

检测人18、13号和性染色体STR基因 型的试剂盒

申请号 CN201410188282.2

申请日 2014.05.06

公开（公告）号 [CN103952488A](#)

公开（公告）日 2014.07.30

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 103952488 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201410188282. 2

(22) 申请日 2014. 05. 06

(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 号

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 葛海鹏

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公

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12页

序列表11页 附图9页

(54) 发明名称

检测人 18、13 号和性染色体 STR 基因型的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种单管复合扩增检测人类 18 号、13 号染色体和性染色体 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 22 对引物混合物、分子量内标、等位基因分型标准品等成分，避免了试剂配置过程中产生的污染或误差，保证了结果的准确性和稳定性，有利于控制实验室质量。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 22 个基因座；检测特异性强，加入一定浓度的 DNA 量进行复合扩增，不产生 22 个基因座以外的扩增产物，适用标本类型多，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 18、13 号和性染色体 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,所述扩增反应液包含 PCR 缓冲液、 $MgCl_2$ 和 dNTP;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;其特征在于,所述的引物混合物包括 22 对引物 SEQ ID NO. 1-44,质控品优选 9947A 女性 DNA 和 9948 男性 DNA 或已知基因型的其它 DNA,同时扩展的 22 个基因座是:Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267、D13S305、TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386、D13S634、D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809、D13S742、D18S391、X22、D18S499 和 SRY。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测人 18、13 号和性染色体 STR 基因型的试剂盒,其特征在于,所述的用于扩增 22 个基因座的 22 对引物混合物核苷酸序列分别是:Amelogenin: SEQ ID NO. 1 ~ 2;D18S535:SEQ ID NO. 3 ~ 4;D13S797:SEQ ID NO. 5 ~ 6;DXS1187:SEQ ID NO. 7 ~ 8;DXYS267:SEQ ID NO. 9 ~ 10;D13S305:SEQ ID NO. 11 ~ 12;TAF9b:SEQ ID NO. 13 ~ 14;DXS6803:SEQ ID NO. 15 ~ 16;D13S628:SEQ ID NO. 17 ~ 18;DXS981:SEQ ID NO. 19 ~ 20;XHPRT:SEQ ID NO. 21 ~ 22;D18S386:SEQ ID NO. 23 ~ 24;D13S634:SEQ ID NO. 25 ~ 26;D18S390:SEQ ID NO. 27 ~ 28;D18S1002:SEQ ID NO. 29 ~ 30;D13S258:SEQ ID NO. 31 ~ 32;DXS6809:SEQ ID NO. 33 ~ 34;D13S742:SEQ ID NO. 35 ~ 36;D18S391:SEQ ID NO. 37 ~ 38;X22:SEQ ID NO. 39 ~ 40;D18S499:SEQ ID NO. 41 ~ 42;SRY:SEQ ID NO. 43 ~ 44。

3. 根据权利要求 1 所述的一种检测人类 18、13 号和性染色体 STR 基因型的试剂盒,其特征在于,所述的等位基因分型标准品是 Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267、D13S305、TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386、D13S634、D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809、D13S742、D18S391、X22、D18S499 和 SRY22 个基因座的等位基因标准品。

检测人 18、13 号和性染色体 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),具体涉及一种快速高通量检测人类 18 号、13 号常染色体和 X、Y 性染色体 STR 基因型的试剂盒,主要用于上述染色体非整倍体的检测。

背景技术

[0002] 18 三体综合征 (爱德华氏综合征) 是常见的三体综合征之一,新生儿发病率约为 1/8000-1/3500,该综合征患者存在严重的智力低下和多种生理缺陷,如胎儿生长受限,脉络膜囊肿,心脏畸形,脑室轻度积水等,很少能存活至成年;13 三体综合征 (Patau 综合征),新生儿中的发病率约为 1/7000-1/5000,表现为严重的脏器畸形和智力低下,多在婴儿期夭折。这两类染色体异常为严重出生缺陷且目前无法治疗,主要通过产前诊断进行预防。

