



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107922940 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 08

(21) 申请号 201680026192.0

(22) 申请日 2016.03.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107922940 A

(43) 申请公布日 2018.04.17

(30) 优先权数据
10-2015-0034697 2015.03.12 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.11.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2016/002461 2016.03.11

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2016/144136 KO 2016.09.15

(73) 专利权人 财团法人峨山社会福祉财团
地址 韩国首尔市
专利权人 蔚山大学校产学协力团

(72) 发明人 张世镇 千成民 金兑任 李政慎
崔恩卿

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410

代理人 石宝忠

(51) Int.Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)

(56) 对比文件
CN 101268189 A, 2008.09.17
CN 102884191 A, 2013.01.16
CN 102238991 A, 2011.11.09
CN 101787364 A, 2010.07.28
CN 104328108 A, 2015.02.04
单志等. 磁珠分离法快速提取大肠杆菌质粒
DNA.《四川农业大学学报》.2011, 第29卷(第2
期), 第230-234页.

张立明. 磁性微球的制备及其在基因组脱氧
核糖核酸提取上的应用.《中国优秀硕士学位论文
文 医药卫生科技辑》.2007, E079-16.

审查员 万青

权利要求书1页 说明书16页
序列表25页 附图6页

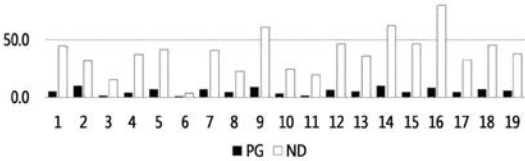
(54) 发明名称

从FFPE组织中分离核酸的方法

(57) 摘要

本发明涉及从含有福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织片段的样品中分离核酸的方法、核酸分离试剂盒、以及用于分离核酸的裂解缓冲液, 更具体地, 所述从福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织中分离核酸的方法包括: 步骤a: 将包含盐和聚乙二醇的溶液和磁珠加入到通过裂解FFPE组织片段而制备的分离样品中; 以及步骤b: 从包含所述磁珠的样品中获得磁珠, 然后从所述磁珠中分离核酸。

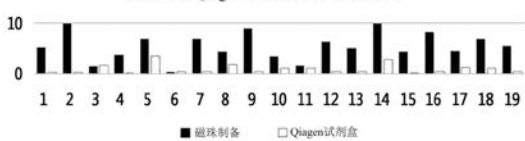
用PG和ND计算的DNA量



用ND和PG计算的DNA量的比率



用磁珠和Qiagen试剂盒纯化的DNA量



1. 一种从福尔马林固定石蜡包埋组织中分离核酸的方法, 包括:

步骤a: 通过用有机溶剂或矿物油处理福尔马林固定石蜡包埋组织片段来从所述福尔马林固定石蜡包埋组织片段中去除石蜡;

步骤b: 在由浓度为10mM至100mM的螯合剂、浓度为0.1% (w/v) 至5% (w/v) 的离子表面活性剂和浓度为10mM至100mM的Tris-Cl组成的裂解缓冲液中裂解所述福尔马林固定石蜡包埋组织片段, 以制备分离样品;

步骤c: 向所述福尔马林固定石蜡包埋组织片段中加入蛋白酶K;

步骤d: 向所述分离样品中加入由浓度为1M至4M的氯化钠和浓度为10% (w/v) 至40% (w/v) 的平均分子量为6000Da至10000Da的聚乙二醇组成的溶液和磁珠; 以及

步骤e: 从包含所述磁珠的分离样品中获得磁珠, 然后从所述磁珠中分离核酸,

其中, 所述螯合剂选自由二亚乙基三胺五乙酸、乙二胺四乙酸、乙二醇四乙酸和N,N-双(羧甲基)甘氨酸组成的组,

其中, 所述离子表面活性剂选自由十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸铵、月桂基醚硫酸钠、肉豆蔻醇聚醚硫酸钠、磺基琥珀酸二辛酯钠、全氟辛烷磺酸盐、全氟丁烷磺酸盐、直链烷基苯磺酸盐、月桂酰肌氨酸钠、全氟壬酸酯和全氟辛酸盐组成的组。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述裂解缓冲液包含乙二胺四乙酸、十二烷基硫酸钠和Tris-Cl。

3. 一种试剂盒用于从福尔马林固定石蜡包埋组织中分离核酸的用途, 所述试剂盒包含: 有机溶剂或矿物油; 蛋白酶K; 裂解缓冲液; 由浓度为1M至4M的氯化钠和浓度为10% (w/v) 至40% (w/v) 的平均分子量为6000Da至10000Da的聚乙二醇组成的溶液; 以及磁珠, 其中所述裂解缓冲液由浓度为10mM至100mM的螯合剂、浓度为0.1% (w/v) 至5% (w/v) 的离子表面活性剂和浓度为10mM至100mM的Tris-Cl组成,

其中, 所述螯合剂选自由二亚乙基三胺五乙酸、乙二胺四乙酸、乙二醇四乙酸和N,N-双(羧甲基)甘氨酸组成的组,

其中, 所述离子表面活性剂选自由十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸铵、月桂基醚硫酸钠、肉豆蔻醇聚醚硫酸钠、磺基琥珀酸二辛酯钠、全氟辛烷磺酸盐、全氟丁烷磺酸盐、直链烷基苯磺酸盐、月桂酰肌氨酸钠、全氟壬酸酯和全氟辛酸盐组成的组。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中, 所述裂解缓冲液包含乙二胺四乙酸、十二烷基硫酸钠和Tris-Cl。

从FFPE组织中分离核酸的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从通过裂解福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织片段而制备的样品中分离核酸的方法、分离核酸的试剂盒及用于分离核酸的裂解缓冲液。

背景技术

[0002] 近来,分子生物学技术已经广泛应用于医学领域。特别地,在分子病理学方面,这些技术能够从形态学水平到基因水平进行病理学诊断,并且还可以在形态学水平和基因水平上揭示特定疾病的遗传特征 (DeMarzo等, Lancet, (2003) 361, 955-64)。对于这样的诊断过程,医院收集福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 形式的组织,其能够分析和诊断与各种临床症状相关的遗传信息 (Roukos DH等, Pharmacogenomics, (2010) 11, 283-7)。然而,由于FFPE样品中的核酸被分解成小片段并与蛋白质缠结,所以为了临床应用在分子水平上从FFPE组织中分离DNA存在限制 (Feldman MY等, Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, (1973) 13, 1-49)。因此,已经注重需要分离具有优化浓度和纯度的高质量DNA的方法。

[0003] 使用色谱法从FFPE组织中分离核酸的试剂盒、方法等是已知的 (QIAamp FFPE组织试剂盒)。然而,仍然需要开发从FFPE组织中分离核酸的试剂盒和方法,其与先前已知的方法相比得到改进。

发明内容

[0004] 技术问题

[0005] 本发明人大力开发能够从FFPE组织中有效获得核酸的试剂盒和方法,结果是,通过裂解FFPE组织片段制备样品,以及通过向样品中加入包含盐和PEG的溶液以及磁珠,以从结合有核酸的磁珠中获得核酸的方法。他们还证实了可以使用上述开发的方法从通过裂解FFPE组织片段而制备的样品中有效分离核酸,从而完成本发明。

[0006] 技术方案

[0007] 本发明的目的是提供一种从通过裂解福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织片段而制备的样品中分离核酸的方法。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种从FFPE组织中分离核酸的试剂盒,包含:裂解缓冲液;包含盐和PEG的溶液;以及磁珠。

[0009] 本发明的另一个目的是提供一种从FFPE组织中分离核酸的裂解缓冲液,其包含螯合剂、离子表面活性剂和Tris-Cl。

[0010] 有益效果

[0011] 本发明的从FFPE组织中分离核酸的试剂盒和方法具有在短时间内从通过裂解FFPE组织片段而制备的样品中获得高产率的核酸的效果。

附图说明

[0012] 图1示出了通过磁珠法从时间久的FFPE组织样品 (2000至2004) 中分离的DNA量。具

体地,通过PicoGreen (PG) 和NanoDrop (ND) 方法测量DNA量。顶部图示出了DNA的量(单位:μg),中间图示出了ND与PG的DNA量比。底部图示出了使用磁珠法或色谱柱(Qiagen试剂盒)从每个样品中分离DNA后,使用PicoGreen测量的DNA量(单位:μg)。

[0013] 图2示出了通过PicoGreen (PG) 和Nanodrop (ND) 方法测量的使用色谱柱和磁珠法从时间不长的FFPE组织片段(2013)中分离的DNA的比较。顶部图示出了通过PG测量的分离DNA的量(单位:μg),底部图示出了ND与PG的DNA量比。

[0014] 图3示出了使用通过色谱柱(QIAGEN)或磁珠法(100μL裂解缓冲液、100μL裂解缓冲液+PEG、或50μL裂解缓冲液)从FFPE组织样品中分离的9个gDNA对24个SNP位点进行基因分型时定性分析清晰峰值图案的图。

[0015] 图4示出了使用QIAamp DNA FFPE组织试剂盒、QIAquick PCR纯化试剂盒或本发明的磁珠法(ASAN法)重新提取时,使用QIAamp DNA FFPE组织试剂盒从5种不同FFPE组织中分离的100ng gDNA的回收率的比较。

[0016] 图5示出了通过本发明的磁珠法从肝癌FFPE组织样品(#4864和#19401)中的不同量(6μm厚,1层至5层)组织片段中分离的DNA产率。包含在肝癌FFPE嵌段中的组织的尺寸为1cm至1.5cm×1cm至1.5cm,并使用洗脱溶剂100μL。图上的Y轴表示所得DNA的总量(ng)。

[0017] 图6是使用MN试剂盒和本发明的磁珠法来确认从5个组织样品中分离DNA的产率的电泳图像。左侧5道(泳道2至6)示出了通过本发明的磁珠法分离的DNA,右侧5道(泳道8至12)示出了通过MN试剂盒分离的DNA。使用总共50μL的洗脱溶剂,其中5μL加载在凝胶上。为了确认实验的客观性,属于其它机构的研究人员进行了实验。

[0018] 图7示出了通过MN试剂盒和本发明的磁珠法从5个组织样品中分离DNA的产率。示出了通过NanoDrop (ND) 测量的DNA量(单位:μg)的图在左侧,示出了通过PicoGreen (PG) 测量的DNA量的图在中间,示出了ND/PG比例的图在右侧。

具体实施方式

[0019] 本发明的一个具体方面是从福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织中分离核酸的方法,包括:

[0020] 步骤a:将包含盐和聚乙二醇(PEG)的溶液和磁珠加入到通过裂解FFPE组织片段而制备的分离样品中;以及

[0021] 步骤b:从包含该磁珠的样品中获得磁珠后,从磁珠中分离核酸。

[0022] 如本文所用,术语“福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)”是指用于保管或储存从动物分离的组织的一种方法,并且意味着将组织固定在福尔马林中并将固定的组织包埋在蜡中。虽然不限于此,但FFPE组织制备的具体方法可以如下:

[0023] 首先,通过切割或活检从动物标本中分离组织。通过切割组织而制备片段,然后固定组织以防止分解或解体,并在显微镜下准确检查以进行组织学、病理学或细胞学研究。固定是为了在显微镜下染色和观察组织而将组织固定化、杀死和保存的工艺。该工艺后的加工使得组织对染料试剂可渗透,并且使巨大分子交联,使组织在其位置稳定并捕获。例如,为了本发明的目的,使用许多固定液,例如布安溶液(bouin solution)、福尔马林和液氮。然后将固定的组织包埋在蜡中并切成薄片,随后用苏木精和伊红染液染色。通过在显微镜下将组织切割成用于抗体染色研究的微片而进行显微切片。

[0024] 关于从FFPE组织中分离核酸的方法,常规方法伴随着诸如DNA微碎裂、蛋白质缠结等问题,从而降低产率。在这方面,需要开发以高产率获得核酸的方法。

[0025] 在本发明中,已经开发了通过使包含FFPE组织片段的样品与磁珠和包含盐和PEG的溶液反应来分离与磁珠结合的核酸的方法。在使磁珠与从FFPE组织中分离的核酸反应时使用包含盐和PEG的溶液的情况下,确认了磁珠可以更有效地捕获核酸,导致核酸的高产率。特别地,确认了可以有效地收集至少10年以前制造的FFPE组织片段中的核酸样品。此外,关于上述方法,本发明人已经开发了一种技术,其通过优化裂解缓冲液的构成,可重复地从FFPE组织中有效分离核酸。

[0026] 在下文中,将更详细地描述本发明的步骤和每个构成。

[0027] 本发明方法的步骤a通过将溶液(包括盐和PEG)和磁珠加入到通过裂解FFPE组织片段而制备的分离样品中来将核酸与磁珠结合。

[0028] 在本发明中,如果组织从其核酸需要分析或获得的受试者中分离,则对组织的类型没有特别限制,只要其从动物分离即可。作为具有适合于核酸分离的尺寸的FFPE组织,FFPE组织片段可以是薄片的形式,以具有用于核酸分离的适当尺寸。厚度可以为 $2\mu\text{m}$ 至 $10\mu\text{m}$,但不限于此。用于核酸分离的本发明方法的FFPE组织不仅可以是最近制造的FFPE组织,而且还可以是存储10年以上的FFPE组织。此外,使用珠分离核酸的常规方法通常包括在裂解和加入乙醇后加入珠,而本发明的优点在于,可以不用在裂解和加入珠之间加入乙醇而分离核酸。然而,并不限于此。

