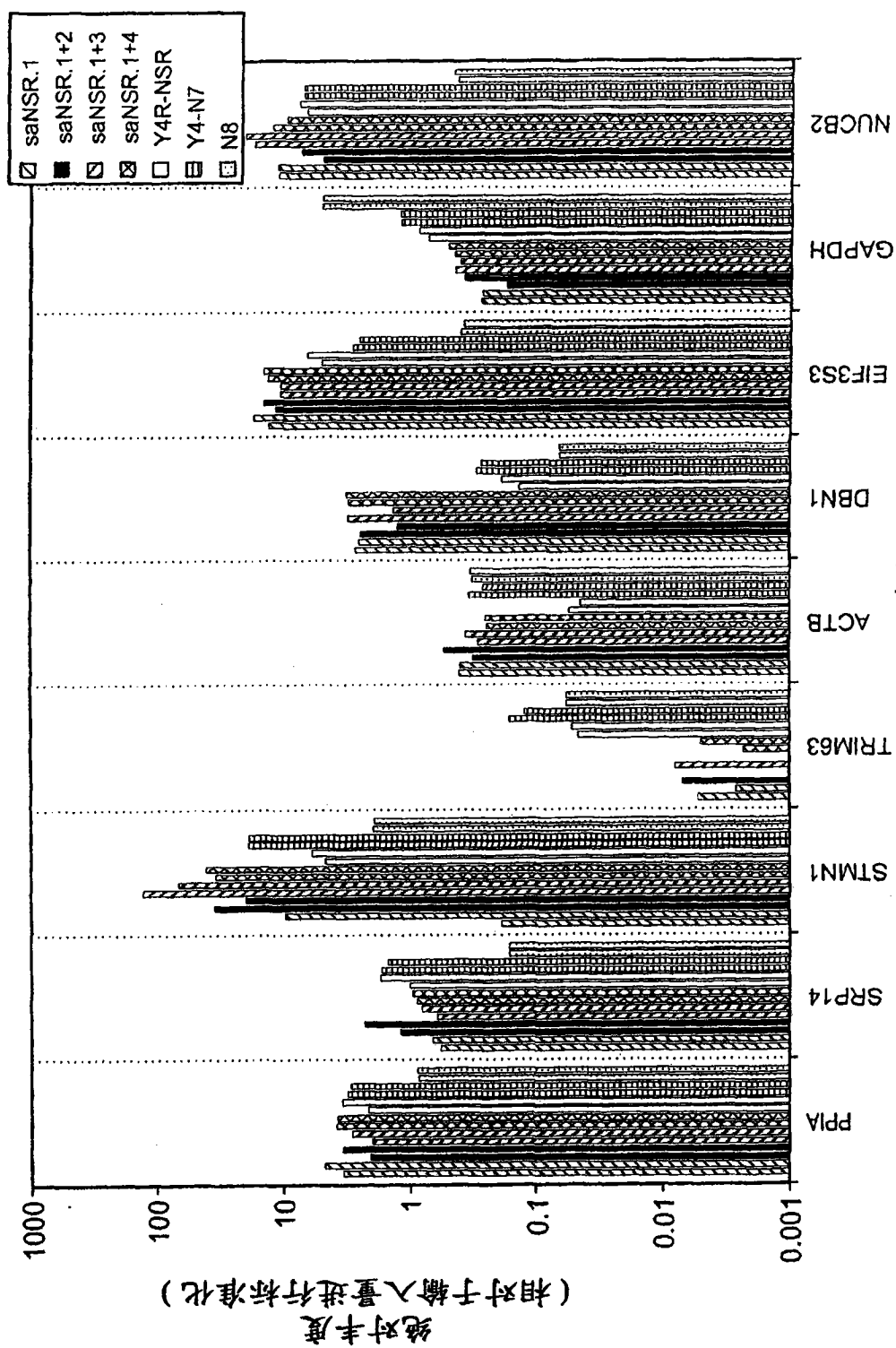


图 4A

