



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101768616 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 09

(21) 申请号 200910263837. 4

(22) 申请日 2009. 12. 17

(30) 优先权数据

08022082. 5 2008. 12. 19 EP

(73) 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 T·哈斯林格 T·梅茨勒

A·佩塞尼 H·索贝克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 林毅斌 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12P 19/34 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2004072167 A1, 2004. 04. 15,

WO 2006131391 A1, 2006. 12. 14,

审查员 王奇

权利要求书1页 说明书19页

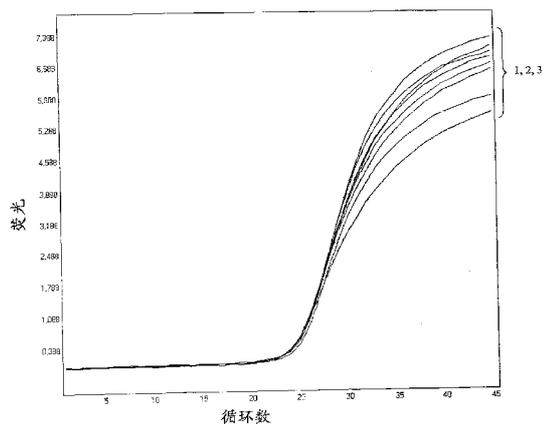
序列表5页 附图14页

(54) 发明名称

含稳定聚合酶的反应化合物的干组合物

(57) 摘要

本发明提供获得反应化合物干组合物的方法,该方法在某一储存时间后重新溶解时维持化合物的生物活性。优选干组合物包含聚合酶并且干组合物对于重新溶解后的PCR扩增是可用的。



1. 制备反应化合物的可储存干组合物的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a) 提供反应化合物的液体混合物,所述液体混合物包含引物、核苷酸、Taq DNA 聚合酶和第一稳定分子,其中所述第一稳定分子选自酪蛋白和 BSA,以及
 - b) 通过降低所述液体混合物周围的压力干燥所述液体混合物,其中所述反应化合物的干组合物可溶于水溶液中,所述方法的特征在于步骤 a) 的所述反应化合物的液体混合物进一步包含作为第二稳定分子的适配体,其中所述适配体选自序列 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述反应化合物的液体混合物是含有镁盐的缓冲水溶液。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中在步骤 b) 中所述液体混合物周围的压力下降至低于 600mbar。
4. 权利要求 3 的方法,其中在步骤 b) 中所述液体混合物周围的压力下降至低于 400mbar。
5. 权利要求 4 的方法,其中在步骤 b) 中所述液体混合物周围的压力下降至 200mbar。
6. 权利要求 1 或 2 的方法,其中在步骤 b) 中所述干燥在室温下完成。
7. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述反应化合物的液体混合物进一步包含检测探针。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述检测探针是荧光标记探针。
9. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述反应化合物的液体混合物进一步包含模板 DNA。
10. 反应化合物的干组合物,所述干组合物包含引物、核苷酸、Taq DNA 聚合酶、第一稳定分子和作为第二稳定分子的适配体,其中所述第一稳定分子选自酪蛋白和 BSA,所述适配体选自序列 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10 以及所述干组合物室温下储存至少 1 周后重新溶解时提供 PCR 活性。
11. 权利要求 10 的反应化合物的干组合物,其中所述反应化合物的干组合物进一步包含检测探针。
12. 实施 PCR 扩增的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a) 通过加入水溶液重新溶解权利要求 10-11 任一项的反应化合物的干组合物,并且
 - b) 用包含重新溶解的反应化合物的水溶液来实施热循环方案。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述水溶液包含待通过热循环方案扩增的靶核酸。

含稳定聚合酶的反应化合物的干组合物

[0001] 发明背景

[0002] 极少生物反应化合物以溶解形式在任何长的时间内保持稳定,尤其在室温下储存更是如此。因此,过去进行了大量评价增强干燥形式生物反应化合物储存能力可能性的研究。

[0003] 基于在干反应化合物领域的大量现有技术文献,本领域技术人员确信为了确保例如聚合酶在重新溶解时的生物活性,使用至少一种稳定添加剂是必不可少的。

[0004] WO 2008/36544 描述了为提供干组合物的所谓填充材料的应用,所述填充材料是例如:糖类(如 FICOLL™、蔗糖、葡萄糖、海藻糖、松三糖、DEXTRAN™ 或甘露醇)、蛋白质(如 BSA、明胶或胶原)以及聚合物(如 PEG 或聚乙烯吡咯烷酮(PVP))。在 US 5,098,893、US5,200,399 和 US 5,240,843 中进一步描述了用于稳定生物试剂的玻璃形成的填充材料。在 US 3,300,474 中公开的填充材料 FICOLL™ 是共聚物。

[0005] 此外,液体反应混合物的干燥方法在大多数情况下本质上是非常复杂的,因此干燥程序有很高的要求而且昂贵。在文献中,冻干(US5,593,824)或真空干燥(US 5,565,318)用于干燥糖类聚合物基质中的生物材料。冷冻干燥法即冻干是在很多现有技术文献中公开的充分建立的蛋白质储藏技术(例如 Passot, S., 等, *Pharmaceutical Development and Technology* 12(2007)543-553; Carpenter, J. F., 等, *Pharmaceutical Research* 14(8)(1997)969-975; Schwegman, J. J., 等, *Pharmaceutical Development and Technology* 10(2005)151-173)。

[0006] 在 US 7,407,747 中描述了包含 Taq 聚合酶遗传修饰的用于测序的不同反应混合物干燥条件的选择。所使用的干燥程序是冻干、在没有另外加热下的离心真空蒸发浓缩(speedvac)、在另外加热下的离心真空蒸发浓缩和室温风干。对该专利内的反应混合物进行了有关各种冷冻保护剂如海藻糖、蔗糖、葡萄糖和三甲胺-N-氧化物(TMANO)的试验。此外,还进行了在没有任何冷冻保护剂下的实验,但没有公开关于那些反应混合物稳定性随时间变化的数据。仅报道了含有海藻糖和牛血清白蛋白(BSA)的反应混合物长达8周的良好稳定性。

[0007] 此外,US 7,407,747 公开了使用各种测序混合物中的聚合酶的实验,所述测序混合物包含缓冲液、核苷酸、含荧光标记的核苷酸和引物的各种组成。尚没有公开是否可干燥并储存用于实时 PCR 扩增的混合物(即含有缓冲液、核酸、引物和检测探针的混合物)中的聚合酶而不影响聚合酶的 PCR 活性。

[0008] 本发明提供了干燥实时 PCR 混合物内 Taq DNA 聚合酶的方法,而所获得的干组合物可被储存但不影响 Taq DNA 聚合酶的 PCR 性能。

[0009] 发明概述

[0010] 提供含有聚合酶的反应化合物的干组合物是一个复杂的问题,特别是在以下情况:意欲将所述干组合物储存一定时间并且所述干组合物随后的重新溶解必须尽可能不影响 PCR 应用的聚合酶活性。

[0011] 在干燥含不同组分的液体溶液过程中,所述组分的浓度会不断增加,致使其性质

彻底改变,而液体溶液的确切性能取决于各组分和干燥程序。技术人员认识到的是,例如高盐浓度将使蛋白质失去稳定性,缓冲液在高浓度下性能将改变,导致产生极端的 pH 值。

[0012] 如上文所述,本领域技术人员了解可加入到含有聚合酶的溶液中以增强聚合酶在干燥过程中的稳定性的某些化合物。此外,如果某种聚合酶的混合物的组分会改变,那么本领域技术人员将不能预料可得到该聚合酶的不同干燥效果。

[0013] 例如,US 7,407,747 公开了可在由以下物质组成的混合物中干燥 Taq 聚合酶:缓冲液、核苷酸、BSA 和海藻糖,并且公开了所述聚合物可保持活性长达 8 周。

[0014] 开发了本发明的方法以提供 PCR 应用的聚合酶干组合物,所述组合物不仅包含缓冲剂和核苷酸,而且还包含另外的组分(即引物乃至引物和探针),以构成完整的检测混合物。

[0015] 业已认识到的是,可将含有聚合酶、核苷酸和稳定分子的液体混合物进行干燥和储存而不影响聚合酶的活性,但如果将额外的引物加到液体混合物中,则会使聚合酶的活性丧失。更详细地说,如果在干燥程序之后直接进行重新溶解,则由于引物的加入而使 PCR 性能丧失。

[0016] 本发明解决了增加 Taq 聚合酶稳定性致使所干燥的液体混合物可包含附加的引物这一技术问题。

[0017] 令人意想不到的是,发现将适配体加入液体溶液增强了 Taq 聚合酶的稳定性,其中所述稳定化不仅对于干燥而且对于干燥混合物的储存都是足够好的。

[0018] 因此,本发明的一个方面是制备可储存的反应化合物干组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0019] a) 提供反应化合物的液体混合物,所述液体混合物包含引物、核苷酸、Taq DNA 聚合酶和第一稳定分子,和

[0020] b) 通过降低所述液体混合物周围的压力来干燥所述液体混合物,

[0021] 其中所述反应化合物干组合物在水溶液中是可溶性的,其特征在于步骤 a) 中所述反应化合物的液体混合物进一步包含作为第二稳定分子的适配体。

[0022] 在本发明全文中,短语“干组合物”用于强调溶剂的量,优选水溶剂下降至 5% 重量以下。

[0023] 短语“可储存的干组合物”在本发明全文中意指所述干组合物必须可储存至少一周,优选至少 4 周,更优选 8 周以上而不影响聚合酶的活性。

[0024] 本发明中的“稳定分子”是在含有所述聚合酶水溶液的干燥过程中,提高聚合酶对其 PCR 活性丧失的抗性的分子。

[0025] 本发明的另一方面是含有引物、核苷酸、Taq DNA 聚合酶、第一稳定分子和作为第二稳定分子的适配体的反应化合物的干组合物,所述干组合物提供了室温储存至少一周后重新溶解时的 PCR 活性。

[0026] 还有本发明的另一方面是实施 PCR 扩增的方法,所述方法包括以下步骤:

[0027] a) 通过加入水溶液重新溶解本发明的反应化合物干组合物,和

[0028] b) 用含有重新溶解的反应化合物的水溶液实施热循环方案。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明的一个方面是提供反应化合物的可储存干组合物的方法,所述方法包括以

下步骤：

[0031] a) 提供反应化合物的液体混合物，所述液体混合物包含引物、核苷酸、Taq DNA 聚合酶和第一稳定分子，和

[0032] b) 通过降低所述液体混合物周围的压力干燥所述液体混合物，

[0033] 其中所述反应化合物的干组合物在水溶液中是可溶性的，其特征在于步骤 a) 中所述反应化合物的液体混合物进一步包含作为第二稳定分子的适配体。

[0034] 可从几类分子中选出用于 Taq DNA 聚合酶的第一稳定分子。

[0035] 本发明优选的方法是其中所述第一稳定分子是蛋白质，优选所述的稳定分子是酪蛋白和 BSA 的方法。

[0036] 本发明另一个优选的方法是其中所述第一稳定分子是糖类，优选所述稳定分子是海藻糖或甘露醇的方法，。

[0037] 本发明又一个优选的方法是其中所述第一稳定分子是合成聚合物，优选所述稳定分子是 PEG 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 的方法。

[0038] 本发明令人意想不到的发现是，另一类分子，即适配体类能够为聚合酶提供稳定作用。已知适配体在溶液中与聚合酶结合，并将所谓的“热启动”特征附加到聚合酶中（例如 US 5, 475, 096 和 US 5, 270, 163）。简言之，短的寡核苷酸（适配体）与聚合酶结合致使聚合酶活性被阻断。如果在 PCR 扩增的热循环方案中温度升高到某一阈值以上，适配体则将释放聚合酶并启动聚合酶活性。因此，在“热启动”PCR 中，利用与聚合酶结合的适配体可阻碍不合乎需要的聚合酶低温活性，直到反应温度达到足以实施引物退火的高严格性。

[0039] 如上文所述，可干燥、储存并重新溶解含有缓冲剂、核苷酸和第一稳定分子的混合物中的 Taq DNA 聚合酶而不影响聚合酶活性，但向混合物加入引物之后，聚合酶活性在干燥之后直接丧失。只有在将适配体加入到溶液之后，聚合酶活性才可重新恢复。

[0040] 在不受理论的束缚下，预期引物 3' 端的羟基至少影响提供 PCR 活性的聚合酶的那些氨基酸。通过另外的实验（数据未显示）来检验该理论，其中用磷酸化的引物来代替引物，并分析了干燥后的 PCR 活性。结果表明磷酸化的引物不影响聚合酶，并且无需额外的适配体即可干燥反应化合物的液体混合物。

[0041] 在 Taq DNA 聚合酶的情况下，可将包含缓冲剂、核苷酸和例如作为稳定分子的酪蛋白的混合物进行干燥、储存和重新溶解而不影响聚合酶的稳定性（见实施例）。将引物加入混合物之后，PCR 性能在干燥后直接丧失（数据未显示，实施例仅显示储存后的结果）。因此，由于在液体混合物中引物的加入，增加了对稳定用于干燥的 Taq 聚合酶的需要。

[0042] 另外的实验显示，在没有第一稳定分子下，适配体不能提供足够的稳定性以维持聚合酶的活性（数据未显示）。因此，第一稳定分子与适配体的结合能够使包含缓冲剂、核苷酸和引物的混合物中的 TaqDNA 聚合酶的干燥和储存成为可能。

[0043] 在本发明的一个优选方法中，所述适配体是具有序列 SEQ ID NO :9 或 SEQ ID NO : 10 的适配体。

[0044] 在不受理论的束缚下，预期由于适配体附着在 Taq DNA 聚合酶上的能力，其增强了聚合酶对高盐浓度、极端 pH 值和引物羟基的抗性。

[0045] 在本发明另一个优选的方法中，所述反应化合物的液体混合物是包含镁盐的缓冲水溶液。

[0046] 在本发明更优选的方法中,用 Tris 或 HEPES 对所述反应化合物的液体混合物进行缓冲。

[0047] 在本发明另一个更优选的方法中,所述反应化合物的液体混合物进一步包含氯化钾。

[0048] 对于本发明方法的步骤 b) 中的干燥程序,若干工作流程是合适的。一般而言,本领域技术人员认识的是,干燥液体混合物所需的时间与所述液体混合物周围的压力相关。在本发明中认可的是,压力不应(至少不应在一个步骤内)降至非常小的压力值。如果压力差太大,那么液体混合物与含混合物的容器会接触不良,致使不能再实现完全的重新溶解。