[0029] 通过裂解FFPE组织片段而制备的分离样品可以通过用裂解缓冲液裂解FFPE组织片段来制备。

[0030] 因此,本发明的方法可以包括:第一步骤,将裂解缓冲液加入到FFPE组织片段中;第二步骤,将包含盐和PEG的溶液和磁珠加入到在步骤1中裂解的样品中;以及第三步骤,从加入有磁珠的样品中获得磁珠,然后从其中分离核酸,但不限于此。

[0031] 本发明人通过比较具有各种结构的裂解缓冲液,建立了为从FFPE样品中分离高纯度和高产率的核酸而优化的裂解缓冲液的构成。

[0032] 用于裂解FFPE组织片段的裂解缓冲液可以具体包含螯合剂、离子表面活性剂和Tris-Cl,但不限于此。

[0033] 根据本发明的一个实施方式,与使用其他缓冲液的情况相比,使用具有上述结构的裂解缓冲液可以更容易地分离磁珠和/或获得更高的产率。

[0034] 在本发明中,螯合剂可用于分离 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等二价阳离子,因此可以保护DNA免于能够分解DNA的酶,但不限于此。

[0035] 螯合剂的实例可以选自由二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)和N,N-双(羧甲基)甘氨酸(NTA)所组成的组,但是不限于此。在本发明的一个实例中使用EDTA作为螯合剂。

[0036] EDTA可以是EDTA化合物(例如 K_2EDTA 、 K_5EDTA 或 Na_2EDTA)中的EDTA部分,但不限于此。

[0037] 在本发明中,离子表面活性剂是在单一分子中同时具有亲水性部分和疏水性部分的材料,并且在解离过程中显示出离子特性。

[0038] 可用于本发明的离子表面活性剂的实例包括十二烷基硫酸钠(SDS)、月桂基硫酸

铵、月桂基醚硫酸钠 (SLES)、肉豆蔻醇聚醚硫酸钠、磺基琥珀酸二辛酯钠、全氟辛烷磺酸盐 (PFOS)、全氟丁烷磺酸盐、直链烷基苯磺酸盐 (LAB)、月桂酰肌氨酸钠、全氟壬酸酯 (PFOA) 和全氟辛酸盐 (PFO)，但不限于此。

[0039] 裂解缓冲液包含浓度为10mM至100mM的螯合剂；浓度为0.1% (w/v) 至5% (w/v) 的离子表面活性剂；和/或浓度为10mM至100mM的Tris-Cl，但不限于此。

[0040] 裂解缓冲液的pH可以为7.0至8.5。

[0041] 更具体地，裂解缓冲液可以包含EDTA、SDS和Tris-Cl，但不限于此。

[0042] 此外，当用裂解缓冲液裂解FFPE组织样品时，也可以加入蛋白酶。

[0043] 可以使用常规用于核酸分离的各种蛋白酶；例如可以使用蛋白酶K。

[0044] 在本发明中，将磁珠和包含盐和PEG的溶液加入到样品中可以依次或同时进行，但不限于此。

[0045] 在依次进行加入的情况下，可以在加入磁珠后加入溶液，或者可以在加入溶液后加入磁珠。

[0046] 在本发明中，对与磁珠一起加入的包含盐和PEG的溶液没有特别限制，但有助于捕获100bp或100nt以下的小核酸片段。

[0047] 对包含盐和聚乙二醇 (PEG) 的溶液中盐的类型没有特别限制，可以为氯化钠。

[0048] 溶液的PEG的平均分子量可以为6000Da至10000Da，但不限于此。

[0049] 更具体地，包括盐和PEG的溶液可以包含浓度为1μM至4μM的盐和浓度为10% (w/v) 至40% (w/v) 的PEG，但不限于此。

[0050] 本发明中的磁珠是指对磁场作出反应的颗粒或珠。通常，磁珠不具有磁场，而是指当暴露于磁场时形成磁偶极子的材料；例如，可以在磁场下磁化但在不存在磁场的情况下本身不具有磁性的材料。本发明中使用的磁性包括顺磁性材料和超顺磁性材料，但不限于此。

[0051] 为了本发明的目的，优选为磁珠具有与核酸结合的特性；例如，磁珠是具有与核酸结合的官能团 (例如-COOH) 的形式，但不限于此。

[0052] 对从FFPE组织中分离核酸的本发明方法没有特别限制，但可以包括对FFPE组织进行脱蜡的步骤。

[0053] FFPE组织是包埋在蜡中的固定组织。由于大多数包埋介质是疏水性的，因此在进行主要使用亲水试剂的组织学、细胞学或分子生物学分析之前，必须除去非活性材料。如本文所用，术语“脱蜡”或“去蜡”是指从生物样品中除去任何类型的包埋介质的一部分或全部，并且广泛用于本发明。例如，虽然没有限制，石蜡包埋的组织片段可以通过用有机溶剂例如甲苯、二甲苯、柠檬烯或其它合适的溶剂处理来脱蜡。

[0054] 根据本发明的一个实施方式，通过重复进行加入二甲苯并用乙醇洗涤来进行脱蜡。

[0055] 在本发明的步骤b中，从加入有磁珠的样品中获得磁珠，并从磁珠中分离核酸。

[0056] 特别地，步骤b将附着到在步骤a中加入的磁珠的核酸与磁珠分离。

[0057] 在从加入有磁珠的样品中获得磁珠之前，可以包括洗涤磁珠的步骤。

[0058] 磁珠洗涤可以使用50% (v/v) 至95% (v/v) 的乙醇溶液、具体地80% (v/v) 至90% (v/v) 的乙醇溶液来进行。

[0059] 可以通过将磁珠置于磁性支架下并收集磁珠,然后除去上清液并加入洗涤缓冲液来进行洗涤。此外,这种洗涤可以进行至少一次。

[0060] 在可选地进行洗涤之后,可以通过分离磁珠、向分离的磁珠中加入洗脱缓冲液等来从磁珠中分离核酸。

[0061] 本发明的另一个具体方面是从FFPE组织分离核酸的试剂盒,其包含裂解缓冲液、包含盐和聚乙二醇(PEG)的溶液、以及磁珠。

[0062] 裂解缓冲液、包含盐和PEG的溶液和磁珠与上述相同。

[0063] 此外,试剂盒还可以包括通常用于核酸分离的其它装置、溶液等;从FFPE组织中分离核酸的说明书;等等,但不限于此。

[0064] 此外,试剂盒还可以包括用于磁珠的洗涤缓冲液和用于分离磁珠的装置(例如磁性支架),但不限于此。

[0065] 本发明的另一个具体方面是从FFPE组织中分离核酸的裂解缓冲液,包含螯合剂、离子表面活性剂和Tris-Cl。

[0066] 螯合剂、离子表面活性剂和从FFPE组织中分离核酸的裂解缓冲液与上述相同。

[0067] 实施例

[0068] 在下文中,将参考以下实施例和实验例更详细地描述本发明。然而,以下实施例和实验例仅用于说明目的,本发明的范围不应以任何方式限于此。

[0069] 实施例1:从FFPE组织样品中分离基因组DNA(包括去除石蜡)

[0070] (1) FFPE嵌段片段和石蜡去除

[0071] 将FFPE嵌段切割成6 μ m的厚度,然后将一个或两个FFPE组织片段置于1.5mL管中。加入1mL二甲苯并混合,然后在室温下以12000 $\times$ g离心3分钟。除去上清液后,加入0.8mL二甲苯、0.4mL EtOH并混合,在室温下以12000 $\times$ g离心3分钟,除去上清液。加入1mL EtOH并再次混合,在室温下以12000 $\times$ g离心3分钟,除去上清液。为了完全蒸发剩余的EtOH,在室温下进行培养0.5小时至1小时。

[0072] (2) 裂解和基因组DNA分离

[0073] 将90 μ L裂解缓冲液(10mM Tris-Cl,pH8.0、100mM EDTA,pH8.0、0.5%SDS)和10 μ L蛋白酶K加入到包含去除石蜡的FFPE组织片段的管中并混合,然后在56 $^{\circ}$ C下培养过夜。

[0074] 接着,将100 μ L磁珠(AMPure XP)和100 μ L溶液A(2.5M NaCl,20%PEG-8000)加入到管中并混合。然后将管在室温下培养3分钟。将管在磁性支架上培养5分钟,并除去上清液。

[0075] 在加入500 μ L洗涤缓冲液(85%EtOH)并反应后,在磁性支架上除去乙醇上清液。将上述洗涤过程重复数次。

[0076] 将磁珠干燥并将反应管从磁性支架上取出,向反应管中加入60 μ L裂解缓冲液(10mM Tris-Cl,pH8.5或三次蒸馏水)。将反应管置于磁性支架上,分离洗脱液,得到基因组DNA样品。

[0077] 实施例2:从FFPE组织样品中分离基因组DNA(不含去除石蜡)

[0078] (1) FFPE嵌段片段化

[0079] 将FFPE嵌段切割成6 μ m的厚度,然后将一个或两个FFPE组织片段置于1.5mL管中。

[0080] (2) 裂解和基因组DNA分离

[0081] 将200 μ L裂解缓冲液(10mM Tris-Cl,pH8.0、100mM EDTA,pH8.0、0.5%SDS)、200 μ L

矿物油和10μL蛋白酶K加入到包含FFPE组织片段的管中并混合,然后在56℃下培养过夜。

[0082] 接着,分离下相(lower phase)并转移到新管中。将100μL磁珠(AMPure XP)和100μL溶液A(2.5M NaCl,20%PEG-8000)加入到管中并混合。然后将管在室温下培养3分钟。将管在磁性支架上培养5分钟,并除去上清液。

[0083] 在加入500μL洗涤缓冲液(85%EtOH)并反应后,在磁性支架上除去乙醇上清液。将上述洗涤过程重复数次。

[0084] 将磁珠干燥并将反应管从磁性支架取出,向反应管中加入60μL裂解缓冲液(10mM Tris-Cl,pH8.5或三次蒸馏水)。将反应管置于磁性支架中,分离洗脱液,得到基因组DNA样品。

[0085] 当比较通过实施例1的方法(包括石蜡去除过程)提取的基因组DNA和通过实施例2的方法(不包括石蜡去除过程)提取的基因组DNA时,DNA的质量相关特性相似,但不包括石蜡去除过程的方法的产率是包括石蜡去除过程的方法的产率的80%至90%。如果没有额外进行脱蜡,实验将更加方便,并且可以非常有效地从多个样品提取基因组DNA。以下通过实施例1的包括石蜡去除的方法进行所有的实验方法。

[0086] 实施例3:DNA的定量分析

[0087] (1)使用NanoDrop (ND) 定量

[0088] NanoDrop 2000 (Thermo Scientific公司)使用为dsDNA浓度测定模式。使用DNA提取洗脱液作为参照测定空白值后,使用1μL提取的DNA测定OD₂₆₀下的吸光度,使用下式计算浓度:dsDNA浓度=吸光度(OD₂₆₀)*50ng/μL。通过乘以100μL(提取溶剂的总体积)计算最终产率。

[0089] (2)使用PicoGreen (PG) 定量

[0090] 购买了Quant-Ti PicoGreen dsDNA测定试剂盒(Invitrogen公司)用于测量dsDNA浓度。

[0091] A、PicoGreen试剂的制备

[0092] 在测量浓度30分钟前,用1×TE缓冲液将PicoGreen试剂稀释至1/200,用铝箔包裹并在室温下避光保存。

[0093] B、标准浓度的DNA(λDNA)的制备

[0094] 使用1×TE缓冲液对包含在试剂盒中的标准浓度DNA(100ng/μL)依次稀释至1/2,以得到50ng/μL、25ng/μL、12.5ng/μL、6.3ng/μL、3.2ng/μL、1.6ng/μL和0.8ng/μL。将150μL的1×TE缓冲液加入3μL上述以50ng/μL至0.8ng/μL制备的标准浓度的DNA稀释液中,并充分混合,然后储存混合物。

[0095] C、提取的FFPE DNA的制备

[0096] 在测量浓度30分钟前,将3μL提取的FFPE DNA与150μL的1×TE缓冲液充分混合并储存。

[0097] D、浓度测定和最终产率计算

[0098] 将50μL上述A中制备的PicoGreen试剂以及50μL各DNA(在B和C中制备的依次稀释的标准浓度DNA以及提取的FFPE DNA样品)加入不透光的96孔试验板中的各孔中并充分混合,然后在室温下储存3分钟。

[0099] 接着,将混合物以2000×g离心1分钟,并在485nm的波长下进行激发。在波长535nm

处测量值。为了测量值的高精度,将所有DNA的实验重复三次,并且使用不包括DNA的 $1 \times TE$ 测量阴性对照的值。通过从波长535nm处的所有DNA的测量值中减去阴性对照的测量值来计算校正值。