[0003] 性染色体异常综合征主要有:Klinefelter 综合征 (47, XXY),超雄综合征 (47, XYY),超雌综合征 (47, XXX),Turner 综合征 (45, X) 等,这些疾病患者的共同临床特征是男性或女性性器官发育不全,患者可伴有其他脏器结构或功能异常,或伴有一定智力低下或精神神经障碍等临床表现,早期诊断和干预可以有效缓解病情。

[0004] 三倍体综合征是一种严重的、致死性的染色体病,能活到出生的三倍体患儿极为罕见,存活者都是二倍体/三倍体的嵌合体。其主要症状为智力与身体发育障碍、畸形。绝大部分的三倍体胎儿在孕早期即流产,是自然流产组织染色体异常中较常见的类型。检测胚胎绒毛染色体数目异常有助于指导下次妊娠。

[0005] 我国大规模开展上述染色体病诊断的主要手段是染色体核型分析技术,产前是采集绒毛、羊水或脐血做胎儿染色体核型分析,出生后诊断则直接采集外周血进行染色体检查。染色体核型分析方法准确、可靠,但建立在手工操作基础上,依赖人工分析和经验积累,存在需要进行细胞培养、检测周期长 (2-3 周时间)、检测通量低下等诸多局限性。另一临床常用的荧光原位杂交技术 (FISH) 一般用于染色体异常的辅助检测,可在 48 小时内快速诊断,但该方法手工操作繁琐、检测通量低下。因此,发展一种快速、准确、通量高、自动化程度强的诊断方法十分必要。

[0006] QF-PCR 是一种基于 STR (短串联重复序列) 基因型分析的快速分子诊断技术。STR 是第二代遗传分子标记,遵循孟德尔遗传规律,具有高度多态性、易于检测等优点,通过定性、定量分析 STR 基因型能用于目标染色体数目的检测。基于多色荧光标记技术、PCR 扩增技术和毛细管电泳,能够实现 STR 基因型分析的半自动化检测,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、高通量诊断目标染色体数目异常的目的。但是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 ChromoQuent、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。国内自主开发的 QF-PCR 试剂盒或专利 (如专利申请号:200710028600.9) 缺乏对 STR 基因型分析的标准化,检测结果表述难以统一,并且检测通量相对较低,一般需要多组反应体系才能

实现多条染色体的检测,不利于临床检测的常规开展和质量控制。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种单管复合扩增检测人类 18 号、13 号染色体和性染色体 STR 基因型的试剂盒,是一种采用五色荧光标记的快速高通量单管复合扩增 QF-PCR 试剂盒,用于检测 18 号、13 号染色体和性染色体的数目,主要用于诊断 18 三体综合征、13 三体综合征和性染色体非整倍体异常。

[0008] 本发明试剂盒由独立包装的扩增试剂和扩增产物检测试剂组成,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,扩增反应液包含 PCR 缓冲液、MgCl₂ 和 dNTP;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;引物混合物包括 22 对引物 (SEQ ID NO. 1-44),质控品优选 9947A 女性 DNA 和 9948 男性 DNA 或已知基因型的其它 DNA,用于控制实验室质量,同时检测 22 个基因座的扩增产物,分别是:Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267、D13S305、TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386、D13S634、D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809、D13S742、D18S391、X22、D18S499 和 SRY。

[0009] 本发明试剂盒是根据复合检测的要求对 22 个基因座的扩增引物进行了设计,引物均对应于基因座的侧翼序列,分别用五种荧光染料标记每对引物中的一条引物的 5' 端。所述引物混合物中,Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267 和 D13S305 等 6 个基因座的引物采用 FAM(蓝色)标记;TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386 和 D13S634 等 7 个基因座的引物采用 HEX(绿色)标记;D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809 和 D13S742 等 5 个基因座的引物采用 TAMRA(黄色)标记;D18S391、X22、D18S499 和 SRY 等 4 个基因座的引物采用 ROX(红色)标记。