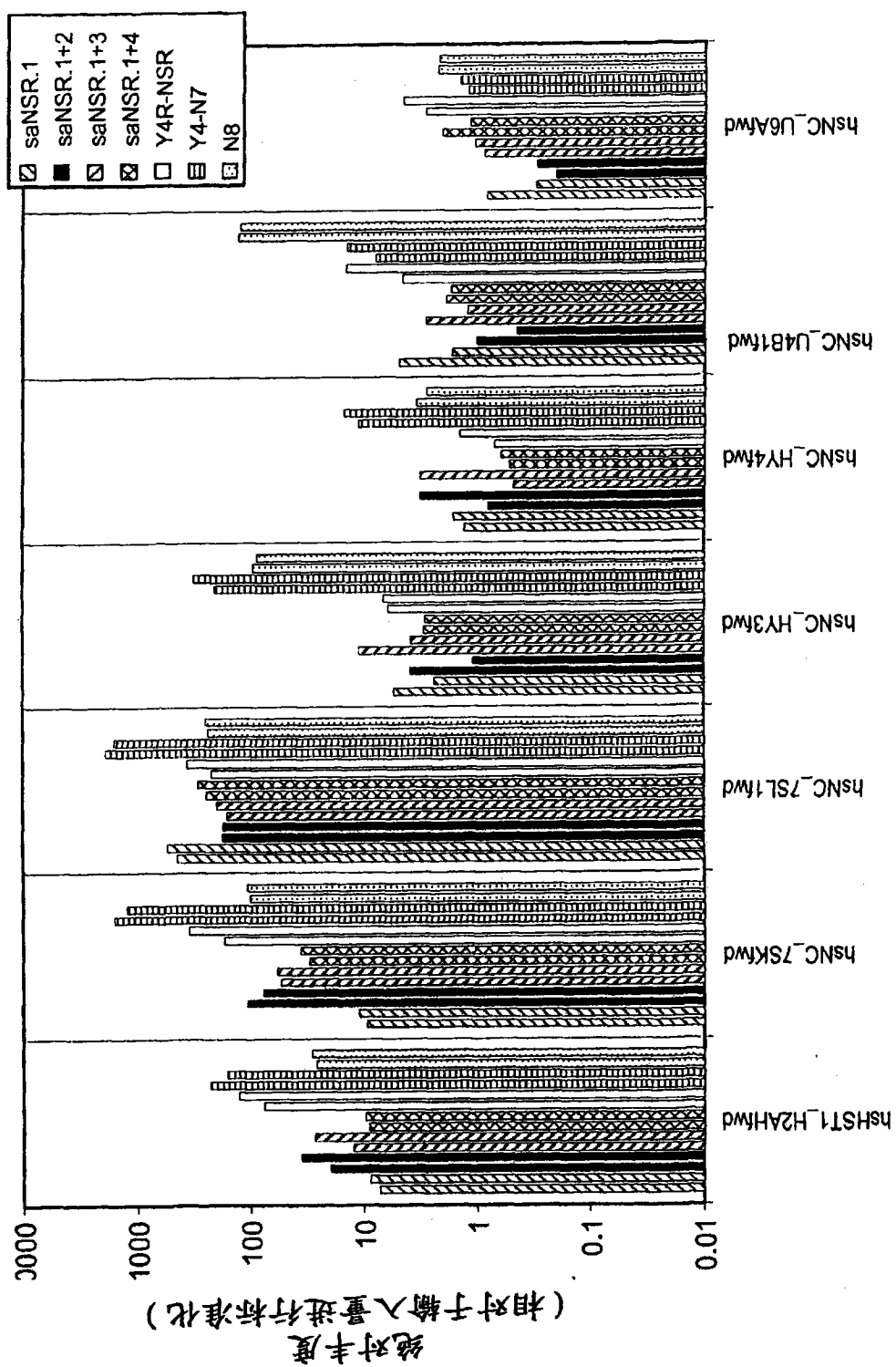


图 4B

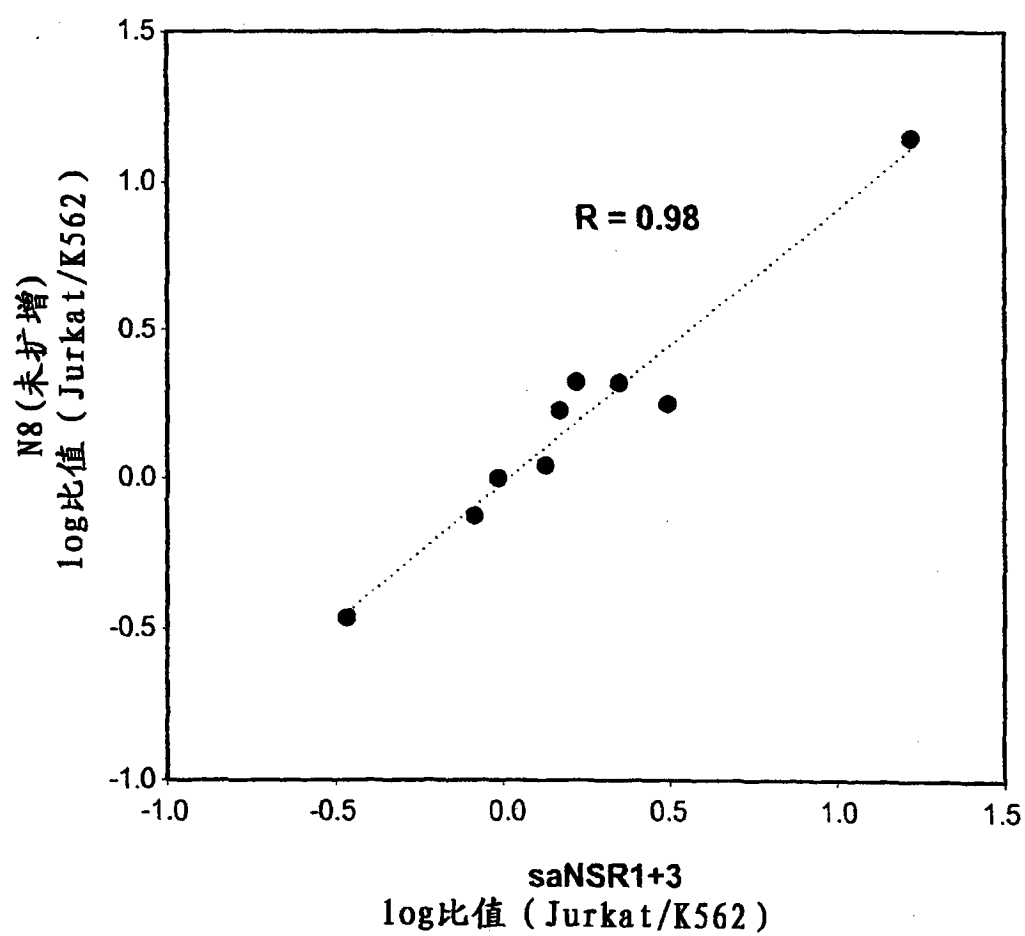