[0100] 使用依次稀释的标准浓度DNA的浓度和535nm波长的校正值,制作根据535nm处的测量值的DNA浓度方程式。测定该方程式的p值(针对DNA浓度和535nm波长处的测定值的线性度),以确认其是否为0.99以上。如果该值低于0.99,则再次测量p值以制作标准浓度方程式。

[0101] 将校正值应用于标准浓度方程式以计算每个DNA浓度,将100 μ L萃取溶剂的总体积乘以每个DNA浓度以计算最终产率。

[0102] 实施例4:使用至少10年的FFPE组织的制备

[0103] 由于时间久的FFPE嵌段经过高度的gDNA片段化,在制备用于分离一般尺寸的基因组DNA的试剂盒的情况下,DNA产率可能较低。在本研究中,在DNA提取过程中加入了具有优化浓度的由PEG和NaCl组成的溶液,以便提取即使是小尺寸的DNA片段,导致时间久的FFPE DNA的产率显著提高。

[0104] 如图1的顶部和中间图所示,ND和PG之间的定量值差异很大的原因是本发明的DNA分离方法使得能够从DNA片段化获得小尺寸基因组DNA。如底部图所示,确认了当从时间久的FFPE嵌段提取小尺寸的DNA片段时,与QIAGEN试剂盒相比,使用本研究的磁珠法产生10倍以上的产率。

[0105] 实施例5:使用时间不长的FFPE组织的制备

[0106] 在最近制造FFPE嵌段的情况下,可以获得较大尺寸的gDNA,因为DNA片段化没有广泛发生。因此,确认了当使用磁珠法和QIAGEN试剂盒时,DNA产率和ND与PG的定量值比相似(图2)。

[0107] 实施例6:通过实施例1的基因组DNA制备方法获得的样品的清晰基因分型

[0108] 为了评估获得的基因组DNA质量,进行了清晰的基因分型。具体地,使用通过色谱柱法(QIAGEN)或磁珠法(100 μ L裂解缓冲液、100 μ L裂解缓冲液+PEG或50 μ L裂解缓冲液)从FFPE组织样品中分离的9个基因组DNA对24个SNP位点进行基因分型,并进行了清晰峰值模式的定性分析。100 μ L裂解缓冲液+PEG的情况是指使用100 μ L裂解缓冲液进行裂解,然后加入100 μ L含有PEG和NaCl混合物的溶液A,而100 μ L裂解缓冲液和50 μ L裂解缓冲液的情况是指仅使用裂解缓冲液,但不加入溶液A。

[0109] 由于上述分析是SNP分析,即种系突变,因此可以将SNP仅作为同源碱基、同源(100%)或异源碱基、异源(50%)来分析。然而,根据用作模板的基因组DNA的质量,存在一种情况,其中一种模式的异源具有难以确定其是同源还是异源,可能导致即同源性为80%至90%的同源,10%至20%或80%至90%的异源,因此提取的DNA的质量不能通过上述分析来确定。

[0110] 将使用Sanger测序确认的基因型作为金标准,对通过每种方法获得的基因组DNA的24个SNP进行基因分型,并分析哪种方法导致对DNA的最准确分析,即是否是同源(100%)或异源(50%)。当对9个基因组DNA的24个SNP进行分析时,计算出216个基因型总数中最准确的基因型数,并分析了哪种方法导致最多的准确基因型。实验方法的细节如下:

[0111] (1) 为24个SNP位点设计引物

[0112] 使用Tyler程序 (Sequenom公司) 的测定设计器模块, 为24个SNP位点中的每一个设计PCR和UEP引物。扩增子的尺寸约为100bp, 并且将SNP的位置设计在每个扩增产物的中间。设计的引物 (序列号: 1至120) 如下表1和表2所示。

[0113] [表1]

[0114] PCR引物信息

[0115]

SNP_ID	2nd-PCRP	1st-PCRP	AMP_LEN
rs248205	ACGTTGGATGGGCTCATGGGA AGAATCATC (序列号 1)	ACGTTGGATGGGGCAACATA CCACTATTG (序列号 2)	102
rs2051068	ACGTTGGATGACCCTGGAAAC CATTCAGA (序列号 3)	ACGTTGGATGCTGAAGGTAA AGATTCAAG (序列号 4)	101
rs1950501	ACGTTGGATGAATGACTCACC ACTGACCAC (序列号 5)	ACGTTGGATGTGTTGTCTGGG AACTCAGGG (序列号 6)	104

[0116]

rs1952966	ACGTTGGATGGGCTCTGGTTAC AACAGCTT (序列号 7)	ACGTTGGATGAGAAGTTTGC TTGGCTGAAG (序列号 8)	120
AMG_mid1 00	ACGTTGGATGGGCTTGAGGCC AACCATCAG (序列号 9)	ACGTTGGATGCCTCATCCTGG GCACCCTGG (序列号 10)	99
rs1385306	ACGTTGGATGGTCTGTCAGCT GTTCTGATG (序列号 11)	ACGTTGGATGGGCTCTGTATA GAGCTTTGG (序列号 12)	99
rs1365740	ACGTTGGATGGTACTTACCTCC TGAGGTAG (序列号 13)	ACGTTGGATGACTTCCTATGT TGCCAGCAC (序列号 14)	102
rs2016207	ACGTTGGATGCTGATGCAAAA ATCTATGGC (序列号 15)	ACGTTGGATGGCTCTAGTAGA TTGCTAGCC (序列号 16)	107
rs1571256	ACGTTGGATGATACCGCAGAA GTTTGGCAC (序列号 17)	ACGTTGGATGGCATTCTAAAC ATGCCTCTC (序列号 18)	99
rs1350836	ACGTTGGATGATTTCAGACTGT TGTGCTGG (序列号 19)	ACGTTGGATGCCTGTGGCCTT TTCATGGAG (序列号 20)	102
rs120434	ACGTTGGATGATGCCTTGTTCC ATGTGCTG (序列号 21)	ACGTTGGATGACACAAGTGG AAGCTTGCAG (序列号 22)	101
rs2347790	ACGTTGGATGATGCTCCACCC ACACAGTTC (序列号 23)	ACGTTGGATGACCTATGCAAC AGCTGGAAG (序列号 24)	93
rs298898	ACGTTGGATGCCATATATACAG GGTGTATAG (序列号 25)	ACGTTGGATGATAGTGTAGTG AGTGCTATG (序列号 26)	103
rs2380657	ACGTTGGATGGCTAGGGTTGA AAACCAATG (序列号 27)	ACGTTGGATGGAATATGAGCA CAACACACG (序列号 28)	110
rs2180770	ACGTTGGATGCACTTGTCACA AACTCTAGG (序列号 29)	ACGTTGGATGAACCACAGTG AGCATGGAAG (序列号 30)	113
rs58616	ACGTTGGATGTAGGCAGAAAA GGGCTGAAG (序列号 31)	ACGTTGGATGCCCTTCTGCTT TAACACTATC (序列号 32)	114
rs265005	ACGTTGGATGATCAGGCACAA TCTCTACCC (序列号 33)	ACGTTGGATGACACAAAGCT ACCACTGCAC (序列号 34)	101

[0117]

rs1259859	ACGTTGGATGGCCAATTTTATA GAAACTC (序列号 35)	ACGTTGGATGTAGTATCAAGG TTTTCTGGC (序列号 36)	104
rs1549944	ACGTTGGATGTGTCACATATGC TGGCCTTG (序列号 37)	ACGTTGGATGCTCTCTTGAAG AAGGTGCAG (序列号 38)	100
rs1028330	ACGTTGGATGTTTTCGGGCAG TGAAGAGAC (序列号 39)	ACGTTGGATGCTCTACATCTG TGGGTCTAG (序列号 40)	105
rs1390272	ACGTTGGATGCCTTTGATATT GTTCCAC (序列号 41)	ACGTTGGATGCAGGATAGTCT ACTATGTGC (序列号 42)	97
rs1434199	ACGTTGGATGGGCATAGGGAG CTGAATCAA (序列号 43)	ACGTTGGATGCACCTCTGCCC CCTAATTTC (序列号 44)	111
rs464221	ACGTTGGATGTGAGGACTTGG GATTAGGAC (序列号 45)	ACGTTGGATGAGGCAGCAGC AGAAGTTTAG (序列号 46)	87
rs1522307	ACGTTGGATGTAGGGTCCAGA AATGTGTTG (序列号 47)	ACGTTGGATGGGAGAAGCAA GCCATAGATG (序列号 48)	95

[0118] [表2]

[0119] UEP引物信息

[0120]

SNP_ ID	UEP_ MASS	UEP_SEQ	EXT1_ CALL	EXT1_ MASS	EXT1_SEQ	EXT2_ CALL	EXT2_ MASS	EXT2_SEQ
rs248 205	4803	AAAGCTCCAA CACACT (序列号 49)	C	5050	AAAGCTCC AACACACT C (序列号 50)	G	5090	AAAGCTCC AACACACT G (序列号 51)
rs205 1068	4955	GAGCGCACAG GTATAG (序列号 52)	T	5226	GAGCGCAC AGGTATAGA (序列号 53)	C	5243	GAGCGCA CAGGTATA GG (序列号 54)

[0121]

rs195 0501	5284	GTGGGTACAA AGGTCAA (序 列号 55)	G	5531	GTGGGTACA AAGGTCAA C (序列号 56)	C	5571	GTGGGTAC AAAGGTC AAG (序列 号 57)
rs195 2966	5194	CTTGGCTGAA GCAATAC (序列 号 58)	A	5466	CTTGGCTGA AGCAATACA (序列号 59)	G	5482	CTTGGCTG AAGCAATA CG (序列号 60)
AMG _mid 100	5203	tGGACCACTTG AGAAAC (序列 号 61)	G	5451	tGGACCACT TGAGAAAC C (序列号 62)	T	5475	tGGACCAC TTGAGAAA CA (序列号 63)
rs138 5306	5423	TTTGGCTCATC TGTTCTC (序列 号 64)	G	5670	TTTGGCTCA TCTGTTCTC C (序列号 65)	C	5710	TTTGGCTC ATCTGTTC TCG (序列 号 66)
rs136 5740	5631	CACCTTTTTCC TCTTCATT (序 列号 67)	G	5918	CACCTTTTT CCTCTTCAT TG (序列号 68)	T	5958	CACCTTTT TCCTCTTC ATTT (序列 号 69)
rs201 6207	5805	AGCACAGAAT CCTTTAGAA (序列号 70)	C	6052	AGCACAGA ATCCTTTAG AAC (序列号 71)	T	6132	AGCACAG AATCCTTT AGAAT (序 列号 72)
rs157 1256	6019	TGCCTCTCAGT ACTCTAGTC (序列号 73)	T	6290	TGCCTCTCA GTACTCTAG TCA (序列号 74)	C	6306	TGCCTCTC AGTACTCT AGTCG (序 列号 75)

[0122]

rs135 0836	6094	CCACCTCAAA GGGATATTAA (序列号 76)	C	6341	CCACCTCAA AGGGATATT AAC (序列号 77)	T	6421	CCACCTCA AAGGGATA TTAAT (序 列号 78)
rs120 434	6237	ggGTTGGCAAC ATGGTTAAG (序列号 79)	C	6484	ggGTTGGCA ACATGGTTA AGC (序列号 80)	G	6524	ggGTTGGC AACATGGT TAAGG (序 列号 81)
rs234 7790	6373	ccccGATGTGCG TATGCCTTA (序 列号 82)	A	6644	ccccGATGTG CGTATGCCT TAA (序列号 83)	G	6660	ccccGATGT GCGTATGC CTTAG (序 列号 84)
rs298 898	6451	GTGAGTGCTAT GATCATTATC (序列号 85)	C	6698	GTGAGTGCT ATGATCATT ATCC (序列号 86)	T	6778	GTGAGTGC TATGATCA TTATCT (序 列号 87)
rs238 0657	6733	tggaACAACACA CGTTTTTAGT (序列号 88)	C	6981	tggaACAACA CACGTTTTT AGTC (序列 号 89)	T	7061	tggaACAAC ACACGTTT TTAGTT (序 列号 90)
rs218 0770	6943	ccAAATATAAC CTTGATCCTCT G (序列号 91)	T	7214	ccAAATATAA CCTTGATCC TCTGA (序列 号 92)	C	7230	ccAAATATA ACCTTGAT CCTCTGG (序列号 93)
rs586 16	7014	TCTGCTTTAAC ACTATCAGGGT A (序列号 94)	G	7261	TCTGCTTTA ACACTATCA GGGTAC (序 列号 95)	A	7341	TCTGCTTT AACACTAT CAGGGTAT (序列号 96)

