

检测人21号染色体STR基因型的试剂 盒

申请号 CN201310020780.1

申请日 2013.01.19

公开(公告)号 [CN103103267A](#)

公开(公告)日 2013.05.15

分类号 C12Q1/68(2006.01)

申请(专利权)人 浙江大学医学院附属妇产科医院;无锡中德美联生物技术有限公司;杭州博圣生物技术有限公司

www.innojoy.com



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103103267 A

(43) 申请公布日 2013.05.15

(21) 申请号 201310020780.1

(22) 申请日 2013.01.19

(71) 申请人 浙江大学医学院附属妇产科医院

地址 310006 浙江省杭州市学士路 1

申请人 无锡中德美联生物技术有限公司

杭州博圣生物技术有限公司

(72) 发明人 朱宇宁 吕时铭 薛佳 郑卫国

陈雁 张民

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公

司 33200

代理人 张法高 赵杭丽

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表6页 附图4页

(54) 发明名称

检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种检测人类 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒,由扩增试剂和扩增产物检测试剂组成,主要包含 12 对荧光标记的引物、包含 14 个片段大小的分子量内标、等位基因分型标准品和一个质控品。本发明试剂盒,使用时标本需要量少、诊断快速,可用于绒毛、羊水、血液等多种组织,既可进行产前诊断,也可用于 21 三体流产胚胎多余染色体的来源分析;能够精确地诊断基因型,有利于诊断结果表述和实验室质量评价;能够实现快速、准确、自动化、高通量地检测 21 号染色体数目,并实现检测结果的质量可控和标准化,具有临床应用前景。

1. 一种检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒,由扩增试剂和扩增产物检测试剂组成,

所述的扩增试剂包括引物混合物、热启动 C-Taq 酶、扩增反应液、质控品,所述的扩增产物检测试剂包括分子量内标、等位基因分型标准品;所述的引物混合物包括 12 对引物 SEQ ID NO. 1-24,所述扩增反应液包含 PCR 缓冲液、 $MgCl_2$ 和 dNTP,质控品选用 9947A 女性 DNA 或已知基因型的其它 DNA。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒,其特征在于,所述分子量内标包括 75、100、139、150、160、200、250、300、340、350、400、450、490、500 的 14 个片段长度,采用荧光染料 SIZ 标记分子量内标,使用时加入电泳混合液与待测样本一起电泳。

3. 根据权利要求 1 所述的一种检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒,其特征在于,所述等位基因分型标准品由各 STR 基因座的所有已知等位基因经混合调平衡后制备而成,使用时加入电泳混合液与待测样本一起电泳,经 ABI GeneMapper IDv3.2 软件分析。

4. 根据权利要求 1 所述的一种检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒,其特征在于,所述引物混合物中的引物均对应于基因座的侧翼序列,其中每对引物中有一条引物的 5' 端进行荧光染料标记。

5. 根据权利要求 4 所述的一种检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒,其特征在于,每对引物分别用三种不同的荧光染料 FAM、HEX、TAMRA 进行标记,用于同时扩增 21 号染色体上的 11 个 STR 基因座和 1 个性染色体基因座。

检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,涉及荧光定量 PCR 技术(QF-PCR),具体涉及一种检测人类 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒,是多个 STR 基因座基因型的快速高通量检测。

背景技术

[0002] 21 三体综合征(又称唐氏综合征)是活产儿中发病率最高的染色体异常疾病,约占 1/600。该疾病患者的 21 号染色体数目由正常的两条变为 3 条,临床表现为严重的智力发育迟缓,易并发心脏病、白血病、免疫功能低下等。该疾病目前无法治疗,主要通过产前诊断进行预防。我国大规模开展的产前诊断主要手段和金标准是细胞遗传学染色体核型分析,该方法准确、可靠,但建立在手工操作基础上,依赖人工分析和经验积累,存在检测周期长(2-3 周时间)、检测通量低下等诸多问题。染色体核型分析作为主流技术,已难以满足临床日益增长的产前诊断需求。

[0003] QF-PCR 是一种快速分子诊断技术,能基于自动化平台对遗传标记 STR(短串联重复序列)的多态性进行定性、定量分析以诊断目标染色体数目,有助于突破目前染色体核型分析的技术瓶颈,达到快速、准确、自动化、高通量检测的目的。STR 存在于染色体上的特定位置,遵循孟德尔遗传规律,每个 STR 基因座与所在染色体具有连锁关系,能够代表相应染色体的数量。具体来说,正常染色体有两条,在特定 STR 基因座上可表现为 1 个等位基因(来源于父母的两个等位基因一致,也称纯合子)或基因量相等的 2 个等位基因(来源于父母的两个等位基因不同,也称杂合子)。对 21 三体综合征而言,多余的 1 条 21 号染色体来自于母亲或父亲,理论上在特定 STR 基因座应有 3 个等位基因,但由于 STR 的多态性有限,实际检测时在 21 号染色体 STR 基因座可能出现三种基因型情况:第一种为 1 个等位基因,即 3 条染色体的 STR 等位基因相同;第二种为 2 个等位基因,即 3 条染色体中有两条的等位基因一致,但两个等位基因的基因量有差别,约为 1:2 或 2:1 的比例;第三种为 3 个等位基因,即 3 条染色体的等位基因各不相同,其基因量比例近似为 1:1:1。后两种基因型能够提示染色体数量为 3 条,都具有诊断价值,以第三种最有诊断价值。