[0010] 所述的 22 对引物的核苷酸序列和对应的 22 对基因座分别是:Amelogenin:SEQ ID NO. 1~2;D18S535:SEQ ID NO. 3~4;D13S797:SEQ ID NO. 5~6;DXS1187:SEQ ID NO. 7~8;DXYS267:SEQ ID NO. 9~10;D13S305:SEQ ID NO. 11~12;TAF9b:SEQ ID NO. 13~14;DXS6803:SEQ ID NO. 15~16;D13S628:SEQ ID NO. 17~18;DXS981:SEQ ID NO. 19~20;XHPRT:SEQ ID NO. 21~22;D18S386:SEQ ID NO. 23~24;D13S634:SEQ ID NO. 25~26;D18S390:SEQ ID NO. 27~28;D18S1002:SEQ ID NO. 29~30;D13S258:SEQ ID NO. 31~32;DXS6809:SEQ ID NO. 33~34;D13S742:SEQ ID NO. 35~36;D18S391:SEQ ID NO. 37~38;X22:SEQ ID NO. 39~40;D18S499:SEQ ID NO. 41~42;SRY:SEQ ID NO. 43~44。

[0011] 引物信息具体如表 1:

[0012] 表 1QF-PCR 试剂盒 22 对引物信息表

[0013]

引物对 编号	基因座	引物序列(5' -3')	核苷酸序列 (SEQ ID NO.)	荧光标记
1	Amelogenin	F: CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAG	1	FAM
		R: GCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	2	
2	D18S535	F: CTACAGCAAACCTTCATGTGACAAAA	3	FAM
		R: TGAGAATGCAGAGAAAGAGAATCTATA	4	
3	D13S797	F: GTTTTGGTTTGCTGGCATCTGTAT	5	
		R: TGGCTTGTCTGGAGGCTTTTCAG	6	FAM
4	DXS1187	F: GAAGAAGGCACCTTTCAGCTACTC	7	FAM
		R: GTTAGAGGGTGATATGGGGGACT	8	
5	DXYS267	F: GTTCACCTTTAGCCATGATTTTGAG	9	
		R: ACTAAATAAAGTCATATCAGCTGCATA	10	FAM
6	D13S305	F: TGAGGACCTGTCGTTACGAATG	11	FAM
		R: GTTAAGCCACAAAAGCCACCTC	12	
7	TAF9b	F: TTTGACAGGTAGTTTTGGGTCAGT	13	HEX
		R: GCATCTCTGTAAATTTAGAAATGTGAAA	14	
8	DXS6803	F: AATTTTCCTCAAAAACAAAAGGAAC	15	
		R: CAGGAAAAACAATATACACAGAATG	16	HEX
9	D13S628	F: ACGCCACTTTTCTAAATGCCAG	17	HEX
		R: TTCTCATTCTTCATGTTCCATCTAC	18	
10	DXS981	F: CCTGCAAAATACAGCTAAAACTTG	19	
		R: TCATTGGTGTCTTCTGTTTGCTGC	20	HEX
11	XHPRT	F: GCAGTAGCTTTCAGCTTAACTTT	21	
		R: ATTCTTTCTCTCACCCTGTCTATG	22	HEX
12	D18S386	F: GAGTCAGGAGAATCACTTGGAAC	23	
		R: CCATGAAGTAGCTAAGCAGGTAGAA	24	HEX
13	D13S634	F: GTAATTTCCATTGCCCTATCTTTAAGTT	25	
		R: ATTTGAATGTTGCCACACTACTGG	26	HEX
14	D18S390	F: TCACCTGGATGACTGTACTTCCCT	27	TAMRA

[0014]