[0123]

rs265 005	7022	tttaTGCTCAACT GGACTATAAA (序列号 97)	T	7293	tttaTGCTCAA CTGGACTAT AAAA (序列 号 98)	C	7309	tttaTGCTCA ACTGGACT ATAAAG (序列号 99)
rs125 9859	7110	gatgGGAGGTGA TCCTTCTTATA (序列号 100)	C	7397	gatgGGAGGT GATCCTTCT TATAG (序列 号 101)	A	7437	gatgGGAGG TGATCCTT CTTATAT (序列号 102)
rs154 9944	7469	ggggAGGAAAG AAACACTGAT CCA (序列号 103)	A	7740	ggggAGGAA AGAAACAC TGATCCAA (序列号 104)	G	7756	ggggAGGA AAGAAAC ACTGATCC AG (序列号 105)
rs102 8330	7561	ccacTGACATGT ATCCACCATTA TG (序列号 106)	T	7832	ccacTGACAT GTATCCACC ATTATGA (序 列号 107)	C	7848	ccacTGACA TGTATCCA CCATTATG G (序列号 108)
rs139 0272	7613	gCTTGGTTTTT CTTAACAAGTT CAC (序列号 109)	T	7884	gCTTGGTTT TTCTTAACA AGTTCACA (序列号 110)	C	7900	gCTTGGTT TTTCTTAA CAAGTTCA CG (序列号 111)
rs143 4199	7686	gATTTGAAGGT CTAGAACTTTC ATT (序列号 112)	G	7933	gATTTGAAG GTCTAGAAC TTTCATTC (序列号 113)	C	7973	gATTTGAA GGTCTAGA ACTTTCAT TG (序列号 114)

[0124]

rs464 221	8027	gtCAGCAGCAG AAGTTTAGAC AATTA (序列号 115)	G	8274	gtCAGCAGC AGAAGTTTA GACAATTAC (序列号 116)	A	8354	gtCAGCAG CAGAAGTT TAGACAAT TAT (序列号 117)
rs152 2307	8069	tagaAAGCCATA GATGAAAATA CGGA (序列号 118)	C	8317	tagaAAGCCA TAGATGAAA ATACGGAC (序列号 119)	T	8396	tagaAAGCC ATAGATGA AAATACGG AT (序列号 120)

[0125] (2) iPLEX反应 (使用Sequenom公司的iPLEX试剂盒)

[0126] A、多重PCR反应

[0127] 将通过各方法提取的5ng DNA、1.2μL表1的引物混合物 (各0.5μM)、0.1μL的25mM dNTP混合物、0.12μL的5U/μL的HotStarTaq DNA聚合酶 (Qiagen公司)、0.65μL的10×PCR缓冲液和0.35μL的25mM MgCl₂混合,加入三次蒸馏水至最终体积为5μL。在94℃下反应15分钟后,使HotStarTaq聚合酶活化,然后重复[94℃ (20秒)/56℃ (30秒)/72℃ (60秒)]45次,然后在72℃下反应3分钟。

[0128] B、虾碱性磷酸酶 (SAP) 处理

[0129] 为了使在多重PCR过程中在每个扩增产物生成中未使用的剩余dNTP失活,将0.2μL SAP缓冲液、0.3μL SAP和1.5μL三次蒸馏水加入到反应A的多重PCR的扩增产物中,并在37℃和85℃下分别反应40分钟和10分钟。

[0130] C、单碱基延伸反应

[0131] 将0.2μL 10×Plus iPLEX缓冲液、0.1μL iPLEX终止混合物、1.2μL UEP混合物 (取决于各分子量为7μM或14μM)、0.02μL测序酶和0.48μL三次蒸馏水加入到上述反应B的产物中,然后在94℃下反应30秒。重复[94℃ (5秒)/52℃ (5秒)/80℃ (5秒)/52℃ (5秒)/80℃ (5秒)/52℃ (5秒)/80℃ (5秒)/52℃ (5秒)/80℃ (5秒)/52℃ (5秒)/80℃ (5秒)]40次,然后在72℃下培养3分钟,从而完成反应。

[0132] (3) 基因分型分析

[0133] 在将每种上述反应物等分到SpectroChip II (Sequenom公司)的每个点后,使用MALDI-ToF仪器 (Sequenom公司) 获得数据,并用Typer Analyzer程序 (Sequenom公司) 进行分析。通过确认24个SNP中的每一个的UEP分子量的变化来鉴别每个SNP的基因型。

[0134] 结果是,如图3所示,在将使用100μL裂解缓冲液+PEG方法分离的DNA作为模板的情况下,总共216种基因型中的150种基因型显示具有清晰峰值图案。因此,与其它DNA提取方法 (QIAGEN, 100μL裂解缓冲液或50μL裂解缓冲液) 相比,使用本发明的磁珠法的DNA提取方法能够提取高质量的DNA以进行最准确的SNP基因分型。

[0135] 实施例7:通过实施例1的基因组DNA制备方法获得的样品的回收率的分析

[0136] 将当使用QIAamp DNA FFPE组织试剂盒、QIAquick PCR纯化试剂盒或本发明的磁珠法(ASAN方法)重新提取将使用QIAamp DNA FFPE组织试剂盒从5种不同的FFPE组织中分离的100ng基因组DNA(基于PicoGreen定量值)时的回收率相比较。实验方法的细节如下:

[0137] (1) QIAamp DNA FFPE组织试剂盒

[0138] 将100ng纯分离的DNA与200 μ L ATL溶液混合,然后添加各200 μ L AL溶液和100%乙醇并充分混合。将混合物转移到置于2mL收集管中的QIAamp MinElute柱中,然后以8000rpm离心1分钟。

[0139] 将QIAamp MinElute柱转移到新的2mL收集管中,然后加入500 μ L的AW1溶液,并以8000rpm离心1分钟。

[0140] 然后,将QIAamp MinElute柱转移到新的2mL收集管中,然后加入500 μ L的AW2溶液,并以8000rpm离心1分钟。

[0141] 然后将QIAamp MinElute柱转移到新的2mL收集管中,并以14000rpm离心3分钟。

[0142] 将QIAamp MinElute柱转移到新的1.5mL管中后,将30 μ L的ATE溶液等分在柱的中心,并在室温下放置1分钟。然后以14000rpm离心1分钟。

[0143] 除去QIAamp MinElute柱,并在1.5mL管中获得提取的DNA。通过PicoGreen测量DNA的浓度,并乘以作为洗脱液的体积的30以计算最终回收率(所获得的总量/100ng)。

[0144] (2) QIAquick PCR纯化试剂盒

[0145] 将50 μ L (5倍体积) PB1溶液加入到100ng (10 μ L) 纯分离的DNA中,并充分混合。接着,将混合物转移到置于2mL收集管中的QIAquick旋转柱中,然后以8000rpm离心1分钟。

[0146] 将QIAquick旋转柱转移到新的2mL收集管中,然后加入750 μ L的PE溶液,并以8000rpm离心1分钟。

[0147] 接着,将QIAquick旋转柱转移到新的2mL收集管中,并以14000rpm离心1分钟。

[0148] 将QIAquick旋转柱转移到新的1.5mL管中后,将30 μ L的EB溶液分配在柱的中心,并在室温下放置1分钟,然后以14000rpm离心1分钟。

[0149] 除去QIAquick旋转柱,并在1.5mL管中获得提取的DNA。通过PicoGreen定量DNA的浓度,并乘以作为洗脱液的体积的30以计算最终回收率(所获得的总量/100ng)。

[0150] (3) 本发明的磁珠法

[0151] 将100ng纯分离的DNA与100 μ L裂解缓冲液混合在干净的1.5mL管中,加入各为100 μ L的磁珠(AMPure XP)和溶液A(2.5M NaCl, 20%PEG-8000)并充分混合。

[0152] 将混合物在室温下反应3分钟并置于磁性支架上5分钟。丢弃剩余的溶液,小心不要碰到底部的磁珠。

[0153] 加入500 μ L的85%乙醇,然后在30秒后丢弃。这样重复两次,并在室温下放置5分钟以蒸发任何剩余的乙醇。

[0154] 将混合物从磁性支架转移到不同的位置后,加入30 μ L洗脱液并充分混合,然后在室温下反应5分钟。

[0155] 将混合物返回到磁性支架,并使磁珠下沉。在注意不要接触磁珠的同时,只将溶液转移到新的1.5mL管中以获得提取的DNA。用PicoGreen定量DNA的浓度,并乘以作为洗脱液的体积的30以计算最终回收率(所获得的总量/100ng)。

[0156] 结果是,如图4所示,当使用磁珠法(ASAN方法)时,获得最高的回收率,两种Qiagen

公司的产品显示差异,与FFPE组织试剂盒相比,PCR纯化试剂盒显示较高的回收率。考虑到PCR纯化试剂盒用于提取扩增产物尺寸的DNA,从而能够更有效地获得片段化的FFPE DNA。然而,与PCR纯化试剂盒相比,本发明的磁珠法显示出显著更高的FFPE DNA回收率,并且在获得片段化的FFPE DNA方面被认为是优异的。

[0157] 实施例8:通过实施例1的基因组DNA制备方法获得的样品的产率分析

[0158] 使用1至5层相同的6 μ m厚度的FFPE嵌段片段,确认了利用本发明中开发的磁珠法提取的DNA的产率(图5)。结果证实,在本发明的条件下,基于PicoGreen定量可获得的产率约为5 μ g,其中使用100 μ L裂解缓冲液、100 μ L磁珠和100 μ L溶液A。

[0159] 实施例9:实施例1的基因组DNA制备方法的再现可能性确认

[0160] 使用总共5个不同的FFPE样品,使用4层6 μ m厚度的FFPE片段,其他机构的研究员使用本发明的磁珠法、MN公司的色谱柱方法的试剂盒,提取DNA并计算ND和PG的定量值,确认每种方法的DNA产率和提取的DNA的质量。

[0161] 首先,通过电泳比较针对相同的样品通过每种方法提取的DNA。具体地,将2 μ L最终DNA提取物加载到1.5%琼脂糖凝胶上,并在100V下进行电泳25分钟。使用GelDoc装置(Biorad公司)拍摄电泳图像并分析。为了确定DNA的大小,在电泳中也使用了100bp的DNA梯。

[0162] 结果证实,通过磁珠法提取的DNA显示出比通过MN试剂盒提取的DNA更强的带强度(图6)。

[0163] 此外,使用磁珠提取的DNA的产率高至2-3倍(图7;左和中)。特别地,通过磁珠法提取的DNA的产率和通过MN试剂盒提取的DNA的产率相比,PicoGreen定量值的差异大于NanoDrop定量值的差异,这表明使用磁珠提取的DNA包括dsDNA,其为完整的形式,更大的量。

[0164] 此外,通过分析能够检测DNA质量的ND/PG比,确认了通过磁珠法提取的DNA与通过MN试剂盒提取的DNA相比显示较低的ND/PG比(图7;右)。

[0165] 总之,与其他方式的DNA提取方法相比,使用磁珠从FFPE组织中分离核酸的本发明方法能够不仅从最近制造的FFPE组织中而且从时间久的FFPE组织中以高产率获得高质量的DNA。

[0166] 本领域普通技术人员将认识到,在不脱离本发明的精神或基本特征的情况下,本发明可以以其它具体形式实施。所描述的实施方式在所有方面仅被认为是说明性的而不是限制性的。因此,本发明的范围由所附权利要求而不是前面的描述来指示。落在权利要求书的等效的含义和范围内的所有改变都将包括在本发明的范围内。

- [0001] <110> 财团法人崑山社会福祉财团
[0002] 蔚山大学校产学协力团
[0003] <120> 从FFPE组织中分离核酸的方法
[0004] <130> OPA16028-PCT
[0005] <150> KR 10-2015-0034697
[0006] <151> 2015-03-12
[0007] <160> 120
[0008] <170> KopatentIn 2.0
[0009] <210> 1
[0010] <211> 30
[0011] <212> DNA
[0012] <213> 人工序列
[0013] <220>
[0014] <223> rs248205-2nd
[0015] <400> 1
[0016] acgttggatg ggctcatggg aagaatcatc 30
[0017] <210> 2
[0018] <211> 29
[0019] <212> DNA
[0020] <213> 人工序列
[0021] <220>
[0022] <223> rs248205-1st
[0023] <400> 2
[0024] acgttggatg gggcaacata ccactattg 29
[0025] <210> 3
[0026] <211> 30
[0027] <212> DNA
[0028] <213> 人工序列
[0029] <220>
[0030] <223> rs2051068-2nd
[0031] <400> 3
[0032] acgttggatg accctggaaa ccatttcaga 30
[0033] <210> 4
[0034] <211> 29
[0035] <212> DNA
[0036] <213> 人工序列
[0037] <220>
[0038] <223> rs2051068-1st

[0039] <400> 4
[0040] acgttggatg ctgaaggtaa agattcaag 29
[0041] <210> 5
[0042] <211> 30
[0043] <212> DNA
[0044] <213> 人工序列
[0045] <220>
[0046] <223> rs1950501-2nd
[0047] <400> 5
[0048] acgttggatg aatgactcac cactgaccac 30
[0049] <210> 6
[0050] <211> 30
[0051] <212> DNA
[0052] <213> 人工序列
[0053] <220>
[0054] <223> rs1950501-1st
[0055] <400> 6
[0056] acgttggatg tgttgtcttg gaactcaggg 30
[0057] <210> 7
[0058] <211> 30
[0059] <212> DNA
[0060] <213> 人工序列
[0061] <220>
[0062] <223> rs1952966-2nd
[0063] <400> 7
[0064] acgttggatg ggctctggtt acaacagctt 30
[0065] <210> 8
[0066] <211> 30
[0067] <212> DNA
[0068] <213> 人工序列
[0069] <220>
[0070] <223> rs1952966-1st
[0071] <400> 8
[0072] acgttggatg agaagtttgc ttggctgaag 30
[0073] <210> 9
[0074] <211> 30
[0075] <212> DNA
[0076] <213> 人工序列
[0077] <220>