[0004] 基于 STR 多态性和基因组正常变异的复杂性,STR 检测用于特定染色体的数目诊断时需要联用多个 STR 基因座,而 STR 又具有人群的特异性,因此,选择本人群中多态性好、杂合度高的多个 STR 基因座联合,更易获得有诊断价值的基因座、达到准确诊断染色体数目的目的。目前用于染色体数目检测的 QF-PCR 商品化试剂盒,如英国的 Aneufast、Elucigene QSTR,瑞典的 Chromo Quant、Deryser,美国 ABI 的 TrueScience™ Aneuploidy STR Kits,所选择的高多态性基因座都是基于白人(或高加索人)的群体样本,可能未必适用于中国人群。

[0005] 研发针对中国人群的 QF-PCR 诊断试剂盒,首先就是要选择本人群具有高多态性的 STR 基因座的方法,这需要在一定样本量基础上建立群体遗传学资料以从中挑选;其次,就是建立复合检测多个 STR 基因座的 QF-PCR 检测方法,达到高通量、快速检测的目的,这对引物设计、PCR 条件控制等提出了较高的要求。

[0006] QF-PCR检测结果的标准化也是临床普及应用的重要前提。目前市场的同类型产品和已有专利缺乏对 STR 等位基因的精确分型,检测结果表述难以统一,不利于临床常规应用和实验室质量控制。要做到 STR 等位基因的精确分型,首先需要对特定群体中观察到的所有等位基因进行扩增、克隆,再通过 DNA 测序证实各等位基因的序列组成,按照国际遗传学通用法则进行等位基因命名,然后将已知等位基因混合制备成标准品,与待测标本同时电泳,配合软件分析对待测标本进行等位基因分型。尽管 STR 分型技术已在法医 DNA 分型及其他领域的应用已得到广泛认可,但在检测染色体数目的 QF-PCR 技术中尚未得到应用。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒,是一种快速复合扩增检测人类 21 号染色体 STR 基因座的 QF-PCR 试剂盒,用于检测 21 号染色体的数目,主要用于诊断 21 三体综合征。

[0008] 本发明试剂盒包括独立包装的扩增试剂和扩增产物检测试剂,所述的扩增试剂包括引物混合物、热启动 C-Taq 酶、扩增反应液、质控品,采用体外聚合酶链式反应(PCR)进行扩增;所述的扩增产物检测试剂包括分子量内标、等位基因分型标准品(Allelic Ladder),在单通道或多通道毛细管电泳仪上检测扩增产物;所述引物混合物包括 12 对引物 SEQ ID NO. 1-24,所述扩增反应液包含 PCR 缓冲液、MgCl₂ 和 dNTP,质控品优选 9947A 女性 DNA,也可以是已知基因型的其它 DNA,用以控制实验室质量。

[0009] 本发明试剂盒没有采用文献报导的引物序列,而是根据复合检测的要求对 12 个基因座的扩增引物重新进行了设计,引物混合物中的引物均对应于基因座的侧翼序列,其中每对引物中有一条引物的 5' 端进行荧光染料标记。每对引物分别用三种不同的荧光染料 FAM、HEX、TAMRA 进行标记,用于同时扩增 21 号染色体上的 11 个 STR 基因座和 1 个性染色体基因座。所述引物混合物中, D21S1432、D21S11、D21S1246 和 D21S1412 等 4 个基因座的引物采用 FAM (蓝色) 标记;D21S1437、D21S1413、D21S2039 和 D21S1270 等 4 个基因座的引物采用 HEX (绿色) 标记;Amelogenin、D21S1435、D21S1446 和 D21S1409 等 4 个基因座的引物采用 TAMRA (黄色) 标记。所述引物信息具体参见表 1。

表 1 QF-PCR 试剂盒 12 对引物信息表

引物对编号	基因座	引物序列 (5'...-3')	荧光标记
1	D21S1432	F: TAGAGGGACAGA ACTAATAGGC	FAM
		R: AGCCTATTGTGGGTTTGTGA	
2	D21S11	F: ATCAATTC CCAAGTGAATTGC	FAM
		R: TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG	
3	D21S1246	F: TGAGTGGGGACACAAAGCCTA	FAM
		R: TGCTTGTATGGAGGGAGGCTTAT	
4	D21S1412	F: GAGTTGAGATCGCACCATTG	FAM
		R: GCTATGGAGGAGAGCCAGACT	
5	D21S1437	F: ATACATGTGTCTGGGAAGG	HEX
		R: TATTTACTGCCAACACTTGTC	
6	D21S1442	F: GCCTTTATACTTGGCTGTGATAG	HEX
		R: AGACTTCTCGATCTCCAGAATCAC	
7	D21S2039	F: CGTTCCTTCATTTGATCTTAGCC	HEX
		R: ACCAGGCATGAGGCACAC	
8	D21S1270	F: ACTTCAGGGATGTTCTGC	HEX
		R: CACACACATGCATATATATACAC	
9	Amelogenin	F: CCCTGGGCTCTGTAAAGAA	TAMRA
		R: AGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	
10	D21S1435	F: TTAGGAAGAGCCCCATTG	TAMRA
		R: ATCAAGAAAATGAGATTTGAC	
11	D21S1409	F: TTCTGAATTTTCTAAGAATGCACC	TAMRA
		R: GAACATACGCTCTCTCCCTTATTC	
12	D21S1446	F: ATTATGTACGATACGTAATACTTGACAA	TAMRA
		R: GCACTGTCTTCCACCTCTACATCACA	