[0049] 在本发明一个优选的方法中,步骤 b) 中所述液体混合物周围的压力下降至低于 600mbar,优选低于 400mbar,更优选 200mbar。

[0050] 在本发明一个更优选的方法中,维持所述减少的压力至少 6 小时,优选至少 10 小时,最优选 16 小时。

[0051] 基于实验室操作的合宜性,优选在 200mbar 下储存液体混合物过夜。

[0052] 为了减少制备干组合物所需的时间,可在两个步骤内完成本发明方法中的干燥步骤 b),即第一步用相对高的压力随后第二步用较低的压力。

[0053] 在本发明另一个优选的方法中,在步骤 b) 的第二部分进一步降低压力,所述进一步降低的压力低于 200mbar,优选低于 100mbar,最优选 50mbar。

[0054] 在本发明又一个优选的方法中,所述进一步降低的压力维持至少 1 小时,优选至少 3 小时,最优选 4 小时。

[0055] 优选的 2 步干燥流程包括第一步在 200mbar 下 10 小时,随后第二步在 50mbar 下 4 小时。

[0056] 在本发明又一个优选的方法中,步骤 b) 中所述的干燥在室温下进行。

[0057] 在本发明中,结果表明将温度调节到某个高值或低值并不影响重新溶解时的 PCR 活性。因此,优选在室温下进行干燥。

[0058] 为了给实时 PCR 提供完整的干组合物,还必须在反应化合物的液体混合物中加入检测探针。在本发明中证实,在反应化合物的液体混合物中加入检测探针不影响重新溶解时的 PCR 活性。请注意如果液体混合物包含检测探针但不含引物,那么即使没有适配体,Taq DNA 聚合酶仍维持其重新溶解时的 PCR 活性(数据未显示)。

[0059] 在本发明一个优选的方法中,所述反应化合物的液体混合物进一步包含检测探针。

[0060] 在本发明更优选的方法中,所述检测探针是荧光标记探针,优选杂交探针或水解探针。

[0061] 因为实时 PCR 通常是基于荧光检测而实施的,所以优选使用荧光标记探针。三种主要的探针模式简要介绍如下。

[0062] a) 水解探针模式(TaqMan®模式):

[0063] 用两种组分对单链的杂交探针进行标记。当用合适波长的光激发第一组分时,根据荧光共振能量转移原理,所吸收的能量转移至第二组分(即所谓的猝灭剂)。在 PCR 反应的退火步骤中,杂交探针结合到靶 DNA 上并在随后的延伸阶段中被 Taq 聚合酶的 5' -3' 核酸外切酶活性降解。结果被激发的荧光组分和猝灭剂在空间上彼此分离,因而可测量到第

一组分的荧光发射 (US 5, 210, 015、US 5, 538, 848、US 5, 487, 972、US 5, 804, 375)。

[0064] b) 分子信标 (Molecular Beacon) :

[0065] 还是用第一组分和猝灭剂对这些杂交探针进行标记, 优选标记物位于探针的两端。作为探针二级结构的结果, 两种组分在溶液中都是空间相邻的。在与靶核酸杂交之后, 两种组分都彼此分离以至于在用合适波长的光激发之后, 可测量到第一组分的荧光发射 (US 5, 118, 801)。

[0066] c) FRET 杂交探针 :

[0067] 该模式的特征在于: 同时使用了两种单链的杂交探针并且它们与所扩增靶核酸的同一条链的邻近位点互补。两种探针用不同的荧光组分来标记。当用合适波长的光激发时, 根据荧光共振能量转移原理, 第一组分将所吸收的能量转移给第二组分, 以至于当两种杂交探针与被检测靶分子的邻近位置结合时, 可以测量第二组分的荧光发射。作为监测 FRET 受体组分荧光增加的选择, 还可监测 FRET 供体组分的荧光下降来作为杂交事件的定量测定 (WO 97/46707 ;WO 97/46712 ;WO 97/46714)。

[0068] 在大多数 PCR 应用中, 需要结合对照机制以评价如此的 PCR 扩增是否确实有效。一般而言, 这是用掺入到样本中的模板 DNA (内部对照) 或用单独的容器内的模板 DNA (外部对照) 来实施的。在本发明的全文中, 这两种备选方式统称为短语“阳性对照”。

[0069] 在本发明优选的方法中, 所述反应化合物的液体混合物进一步包含模板 DNA。

[0070] 在本发明更优选的方法中, 将所述模板 DNA 用作阳性对照。

[0071] 如上文所述, 本发明内的实验提示核酸 3' 端的羟基影响 Taq DNA 聚合酶。因此, 加到液体混合物中的模板 DNA 还可对重新溶解后的 PCR 性能产生不良影响。但是, 可能基于模板 DNA 浓度比正常引物浓度低得多的原因, 经鉴定表明在液体混合物中加入模板 DNA 不影响重新溶解后的 PCR 性能。

[0072] 在本发明更优选的方法中, 所述模板 DNA 是环状质粒。

[0073] 这种环状质粒没有任何 3' 羟基, 因此甚至可进一步减少羟基的不良影响。

[0074] 本发明的另一方面是包含引物、核苷酸、Taq DNA 聚合酶、第一稳定分子和作为第二稳定分子的适配体的反应化合物干组合物, 所述干组合物提供室温储存至少一周后重新溶解时的 PCR 活性。

[0075] 在本发明更优选的反应化合物干组合物中, 在室温储存至少 4 周、更优选至少 8 周之后重新溶解时提供所述 PCR 活性。

[0076] 进行了若干评价长期稳定性的实验, 例如包含带适配体 NTQ12-46A (SEQ ID NO :9) 的 Taq DNA 聚合酶以及引物和探针的反应化合物干组合物提供了室温下储存 8 周后重新溶解时的 PCR 活性 (数据未显示)。

[0077] 本发明优选的反应化合物干组合物是进一步包含检测探针的干组合物。

[0078] 在本发明更优选的反应化合物干组合物中, 所述检测探针是荧光标记探针, 优选杂交探针或水解探针。

[0079] 本发明另外优选的反应化合物干组合物是以下干组合物, 其中所述第一稳定分子是蛋白质, 优选所述稳定分子是酪蛋白或 BSA。

[0080] 本发明还优选的反应化合物干组合物是以下干组合物, 其中所述第一稳定分子是糖类, 优选所述稳定分子是海藻糖或甘露醇。

[0081] 本发明还优选的反应化合物干组合物是以下干组合物,其中所述第一稳定分子是合成的聚合物,优选所述稳定分子是 PEG 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。

[0082] 在本发明另外优选的反应化合物干组合物中,所述适配体是具有序列 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO:10 的适配体。

[0083] 在本发明还优选的反应化合物干组合物中,所述反应化合物液体混合物进一步包含模板 DNA。

[0084] 在本发明更优选的反应化合物干组合物中,所述模板 DNA 是阳性对照。

[0085] 在本发明另外更优选的反应化合物干组合物中,所述模板 DNA 是环状质粒。

[0086] 本发明的另一方面是实施 PCR 扩增的方法,所述方法包括以下步骤:

[0087] a) 通过加入水溶液重新溶解本发明反应化合物的干组合物,以及

[0088] b) 用包含重新溶解的反应化合物的水溶液实施热循环方案。

[0089] 无需特殊的辅助手段,通过简单地加入水溶液便可重新溶解本发明反应化合物的干组合物。但是为了帮助溶解并减少溶解时间,可优选施用机械刺激 (mechanical stimulation)。

[0090] 在本发明优选的实施 PCR 扩增的方法中,通过振荡混合物来帮助在步骤 b) 中所述的重新溶解。

[0091] 在本发明另外优选的实施 PCR 扩增的方法中,通过旋涡振荡混合物来帮助在步骤 b) 中所述的重新溶解。

[0092] 因为只需要加水到所述反应化合物干组合物中,所以在本发明范围内可有两种实施 PCR 扩增的备选方案。在第一种备选方案中,用水溶液对干组合物进行重新溶解,然后加入含有被分析靶核酸的样品。在第二种备选方案中 (优选的备选方案),直接用含有被扩增靶核酸的水溶液重新溶解干组合物。

[0093] 在本发明优选的方法中,所述水溶液包含通过热循环方案进行扩增的靶核酸。

[0094] 提供以下实施例、序列表和附图以帮助理解本发明,其实际范围在所附的权利要求书中阐述。应该理解的是,可对所阐述的方法进行不离背本发明精神的修改。

附图说明

[0095] 图 1 用 Taq 聚合酶和酪蛋白进行的 Eamst 质粒扩增

[0096] 图 2 用 Taq 聚合酶和酪蛋白进行的 Wsebi 质粒扩增

[0097] 图 3 用 Taq 聚合酶和 BSA 进行的 Eamst 质粒扩增

[0098] 图 4 用 Taq 聚合酶和 BSA 进行的 Wsebi 质粒扩增

[0099] 图 5 用 Taq 聚合酶、NTQ12-46A 适配体和酪蛋白进行的 Eamst 质粒扩增

[0100] 图 6 用 Taq 聚合酶、NTQ12-46A 适配体和酪蛋白进行的 Wsebi 质粒扩增

[0101] 图 7 用 Taq 聚合酶、NTQ12-46A 适配体和 BSA 进行的 Eamst 质粒扩增

[0102] 图 8 用 Taq 聚合酶、NTQ12-46A 适配体和 BSA 进行的 Wsebi 质粒扩增

[0103] 图 9 用 Taq 聚合酶、NTQ12-46A 适配体和酪蛋白进行的 Wsebi 质粒扩增

[0104] 图 10 用 Taq 聚合酶、21-41-P 适配体和酪蛋白进行的 Wsebi 质粒扩增

[0105] 图 11 用 Taq 聚合酶、NTQ12-46A 适配体和酪蛋白进行的 Eamst 质粒扩增

[0106] 图 12 用 Taq 聚合酶、21-41-P 适配体和酪蛋白进行的 Eamst 质粒扩增

[0107] 图 13 用干燥的质粒 DNA、Taq 聚合酶、NTQ12-46A 适配体和酪蛋白进行的 Eamst 质粒扩增

[0108] 图 14 用干燥的质粒 DNA、Taq 聚合酶、NTQ12-46A 适配体和酪蛋白进行的 Wsebi 质粒扩增

[0109] 实施例 1

[0110] Taq DNA 聚合酶的稳定性

[0111] 该实施例概述了在不合适适配体下 Taq DNA 聚合酶的液体混合物的效果。使用两种不同的参数,在含和不含检测混合物 (detection mix) (含或不含引物和探针) 下分析了储存并重新溶解后聚合酶的 PCR 性能。重新溶解之前将液体混合物于 200mbar 下干燥 16 小时,并在 37°C 下储存 1 周。还使用了未干燥的液体混合物作为对照 (以下称为液体参照)。

[0112] 在 384 孔微量滴定板 (Roche Diagnostic GmbH) 的孔中提供所有混合物,重新溶解之后在 LightCycler® 480 (Roche Diagnostic GmbH) 上使用以下运行方案来实施 PCR 运行。

[0113] -5 分钟 95°C

[0114] -10 秒钟 95°C, 30 秒钟 60°C, 1 秒钟 72°C (45x)

[0115] -10 秒钟 40°C

[0116] 含酪蛋白的 Mastermix :

[0117] 60mM Tris/HCl pH 8, 3, 60mM KCl, 6, 4mM MgCl₂, 0, 4mM dATP, 0, 4mM dCTP, 0, 4mM dGTP, 1, 2mM dUTP, 1mg/mL 酪蛋白和 0, 3U/μl Taq DNA 聚合酶 (无甘油)。

[0118] 含 BSA 的 Mastermix :

[0119] 60mM Tris/HCl pH 8, 3, 60mM KCl, 6, 4mM MgCl₂, 0, 4mM dATP, 0, 4mM dCTP, 0, 4mM dGTP, 1, 2mM dUTP, 1mg/ml BSA 和 0, 3U/μl Taq DNA 聚合酶 (无甘油)。

[0120] qPCR Eamst Detection Mix :

[0121] 10mM Tris pH 8, 3, 0, 05% Brij, 7, 1μM 正向引物 (SEQ ID NO :1), 7, 1μM 反向引物 (SEQ ID NO :2) 和 0, 6μM Fam-Tamra 探针 (SEQ IDNO :3)。

[0122] qPCR Wsebi Detection Mix :

[0123] 10mM Tris pH 8, 3, 0, 05% Brij, 7, 1μM 正向引物 (SEQ ID NO :4), 7, 1μM 反向引物 (SEQ ID NO :5) 和 0, 6μM Fam-Tamra 探针 (SEQ IDNO :6)。

[0124] 在微量滴定板上制备和干燥下列混合物,将每种混合物以 3 个重复置于所述微量滴定板上 :

		Taq DNA 聚合酶			
		Eamst		Wsebi	
		酪蛋白	BSA	酪蛋白	BSA
[0125]	不含 Detection Mix	5 μl Master		5 μl Master	
	含 Detection Mix	5 μl Master + 1,4 μl Detection Mix Eamst		5 μl Master + 1,4 μl Detection Mix Wsebi	

[0126] 对于随后的 PCR 扩增,按照以下移液方案通过加入溶液重新溶解干组合物。在 PCR 运行之前将液体参照移液至微量滴定板的空孔中。以 4x10⁴ 拷贝 / μl 的浓度对质粒进行

移液。

[0127]

	Eamst			Wsebi		
	不含 Detection Mix	含 Detection Mix	液体参 照	不含 Detection Mix	含 Detection Mix	液体参照
水	6.1 μ l	7.5 μ l	1.1 μ l	6.1 μ l	7.5 μ l	1.1 μ l
Master Mix	---	---	5 μ l	---	---	5 μ l
Eamst Detection Mix	1.4 μ l	---	1.4 μ l	---	---	---
Wsebi Detection Mix	---	---	---	1.4 μ l	---	1.4 μ l
Eamst 质 粒 (SEQ ID NO:7)	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l	---	---	---
Wsebi 质 粒 (SEQ ID NO:8)	---	---	---	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
终体积	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

[0128] 结果：

[0129] 本实施例的PCR扩增曲线概述于图1-4中，其中不含检测混合物 (detection mix) 的曲线用“1”标号，含检测混合物的曲线用“2”标号，液体参照曲线用“3”标号。此外，下表概述了由图1-4的曲线所获得的PCR值。

[0130]

		Taq DNA 聚合酶					
		Eamst			Wsebi		
		不含 Detection Mix	含 Detection Mix	液体参照	不含 Detection Mix	含 Detection Mix	液体参 照
酪蛋白	交点	24.7	21.1	24.8	26.2	---	26.6
	荧光	7.2	2.0	7.2	5.7	---	5.8
BSA	交点	24.5	21.7	24.8	25.9	---	26.6
	荧光	7.5	1.8	8.0	5.5	---	7.0

[0131] 该实施例清楚地显示,在不含检测混合物下干燥的 Taq DNA 聚合酶的性能等同于在液体参照中的 Taq DNA 聚合酶的性能。在另一方面,如果在含检测混合物下干燥 Taq DNA 聚合酶,则重新溶解后的 PCR 性能不再是可接受的。