[0078] <223> AMG_mid100-2nd
[0079] <400> 9
[0080] acgttgatg ggcttgaggc caaccatcag 30
[0081] <210> 10
[0082] <211> 30
[0083] <212> DNA
[0084] <213> 人工序列
[0085] <220>
[0086] <223> AMG_mid100-1st
[0087] <400> 10
[0088] acgttgatg cctcatcctg ggcaccctgg 30
[0089] <210> 11
[0090] <211> 30
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 人工序列
[0093] <220>
[0094] <223> rs1385306-2nd
[0095] <400> 11
[0096] acgttgatg gtctgtcagc tggtctgatg 30
[0097] <210> 12
[0098] <211> 30
[0099] <212> DNA
[0100] <213> 人工序列
[0101] <220>
[0102] <223> rs1385306-1st
[0103] <400> 12
[0104] acgttgatg ggcttgaggc caaccatcag 30
[0105] <210> 13
[0106] <211> 30
[0107] <212> DNA
[0108] <213> 人工序列
[0109] <220>
[0110] <223> rs1365740-2nd
[0111] <400> 13
[0112] acgttgatg gtacttacct cctgaggtag 30
[0113] <210> 14
[0114] <211> 30
[0115] <212> DNA
[0116] <213> 人工序列

[0117] <220>
[0118] <223> rs1365740-1st
[0119] <400> 14
[0120] acgttggatg acttcctatg ttgccagcac 30
[0121] <210> 15
[0122] <211> 30
[0123] <212> DNA
[0124] <213> 人工序列
[0125] <220>
[0126] <223> rs2016207-2nd
[0127] <400> 15
[0128] acgttggatg ctgatgcaaa aatctatggc 30
[0129] <210> 16
[0130] <211> 30
[0131] <212> DNA
[0132] <213> 人工序列
[0133] <220>
[0134] <223> rs2016207-1st
[0135] <400> 16
[0136] acgttggatg gctctagtag attgctagcc 30
[0137] <210> 17
[0138] <211> 30
[0139] <212> DNA
[0140] <213> 人工序列
[0141] <220>
[0142] <223> rs1571256-2nd
[0143] <400> 17
[0144] acgttggatg ataccgcaga agtttggcac 30
[0145] <210> 18
[0146] <211> 30
[0147] <212> DNA
[0148] <213> 人工序列
[0149] <220>
[0150] <223> rs1571256-1st
[0151] <400> 18
[0152] acgttggatg gcattctaaa catgcctctc 30
[0153] <210> 19
[0154] <211> 30
[0155] <212> DNA

[0156] <213> 人工序列
[0157] <220>
[0158] <223> rs1350836-2nd
[0159] <400> 19
[0160] acgttggatg atttcagact gttgtgctgg 30
[0161] <210> 20
[0162] <211> 30
[0163] <212> DNA
[0164] <213> 人工序列
[0165] <220>
[0166] <223> rs1350836-1st
[0167] <400> 20
[0168] acgttggatg cctgtggcct tttcatggag 30
[0169] <210> 21
[0170] <211> 30
[0171] <212> DNA
[0172] <213> 人工序列
[0173] <220>
[0174] <223> rs120434-2nd
[0175] <400> 21
[0176] acgttggatg atgccttggt ccatgtgctg 30
[0177] <210> 22
[0178] <211> 30
[0179] <212> DNA
[0180] <213> 人工序列
[0181] <220>
[0182] <223> rs120434-1st
[0183] <400> 22
[0184] acgttggatg acacaagtgg aagcttgcag 30
[0185] <210> 23
[0186] <211> 30
[0187] <212> DNA
[0188] <213> 人工序列
[0189] <220>
[0190] <223> rs2347790-2nd
[0191] <400> 23
[0192] acgttggatg atgctccacc cacacagttc 30
[0193] <210> 24
[0194] <211> 30

[0195] <212> DNA
[0196] <213> 人工序列
[0197] <220>
[0198] <223> rs2347790-1st
[0199] <400> 24
[0200] acgttggatg acctatgcaa cagctggaag 30
[0201] <210> 25
[0202] <211> 31
[0203] <212> DNA
[0204] <213> 人工序列
[0205] <220>
[0206] <223> rs298898-2nd
[0207] <400> 25
[0208] acgttggatg ccatatatac aggggtgtata g 31
[0209] <210> 26
[0210] <211> 30
[0211] <212> DNA
[0212] <213> 人工序列
[0213] <220>
[0214] <223> rs298898-1st
[0215] <400> 26
[0216] acgttggatg atagtgtagt gagtgctatg 30
[0217] <210> 27
[0218] <211> 30
[0219] <212> DNA
[0220] <213> 人工序列
[0221] <220>
[0222] <223> rs2380657-2nd
[0223] <400> 27
[0224] acgttggatg gctagggttg aaaaccaatg 30
[0225] <210> 28
[0226] <211> 30
[0227] <212> DNA
[0228] <213> 人工序列
[0229] <220>
[0230] <223> rs2380657-1st
[0231] <400> 28
[0232] acgttggatg gaatatgagc acaacacacg 30
[0233] <210> 29

[0234] <211> 30
[0235] <212> DNA
[0236] <213> 人工序列
[0237] <220>
[0238] <223> rs2180770-2nd
[0239] <400> 29
[0240] acgttggatg cacttggtcac aaactctagg 30
[0241] <210> 30
[0242] <211> 30
[0243] <212> DNA
[0244] <213> 人工序列
[0245] <220>
[0246] <223> rs2180770-1st
[0247] <400> 30
[0248] acgttggatg aaccacagtg agcatggaag 30
[0249] <210> 31
[0250] <211> 30
[0251] <212> DNA
[0252] <213> 人工序列
[0253] <220>
[0254] <223> rs58616-2nd
[0255] <400> 31
[0256] acgttggatg taggcagaaa agggctgaag 30
[0257] <210> 32
[0258] <211> 31
[0259] <212> DNA
[0260] <213> 人工序列
[0261] <220>
[0262] <223> rs58616-1st
[0263] <400> 32
[0264] acgttggatg cccttctgct ttaacactat c 31
[0265] <210> 33
[0266] <211> 30
[0267] <212> DNA
[0268] <213> 人工序列
[0269] <220>
[0270] <223> rs265005-2nd
[0271] <400> 33
[0272] acgttggatg atcaggcaca atctctaccc 30

[0273] <210> 34
[0274] <211> 30
[0275] <212> DNA
[0276] <213> 人工序列
[0277] <220>
[0278] <223> rs265005-1st
[0279] <400> 34
[0280] acgttggatg acacaaagct accactgcac 30
[0281] <210> 35
[0282] <211> 29
[0283] <212> DNA
[0284] <213> 人工序列
[0285] <220>
[0286] <223> rs1259859-2nd
[0287] <400> 35
[0288] acgttggatg gccaatTTTA tagaaactc 29
[0289] <210> 36
[0290] <211> 30
[0291] <212> DNA
[0292] <213> 人工序列
[0293] <220>
[0294] <223> rs1259859-1st
[0295] <400> 36
[0296] acgttggatg tagtatcaag gttttctggc 30
[0297] <210> 37
[0298] <211> 30
[0299] <212> DNA
[0300] <213> 人工序列
[0301] <220>
[0302] <223> rs1549944-2nd
[0303] <400> 37
[0304] acgttggatg tgTcacatat gctggccttg 30
[0305] <210> 38
[0306] <211> 30
[0307] <212> DNA
[0308] <213> 人工序列
[0309] <220>
[0310] <223> rs1549944-1st
[0311] <400> 38

[0312] acgttgatg ctctcttgaa gaaggtgcag 30
[0313] <210> 39
[0314] <211> 30
[0315] <212> DNA
[0316] <213> 人工序列
[0317] <220>
[0318] <223> rs1028330-2nd
[0319] <400> 39
[0320] acgttgatg ttttcgggca gtgaagagac 30
[0321] <210> 40
[0322] <211> 30
[0323] <212> DNA
[0324] <213> 人工序列
[0325] <220>
[0326] <223> rs1028330-1st
[0327] <400> 40
[0328] acgttgatg ctctacatct gtgggtctag 30
[0329] <210> 41
[0330] <211> 29
[0331] <212> DNA
[0332] <213> 人工序列
[0333] <220>
[0334] <223> rs1390272-2nd
[0335] <400> 41
[0336] acgttgatg cctttgatat ttgttccac 29
[0337] <210> 42
[0338] <211> 30
[0339] <212> DNA
[0340] <213> 人工序列
[0341] <220>
[0342] <223> rs1390272-1st
[0343] <400> 42
[0344] acgttgatg caggatagtc tactatgtgc 30
[0345] <210> 43
[0346] <211> 30
[0347] <212> DNA
[0348] <213> 人工序列
[0349] <220>
[0350] <223> rs1434199-2nd

[0351] <400> 43
[0352] acgttggatg ggcataggga gctgaatcaa 30
[0353] <210> 44
[0354] <211> 30
[0355] <212> DNA
[0356] <213> 人工序列
[0357] <220>
[0358] <223> rs1434199-1st
[0359] <400> 44
[0360] acgttggatg cacctctgcc ccctaatttc 30
[0361] <210> 45
[0362] <211> 30
[0363] <212> DNA
[0364] <213> 人工序列
[0365] <220>
[0366] <223> rs464221-2nd
[0367] <400> 45
[0368] acgttggatg tgaggacttg ggattaggac 30
[0369] <210> 46
[0370] <211> 30
[0371] <212> DNA
[0372] <213> 人工序列
[0373] <220>
[0374] <223> rs464221-1st
[0375] <400> 46
[0376] acgttggatg aggcagcagc agaagtttag 30
[0377] <210> 47
[0378] <211> 30
[0379] <212> DNA
[0380] <213> 人工序列
[0381] <220>
[0382] <223> rs1522307-2nd
[0383] <400> 47
[0384] acgttggatg tagggtccag aaatgtgttg 30
[0385] <210> 48
[0386] <211> 30
[0387] <212> DNA
[0388] <213> 人工序列
[0389] <220>

[0390] <223> rs1522307-1st
[0391] <400> 48
[0392] acgttgatg ggagaagcaa gccatagatg 30
[0393] <210> 49
[0394] <211> 16
[0395] <212> DNA
[0396] <213> 人工序列
[0397] <220>
[0398] <223> rs248205-UEP
[0399] <400> 49
[0400] aaagctccaa cacact 16
[0401] <210> 50
[0402] <211> 17
[0403] <212> DNA
[0404] <213> 人工序列
[0405] <220>
[0406] <223> rs248205-EXT1
[0407] <400> 50
[0408] aaagctccaa cacactc 17
[0409] <210> 51
[0410] <211> 17
[0411] <212> DNA
[0412] <213> 人工序列
[0413] <220>
[0414] <223> rs248205-EXT2
[0415] <400> 51
[0416] aaagctccaa cacactg 17
[0417] <210> 52
[0418] <211> 16
[0419] <212> DNA
[0420] <213> 人工序列
[0421] <220>
[0422] <223> rs2051068-UEP
[0423] <400> 52
[0424] gagcgcacag gtatag 16
[0425] <210> 53
[0426] <211> 17
[0427] <212> DNA
[0428] <213> 人工序列

[0429] <220>
[0430] <223> rs2051068-EXT1
[0431] <400> 53
[0432] gagcgcacag gtataga 17
[0433] <210> 54
[0434] <211> 17
[0435] <212> DNA
[0436] <213> 人工序列
[0437] <220>
[0438] <223> rs2051068-EXT2
[0439] <400> 54
[0440] gagcgcacag gtatagg 17
[0441] <210> 55
[0442] <211> 17
[0443] <212> DNA
[0444] <213> 人工序列
[0445] <220>
[0446] <223> rs1950501-UEP
[0447] <400> 55
[0448] gtgggtacaa aggtcaa 17
[0449] <210> 56
[0450] <211> 18
[0451] <212> DNA
[0452] <213> 人工序列
[0453] <220>
[0454] <223> rs1950501-EXT1
[0455] <400> 56
[0456] gtgggtacaa aggtcaac 18
[0457] <210> 57
[0458] <211> 18
[0459] <212> DNA
[0460] <213> 人工序列
[0461] <220>
[0462] <223> rs1950501-EXT2
[0463] <400> 57
[0464] gtgggtacaa aggtcaag 18
[0465] <210> 58
[0466] <211> 17
[0467] <212> DNA