图 5

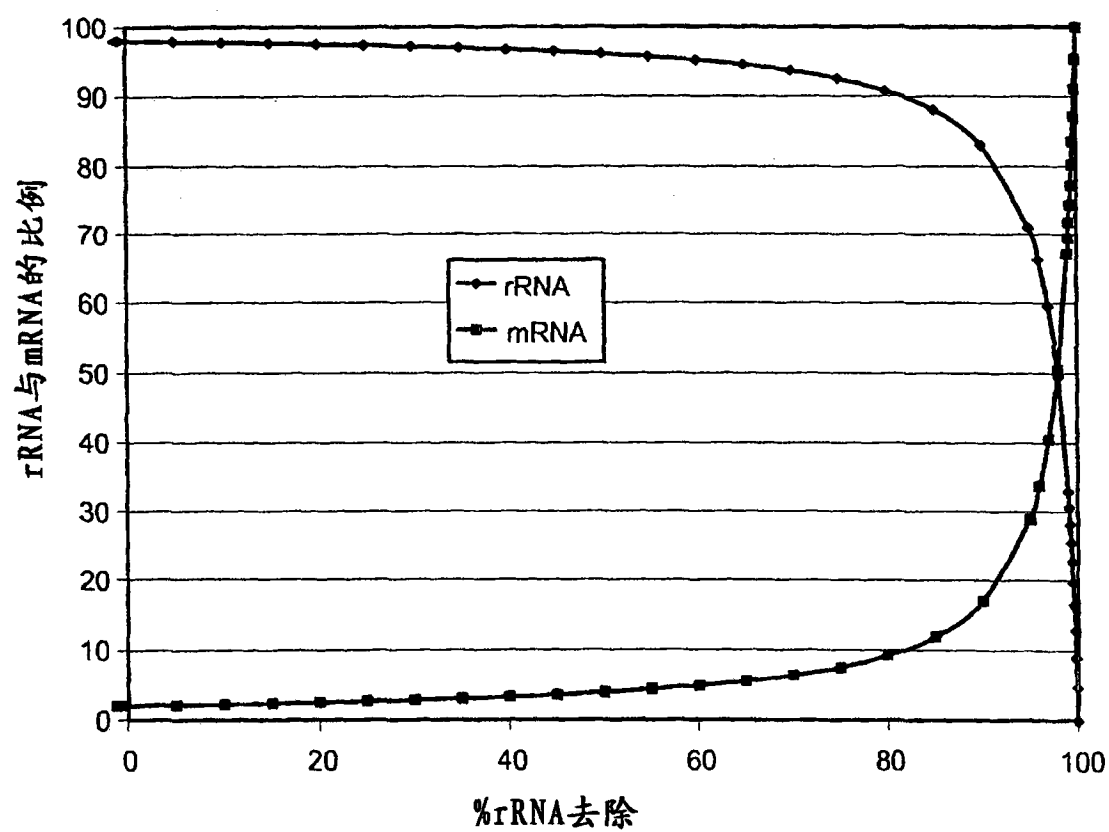


图 6A