[0132] 对于 Wsebi 参数,在含检测混合物下进行干燥的情况下,根本没有可检测到的扩增。对于 Eamst 参数,相似的交点仍然是可检测到的,但荧光值不再是可接受的。

[0133] 实施例 2

[0134] 含适配体 NTQ12-46A 的 Taq DNA 聚合酶的稳定性

[0135] 该实施例概述了含适配体 NTQ12-46A (SEQ ID NO :9) 的 Taq DNA 聚合酶的液体混合物的效果。在该实施例中,含附着的适配体的 TaqDNA 聚合酶命名为 AptaTaq DNA 聚合酶 NTQ 12-46A。

[0136] 使用两种不同的参数,在含和不含检测混合物 (detection mix) (含或不含引物和探针) 下分析了储存并重新溶解后聚合酶的 PCR 性能。重新溶解之前将液体混合物于 200mbar 下干燥 16 小时,并在 37°C 下储存 1 周。还使用了未干燥的液体混合物作为对照 (以下称为液体参照)。

[0137] 在 384 孔微量滴定板 (Roche Diagnostic GmbH) 的孔中提供所有混合物,重新溶解之后在 LightCycler® 480 (Roche Diagnostic GmbH) 上使用以下运行方案来实施 PCR 运行:

[0138] -5 分钟 95°C

[0139] -10 秒钟 95°C, 30 秒钟 60°C, 1 秒钟 72°C (45x)

[0140] -10 秒钟 40°C

[0141] 含酪蛋白的 Mastermix:

[0142] 60mM Tris/HCl pH 8, 3, 60mM KCl, 6, 4mM MgCl₂, 0, 4mM dATP, 0, 4mM dCTP, 0, 4mM dGTP, 1, 2mM dUTP, 1g/L 酪蛋白和 0, 3U/μl AptaTaq DNA 聚合酶 (无甘油 ;0, 65pmol 适配体 (NTQ 12-46A ;SEQ ID NO :9)/1U Taq DNA 聚合酶)。

[0143] 含 BSA 的 Mastermix:

[0144] 60mM Tris/HCl pH 8, 3, 60mM KCl, 6, 4mM MgCl₂, 0, 4mM dATP, 0, 4mM dCTP, 0, 4mM dGTP, 1, 2mM dUTP, 1mg/ml BSA 和 0, 3U/μl AptaTaq DNA 聚合酶 (无甘油 ;0, 65pmol 适配体 (NTQ 12-46A ;SEQ ID NO :9)/1U Taq DNA 聚合酶)。

[0145] qPCR Eamst Detection Mix 和 qPCR Wsebi Detection Mix:

[0146] 这些检测混合物与实施例 1 中的相同。

[0147] 在微量滴定板上制备和干燥下列混合物,将每种混合物以 3 个重复置于所述微量滴定板上:

[0148]

AptaTaq DNA 聚合酶 NTQ12-46A				
Eamst			Wsebi	
酪蛋白	BSA	酪蛋白	BSA	
不含 Detection Mix	5 μ l Master		5 μ l Master	
含 Detection Mix	5 μ l Master + 1,4 μ l Detection Mix Eamst		5 μ l Master + 1,4 μ l Detection Mix Wsebi	

[0149] 对于随后的PCR扩增,按照以下移液方案通过加入溶液重新溶解干组合物。在PCR运行之前将液体参照移液至微量滴定板的空孔中。以 4×10^4 拷贝 / μ l 的浓度对质粒进行移液。

[0150]

	Eamst			Wsebi		
	不含 Detection Mix	含 Detection Mix	液体参照	不含 Detection Mix	含 Detection Mix	液体参照
水	6.1 μ l	7.5 μ l	1.1 μ l	6.1 μ l	7.5 μ l	1.1 μ l
Master Mix	---	---	5 μ l	---	---	5 μ l
Eamst Detection Mix	1.4 μ l	---	1.4 μ l	---	---	---
Wsebi Detection Mix	---	---	---	1.4 μ l	---	1.4 μ l
Eamst 质粒 (SEQ ID NO:7)	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l	---	---	---
Wsebi 质粒 (SEQ ID NO:8)	---	---	---	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
终体积	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

[0151] 结果:

[0152] 本实施例的PCR扩增曲线概述于图5-8中,其中在不含检测混合物下干燥后的曲线用“1”标号,在含检测混合物下干燥后的曲线用“2”标号,液体参照(未干燥)的曲线用“3”标号。此外,下表概述了由图5-8的曲线所获得的PCR值。

[0153]

		AptaTaq DNA 聚合酶 NTQ12-46A					
		Eamst			Wsebi		
		不含 Detection Mix	含 Detection Mix	液体参照	不含 Detection Mix	含 Detection Mix	液体参 照
酪蛋白	交点	24.3	23.9	24.9	24.1	24.0	25.1
	荧光	6.7	5.7	7.3	4.3	4.1	5.4
BSA	交点	24.6	24.2	25.0	24.4	24.2	25.0
	荧光	6.5	5.3	7.6	4.3	4.0	6.0

[0154] 为了证实适配体的稳定化性质,需要将图 5-8 的扩增曲线与图 1-4 比较,更准确地讲是图 5 与图 1 比较,图 6 与图 2 比较,图 7 与图 3 比较,图 8 与图 4 比较。很显然图 1-4 显示显著下降的干燥后扩增曲线,而图 5-8 显示仅有轻微改变的干燥后扩增曲线。

[0155] 该实施例清楚地显示,在含或不含检测混合物下干燥的 AptaTaqDNA 聚合酶 NTQ12-46A 的性能在干组合物重新溶解后仍然是可以接受的。

[0156] 实施例 3

[0157] 含适配体 NTQ12-46A 与含适配体 21-42-P 的 Taq DNA 聚合酶的比较

[0158] 在该实施例中,将含适配体 NTQ12-46A (SEQ ID NO :9) 的 TaqDNA 聚合酶与含适配体 21-42-P (SEQ ID NO :10) 的 Taq DNA 聚合酶的液体混合物的 PCR 性能进行比较。在该实施例中,含附着的适配体的 Taq DNA 聚合酶分别命名为 AptaTaq DNA 聚合酶 NTQ 12-46A 和 AptaTaq DNA 聚合酶 21-42-P。

[0159] 使用两种不同的参数,在含检测混合物(含引物和探针)下分析了储存并重新溶解后含上述两种适配体的聚合酶的 PCR 性能。重新溶解之前将液体混合物于 200mbar 下干燥 16 小时,并在 37°C 下储存 1 周。还使用了未干燥的液体混合物作为对照(以下称为液体参照)。

[0160] 在 384 孔微量滴定板 (Roche Diagnostic GmbH) 的孔中提供所有混合物,重新溶解之后在 **LightCycler®** 480 (Roche Diagnostic GmbH) 上使用以下运行方案来实施 PCR 运行:

[0161] -5 分钟 95°C

[0162] -10 秒钟 95°C, 30 秒钟 60°C, 1 秒钟 72°C (45x)

[0163] -10 秒钟 40°C

[0164] 含酪蛋白 + 适配体 NTQ12-46A 的 Mastermix:

[0165] 60mM Tris/HCl pH 8, 3, 60mM KCl, 6, 4mM MgCl₂, 0, 4mM dATP, 0, 4mM dCTP, 0, 4mM dGTP, 1, 2mM dUTP, 1g/L 酪蛋白和 0, 3U/μl AptaTaq DNA 聚合酶(无甘油; 0, 65pmol 适配体 NTQ 12-46A (SEQ ID NO :9)/1U Taq DNA 聚合酶)。

[0166] 含酪蛋白 + 适配体 21-42-P 的 Mastermix:

[0167] 60mM Tris/HCl pH 8, 3, 60mM KCl, 6, 4mM MgCl₂, 0, 4mM dATP, 0, 4mM dCTP, 0, 4mM dGTP, 1, 2mM dUTP, 1g/L 酪蛋白, 0, 8U/μl AptaTaq DNA 聚合酶(无甘油; 0, 5 μM 适配体 21-42-P (SEQ ID NO :10))。

[0168] qPCR Eamst Detection Mix 和 qPCR Wsebi Detection Mix :

[0169] 这些检测混合物与实施例 1 中的相同。

[0170] 在微量滴定板上制备和干燥下列混合物,将每种混合物以 3 个重复置于所述微量滴定板上:

含不同适配体的 Taq DNA 聚合酶				
Eamst		Wsebi		
	NTQ21-46A	21-42-P	NTQ21-46A	21-42-P
[0171] 含 Detection Mix	5 μ l Master + 1,4 μ l Detection Mix Eamst		5 μ l Master + 1,4 μ l Detection Mix Wsebi	

[0172] 对于随后的 PCR 扩增,按照以下移液方案通过加入溶液重新溶解对应每种适配体的干组合物。在 PCR 运行之前将液体参照移液至微量滴定板的空孔中。以 4×10^4 拷贝/ μ l 的浓度对质粒进行移液。

	Eamst		Wsebi	
	含 Detection Mix	液体参照	含 Detection Mix	液体参照
水	7.5 μ l	1.1 μ l	7.5 μ l	1.1 μ l
2x Master Mix	---	5 μ l	---	5 μ l
Eamst Detection Mix	---	1.4 μ l	---	---
[0173] Wsebi Detection Mix	---	---	---	1.4 μ l
Eamst 质粒 (SEQ ID NO:7)	2.5 μ l	2.5 μ l	---	---
Wsebi 质粒 (SEQ ID NO:8)	---	---	2.5 μ l	2.5 μ l
终体积	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

[0174] 结果:

[0175] 图 9-12 概述了该实施例的 PCR 扩增曲线,其中在含检测混合物下干燥后的曲线用“1”标号,液体参照(未干燥)曲线用“2”标号。此外,下表概述了由图 9-12 的曲线获得的 PCR 值。

		适配体 NTQ21-46A		适配体 21-42-P		
		Eamst	Wsebi	Eamst	Wsebi	
[0176]	含 Detection Mix 的干燥的 Master	交点	25.5	24.1	25.5	24.8
		荧光	6.4	5.0	7.3	6.4
	液体参照	交点	25.6	24.2	25.6	24.7
		荧光	6.3	5.3	7.8	6.6

[0177] 再次,为了证实适配体的稳定化性质,需要将图 9-12 的扩增曲线与图 1-4 的相比较,显然图 1-4 显示了干燥后显著下降的扩增曲线,而图 9-12 显示了仅轻微改变的干燥后曲线。

[0178] 该实施例清楚地显示,在含检测混合物下干燥的 AptaTaq DNA 聚合酶 NTQ12-46A 与 AptaTaq DNA 聚合酶 21-41-P 的性能在干组合物重新溶解后是相当的。

[0179] 实施例 4

[0180] 在含质粒 DNA 下干燥的 Apta Taq DNA 聚合酶 NTQ12-46A

[0181] 在本实施例中,将含 AptaTaq DNA 聚合酶 NTQ12-46A、两种不同参数的质粒和各自的检测混合物的液体混合物进行干燥,并将储存并重新溶解后的 PCR 性能与不含所述质粒的液体混合物进行比较。重新溶解之前将液体混合物于 200mbar 下干燥 16 小时,并在 37°C 下储存 1 周。还使用未干燥的液体混合物作为对照(以下称为液体参照)。在 384 孔微量滴定板(Roche Diagnostic GmbH)的孔中提供所有混合物,重新溶解之后在 LightCycler® 480(Roche Diagnostic GmbH)上使用以下运行方案来实施 PCR 运行:

[0182] -5 分钟 95°C

[0183] -10 秒钟 95°C, 30 秒钟 60°C, 1 秒钟 72°C (45x)

[0184] -10 秒钟 40°C

[0185] Master mix 和两种检测混合物均与在实施例 2 中的相同。

[0186] 在微量滴定板上制备和干燥下列混合物,将每种混合物以 3 个重复置于所述微量滴定板上。以 4×10^4 拷贝 / μ l 的浓度对质粒进行移液。

AptaTaq DNA 聚合酶 NTQ12-46A			
	Eamst	Wsebi	
[0187]	含 Detection Mix 的 Master	5 μ l Master + 1,4 μ l Detection Mix Eamst	5 μ l Master + 1,4 μ l Detection Mix Wsebi
	含 Detection Mix 和质粒 DNA 的 Master	5 μ l Master + 1,4 μ l Detection Mix Eamst + 2,5 μ l 质粒 DNA Eamst	5 μ l 2x Master + 1,4 μ l Detection Mix Wsebi + 2,5 μ l 质粒 DNA Wsebi

[0188] 对于随后的 PCR 扩增,按照以下移液方案通过加入溶液重新溶解对应每种混合物的干组合物。在 PCR 运行之前将液体参照移液至微量滴定板的空孔中。

[0189]

	Eamst			Wsebi		
	含 Detection Mix 的 Master	含 Detection Mix 和质 粒的 Master	液体参照	含 Detection Mix 的 Master	含 Detection Mix 和质 粒的 Master	液体参照
水	7.5μl	10μl	1.1μl	7.5μl	10μl	1.1μl
Master Mix	---	---	5μl	---	---	5μl
Eamst Detection Mix	---	---	1.4μl	---	---	---
Wsebi Detection Mix	---	---	---	---	---	1.4μl
Eamst 质粒	2.5μl	---	2.5μl	---	---	---
Wsebi 质粒	---	---	---	2.5μl	---	2.5μl
终体积	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl

[0190] 结果：

[0191] 图 13-14 概述了该实施例的 PCR 扩增曲线，其中在不含质粒下干燥后的曲线用“1”标号，在含质粒下干燥后的曲线用“2”标号，液体参照曲线（未干燥）用“3”标号。此外，下表概述了由图 13-14 的曲线获得的 PCR 值。

[0192]

		Eamst	Wsebi
含 Detection Mix 的 Master	交点	24.5	24.8
	荧光	6.6	5.2
含 Detection Mix 和质粒的 Master	交点	24.5	24.5
	荧光	6.5	5.0
液体参照	交点	24.9	24.9
	荧光	7.3	5.0

[0193] 该实施例清楚地显示，即使在干燥之前将质粒加入液体混合物中，在干组合物的储存和重新溶解后 AptaTaq DNA 聚合酶 NTQ12-46A 的性能也是不受影响的。