[0468] <213> 人工序列
[0469] <220>
[0470] <223> rs1952966-UEP
[0471] <400> 58
[0472] cttggctgaa gcaatac 17
[0473] <210> 59
[0474] <211> 18
[0475] <212> DNA
[0476] <213> 人工序列
[0477] <220>
[0478] <223> rs1952966-EXT1
[0479] <400> 59
[0480] cttggctgaa gcaataca 18
[0481] <210> 60
[0482] <211> 18
[0483] <212> DNA
[0484] <213> 人工序列
[0485] <220>
[0486] <223> rs1952966-EXT2
[0487] <400> 60
[0488] cttggctgaa gcaatacg 18
[0489] <210> 61
[0490] <211> 17
[0491] <212> DNA
[0492] <213> 人工序列
[0493] <220>
[0494] <223> AMG_mid100-UEP
[0495] <400> 61
[0496] tggaccactt gagaaac 17
[0497] <210> 62
[0498] <211> 18
[0499] <212> DNA
[0500] <213> 人工序列
[0501] <220>
[0502] <223> AMG_mid100-EXT1
[0503] <400> 62
[0504] tggaccactt gagaaacc 18
[0505] <210> 63
[0506] <211> 18

[0507] <212> DNA
[0508] <213> 人工序列
[0509] <220>
[0510] <223> AMG_mid100-EXT2
[0511] <400> 63
[0512] tggaccactt gagaaaca 18
[0513] <210> 64
[0514] <211> 18
[0515] <212> DNA
[0516] <213> 人工序列
[0517] <220>
[0518] <223> rs1385306-UEP
[0519] <400> 64
[0520] tttggctcat ctgttctc 18
[0521] <210> 65
[0522] <211> 19
[0523] <212> DNA
[0524] <213> 人工序列
[0525] <220>
[0526] <223> rs1385306-EXT1
[0527] <400> 65
[0528] tttggctcat ctgttctcc 19
[0529] <210> 66
[0530] <211> 19
[0531] <212> DNA
[0532] <213> 人工序列
[0533] <220>
[0534] <223> rs1385306-EXT2
[0535] <400> 66
[0536] tttggctcat ctgttctcg 19
[0537] <210> 67
[0538] <211> 19
[0539] <212> DNA
[0540] <213> 人工序列
[0541] <220>
[0542] <223> rs1365740-UEP
[0543] <400> 67
[0544] cacctttttc ctcttcatt 19
[0545] <210> 68

[0546] <211> 20
[0547] <212> DNA
[0548] <213> 人工序列
[0549] <220>
[0550] <223> rs1365740-EXT1
[0551] <400> 68
[0552] caccttttttc ctcttcattg 20
[0553] <210> 69
[0554] <211> 20
[0555] <212> DNA
[0556] <213> 人工序列
[0557] <220>
[0558] <223> rs1365740-EXT2
[0559] <400> 69
[0560] caccttttttc ctcttcattt 20
[0561] <210> 70
[0562] <211> 19
[0563] <212> DNA
[0564] <213> 人工序列
[0565] <220>
[0566] <223> rs2016207-UEP
[0567] <400> 70
[0568] agcacagaat ccttttagaa 19
[0569] <210> 71
[0570] <211> 20
[0571] <212> DNA
[0572] <213> 人工序列
[0573] <220>
[0574] <223> rs2016207-EXT1
[0575] <400> 71
[0576] agcacagaat ccttttagaac 20
[0577] <210> 72
[0578] <211> 20
[0579] <212> DNA
[0580] <213> 人工序列
[0581] <220>
[0582] <223> rs2016207-EXT2
[0583] <400> 72
[0584] agcacagaat ccttttagaat 20

[0585] <210> 73
[0586] <211> 20
[0587] <212> DNA
[0588] <213> 人工序列
[0589] <220>
[0590] <223> rs1571256-UEP
[0591] <400> 73
[0592] tgcctctcag tactctagtc 20
[0593] <210> 74
[0594] <211> 21
[0595] <212> DNA
[0596] <213> 人工序列
[0597] <220>
[0598] <223> rs1571256-EXT1
[0599] <400> 74
[0600] tgcctctcag tactctagtc a 21
[0601] <210> 75
[0602] <211> 21
[0603] <212> DNA
[0604] <213> 人工序列
[0605] <220>
[0606] <223> rs1571256-EXT2
[0607] <400> 75
[0608] tgcctctcag tactctagtc g 21
[0609] <210> 76
[0610] <211> 20
[0611] <212> DNA
[0612] <213> 人工序列
[0613] <220>
[0614] <223> rs1350836-UEP
[0615] <400> 76
[0616] ccacctcaaa gggatattaa 20
[0617] <210> 77
[0618] <211> 21
[0619] <212> DNA
[0620] <213> 人工序列
[0621] <220>
[0622] <223> rs1350836-EXT1
[0623] <400> 77

[0624] ccacctcaaa gggatattaa c 21
[0625] <210> 78
[0626] <211> 21
[0627] <212> DNA
[0628] <213> 人工序列
[0629] <220>
[0630] <223> rs1350836-EXT2
[0631] <400> 78
[0632] ccacctcaaa gggatattaa t 21
[0633] <210> 79
[0634] <211> 20
[0635] <212> DNA
[0636] <213> 人工序列
[0637] <220>
[0638] <223> rs120434-UEP
[0639] <400> 79
[0640] gggttggcaa catggttaag 20
[0641] <210> 80
[0642] <211> 21
[0643] <212> DNA
[0644] <213> 人工序列
[0645] <220>
[0646] <223> rs120434-EXT1
[0647] <400> 80
[0648] gggttggcaa catggttaag c 21
[0649] <210> 81
[0650] <211> 21
[0651] <212> DNA
[0652] <213> 人工序列
[0653] <220>
[0654] <223> rs120434-EXT2
[0655] <400> 81
[0656] gggttggcaa catggttaag g 21
[0657] <210> 82
[0658] <211> 21
[0659] <212> DNA
[0660] <213> 人工序列
[0661] <220>
[0662] <223> rs2347790-UEP

[0663] <400> 82
[0664] ccccgatgtg cgtatgcctt a 21
[0665] <210> 83
[0666] <211> 22
[0667] <212> DNA
[0668] <213> 人工序列
[0669] <220>
[0670] <223> rs2347790-EXT1
[0671] <400> 83
[0672] ccccgatgtg cgtatgcctt aa 22
[0673] <210> 84
[0674] <211> 22
[0675] <212> DNA
[0676] <213> 人工序列
[0677] <220>
[0678] <223> rs2347790-EXT2
[0679] <400> 84
[0680] ccccgatgtg cgtatgcctt ag 22
[0681] <210> 85
[0682] <211> 21
[0683] <212> DNA
[0684] <213> 人工序列
[0685] <220>
[0686] <223> rs298898-UEP
[0687] <400> 85
[0688] gtgagtgcta tgatcattat c 21
[0689] <210> 86
[0690] <211> 22
[0691] <212> DNA
[0692] <213> 人工序列
[0693] <220>
[0694] <223> rs298898-EXP1
[0695] <400> 86
[0696] gtgagtgcta tgatcattat cc 22
[0697] <210> 87
[0698] <211> 22
[0699] <212> DNA
[0700] <213> 人工序列
[0701] <220>

[0702] <223> rs298898-EXP2
[0703] <400> 87
[0704] gtgagtgcta tgatcattat ct 22
[0705] <210> 88
[0706] <211> 22
[0707] <212> DNA
[0708] <213> 人工序列
[0709] <220>
[0710] <223> rs2380657-UEP
[0711] <400> 88
[0712] tggaacaaca cacgttttta gt 22
[0713] <210> 89
[0714] <211> 23
[0715] <212> DNA
[0716] <213> 人工序列
[0717] <220>
[0718] <223> rs2380657-EXT1
[0719] <400> 89
[0720] tggaacaaca cacgttttta gtc 23
[0721] <210> 90
[0722] <211> 23
[0723] <212> DNA
[0724] <213> 人工序列
[0725] <220>
[0726] <223> rs2380657-EXT2
[0727] <400> 90
[0728] tggaacaaca cacgttttta gtt 23
[0729] <210> 91
[0730] <211> 23
[0731] <212> DNA
[0732] <213> 人工序列
[0733] <220>
[0734] <223> rs2180770-UEP
[0735] <400> 91
[0736] ccaaataaa ccttgatcct ctg 23
[0737] <210> 92
[0738] <211> 24
[0739] <212> DNA
[0740] <213> 人工序列

[0741] <220>
[0742] <223> rs2180770-EXT1
[0743] <400> 92
[0744] ccaaataataa ccttgatcct ctga 24
[0745] <210> 93
[0746] <211> 24
[0747] <212> DNA
[0748] <213> 人工序列
[0749] <220>
[0750] <223> rs2180770-EXT2
[0751] <400> 93
[0752] ccaaataataa ccttgatcct ctgg 24
[0753] <210> 94
[0754] <211> 23
[0755] <212> DNA
[0756] <213> 人工序列
[0757] <220>
[0758] <223> rs58616-UEP
[0759] <400> 94
[0760] tctgctttaa cactatcagg gta 23
[0761] <210> 95
[0762] <211> 24
[0763] <212> DNA
[0764] <213> 人工序列
[0765] <220>
[0766] <223> rs58616-EXT1
[0767] <400> 95
[0768] tctgctttaa cactatcagg gtac 24
[0769] <210> 96
[0770] <211> 24
[0771] <212> DNA
[0772] <213> 人工序列
[0773] <220>
[0774] <223> rs58616-EXT2
[0775] <400> 96
[0776] tctgctttaa cactatcagg gtat 24
[0777] <210> 97
[0778] <211> 23
[0779] <212> DNA

[0780] <213> 人工序列
[0781] <220>
[0782] <223> rs265005-UEP
[0783] <400> 97
[0784] tttatgctca actggactat aaa 23
[0785] <210> 98
[0786] <211> 24
[0787] <212> DNA
[0788] <213> 人工序列
[0789] <220>
[0790] <223> rs265005-EXT1
[0791] <400> 98
[0792] tttatgctca actggactat aaaa 24
[0793] <210> 99
[0794] <211> 24
[0795] <212> DNA
[0796] <213> 人工序列
[0797] <220>
[0798] <223> rs265005-EXT2
[0799] <400> 99
[0800] tttatgctca actggactat aaag 24
[0801] <210> 100
[0802] <211> 23
[0803] <212> DNA
[0804] <213> 人工序列
[0805] <220>
[0806] <223> rs1259859-UEP
[0807] <400> 100
[0808] gatgggaggt gaccttctt ata 23
[0809] <210> 101
[0810] <211> 24
[0811] <212> DNA
[0812] <213> 人工序列
[0813] <220>
[0814] <223> rs1259859-EXT1
[0815] <400> 101
[0816] gatgggaggt gaccttctt atag 24
[0817] <210> 102
[0818] <211> 24

[0819] <212> DNA
[0820] <213> 人工序列
[0821] <220>
[0822] <223> rs1259859-EXT2
[0823] <400> 102
[0824] gatgggaggt gatccttctt atat 24
[0825] <210> 103
[0826] <211> 24
[0827] <212> DNA
[0828] <213> 人工序列
[0829] <220>
[0830] <223> rs1549944-UEP
[0831] <400> 103
[0832] ggggaggaaa gaaacactga tcca 24
[0833] <210> 104
[0834] <211> 25
[0835] <212> DNA
[0836] <213> 人工序列
[0837] <220>
[0838] <223> rs1549944-EXT1
[0839] <400> 104
[0840] ggggaggaaa gaaacactga tccaa 25
[0841] <210> 105
[0842] <211> 25
[0843] <212> DNA
[0844] <213> 人工序列
[0845] <220>
[0846] <223> rs1549944-EXT2
[0847] <400> 105
[0848] ggggaggaaa gaaacactga tccag 25
[0849] <210> 106
[0850] <211> 25
[0851] <212> DNA
[0852] <213> 人工序列
[0853] <220>
[0854] <223> rs1028330-UEP
[0855] <400> 106
[0856] ccatgacat gtatccacca ttatg 25
[0857] <210> 107

[0858] <211> 26
[0859] <212> DNA
[0860] <213> 人工序列
[0861] <220>
[0862] <223> rs1028330-EXT1
[0863] <400> 107
[0864] ccactgacat gtatccacca ttatga 26
[0865] <210> 108
[0866] <211> 26
[0867] <212> DNA
[0868] <213> 人工序列
[0869] <220>
[0870] <223> rs1028330-EXT2
[0871] <400> 108
[0872] ccactgacat gtatccacca ttatgg 26
[0873] <210> 109
[0874] <211> 25
[0875] <212> DNA
[0876] <213> 人工序列
[0877] <220>
[0878] <223> rs1390272-UEP
[0879] <400> 109
[0880] gcttggtttt tcttaacaag ttcac 25
[0881] <210> 110
[0882] <211> 26
[0883] <212> DNA
[0884] <213> 人工序列
[0885] <220>
[0886] <223> rs1390272-EXT1
[0887] <400> 110
[0888] gcttggtttt tcttaacaag ttcaca 26
[0889] <210> 111
[0890] <211> 26
[0891] <212> DNA
[0892] <213> 人工序列
[0893] <220>
[0894] <223> rs1390272-EXT2
[0895] <400> 111
[0896] gcttggtttt tcttaacaag ttcacg 26