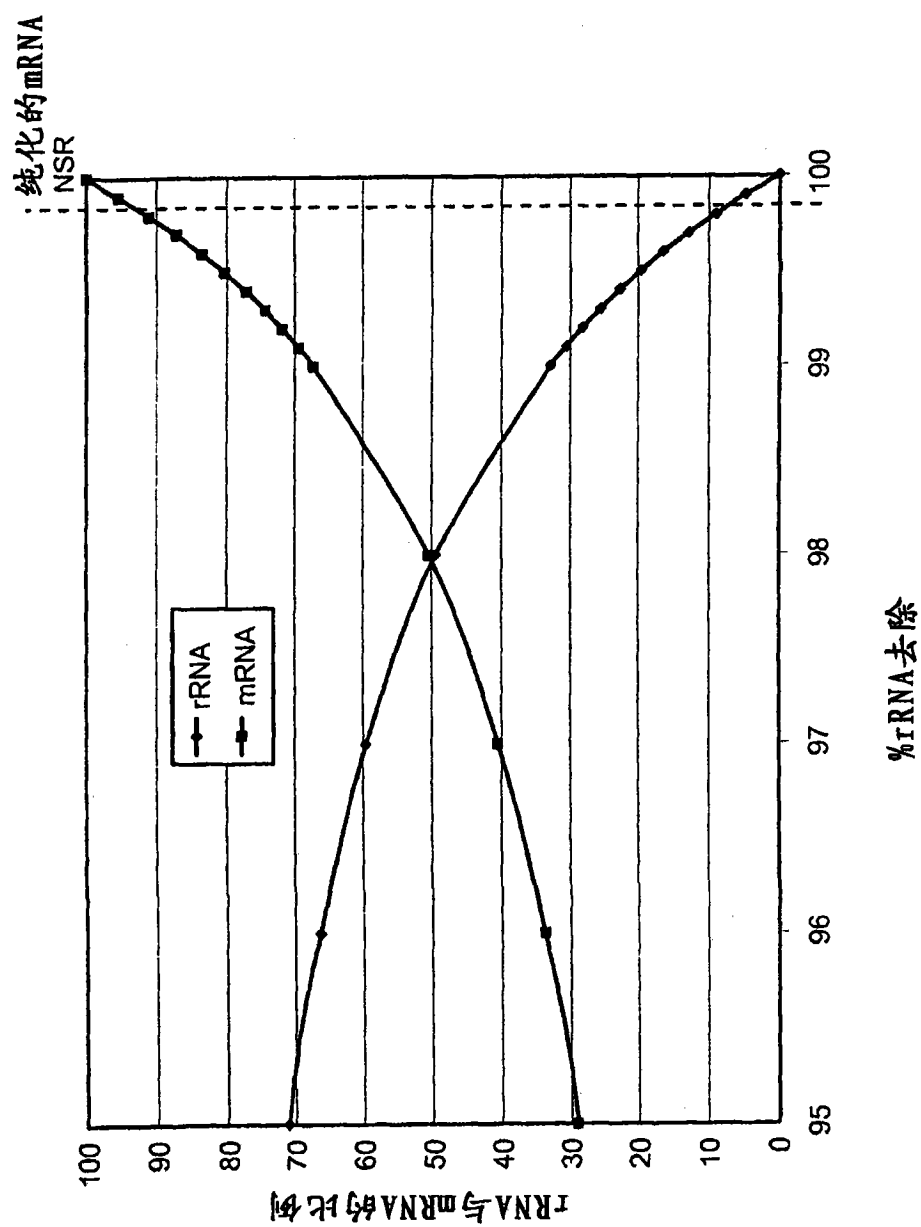


图 6B