[0194] 序列表

[0195] <110> 罗赫诊断器材股份有限公司

[0196] 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

[0197] <120> 含稳定聚合酶的反应化合物的干组合物

[0198] <130>25614 FT

[0199] <150>EP08022082

[0200]	<151>2008-12-19	
[0201]	<160>10	
[0202]	<170>PatentIn version 3.5	
[0203]	<210>1	
[0204]	<211>17	
[0205]	<212>DNA	
[0206]	<213>人工的	
[0207]	<220>	
[0208]	<223>正向引物 Eamst	
[0209]	<400>1	
[0210]	gtggcggcac catgtct	17
[0211]	<210>2	
[0212]	<211>23	
[0213]	<212>DNA	
[0214]	<213>人工的	
[0215]	<220>	
[0216]	<223>反向引物 Eamst	
[0217]	<400>2	
[0218]	ctggttaaaa agattggttg cga	23
[0219]	<210>3	
[0220]	<211>22	
[0221]	<212>DNA	
[0222]	<213>人工的	
[0223]	<220>	
[0224]	<223>Fam-Tamra 探针 Eamst	
[0225]	<400>3	
[0226]	cagctggacc tacgggagcg gg	22
[0227]	<210>4	
[0228]	<211>21	
[0229]	<212>DNA	
[0230]	<213>人工的	
[0231]	<220>	
[0232]	<223>正向引物 Wsebi	
[0233]	<400>4	
[0234]	ggcttagtga atccttcgga g	21
[0235]	<210>5	
[0236]	<211>22	
[0237]	<212>DNA	
[0238]	<213>人工的	

[0239]	<220>	
[0240]	<223> 反向引物 Wsebi	
[0241]	<400>5	
[0242]	gtttacccaa ctttgcagtc ca	22
[0243]	<210>6	
[0244]	<211>23	
[0245]	<212>DNA	
[0246]	<213> 人工的	
[0247]	<220>	
[0248]	<223>Fam-Tamra 探针 Wsebi	
[0249]	<400>6	
[0250]	tgtgccgttg ccggctcaaa tag	23
[0251]	<210>7	
[0252]	<211>3227	
[0253]	<212>DNA	
[0254]	<213> 人工的	
[0255]	<220>	
[0256]	<223>Eamst 质粒	
[0257]	<400>7	
[0258]	tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
[0259]	cagcttgctet gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
[0260]	ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
[0261]	accatagatc ctgaggatcg gggatgataaa tcagtctgcg ccacatcggg gaaacaaaa	240
[0262]	tggcgcgaga tctaaaaaaa aaggctccaa aaggagcctt tcgcgctacc aggtaacgcg	300
[0263]	ccactccgac gggattaacg agtgccgtaa acgacgatgg tttaccgtg tgcggagatc	360
[0264]	aggttctgat cctcgagcat cttagaatt cgtcccacgg tttgtctaga gcagccgaca	420
[0265]	atctgggtgg cggcaccatg tctggctctc gagegatg ggtttgtca cccgctcccg	480
[0266]	taggtccagc tggcagctag cctcgcaacc aatcttttta accagccaat ttctgacgg	540
[0267]	gtaattttga tttgatgcc gtccgggtga gtcatagcgt ctggttgttt tgccagattc	600
[0268]	agcagagtct gtgcaatgcg gccgctgacg tcgaggaacg ccaggttgc cactttctca	660
[0269]	ctagtgacct gcagccggcg cgccatctgt gcagacaaac gcatcaggat atccggattt	720
[0270]	acctgaatca attggcgaaa tttttgtac gaaatttcag ccacttcaca ggcggttttc	780
[0271]	gcacgtacce atgcgctacg ttctggccc ttttcaaca ggcccagttc gccaataaaa	840
[0272]	tcacctgat tcagatagga gaggatcatt tttttaccct ctctgcttt gatcagcact	900
[0273]	gccacagacg ctttaacgat gtagtacagc gtttccgctt tttaccctg gtgaataaagc	960
[0274]	gtgctcttgg atgggtactt atgaatgtgg caatgagaca agaaccattc gagagtagga	1020
[0275]	tccggttgag gtttaccgaag taccataaga tcttaaaatt tttattatct agctagatga	1080
[0276]	taatattata tcaagaattg tacctgaaag caaataaatt tttatctgg cttactatg	1140
[0277]	cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatagcgt gtgtgaaata ccgcacagat	1200

[0278]	gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcct ctccgccttc ctcgctcact gactcgcctgc	1260
[0279]	gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	1320
[0280]	ccacagaatc aggggataac gcaggaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	1380
[0281]	ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc cctgacgagc	1440
[0282]	atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc	1500
[0283]	aggegtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgettaccg	1560
[0284]	gatacctgtc cgcctttctc ctttcgggaa gcgtggcgcct ttctcatagc tcacgctgta	1620
[0285]	ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg	1680
[0286]	ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac	1740
[0287]	acgacttate gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	1800
[0288]	gcggtgctac agagtctctg aagtggggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat	1860
[0289]	ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ctttcggaaa aagagttggt agctcttgat	1920
[0290]	ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	1980
[0291]	gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacgggtct gacgctcagt	2040
[0292]	ggaacgaaaa ctcacgtaa gggattttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	2100
[0293]	agatcctttt aaattaaaaa tgaagttta aatcaateta aagtatatat gaggtaactt	2160
[0294]	ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggacctat ctcagcgatc tgtctatttc	2220
[0295]	gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggttac	2280
[0296]	catctggccc cagtgcgca atgataccgc gagaccacg ctcaccgct ccagatttat	2340
[0297]	cagcaataaa ccagccagcc ggaaggccg agcgagaag tggctcgcga actttatccg	2400
[0298]	cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	2460
[0299]	gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcacgtggt gtcacgctcg tcgtttgta	2520
[0300]	tggttcatt cagctccggt tccaacgat caaggcagat tacatgatcc ccatgttgt	2580
[0301]	gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtctc cgatcgtgt cagaagtaag ttggccgag	2640
[0302]	tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa	2700
[0303]	gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc	2760
[0304]	gaccgagttg ctcttgccc gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt	2820
[0305]	taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc	2880
[0306]	tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcactttta	2940
[0307]	ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgccgca aaaaagggaa	3000
[0308]	taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctc tttcaatat tattgaagca	3060
[0309]	tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac	3120
[0310]	aataggggt tccgcgaca tttccccgaa aagtgcacc tgctaagaaa ccattattat	3180
[0311]	catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgagcccc tttcgtc	3227
[0312]	<210>8	
[0313]	<211>3200	
[0314]	<212>DNA	
[0315]	<213>人工的	
[0316]	<220>	

[0317]	<223>Wasabi 质粒	
[0318]	<400>8	
[0319]	tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca	60
[0320]	cagcttgct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
[0321]	ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
[0322]	accatagatc ctgaggatcg ggtgataaa tcagtctgcg ccacatcggg gaaacaaaa	240
[0323]	tggcgcgaga tctaaaaaa aaggctcaa aaggagcctt tcgcgctacc aggtaacgcg	300
[0324]	ccactccgac gggattaacg agtgccgtaa acgacgatg tttaccgtg tgcggagatc	360
[0325]	aggttctgat cctcagcat cttagaatt cgtcccacgg tttgtctaga gcagccgaca	420
[0326]	atctgggttt acccaacttt gcagtccaaa tgtgccgttg ccggctcaaa tagaccactc	480
[0327]	cgaaggattc actaagcccc aatttcctga cgggtaattt tgatttgcg gccgtccggg	540
[0328]	tgagtcatag cgtctggtg tttgccaga ttcagcagag tctgtcaat gcggccctg	600
[0329]	acgtcgagga acgccagggt gccacttct cactagtga cctgcagccg gcgcgccatc	660
[0330]	tgtgcagaca aacgcacag gatatccgga tttacctgaa tcaattggcg aaattttttg	720
[0331]	tacgaaattt cagccacttc acaggcgggt ttcgcacgta cccatgcgct acgttcctgg	780
[0332]	ccctctcaa acaggcccag ttcgcaata aatcacct gattcagata ggagaggatc	840
[0333]	atttctttac cctcttcgtc tttgatcagc actgccacag agcctttaac gatgtagtac	900
[0334]	agcgtttccg cttttcacc ctggtgaata agcgtgctct tggatgggta cttatgaatg	960
[0335]	tggcaatgag acaagaacca ttcgagagta ggatccgttt gaggtttacc aagtaccata	1020
[0336]	agatcctaa atttttatta tctagctaga tgataatatt atatcaagaa ttgtacctga	1080
[0337]	aagcaataa atttttatc tggttaact atgcggcacc agagcagatt gtactgagag	1140
[0338]	tgcaccatat gcggtgtgaa atacgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatcaggc	1200
[0339]	gctcttcgc ttctcctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg	1260
[0340]	tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacgggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa	1320
[0341]	agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gcgttgctgg	1380
[0342]	cgttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga	1440
[0343]	ggtggcgaac cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg	1500
[0344]	tgcgctctcc tgttccgacc ctgccctta ccggatacct gtccgccttt ctccctcgg	1560
[0345]	gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc	1620
[0346]	gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg	1680
[0347]	gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atgccactg gcagcagcca	1740
[0348]	ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtgg	1800
[0349]	ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag	1860
[0350]	ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg	1920
[0351]	gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc	1980
[0352]	ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt	2040
[0353]	tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt	2100
[0354]	ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggctctga cagttacca tgcttaatca	2160
[0355]	gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcate catagttgcc tgactccccg	2220

[0356]	tcgtgtagat aactacgata cgggagggt taccatctgg cccagtgct gcaatgatac	2280
[0357]	cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg	2340
[0358]	ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagcttatt aattgttgcc	2400
[0359]	gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta	2460
[0360]	caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttccaac	2520
[0361]	gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc	2580
[0362]	ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttate actcatggtt atggcagcac	2640
[0363]	tgcataatte tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact	2700
[0364]	caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa	2760
[0365]	tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt	2820
[0366]	cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca	2880
[0367]	ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaa	2940
[0368]	aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac	3000
[0369]	tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg	3060
[0370]	gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata acaaatagg ggttccgcgc acatttcccc	3120
[0371]	gaaaagtgcc acctgctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg	3180
[0372]	tatcacgagg ccctttcgtc	3200
[0373]	<210>9	
[0374]	<211>46	
[0375]	<212>DNA	
[0376]	<213> 人工的	
[0377]	<220>	
[0378]	<223> 适配体 NTQ12-46A	
[0379]	<400>9	
[0380]	cgatcatctc agaacattct tagcgttttg ttcttgtgta tgatec	46
[0381]	<210>10	
[0382]	<211>42	
[0383]	<212>DNA	
[0384]	<213> 人工的	
[0385]	<220>	
[0386]	<223> 适配体 21-42-P	
[0387]	<400>10	
[0388]	gatcatctca gaacattctt agcgttttgt tcttgtgtat ga	42

[0001]	<110> 罗赫诊断器材股份有限公司	
[0002]	霍夫曼 - 拉罗奇有限公司	
[0003]	<120> 含稳定聚合酶的反应化合物的干组合物	
[0004]	<130>25614 FT	
[0005]	<150>EP08022082	
[0006]	<151>2008-12-19	
[0007]	<160>10	
[0008]	<170>PatentIn version 3.5	
[0009]	<210>1	
[0010]	<211>17	
[0011]	<212>DNA	
[0012]	<213> 人工的	
[0013]	<220>	
[0014]	<223> 正向引物 Eamst	
[0015]	<400>1	
[0016]	gtggcggcac catgtct	17
[0017]	<210>2	
[0018]	<211>23	
[0019]	<212>DNA	
[0020]	<213> 人工的	
[0021]	<220>	
[0022]	<223> 反向引物 Eamst	
[0023]	<400>2	
[0024]	ctggttaaaa agattggttg cga	23
[0025]	<210>3	
[0026]	<211>22	
[0027]	<212>DNA	
[0028]	<213> 人工的	
[0029]	<220>	
[0030]	<223>Fam-Tamra 探针 Eamst	
[0031]	<400>3	
[0032]	cagctggacc tacgggagcg gg	22
[0033]	<210>4	
[0034]	<211>21	
[0035]	<212>DNA	
[0036]	<213> 人工的	
[0037]	<220>	
[0038]	<223> 正向引物 Wsebi	

[0039]	<400>4		
[0040]	ggcttagtga atccttegga g	21	
[0041]	<210>5		
[0042]	<211>22		
[0043]	<212>DNA		
[0044]	<213> 人工的		
[0045]	<220>		
[0046]	<223> 反向引物 Wsebi		
[0047]	<400>5		
[0048]	gtttacccaa ctttgcagtc ca	22	
[0049]	<210>6		
[0050]	<211>23		
[0051]	<212>DNA		
[0052]	<213> 人工的		
[0053]	<220>		
[0054]	<223>Fam-Tamra 探针 Wsebi		
[0055]	<400>6		
[0056]	tgtgccgttg ccggctcaaa tag	23	
[0057]	<210>7		
[0058]	<211>3227		
[0059]	<212>DNA		
[0060]	<213> 人工的		
[0061]	<220>		
[0062]	<223>Eamst 质粒		
[0063]	<400>7		
[0064]	tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtea	60	
[0065]	cagcttgctet gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120	
[0066]	ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180	
[0067]	accatagatc ctgaggatcg gggatgataaa tcagtctgcg ccacatcggg gaaacaaaa	240	
[0068]	tggcgcgaga tctaaaaaaaa aaggctccaa aaggagcctt tcgcgctacc aggtaacgcg	300	
[0069]	ccactccgac gggattaacg agtgccgtaa acgacgatgg tttaccgtg tgcggagatc	360	
[0070]	aggttctgat cctcgagcat cttagaatt cgteccacgg tttgtctaga gcagccgaca	420	
[0071]	atctgggtgg cggcaccatg tctggctc gagegatgg ggctttgtca cccgtccc	480	
[0072]	taggtccagc tggcagctag cctcgcaacc aatcttttta accagccaat ttctgacgg	540	
[0073]	gtaattttga tttgatgcc gtccgggtga gtcatagcgt ctggttgttt tgccagattc	600	
[0074]	agcagagtct gtgcaatgcg gccgctgacg tcaggaacg ccaggttgc cactttctca	660	
[0075]	ctagtacct gcagccggcg cgccatctgt gcagacaaac gcatcaggat atccgattt	720	
[0076]	acctgaatca attggcgaaa tttttgtac gaaatttcag ccaattcaca ggcggttttc	780	
[0077]	gcacgtacce atgcgctacg ttctggccc tcttcaaaca ggcccagttc gccaataaaa	840	