[0010] 所述引物混合物包括上述 12 对引物,在同一扩增体系中应用。随着复合扩增体系中基因座数目的增加,由于扩增竞争的影响,各基因座的相对平衡控制难度加大,本试剂盒通过反复优化引物序列、平衡不同基因座引物浓度、控制复合扩增体系参数等措施,能够使上述 12 个基因座均获得清晰的检测结果,没有发现非目的片段以外的扩增峰,各基因座扩增平衡。这表明本试剂盒对各基因座能够进行特异性检测,并能在基因座内进行杂合子的基因相对定量分析。

[0011] 所述分子量内标采用荧光染料 SIZ 标记分子量内标,包括 75、100、139、150、160、200、250、300、340、350、400、450、490、500 等 14 个片段长度,使用时加入电泳混合液与待测样本一起电泳,用于检测等位基因的片段长度。

[0012] 所述等位基因分型标准品(Allelic Ladder)由各 STR 基因座的所有已知等位基因经混合调平衡后制备而成,其特征在于,包含中国汉族人群在 11 个 STR 基因座中的常见等位基因(表 2),这些等位基因经扩增、克隆和 DNA 测序证实其序列组成,按照国际遗传学

通用法则命名 ;使用时加入电泳混合液与待测样本一起电泳,经ABI GeneMapper IDv3.2 软件分析,能够直观、精确地显示待测标本在 11 个 STR 基因座的基因型和性别基因型。

表 2 等位基因分型标准品包含的基因座常见等位基因和性别基因型

基因座	等位基因	等位基因片段长度范围(bp)
D21S1432	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	132-156
D21S11	26, 27, 28, 28. 2, 29, 29. 2, 30, 30. 2, 31, 31. 2, 32, 32. 2, 33. 2, 34, 34. 2, 35, 35. 2	204-266
D21S1246	5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16	308-352
D21S1412	17. 1, 18. 2, 19. 2, 20, 21, 22. 2, 23, 24, 25, 26. 1, 27, 28. 1	375-419
D21S1437	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	108-140
D21S1442	17. 3, 18. 3, 20. 3, 21. 3, 23. 3	161-185
D21S2039	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13	219-251
D21S1270	12. 2, 13. 2, 14. 2, 15. 2, 17. 2, 18. 2	345-369
D21S1435	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	169-193
D21S1409	7, 8, 9, 10, 11	256-276
D21S1446	11. 1, 12. 1, 13. 1, 13. 3, 14. 1, 14. 3, 15. 3, 16. 3	318-338
Amelogenin	X, Y	106, 112

[0013] 为控制实验室质量,本发明试剂盒还包括质控品,优选的质控品可以是 9947A 女性 DNA,也可以是已知基因型的其它 DNA。

[0014] 本发明试剂盒根据前期的群体遗传学数据资料,选择检测均匀分布在 21 号染色体上具有高度遗传多态性的 11 个 STR 基因座和 1 个性染色体基因座,分别为 D21S1432、D21S11、D21S1246、D21S1412、D21S1437、D21S1413、D21S2039、D21S1270、D21S1435、D21S1446、D21S1409 和 Amelogenin。所选择的 11 个 STR 基因座均为四核苷酸重复,多态性好,杂合度高,能够同管扩增和检测。四核苷酸重复的 STR 基因座在 PCR 过程中产生复制滑脱峰(即 stutter 峰)的比率低,杂峰少,有助于基因型判别 ;STR 基因座的多态性越好、杂合度越高,21 三体患儿在这一基因座出现有诊断价值基因型的可能性就越大,有助于 21 号染色体数目的判断 ;同时检测多达 11 个 21 号染色体上的 STR 基因座,遗传分析效能增加,能更可靠地诊断 21 号染色体数目的异常。

[0015] 本发明试剂盒针对中国人群 21 三体综合征临床诊断设计,与现有技术相比有以下特点 :1)所选用 21 号染色体的 11 个 STR 基因座是从前期大样本群体遗传学研究中挑选

出来的,在中国汉族人群中均具有较高的多态性,能获得较高的诊断效能,达到准确诊断的目的;2)采用了12个基因座(11个STR基因座+1个性别基因座)同时扩增、检测的QF-PCR技术,能够做到快速、高通量、自动化检测;3)提供了等位基因分型标准品,可以做到STR等位基因的精确分型,使STR检测结果标准化。上述特点为该试剂盒的临床应用提供了可靠保障。

[0016] 本发明试剂盒检测灵敏度高,在25 μ L 扩增反应体系中,DNA模板量低至0.12ng的条件下也可检出全部12个基因座;本发明试剂盒特异性强,加入一定的DNA模版量(在试剂盒规定范围内)进行复合扩增不产生12个基因座以外的扩增产物。