		R: GAACAGATTGTAGAAGAACAAGGATG	28	
15	D18S1002	F: AACAGCAAACCTTTACAGGGAAAAA	29	
		R: TGTGTTTATTTGTTTGA CTCAATGGAT	30	TAMRA
16	D13S258	F: TACCAGGAGGAGAGGGACTACC	31	TAMRA
		R: GGGATGAGAGAGGAAGACAGAG	32	
17	DXS6809	F: CTTGGCCTCACTTAATGGATGA	33	TAMRA
		R: AAGGAGGACCATGTTTCACTGG	34	
18	D13S742	F: TGGGCTAGGAATGGAAATAGGT	35	TAMRA
		R: GTGCTGGCAGTTCTGAAGGAT	36	
19	D18S391	F: AGGCAATGTGACTTGAGGAAGAGAG	37	ROX
		R: GAACCCAGTTAGACTTCACTATTCCCA	38	
20	X22	F: CCCATTGTTGCTACTTGAGACTTGG	39	ROX
		R: ATGAGAGTTGGAAAGAAAAGGAAAGC	40	
21	D18S499	F: ACTGACAGATTACCCAGAAATGAG	41	ROX
		R: GCATCTGAGCCCAGTTTGAGC	42	
22	SRY	F: CTGCTATGTTAAGCGTATTCAA	43	ROX
		R: GATCTGCGGGAAGCAAACCT	44	

[0015] 等位基因分型标准品是 Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267、D13S305、TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386、D13S634、D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809、D13S742、D18S391、X22、D18S499 和 SRY22 个基因座的等位基因标准品。

[0016] 本发明试剂盒能快速、高通量地检测人 18 号、13 号常染色体和 X、Y 性染色体的数目异常，与发明人前期已申请公开的专利“检测人类 21 号染色体 STR 基因型的试剂盒”(201310020780.1) 联合，可用于人类常见染色体异常的临床诊断，包括 21 三体综合征、18 三体综合征、13 三体综合征，以及性染色体数目异常等。

[0017] 本发明试剂盒主要针对中国人群 18 三体综合征、13 三体综合征和性染色体非整倍体异常的临床诊断进行设计。与现有发明专利或同类型试剂盒相比，其优势在于：

[0018] 1. 单管复合扩增：采用了五色荧光标记技术，能在同一个 PCR 管中对 22 个基因座进行扩增、检测，做到操作便捷、快速、高通量、自动化；

[0019] 2. 较高的诊断效能比：所采用的 22 个 STR 基因座包含 18 号染色体的 6 个基因座、13 号染色体的 6 个基因座和性染色体上的 10 个基因座，在中国汉族人群中均具有较高的多态性，能够达到准确诊断目标染色体数目的目的；

[0020] 3. 有助于诊断 X 染色体数目异常：所选用的 X 染色体 STR 基因座及 TAF9b 基因座联用，能够有效的判断 X 染色体数目异常，尤其能提高对 X 单体的诊断率；

[0021] 4. 结果标准化和质量控制：采用了包含 14 个片段长度 (75-500bp) 的分子量内标，用于检测等位基因的片段长度，保证结果的一致性和可比性；提供了等位基因分型标准品 (Allelic Ladder)，可以做到 STR 等位基因的精确分型，使 STR 基因型检测结果标准化；采用了具有已知基因型的质控品 9947A 女性 DNA 和 9948 男性 DNA，用于 PCR 扩增及产物检测过程的质量监测。这些措施保障了临床应用时的质量控制和监督。

[0022] 5. 成品试剂盒：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，包

含了引物混合物、分子量内标、等位基因分型标准品 (Allelic Ladder) 等成分,避免了试剂配置过程中产生的污染或误差,保证了结果的准确性和稳定性,有利于控制实验室质量。

[0023] 为实现操作简便、检测稳定可靠、结果标准化,本发明在前期实验中不断优化,实现了以下技术目标:

[0024] 1. 同一反应管内扩增 22 个目标基因座。对于 PCR 扩增体系而言,扩增目标基因座越多,引物竞争导致的扩增平衡难度越大。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、控制复合扩增参数等措施,实现了上述 22 个基因座在同一反应管内的均衡扩增,简便了操作,并得到可靠的等位基因相对定量分析结果。