[0078]	tcacctgat tcagatagga gaggatcatt tctttaccct cttegtcttt gatcagcaact	900
[0079]	gccacagagc ctttaacgat gtagtacagc gtttccgctt tttcacctg gtgaataagc	960
[0080]	gtgctcttgg atgggtactt atgaatgtgg caatgagaca agaaccattc gagagtagga	1020
[0081]	tccgtttgag gtttaccaag taccataaga tccttaaatt tttattatct agctagatga	1080
[0082]	taatattata tcaagaattg tacctgaaag caaataaatt ttttatctgg ctttaactatg	1140
[0083]	cggcacaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat	1200
[0084]	gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcct ctccgcttc ctcgctcact gactcctgc	1260
[0085]	gctcggctgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	1320
[0086]	ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	1380
[0087]	ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc	1440
[0088]	atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc	1500
[0089]	aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg	1560
[0090]	gatacctgtc cgctttctc ctttcgggaa gcgtggcgcct ttctcatagc tcacgctgta	1620
[0091]	ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg	1680
[0092]	ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagc	1740
[0093]	acgacttate gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	1800
[0094]	gcggtgctac agagtctctg aagtggggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat	1860
[0095]	ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ctttcgaaa aagagttggt agctcttgat	1920
[0096]	ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	1980
[0097]	gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacggggtct gacgctcagt	2040
[0098]	ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	2100
[0099]	agatcctttt aaattaaata tgaagtttta aatcaateta aagtataat gatgaaactt	2160
[0100]	ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggacctat ctcagcgatc tgtctatttc	2220
[0101]	gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg ttagataaac tacgatacgg gagggttac	2280
[0102]	catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccgct ccagatttat	2340
[0103]	cagcaataaa ccagccagcc ggaaggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg	2400
[0104]	cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagtctg ccagttaata	2460
[0105]	gtttgcgcaa cgttgttgc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttgta	2520
[0106]	tggttcatt cagctccggt tccaacgat caaggcaggt tacatgatcc ccatgttgt	2580
[0107]	gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgtgt cagaagtaag ttggccgag	2640
[0108]	tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa	2700
[0109]	gatgctttc tgtgactggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc	2760
[0110]	gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt	2820
[0111]	taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc	2880
[0112]	tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatcttita	2940
[0113]	ctttaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgcccga aaaaaggaa	3000
[0114]	taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttct tttcaatat tattgaagca	3060
[0115]	tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac	3120
[0116]	aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgctaagaaa ccattattat	3180

[0117]	catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgagcccc ttctgtc	3227
[0118]	<210>8	
[0119]	<211>3200	
[0120]	<212>DNA	
[0121]	<213> 人工的	
[0122]	<220>	
[0123]	<223>Wasabi 质粒	
[0124]	<400>8	
[0125]	tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccc gagacggtca	60
[0126]	cagcttgctc gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
[0127]	ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
[0128]	accatagatc ctgaggatcg gggtgataaa tcagtctgcg ccacatcggg gaaacaaaa	240
[0129]	tggcgcgaga tctaaaaaaaa aaggctccaa aaggagcctt tcgcgctacc aggtaacgcg	300
[0130]	ccactccgac gggattaacg agtgccgtaa acgacgatgg tttaccgtg tcggagatc	360
[0131]	aggttctgat cctcgagcat cttagaatt cgtcccacgg tttgtctaga gcagccgaca	420
[0132]	atctgggttt acccaacttt gcagtccaaa tgtgccgttg ccggctcaaa tagaccactc	480
[0133]	cgaaggatc actaagcccc aatttctga cgggtaattt tgatttgcac gccgtccggg	540
[0134]	tgagtcacag cgtctggtg tttgcccaga ttcagcagag tctgtcaat gcggccctg	600
[0135]	acgtcagga acgccagggt gccacttctc tcaactagta cctgcagccg gcgcgccatc	660
[0136]	tgtgcagaca aacgcacag gatatccgga tttacctgaa tcaattggcg aaatttttg	720
[0137]	tacgaaattt cagccacttc acaggcgggt ttcgcacgta cccatgcgct acgttctg	780
[0138]	ccctctcaa acaggcccag ttcgcaata aatcacctc gattcagata ggagaggatc	840
[0139]	atttctttac cctctctgctc tttgatcagc actgccacag agcctttaac gatgtagtac	900
[0140]	agcgtttccg cttttcacc ctggtgaata agcgtgctct tggatgggta cttatgaatg	960
[0141]	tggcaatgag acaagaacca ttcgagagta ggatccgttt gaggtttacc aagtaccata	1020
[0142]	agatcctaa atttttatta tctagctaga tgataatatt atatcaagaa ttgtacctga	1080
[0143]	aagcaataa atttttatc tggttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag	1140
[0144]	tgcacatat gcggttgtaa atacgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatcaggc	1200
[0145]	gctcttccgc ttctcctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcagcgg	1260
[0146]	tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa	1320
[0147]	agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctg	1380
[0148]	cgttttcca taggtccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga	1440
[0149]	ggtggcgaac cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg	1500
[0150]	tgcgctctcc tgttccgacc ctgccctta ccggatacct gtccgccttt ctccctcgg	1560
[0151]	gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc	1620
[0152]	gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg	1680
[0153]	gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca	1740
[0154]	ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtgg	1800
[0155]	ggcctaacta cggtacact agaaggacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag	1860

[0156]	ttacettcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	1920
[0157]	gtggtttttt tgtttgaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc	1980
[0158]	ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt	2040
[0159]	tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt	2100
[0160]	ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttaggtctga cagttacca tgcttaataca	2160
[0161]	gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttccat catagttgcc tgactccccg	2220
[0162]	tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac	2280
[0163]	cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg	2340
[0164]	ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagttctatt aattgttgc	2400
[0165]	gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta	2460
[0166]	caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttccaac	2520
[0167]	gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc	2580
[0168]	ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttacc actcatgggt atggcagcac	2640
[0169]	tgcataatc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact	2700
[0170]	caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa	2760
[0171]	tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt	2820
[0172]	cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca	2880
[0173]	ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa	2940
[0174]	aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacgaaa tgttgaatac	3000
[0175]	tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg	3060
[0176]	gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc	3120
[0177]	gaaaagtgcc acctgctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg	3180
[0178]	tatcacgagg ccctttcgtc	3200
[0179]	<210>9	
[0180]	<211>46	
[0181]	<212>DNA	
[0182]	<213> 人工的	
[0183]	<220>	
[0184]	<223> 适配体 NTQ12-46A	
[0185]	<400>9	
[0186]	cgatcatctc agaacattct tagcgttttg ttcttgtgta tgatec	46
[0187]	<210>10	
[0188]	<211>42	
[0189]	<212>DNA	
[0190]	<213> 人工的	
[0191]	<220>	
[0192]	<223> 适配体 21-42-P	
[0193]	<400>10	
[0194]	gatcatctca gaacattctt agcgttttgt tcttgtgtat ga	42