[0017] 本发明试剂盒适用于血液或血痕、羊水、毛发、精液或精斑、唾液斑、肌肉等多种组织来源的DNA样品的检测分析。

[0018] 附图说明

图1-a是等位基因分型标准品在D21S1432、D21S11、D21S1246、D21S1412基因座的基因型图谱。

[0019] 图1-b是等位基因分型标准品在D21S1437、D21S1442、D21S2039、D21S1270基因座的基因型图谱。

[0020] 图1-c是等位基因分型标准品在Amelogenin、D21S1435、D21S1409和D21S1446基因座的基因型图谱。

[0021] 图2是分子量内标电泳图谱。

[0022] 图3-a是阳性质控品在D21S1432、D21S11、D21S1246、D21S1412基因座的基因型图谱。

[0023] 图3-b是阳性质控品在D21S1437、D21S1442、D21S2039、D21S1270基因座的基因型图谱。

[0024] 图3-c是阳性质控品在Amelogenin、D21S1435、D21S1409和D21S1446基因座的基因型图谱。

[0025] 图4是1例21三体综合征胎儿羊水标本在D21S1432、D21S11基因座的特征性STR等位基因型图谱。

[0026] 图5-a是21三体流产胚胎多余染色体的来源分析中父亲DNA。

[0027] 图5-b是21三体流产胚胎多余染色体的来源分析中母亲DNA。

[0028] 图5-c是21三体流产胚胎多余染色体的来源分析胚胎DNA。

具体实施方式

[0029] 本发明结合附图和实施例作进一步的说明。

[0030] 实施例1:检测人类21号染色体STR基因型的试剂盒在21号染色体数目检测中的应用

(1) 试剂盒组成(100人份)(表3)。

表 3 试剂盒组成

扩增前试剂		
2.5×PCR 扩增反应液	1000 μ L×1 支	含 PCR 缓冲液、MgCl ₂ 和 dNTP
引物混合物	500 μ L×1 支	含 12 对扩增引物
热启动 C-Taq 酶	80 μ L×1 支	热启动 C-Taq 酶 5U/ μ L
质控品	10 μ L×1 支	含 0.5ng/ μ L9947A 基因组 DNA
超纯水	1000 μ L×1 支	
扩增后试剂		
Allelic Ladder	10 μ L×1 支	含 12 个基因座的常见等位基因
分子量内标	120 μ L×1 支	荧光分子量内标

[0031] (2) 主要仪器设备

PCR 扩增仪、ABI310 型遗传分析仪、高速离心机、生物安全柜或洁净工作台、微量移液器、紫外分光光度计、恒温水浴箱、冰箱等。

[0032] (3) DNA 提取

标本为 0.2ml 新鲜 EDTA 抗凝全血或 10ml 羊水,用 Chelex-100 法 (Chelex 试剂为 Bia-rad 产品) 提取 DNA, 用紫外分光光度计检测 DNA 纯度及浓度, 加入纯水将提取的样本 DNA 稀释至浓度约 0.1ng/ μ L-0.5 ng/ μ L。

[0033] (4) PCR 反应体系 (25 μ L) (表 4)。

表 4

待测样本 DNA	0.5-2ng 经提取的 DNA 样本
10×PCR 扩增反应液	10 μ L
引物混合物	5.0 μ L
热启动 C-Taq 酶	0.15 μ L
超纯水	补水至 25.0 μ L

[0034] (5) PCR 循环参数:95 $^{\circ}$ C 2 分钟[®] (94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 60 秒,72 $^{\circ}$ C 60 秒;30 个循环)[®] 72 $^{\circ}$ C 20 分钟[®] 4 $^{\circ}$ C 维持。

[0035] (6) 扩增产物电泳:扩增产物 3000rpm 离心 5 分钟,取 1 μ L 产物或 0.5 μ L Allelic Ladder 与 0.5 μ L 分子量内标 和 12 μ L 去离子甲酰胺混合,95 $^{\circ}$ C 变性 3 分钟,冰浴 3 分钟。

瞬时离心混合物,在 ABI310 型遗传分析上按默认电泳条件进行检测,应用 GeneMapper ID v3.2 软件进行基因分型。

[0036] (7)结果判断:21 三体诊断标准:在所检测基因座中,若出现 2 个及 2 个以上有 21 三体特征的峰型,即可诊断 21 三体。

[0037] 非 21 三体诊断标准:指所检测基因座中,呈单峰和正常比例的双峰,或出现有 21 三体特征的峰型少于 2 个。

[0038] 注释:

(1) 21 三体特征的峰型:包括三峰和双峰两种情况。前者是指在某个基因座上有接近 1:1:1 比例的 3 个单峰,后者是指在某个基因座上出现双峰时,较短的片段峰面积除以较长的片段峰面积,其比例 ≤ 0.6 或 ≥ 1.8 。

[0039] (2) 正常比例的双峰:是指在某个基因座上出现双峰时,较短的片段峰面积除以较长的片段峰面积,其比例在 0.8 ~ 1.4 之间。结果参见附图 1-a~1-c,图 2,图 3-a~3c(正常基因型图谱)。

[0040] 实施例 2:用本试剂盒快速产前诊断 21 三体综合征

采用常规染色体核型分析的剩余羊水样本 558 份(羊水量 0.5- 1ml),应用本发明试剂盒中按实施案例 1 进行盲法检测分析。本试剂盒在 558 份羊水样本中共检测出 5 例 21 三体(均为完全型,无嵌合体和易位型),每份样本可在 48 小时内获得检测结果。

[0041] 与染色体核型诊断结果比较,采用 D21 三体分析荧光检测试剂盒检测出了所有 21 三体,无漏检,无扩增失败,具有 100%的诊断灵敏度和 100 % 的诊断准确性。从单个样本检测时间来看,采用 D21 三体分析荧光检测试剂盒费时只有传统染色体核型分析方法的 1/10。由于 D21 三体分析荧光检测采用的分子诊断平台具有高通量特性,对大批量样本检测效率会更高。