[0025] 2. QF-PCR 检测结果标准化。检测标准化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的专利缺乏对 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。本发明试剂盒所述等位基因分型标准品 (Allelic Ladder) 是由各 STR 基因座的等位基因片段经混合调平衡后制备而成,包含中国汉族人群在 22 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,按照国际法医遗传学协会推荐的原则命名;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 22 个 STR 基因座的基因型。

[0026] 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

[0027]

基因座	等位基因	等位基因片段长度范围(bp)
Amelogenin	X, Y	106, 112
D18S535	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	131-155
D13S797	6, 7, 9, 10, 11, 12, 13	195-196
DXS1187	16.3, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3, 21.3	124
DXYS267	12, 13, 14, 15	123
D13S305	28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40	358
TAF9b	3, X	171-183
DXS6803	10, 11, 12, 12.3, 13.3, 14.3	110-126
D13S628	4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13	247
DXS981	12, 13, 14, 15, 16	182-220
XHPRT	12, 13, 14, 15, 16	

[0028]

D18S386	25. 3, 26. 3, 27. 3, 28. 3, 29. 3, 31. 3, 32. 3, 33. 3 35. 3, 36. 3, 37. 3, 38. 3, 39. 3	358
D13S634	27. 1, 28. 1, 29. 1, 30. 1, 30. 3, 31. 1, 31. 3, 32. 1, 32. 3, 33. 3, 34. 1, 34. 3	375
D18S390	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	287
D18S1002	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	286
D13S258	21, 22, 23, 24, 25, 26, 28. 1, 29. 1, 30. 1, 31. 1, 32. 1, 33. 1, 34. 1, 35. 1, 36. 1	180
DXS6809	27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38	241-273
D13S742	14, 15. 2, 16, 17, 18, 18. 2, 19, 19. 2, 20, 21, 21. 2 22, 22. 2, 23, 23. 2, 24. 2, 25, 25. 2, 27. 1	364
D18S391	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	182
X22	5, 6, 7, 7. 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D18S499	7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15	150
SRY	Y1, Y2	150

[0029] 3. 检测灵敏度高、特异性强。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 22 个基因座;检测特异性强,加入一定浓度的 DNA 量(在试剂盒规定范围内)进行复合扩增,不产生 22 个基因座以外的扩增产物。

[0030] 4. 适用标本类型多。本发明试剂盒适用于血液或血痕、羊水、绒毛、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。

附图说明

[0031] 图 1a 是等位基因分型标准品在 Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267、D13S305 基因座的基因型。

[0032] 图 1b 是等位基因分型标准品在 TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386、D13S634 基因座的基因型。

[0033] 图 1c 是等位基因分型标准品在 D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809、D13S742 基因座的基因型。

[0034] 图 1d 是等位基因分型标准品在 D18S391、X22、D18S499、SRY 基因座的基因型。

[0035] 图 2 是分子量内标电泳图谱。分子量内标采用荧光染料 SI2 标记,包括 75、100、139、150、160、200、250、300、340、350、400、450、490、500 等 14 个片段长度,用于检测等位基因的片段长度,保证结果的一致性和可比性。

[0036] 图 3a 是质控品 9947A 在 Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267、D13S305 基因座的基因型图谱。

[0037] 图 3b 是质控品 9947A 在 TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386、D13S634 基因座的基因型图谱。

[0038] 图 3c 是质控品 9947A 在 D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809、D13S742 基因座

的基因型图谱。

[0039] 图 3d 是质控品 9947A 在 D18S391、X22、D18S499、SRY 基因座的基因型图谱。

[0040] 图 3e 是质控品 9948 在 Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267、D13S305 基因座的基因型图谱。

[0041] 图 3f 是质控品 9948 在 TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386、D13S634 基因座的基因型图谱。

[0042] 图 3g 是质控品 9948 在 D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809、D13S742 基因座的基因型图谱。