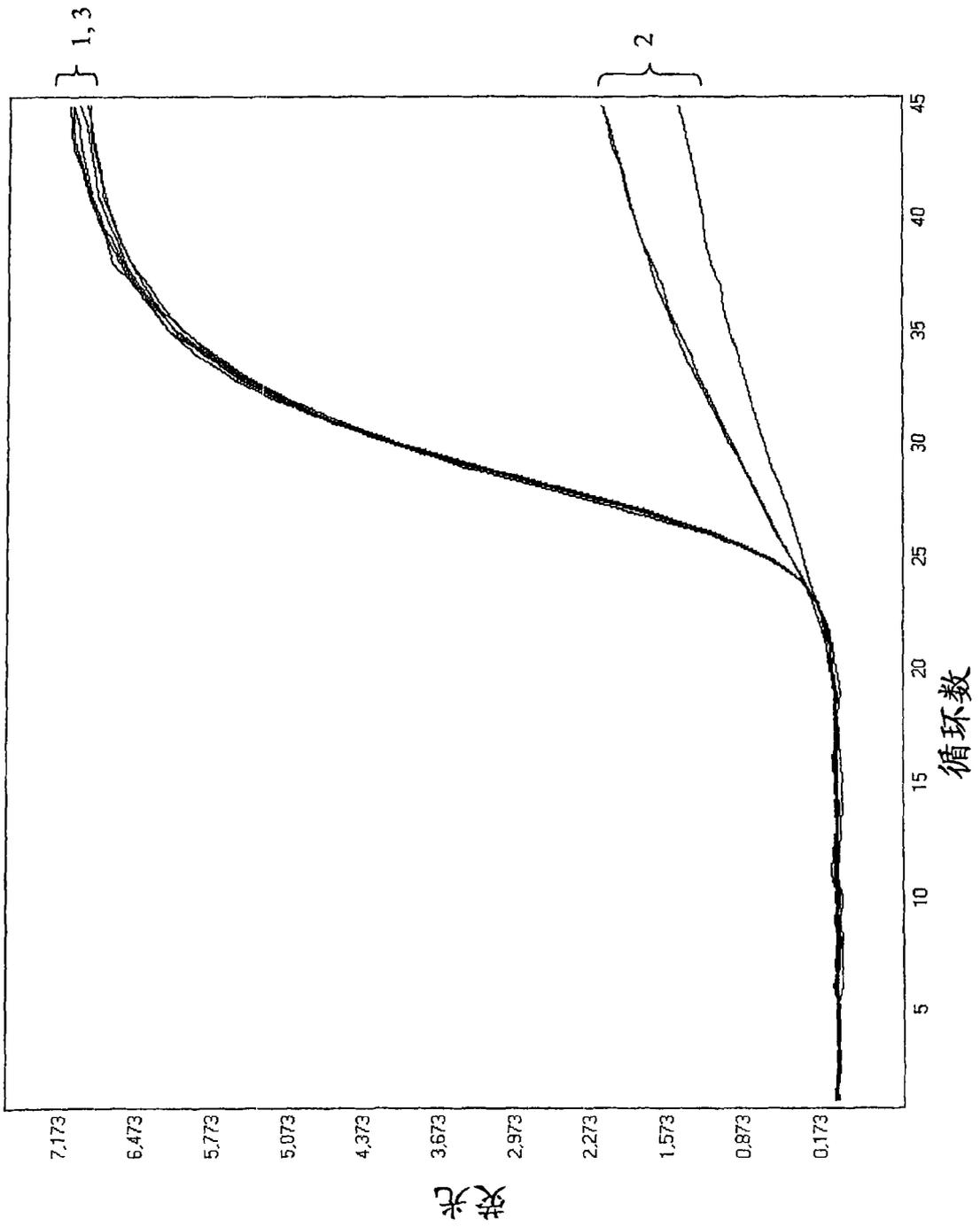


图 1

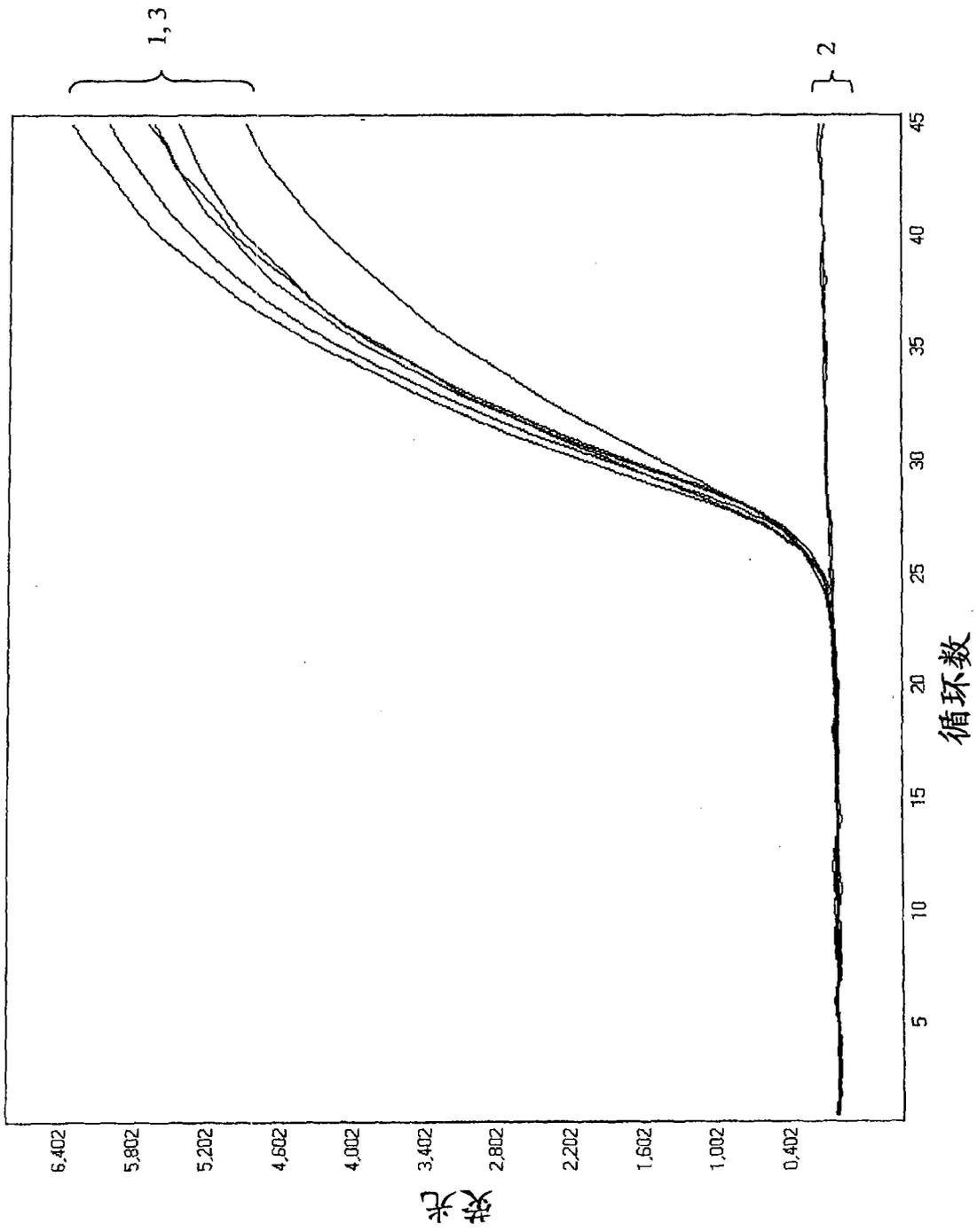


图 2

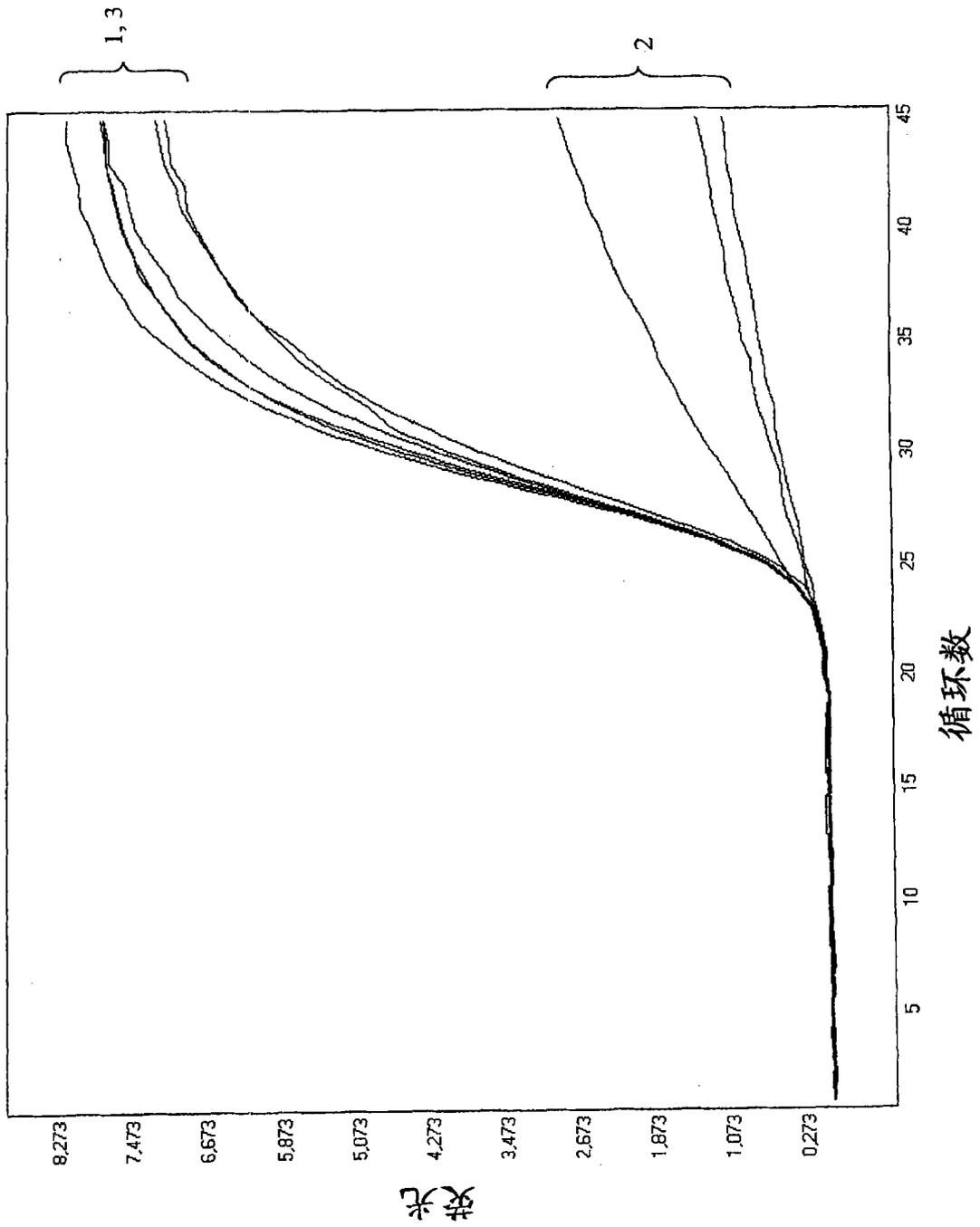


图 3

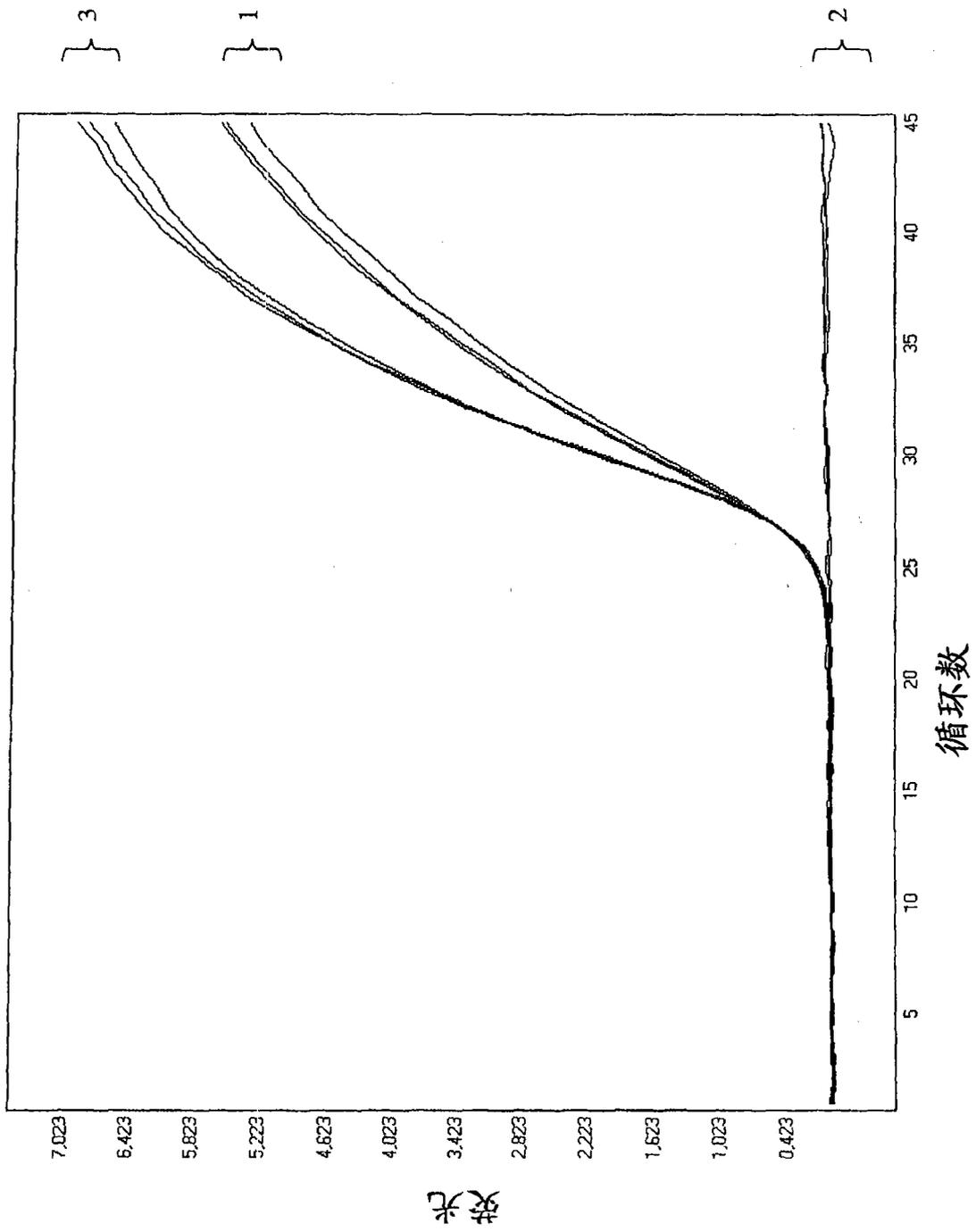


图 4

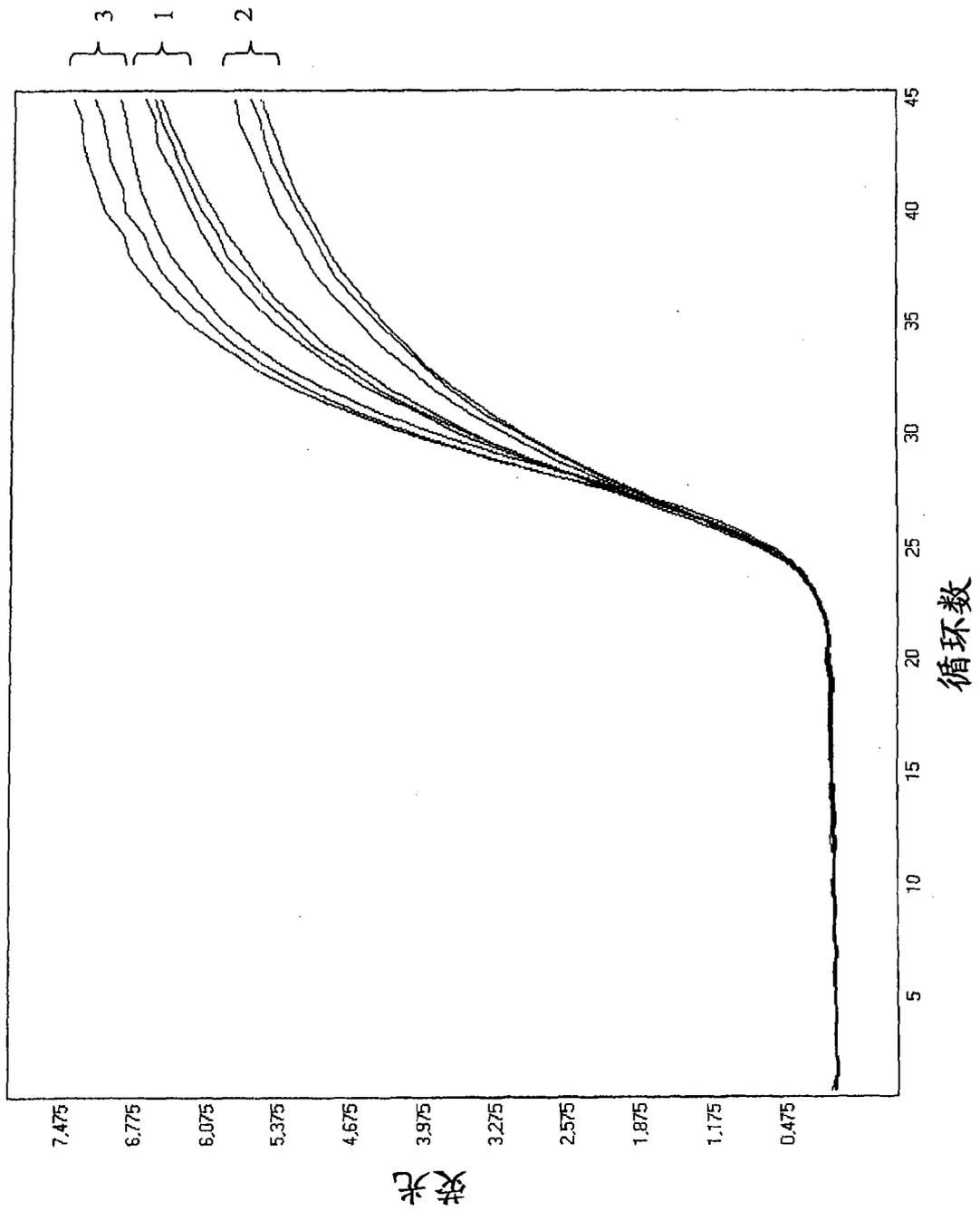