[0042] 结果参见附图 4,图中箭头所示的 D21S11 的基因型呈现为基因量比例近似为 1:1:1 的三个等位基因峰;箭头所示的 D21S1246 的基因型呈现为基因量比例近似为 2:1 的两个等位基因峰。上述两种基因型都具有 21 三体诊断价值。

[0043] 实施例 3:判断 21 三体综合征胚胎额外染色体的来源

采集已知为 21 三体核型(已做过染色体核型分析)的流产绒毛组织 6 份(每份 2g 左右),并抽取流产胚胎的父源和母源的外周血样本(每例 2ml EDTA 抗凝血),应用本发明试剂盒中按实施案例 1 进行盲法检测分析。结果显示,本试剂盒通过检测可清晰判断多余染色体的亲缘来源,有助于下次妊娠指导。附图 5-a~5-c 是 21 三体流产胚胎多余染色体的来源分析,是其中 1 个家庭在 D21S11、D21S1246 基因座的基因型检测情况,由于胚胎的等位基因分别来自于父母亲,基因型比对显示胚胎标本在 D21S11、D21S1412 基因座上的多余等位基因来自于母亲,即提示该多余染色体来自于母亲。

<110> 浙江大学医学院附属妇产科医院,无锡中德美联生物技术有限公司,杭州博圣生物技术有限公司

<120> 检测人 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒

<160> 24

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

TAGAGGGACAGAACTAATAGGC 22

<210>2

<211>20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

AGCCTATTGTGGGTTTGTGA 20

<210>3

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

ATCAATCCCCAAGTGAATTGC 22

<210>4

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4
TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG 22

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 5

TGAGTGGGGACACAAAGCCTA 21

<210>6
<211>23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 6

TGCTTGTATGGAGGGAGGCTTAT 23

<210>7
<211>20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 7

GAGTTGAGATCGCACCATTG 20

<210>8
<211>21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 8

GCTATGGAGGAGAGCCAGACT 21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 9

ATACATGTGTCTGGGAAGG 19

<210>10

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 10

TATTTACTGCCAACACTTGTCC 22

<210>11

<211>23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 11

GCCTTTATACTTGGCTGTGATAG 23

<210>12

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 12

AGACTTCTCGATCTCCAGAATCAC 24

<210>13

<211>22

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 13
CGTTCTTCATTTGATCTTAGCC 22

<210>14
<211>18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 14
ACCAGGCATGAGGCACAC 18

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 15
ACTTCAGGGATGTTCTGC 18

<210>16
<211>23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 16
CACACACATGCATATATATACAC 23