[0043] 图 3h 是质控品 9948 在 D18S391、X22、D18S499、SRY 基因座的基因型。

[0044] 图 4 是 13 三体综合征胎儿羊水标本在 D13S258、D13S742 基因座的特征性 STR 等位基因型。

[0045] 图 5 是 Klinefelter 综合征 (47XXY) 血液标本在 Amelogenin、DXS1187、DXYS267 基因座的特征性 STR 等位基因型。

[0046] 图 6 是超雄综合征 (47XYY) 胎儿羊水标本在 Amelogenin、DXYS267 基因座的特征性 STR 等位基因型。

[0047] 图 7 是 X 三体综合征 (47XXX) 胎儿羊水标本在 Amelogenin、DXS1187、DXS6809 基因座的特征性 STR 等位基因型。

[0048] 图 8a 是三倍体 (69XXY) 胚胎绒毛标本在 Amelogenin、TAF9b 基因座的特征性 STR 等位基因型。

[0049] 图 8b 是三倍体 (69XXY) 胚胎绒毛标本在 X22、D18S499、D13S742 基因座的特征性 STR 等位基因型。

[0050] 图 9 是三倍体 (69XXX) 胚胎绒毛标本在 Amelogenin、D18S535、DXS1187、DXYS267、D13S305 基因座的特征性 STR 等位基因型。

[0051] 图 10a 是父亲 DNA 样本在 D18S390、D18S535、D18S386 基因座的分型结果。

[0052] 图 10b 是母亲 DNA 样本在 D18S390、D18S535、D18S386 基因座的分型结果。

[0053] 图 10c 是羊水 DNA 样本在 D18S390、D18S535、D18S386 基因座的分型结果。

[0054] 图 11a 是父亲 DNA 样本在 TAF9b、DXS6803、DXS961、XHPTR 基因座的分型结果。

[0055] 图 11b 是母亲 DNA 样本在 TAF9b、DXS6803、DXS961、XHPTR 基因座的分型结果。

[0056] 图 11c 是胚胎绒毛样本在 TAF9b、DXS6803、DXS961、XHPTR 基因座的分型结果。

[0057] 图 11d 是胚胎绒毛样本在 Amelogenin、SRY 基因座的分型结果。

具体实施方式

[0058] 本发明结合附图和实施例作进一步的说明。

[0059] 实施例 1 :22 个基因座的确定

[0060] 本发明提供的试剂盒共选取以下 22 个基因座,依据是:

[0061] STR 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 STR 基因座,更易获得有诊断价值的基因型、达到准确诊断染色体数目的目的。本发明所选基因座均为中国汉族人群中多态性较高的基因座。在前期研究中,通过对文献报道和对中国汉族 175 例无血缘关系个体的基因型检测分析,优选出多态性好、具有较高临床诊断价值的 22 个 STR

基因座。具体见表 3。

[0062] 表 3 175 例中国汉族人群无关个体在 19 个 STR 基因座的多态信息量 (PIC) 分析
[0063]

基因座	PIC	基因座	PIC	基因座	PIC
D18S535	0.79	DXS981	0.81	DXS6809	0.77
D13S797	0.51	XHPRT	0.66	D13S742	0.87
DXS1187	0.75	D18S386	0.90	D18S391	0.86
DXYS267	0.60	D13S634	0.85	X22	0.75
D13S305	0.79	D18S390	0.63	D18S499	0.72
DXS6803	0.52	D18S1002	0.77		
D13S628	0.86	D13S258	0.85		

[0064] 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,所用目标染色体上的 STR 基因座的数目越多,多态性越好,诊断价值就越大。因此,本发明试剂盒选择检测均匀分布在 18 号、13 号和性染色体(以下简称目标染色体)上具有高度遗传多态性的 22 个 STR 基因座,分别为 Amelogenin、D18S535、D13S797、DXS1187、DXYS267、D13S305、TAF9b、DXS6803、D13S628、DXS981、XHPRT、D18S386、D13S634、D18S390、D18S1002、D13S258、DXS6809、D13S742、D18S391、X22、D18S499 和 SRY。其特征在于,在每条目标染色体上至少选择了 6 个及以上的 STR 基因座(18 号染色体的 6 个 STR 基因座,13 号染色体的 6 个 STR 基因座和性染色体上的 10 个 STR 基因座),确保了有足够 STR 基因座用于染色体数目的分析,能够可靠地诊断目标染色体数目的异常;所选择的 22 个 STR 基因座均为 4-5 核苷酸重复,多态性好,杂合度高,能够在同一反应管中扩增和检测。