[0897] <210> 112
[0898] <211> 25
[0899] <212> DNA
[0900] <213> 人工序列
[0901] <220>
[0902] <223> rs1434199-UEP
[0903] <400> 112
[0904] gatttgaagg tctagaactt tcatt 25
[0905] <210> 113
[0906] <211> 26
[0907] <212> DNA
[0908] <213> 人工序列
[0909] <220>
[0910] <223> rs1434199-EXT1
[0911] <400> 113
[0912] gatttgaagg tctagaactt tcattc 26
[0913] <210> 114
[0914] <211> 26
[0915] <212> DNA
[0916] <213> 人工序列
[0917] <220>
[0918] <223> rs1434199-EXT2
[0919] <400> 114
[0920] gatttgaagg tctagaactt tcattg 26
[0921] <210> 115
[0922] <211> 26
[0923] <212> DNA
[0924] <213> 人工序列
[0925] <220>
[0926] <223> rs464221-UEP
[0927] <400> 115
[0928] gtcagcagca gaagtttaga caatta 26
[0929] <210> 116
[0930] <211> 27
[0931] <212> DNA
[0932] <213> 人工序列
[0933] <220>
[0934] <223> rs464221-EXT1
[0935] <400> 116

[0936] gtcagcagca gaagtttaga caattac 27
[0937] <210> 117
[0938] <211> 27
[0939] <212> DNA
[0940] <213> 人工序列
[0941] <220>
[0942] <223> rs464221-EXT2
[0943] <400> 117
[0944] gtcagcagca gaagtttaga caattat 27
[0945] <210> 118
[0946] <211> 26
[0947] <212> DNA
[0948] <213> 人工序列
[0949] <220>
[0950] <223> rs1522307-UEP
[0951] <400> 118
[0952] tagaaagcca tagatgaaaa tacgga 26
[0953] <210> 119
[0954] <211> 27
[0955] <212> DNA
[0956] <213> 人工序列
[0957] <220>
[0958] <223> rs1522307-EXT1
[0959] <400> 119
[0960] tagaaagcca tagatgaaaa tacggac 27
[0961] <210> 120
[0962] <211> 27
[0963] <212> DNA
[0964] <213> 人工序列
[0965] <220>
[0966] <223> rs1522307-EXT2
[0967] <400> 120
[0968] tagaaagcca tagatgaaaa tacggat 27