<210>17
<211>19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223>

<400> 17

CCCTGGGCTCTGTAAAGAA 19

<210>18

<211>21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 18

AGAGCTTAAACTGGGAAGCTG 21

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 19

TTAGGAAGAGCCCCATTC 18

<210>20

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 20

ATCAAGAAAAATGAGATTTGAC 22

<210>21

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 21

TTCTGAATTTTCTAAGAATGCACC 24

<210>22

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 22

GAACATACGCTCTCTCCCTTATTC 24

<210>23

<211>28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 23

ATTATGTACGATACGTAATACTTGACAA 28

<210>24

<211>26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 24

GCACTGTCTTCCACCTCTACATCACA 26

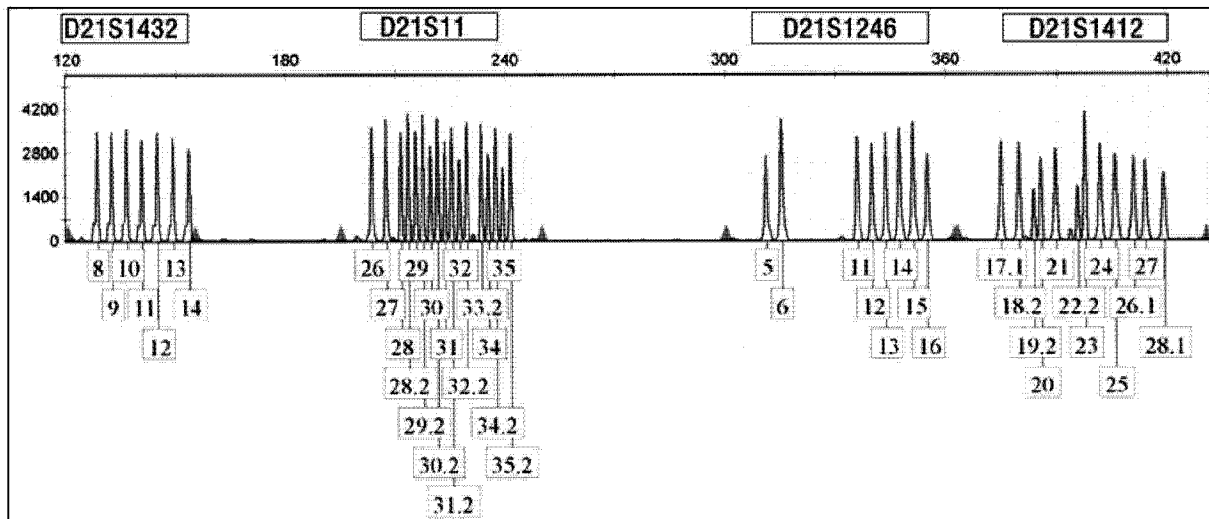


图 1-a

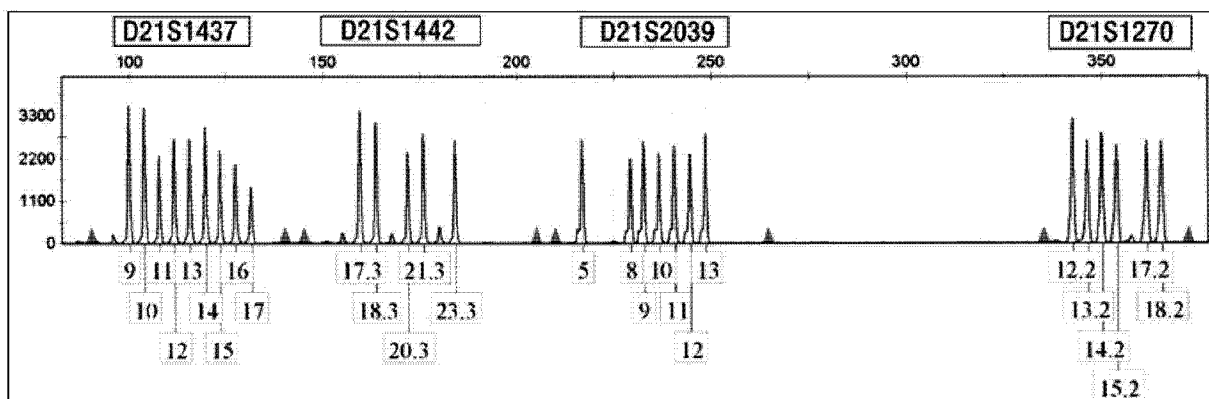


图 1-b