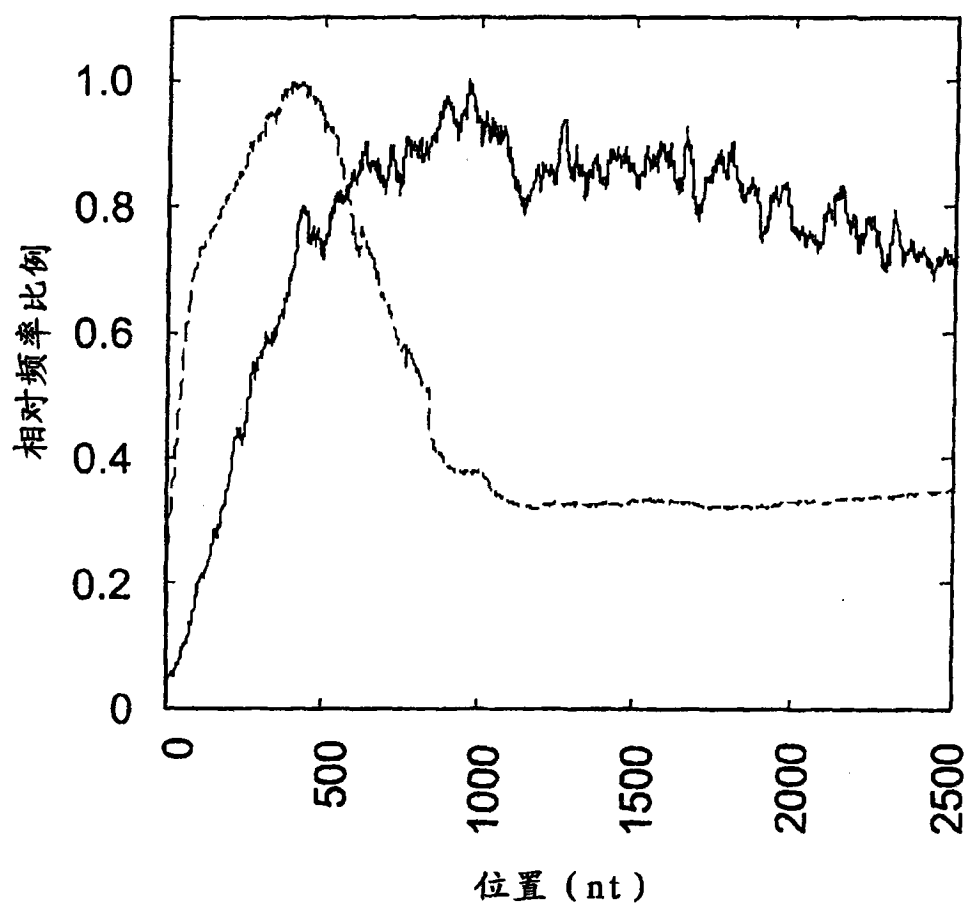


图 7A

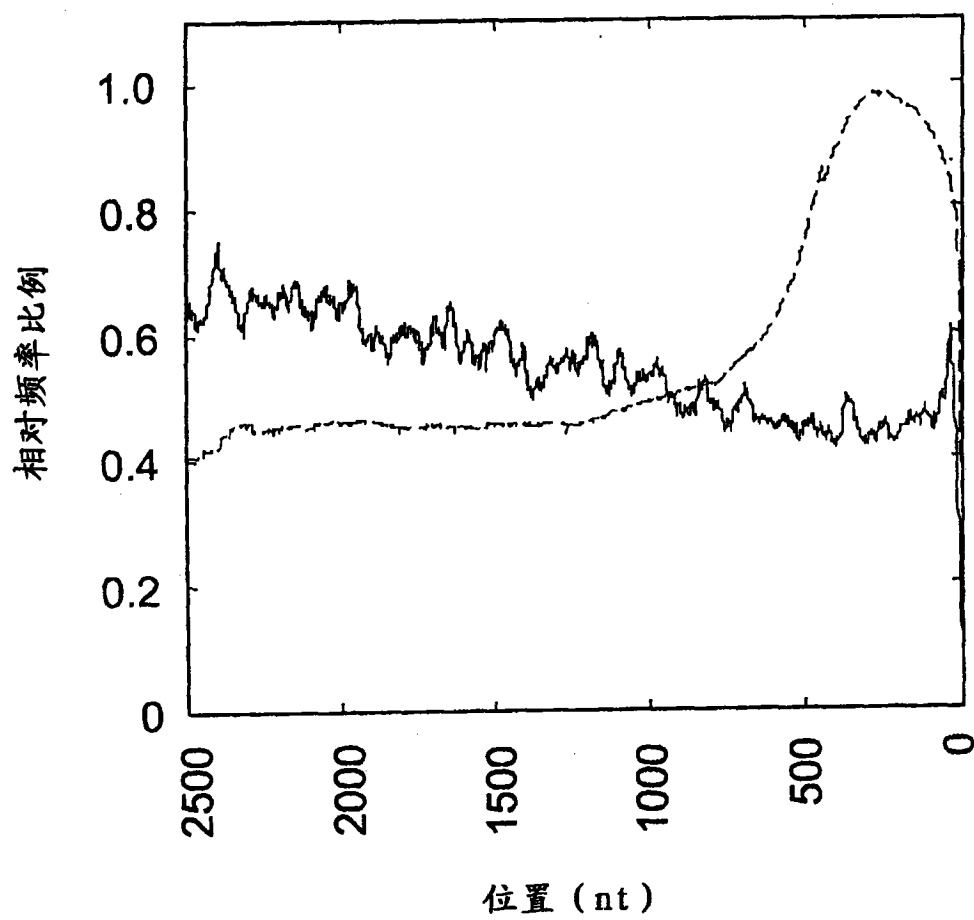