图 5

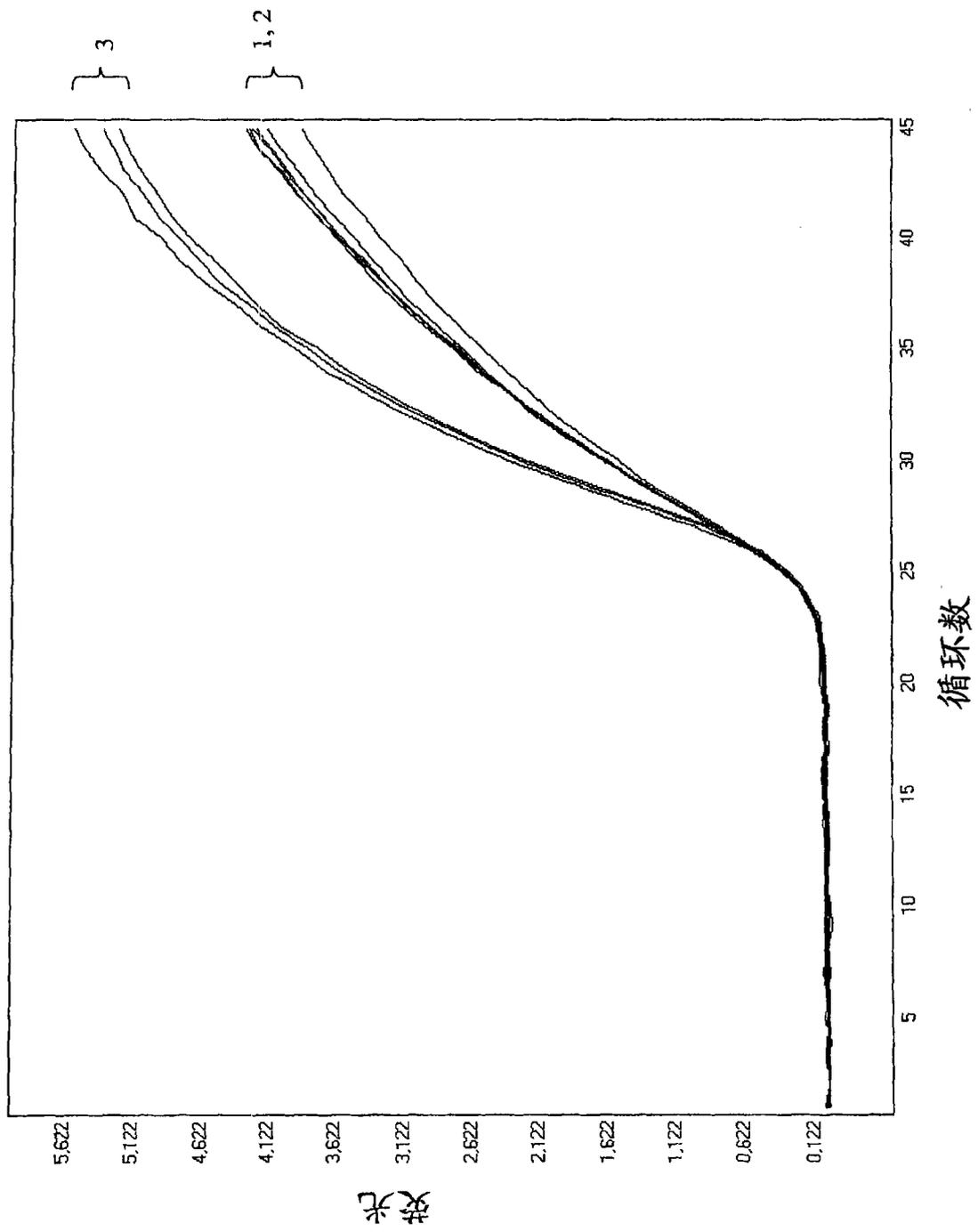


图 6

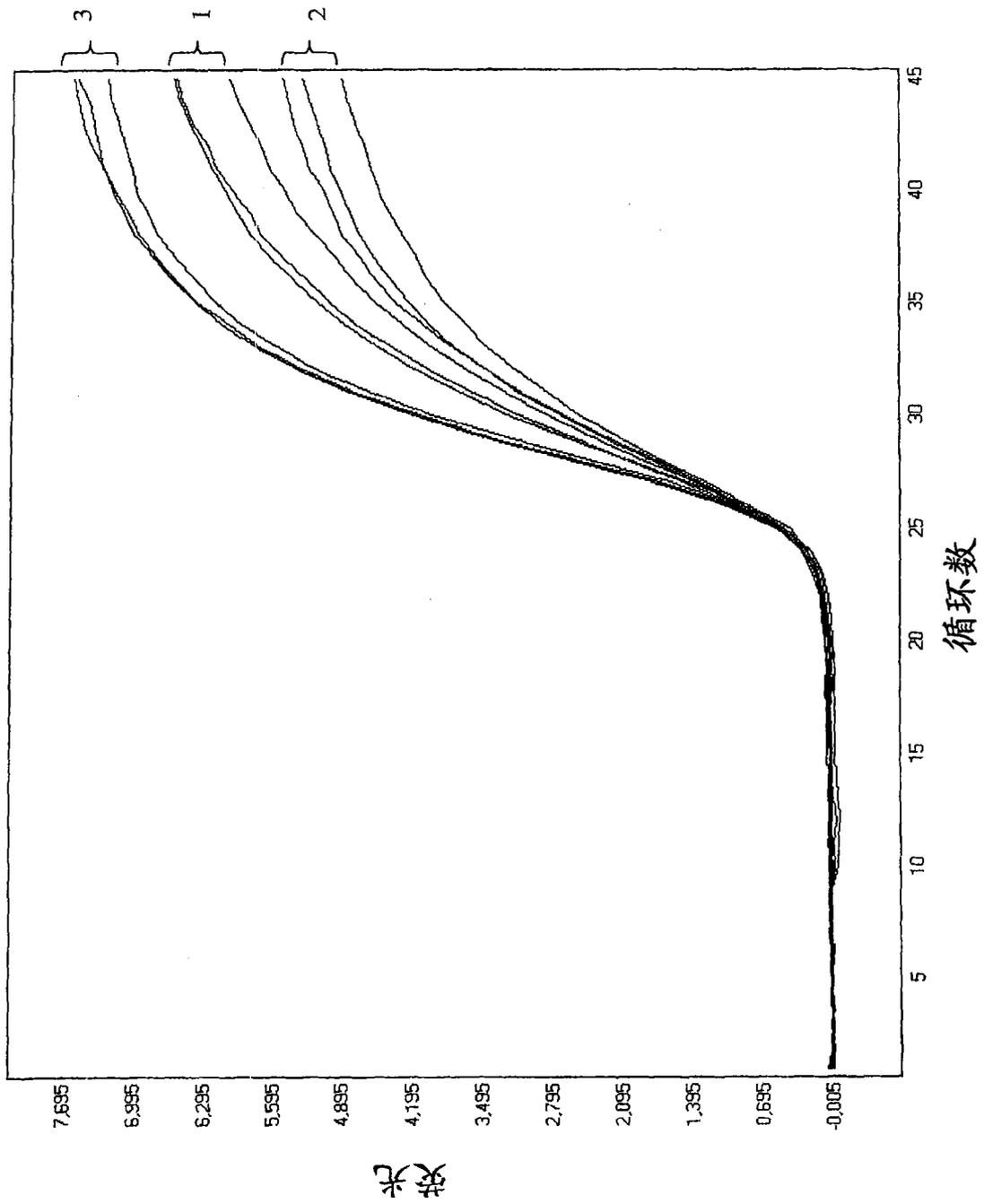


图 7

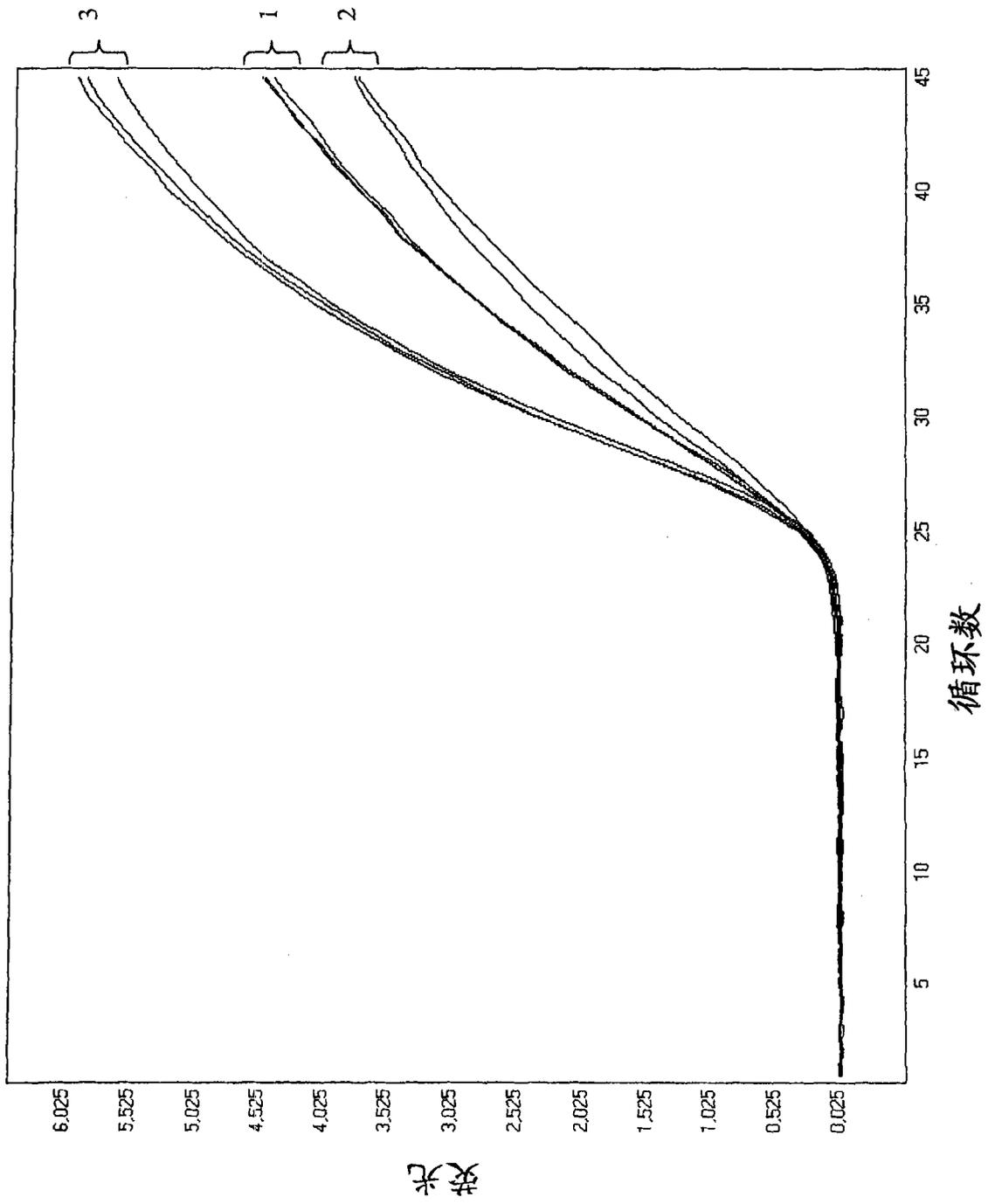


图 8

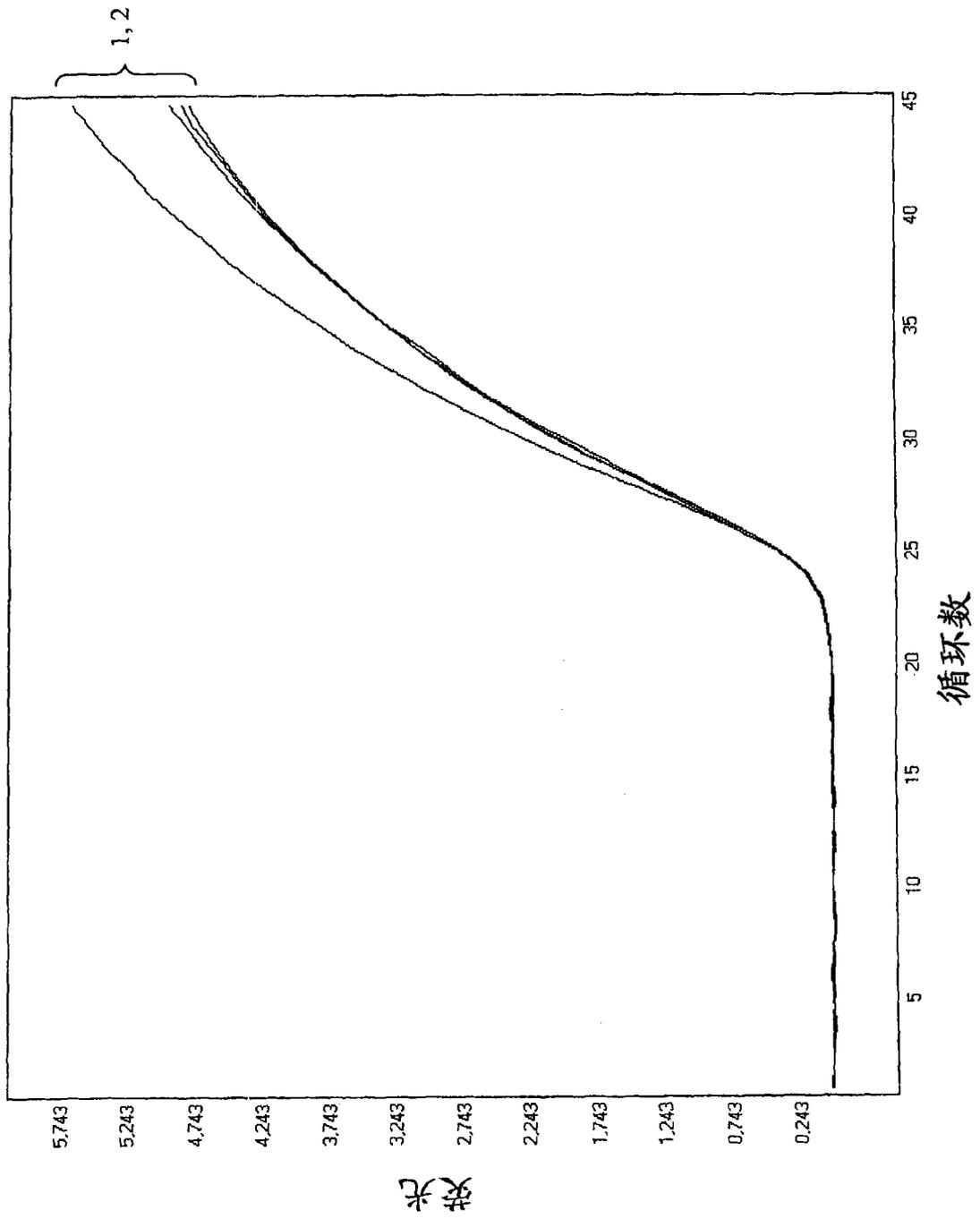


图 9