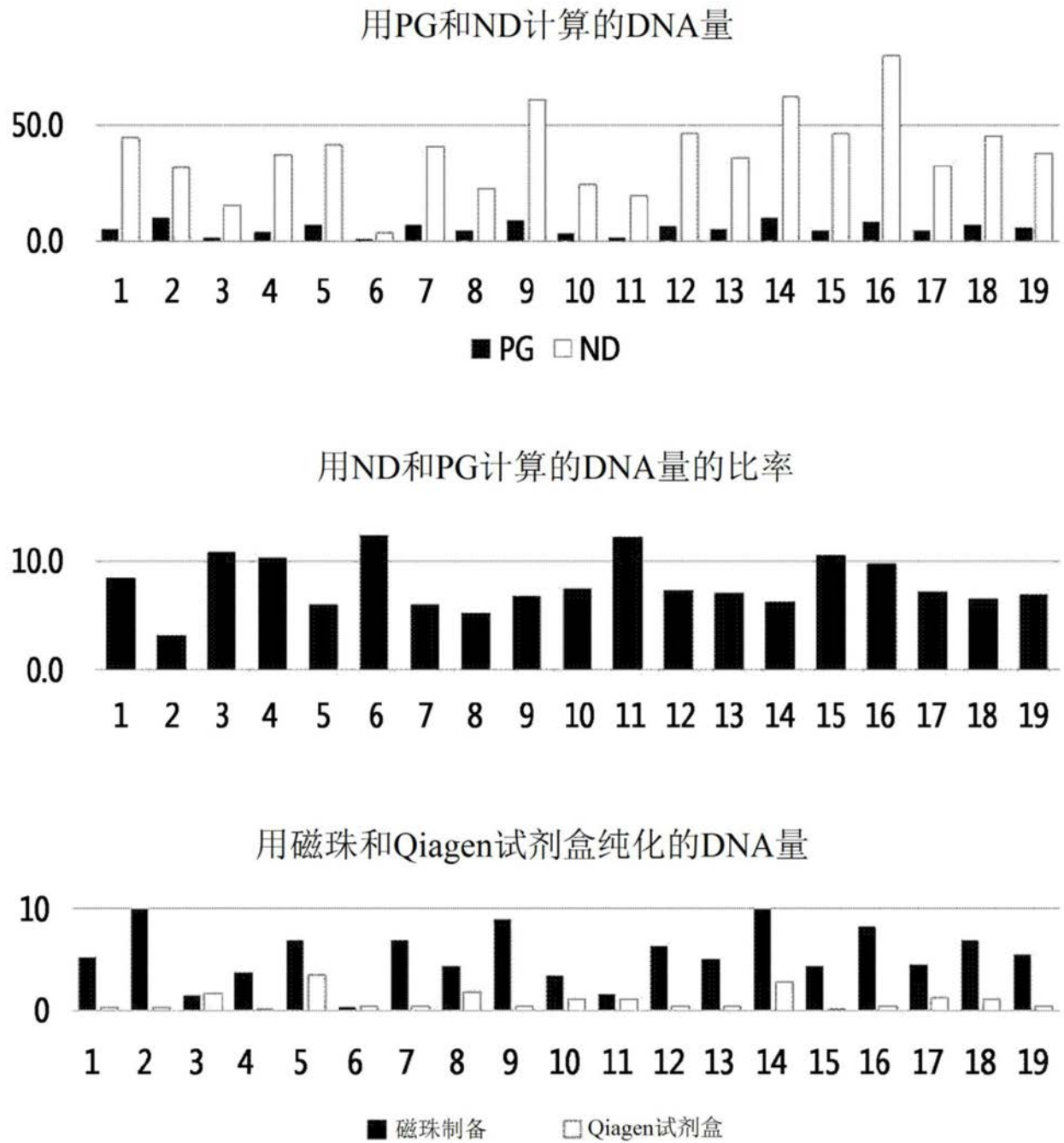


图1

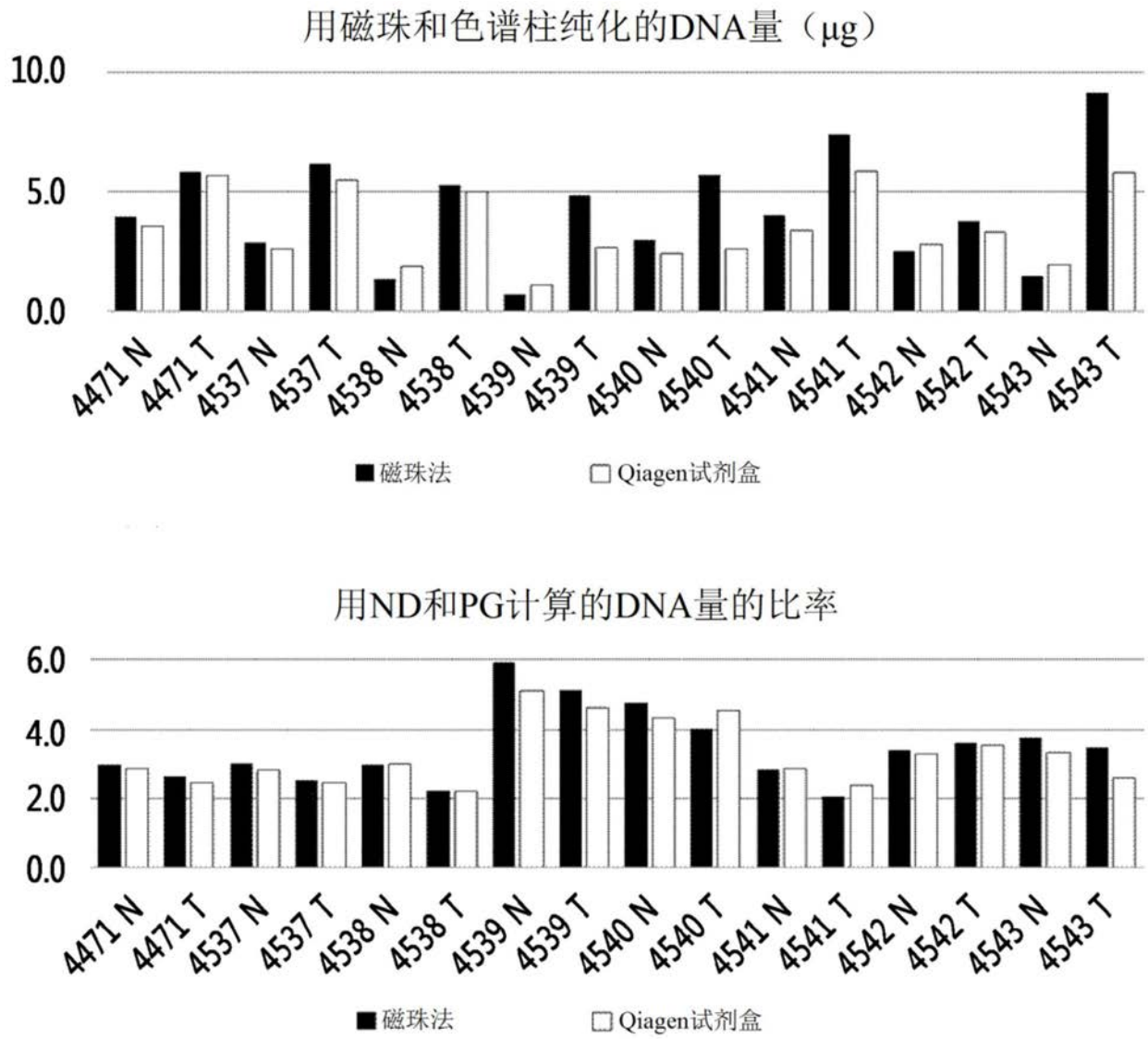


图2

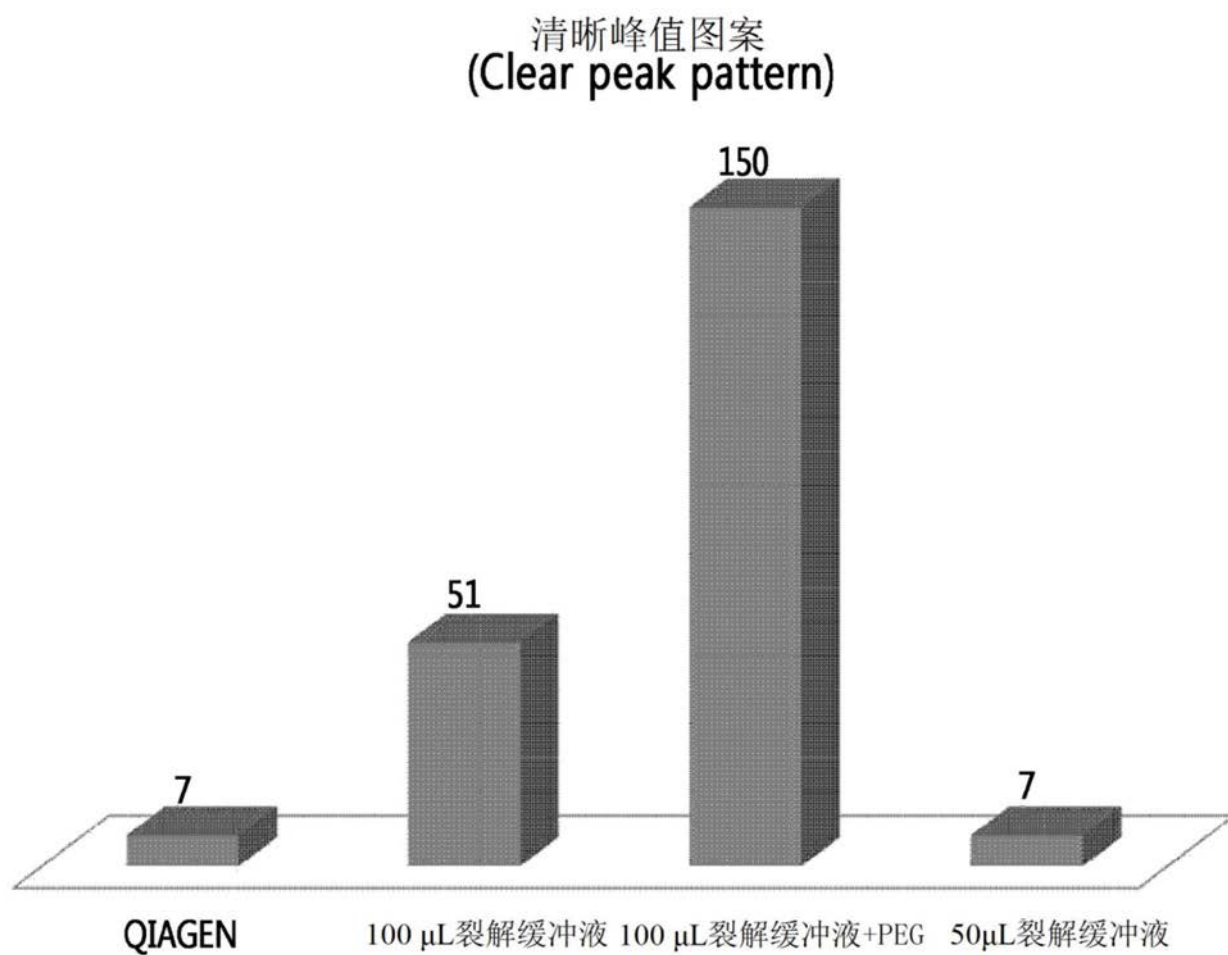


图3

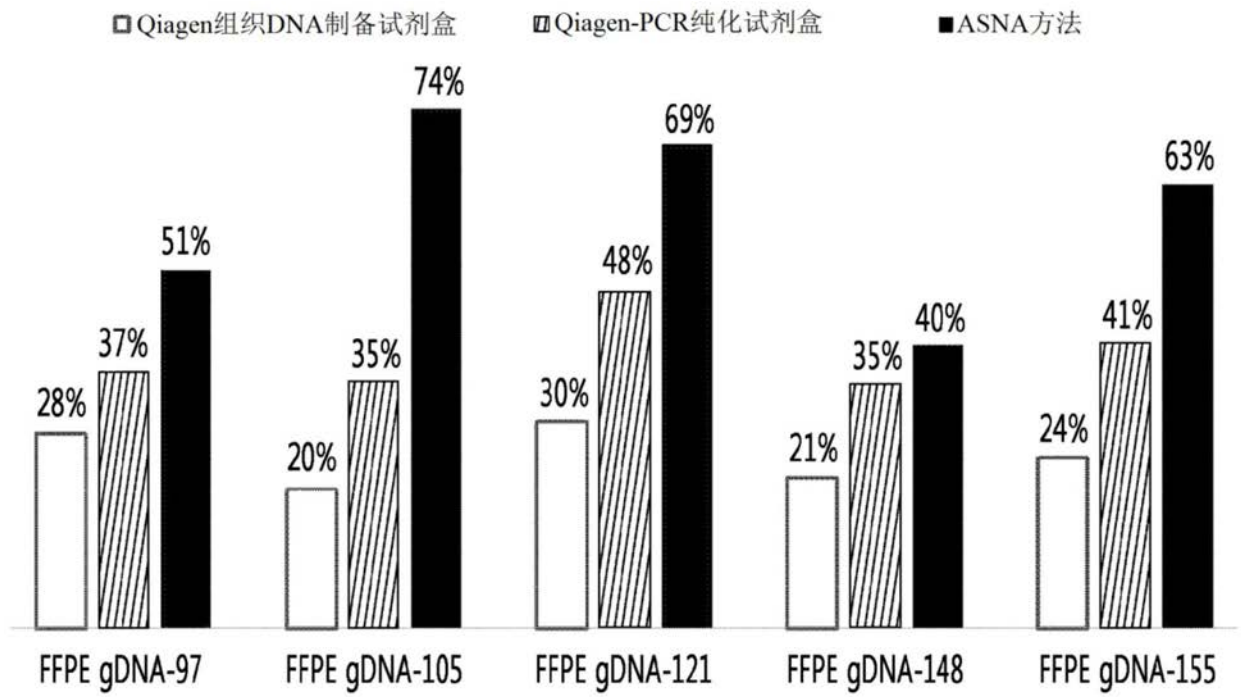


图4

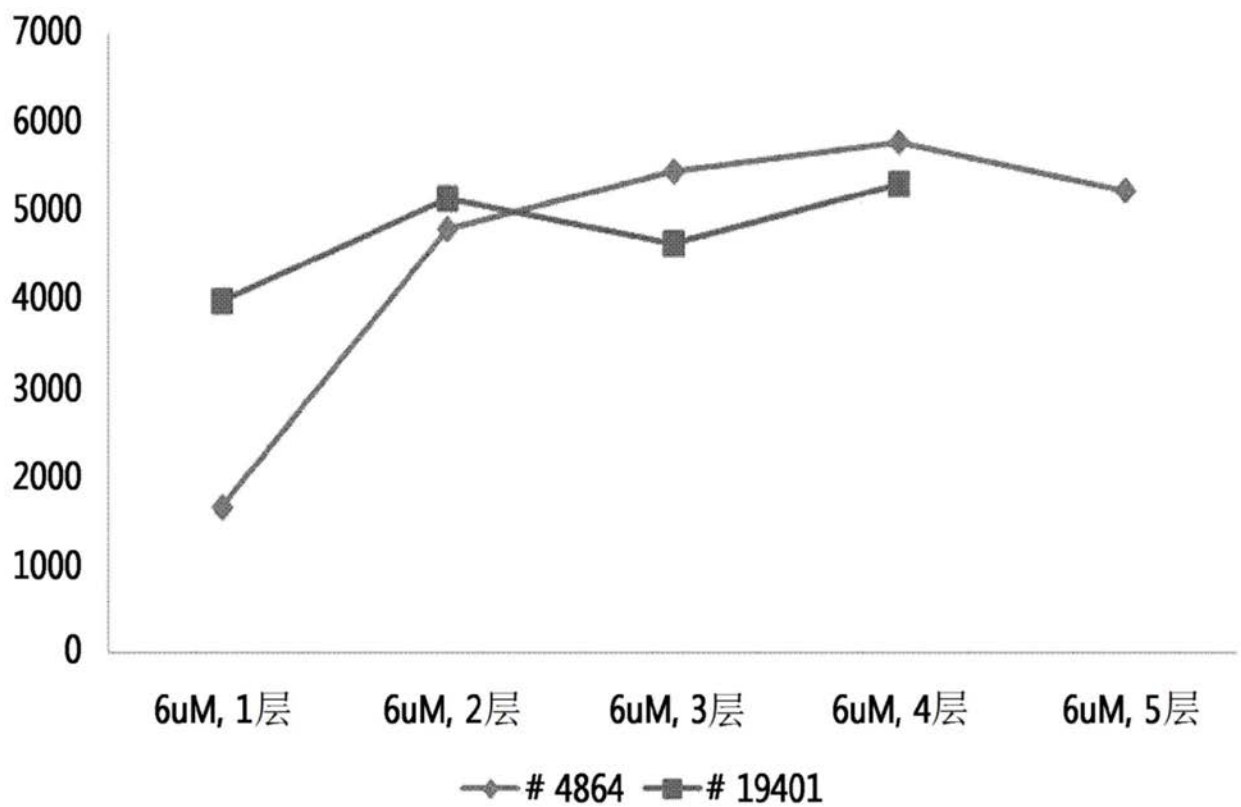


图5

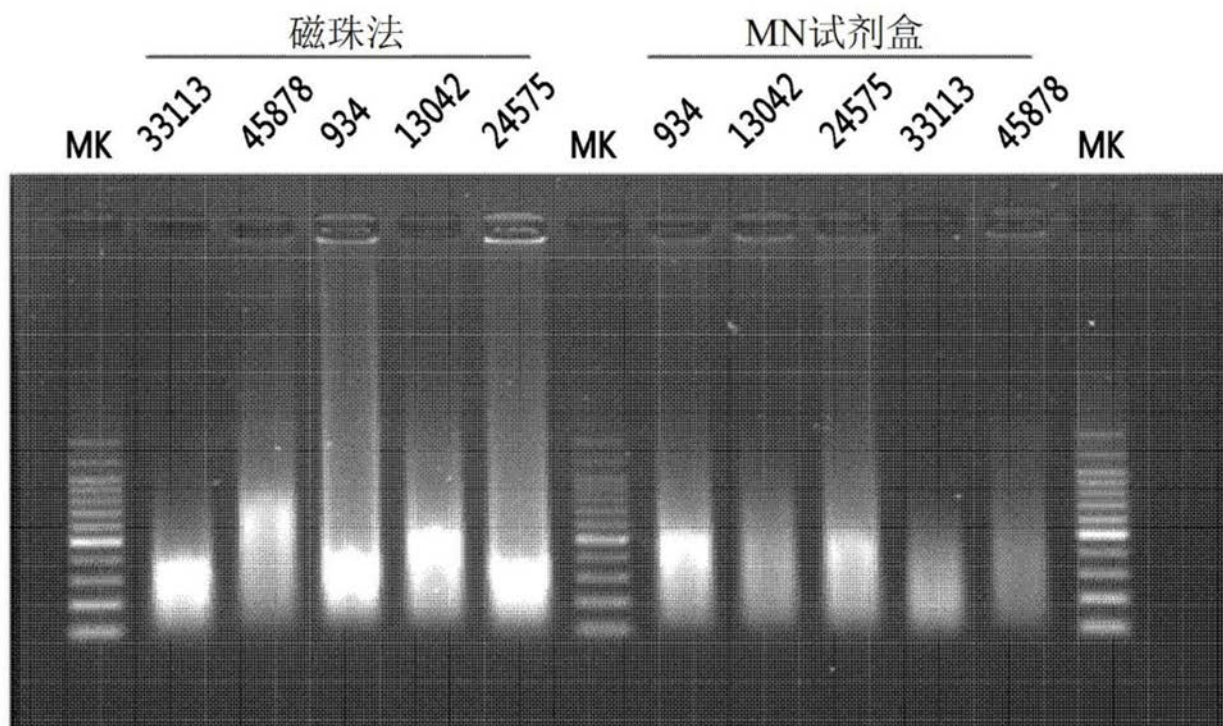


图6

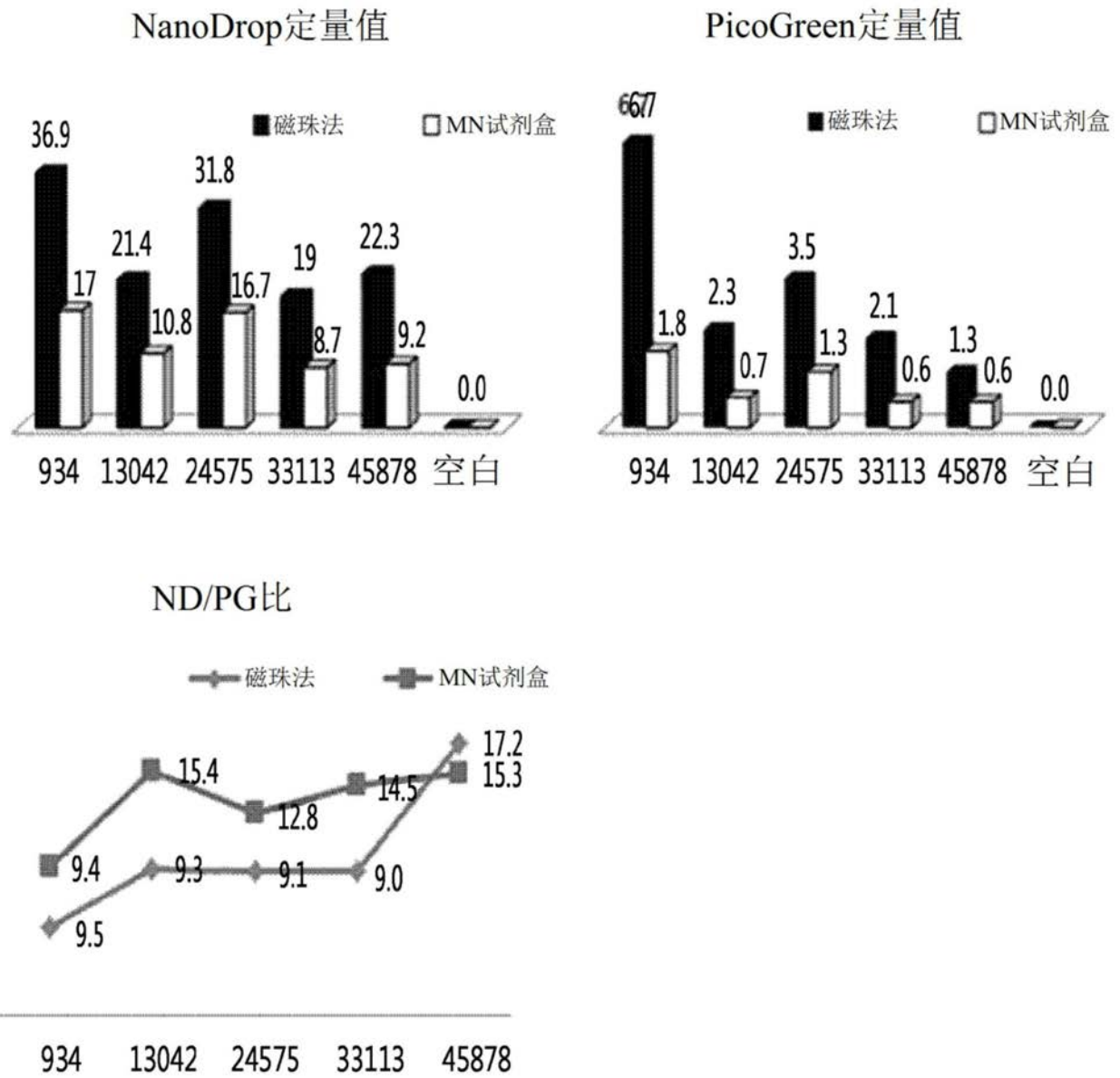


图7