图 7B

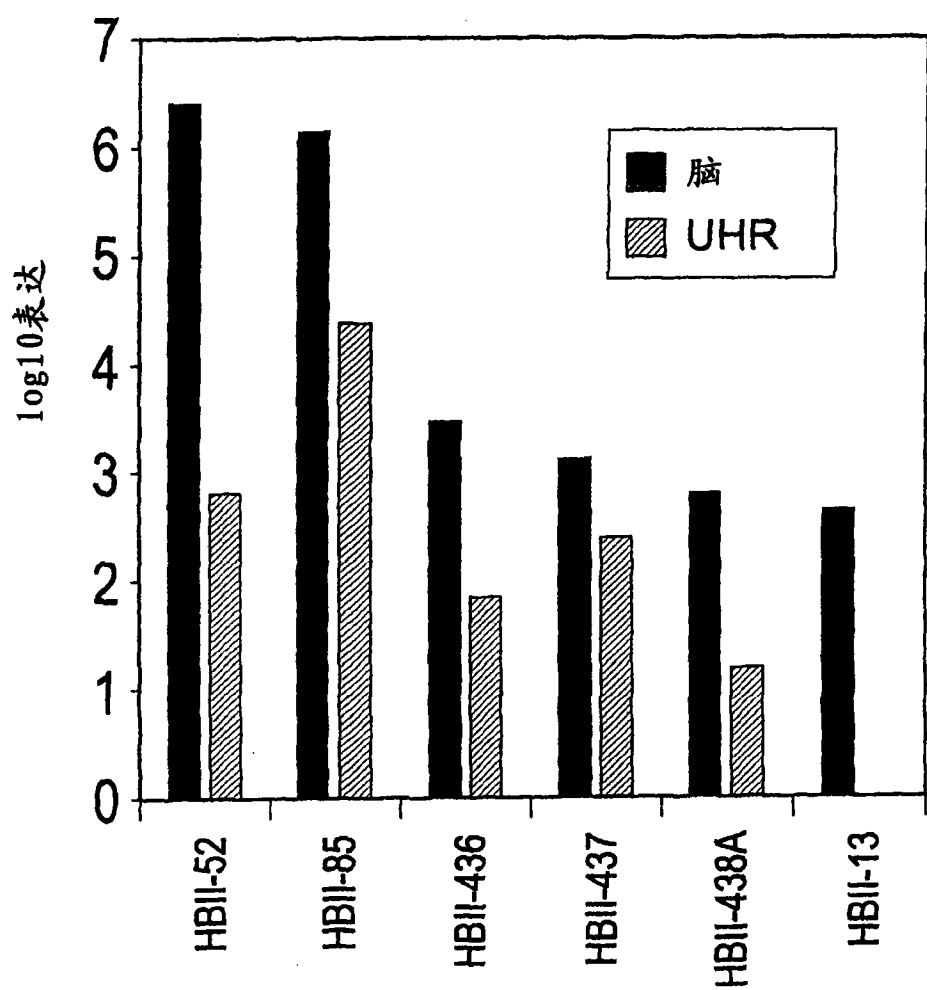


图 8B