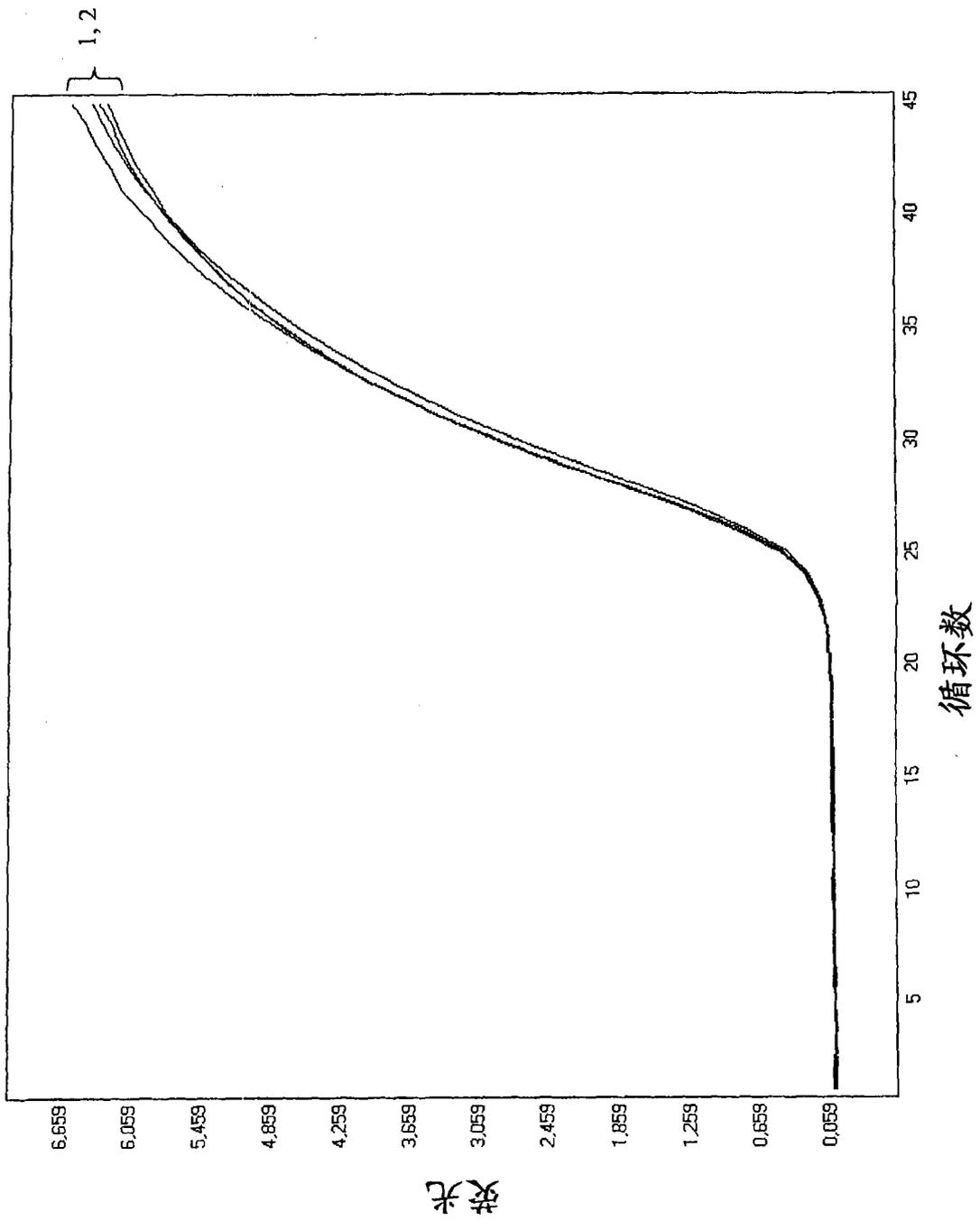


图 10

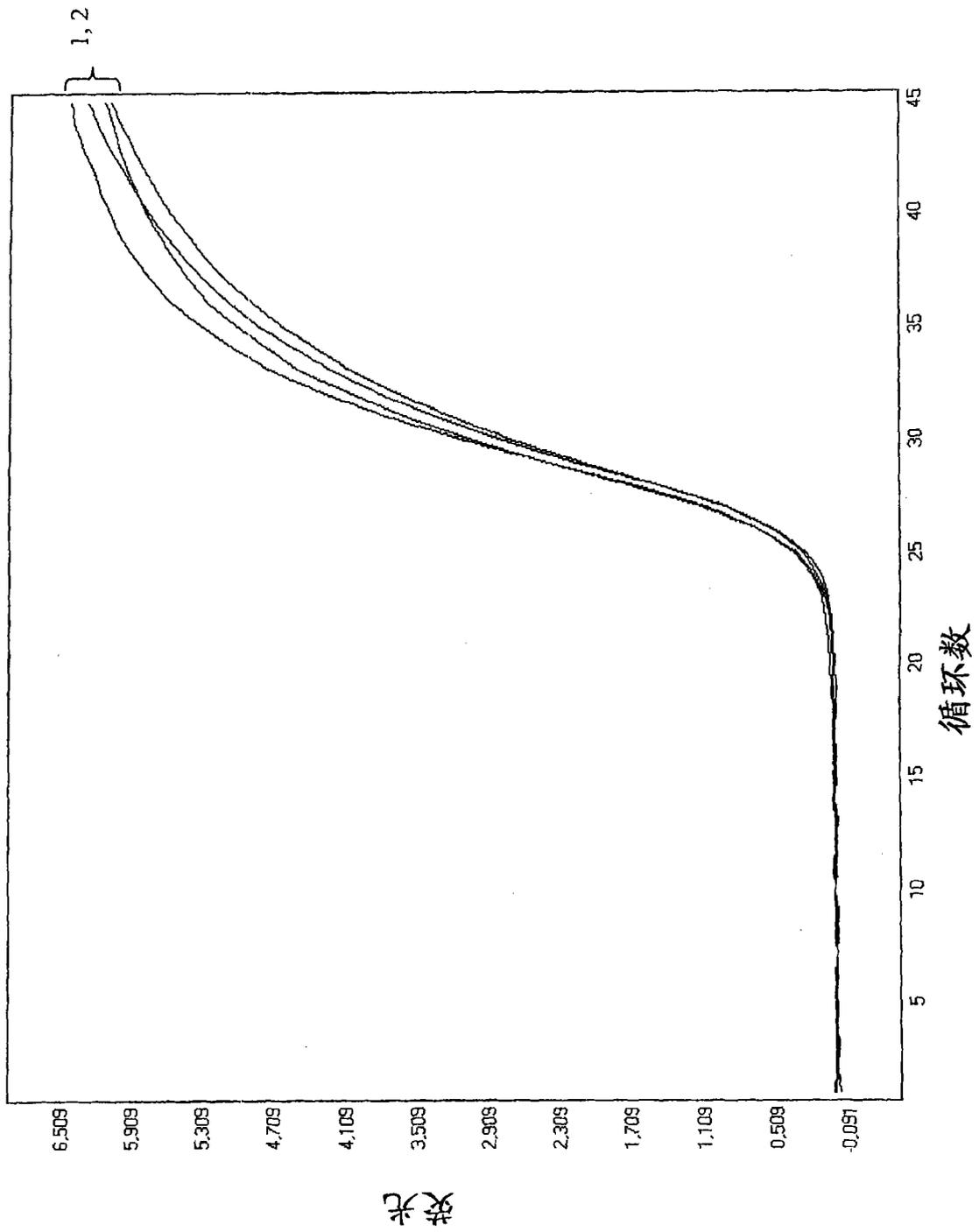


图 11

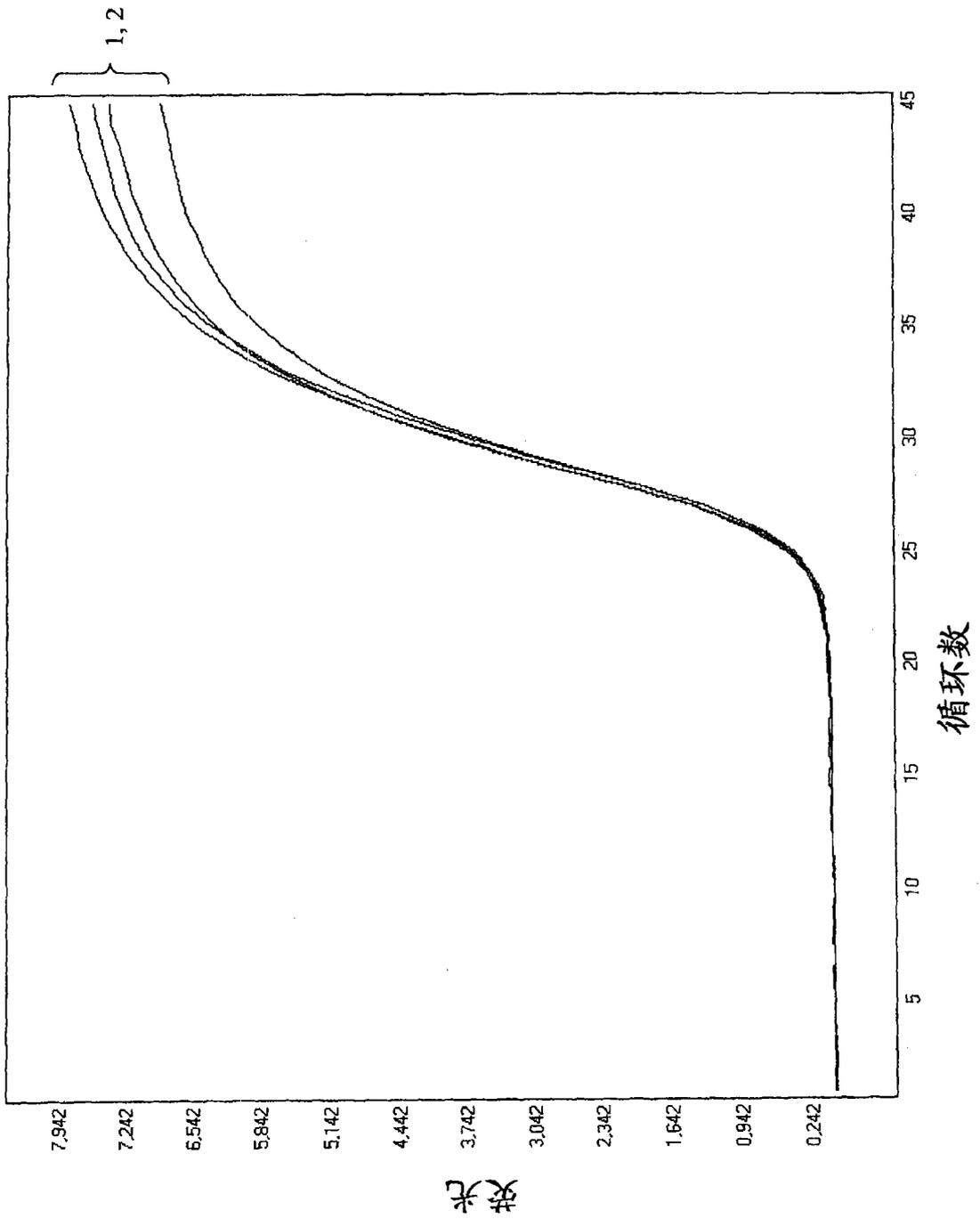


图 12

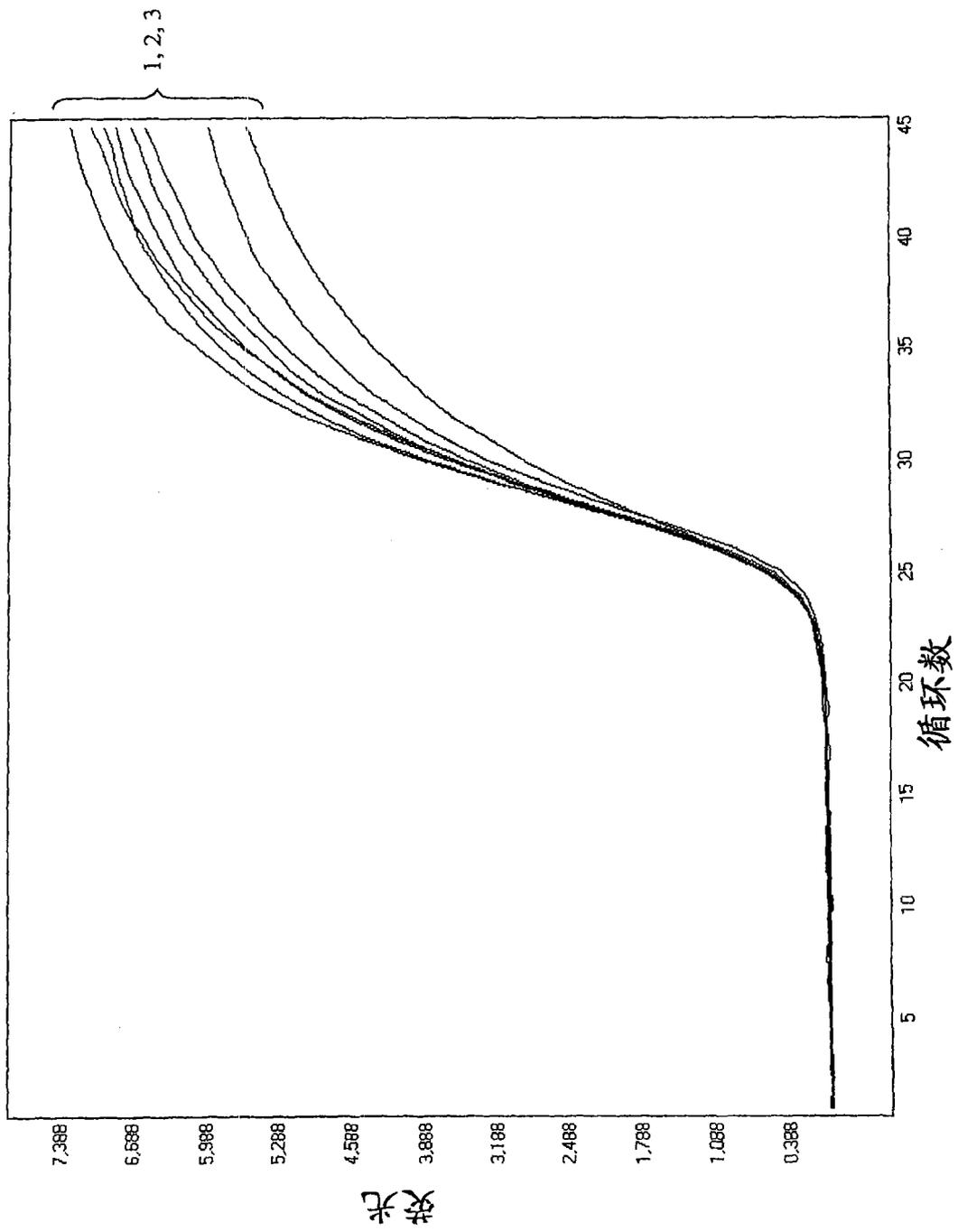


图 13

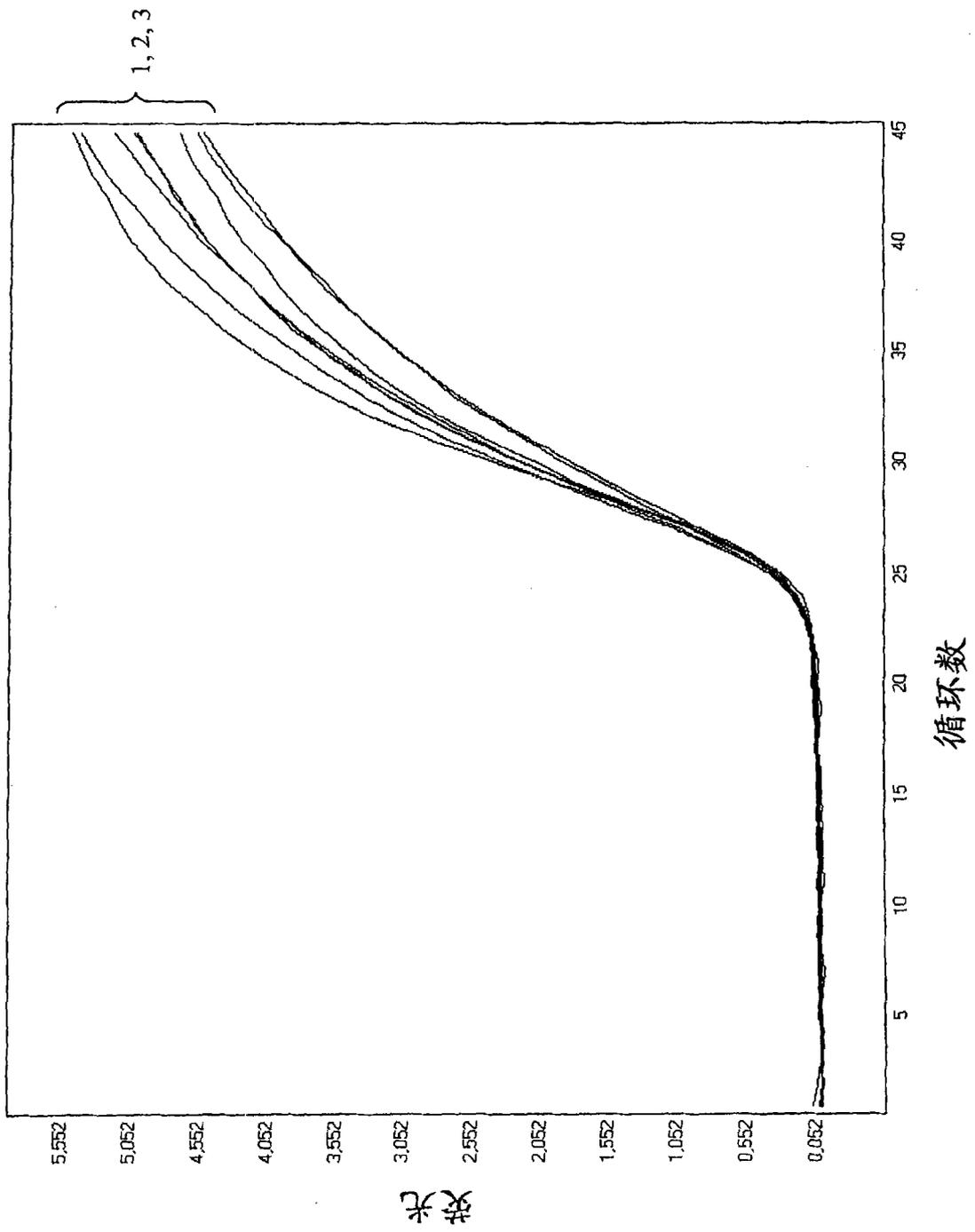


图 14