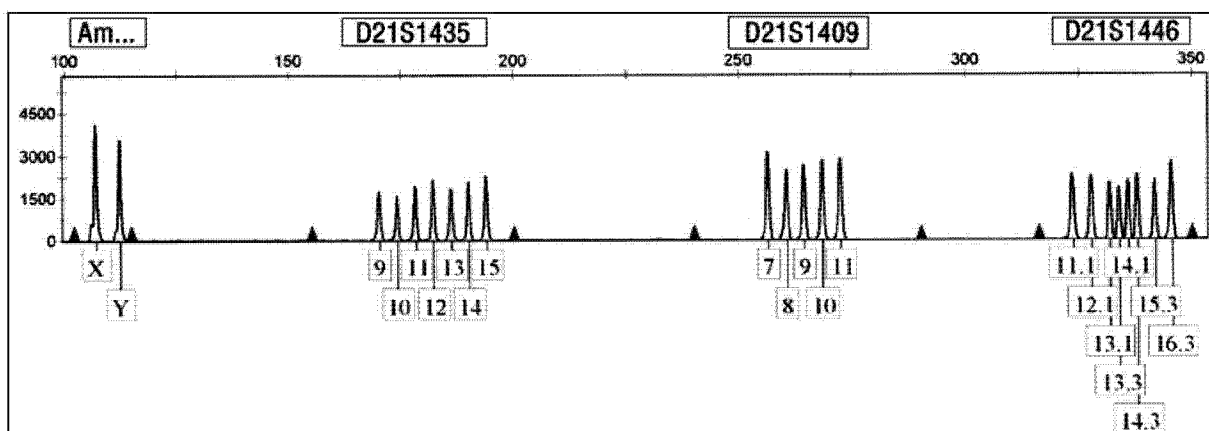


图 1-c

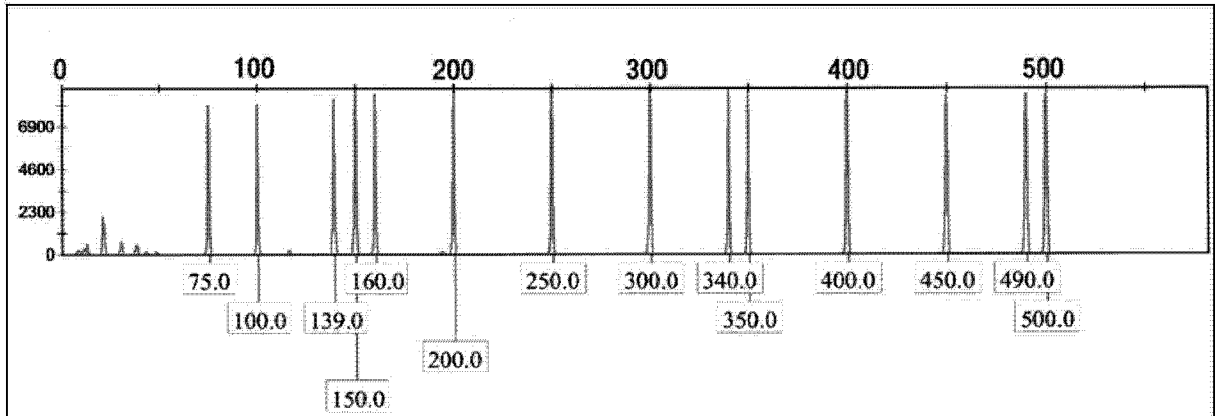


图 2

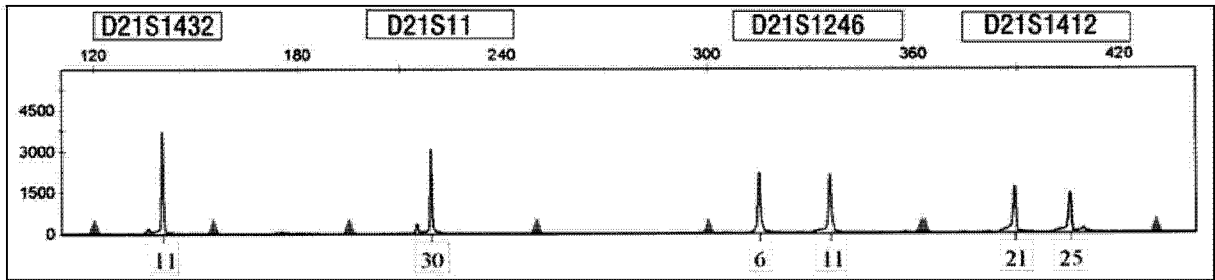


图 3-a

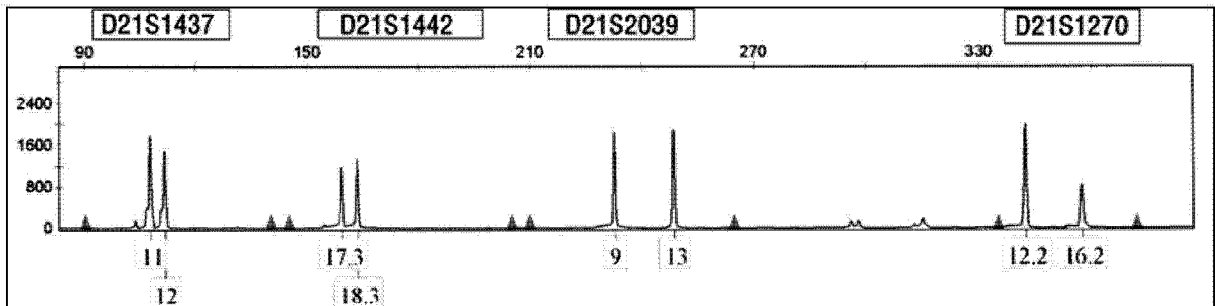


图 3_b

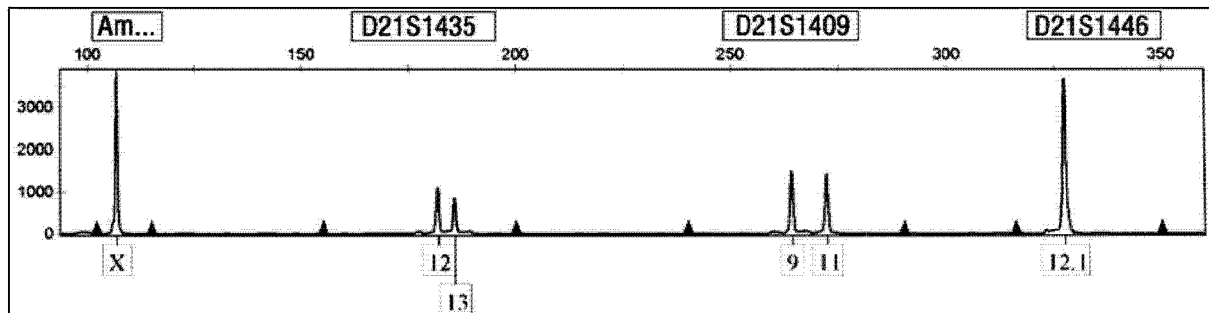


图 3-c

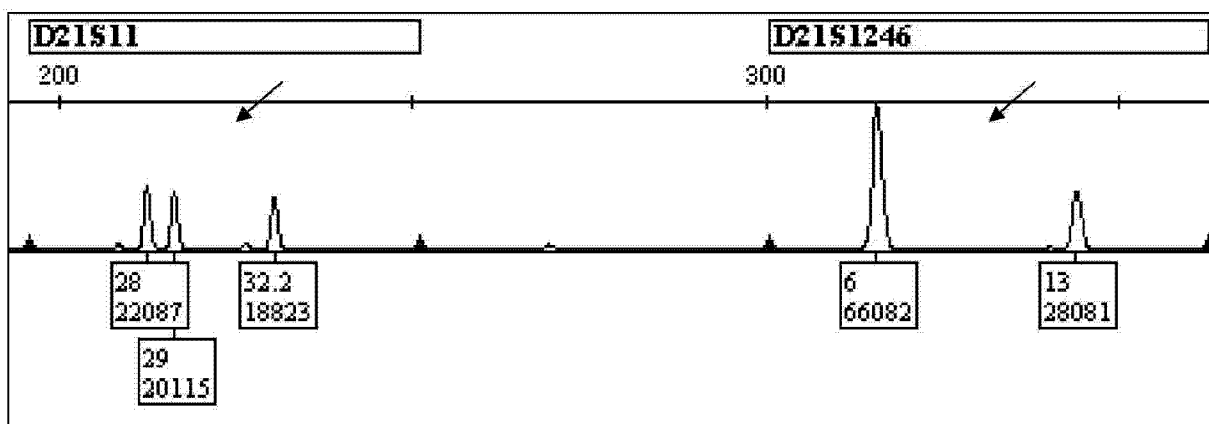


图 4

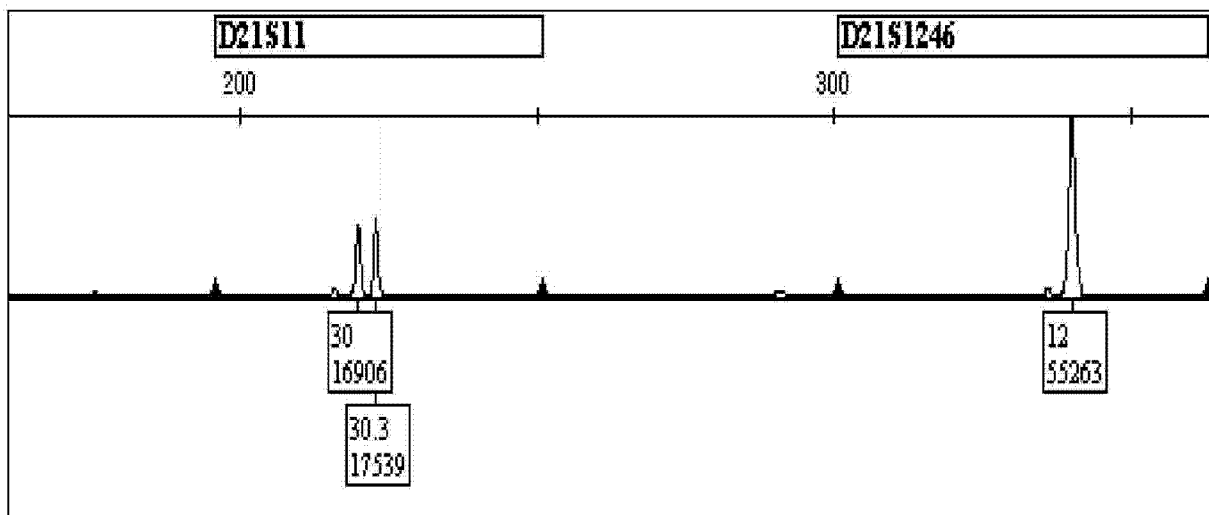


图 5-a

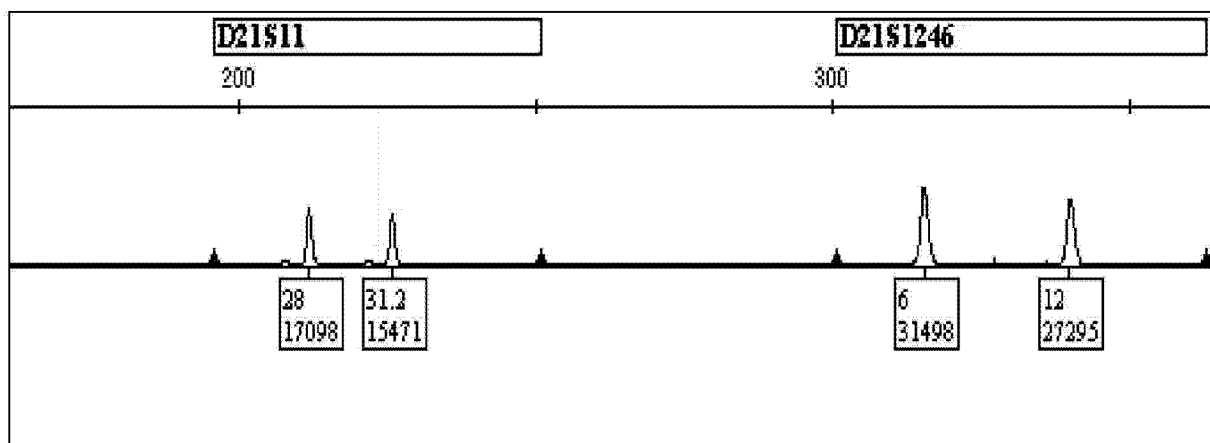


图 5-b

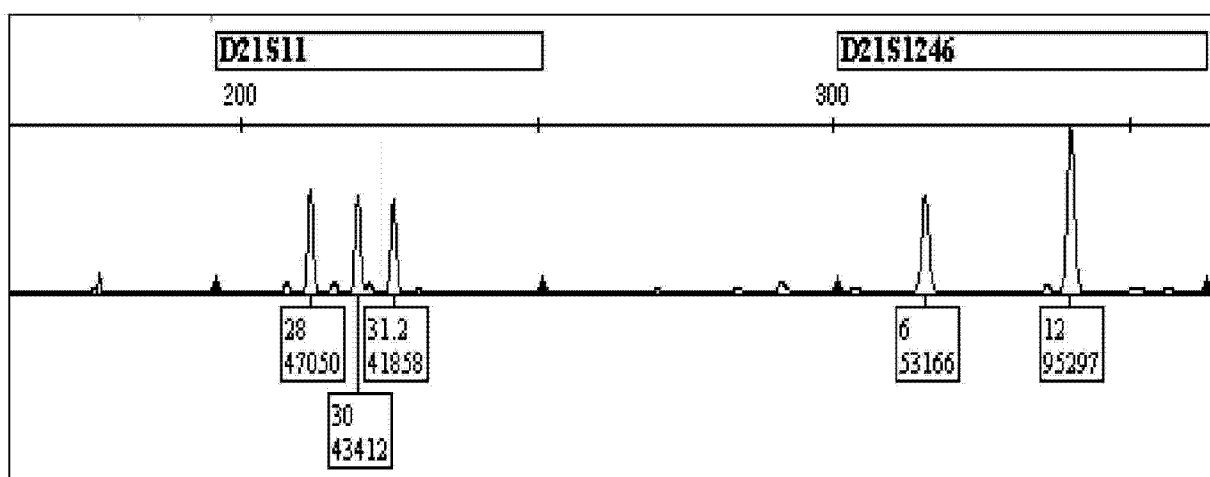


图 5-c