[0065] X 染色体数目异常非常常见,也是检测中的难点。为能够明确检测 X 染色体数目,本发明试剂盒中特别选用了 TAF9b 基因座。该基因座同时存在于 3 号染色体与 X 染色体上,在正常女性中(含两条 3 号染色体与两条 X 染色体),其等位基因定量比应为 1:1,在正常男性中(含两条 3 号染色体与一条 X 染色体),其等位基因定量比应为 2:1,因此可以利用该基因座来指示 X 染色体的相对数量。以 Turner 综合征(45X)为例,采用 Amelogenin、DXS1187 等性别基因座仅表现为单个等位基因,诊断价值不充分;采用 TAF9b 基因座,能够非常直观清晰呈现出基因量近似 2:1 的双等位基因,从而明确诊断。

[0066] 实施例 2:试剂盒组成及诊断标准的确定

[0067] (1) 试剂盒组成(200 人份)见表 4。

[0068] 表 4

[0069]

扩增试剂盒		
PCR 扩增反应液	1000 μ L $\times$ 2 支	含 PCR 缓冲液、MgCl ₂ 和 dNTP Mix
引物混合物	1000 μ L $\times$ 1 支	含 22 对扩增引物
热启动 C-Taq 酶	200 μ L $\times$ 1 支	热启动 C-Taq 酶 5U/ μ L
质控品 (9947A)	20 μ L $\times$ 1 支	含 0.5ng/ μ L 9947A 基因组 DNA
质控品 (9948)	20 μ L $\times$ 1 支	含 0.5ng/ μ L 9948 基因组 DNA
超纯水	1000 μ L $\times$ 1 支	
扩增产物试剂盒		
Allelic Ladder	20 μ L $\times$ 1 支	含 22 个基因座的常见等位基因
分子量内标	250 μ L $\times$ 1 支	荧光分子量内标

[0070] (2) 主要仪器设备

[0071] PCR 扩增仪、ABI3130 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。

[0072] (3) DNA 提取

[0073] 标本为 0.2ml 新鲜 EDTA 抗凝全血或 10ml 羊水, 用 Chelex-100 法 (Chelex 试剂为 Biorad 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-0.5ng/ μ L。

[0074] (4) PCR 反应体系 (25 μ L) 见表 5。

[0075] 表 5

[0076]

待测样本 DNA	0.5-2ng 经提取的 DNA 样本
10 $\times$ PCR 扩增反应液	10 μ L
引物混合物	5.0 μ L
热启动 C-Taq 酶	0.8 μ L
超纯水	补水至 25.0 μ L

[0078] (5) PCR 循环参数

[0079] 95 $^{\circ}$ C 2 分钟 $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 60 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒; 30 个循环) $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 20 分钟 $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 维持。

[0080] (6) 扩增产物电泳

[0081] 扩增产物 3000rpm 离心 5 分钟, 取 1 μ L 产物或 Allelic Ladder 与 0.5 μ L SIZ-500 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 ABI3130 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。

[0082] (7) 结果判断与诊断标准

[0083] 原理:STR 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,电泳图谱上表现为单峰)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,电泳图谱上表现为等位基因量比例为 1:1 的双峰)。而染色体非整倍体异常,以 18 三体综合征为例而言,多余的 1 条 18 号染色体来自于母亲或父亲,由于 STR 的多态性有限,实际检测时在 18 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(单峰),即 3 条染色体的 STR 等位基因相同;第二种为 2 个等位基因(非正常比例双峰),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(三等峰),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。

[0084] 三体诊断标准:在所检测的同种染色体基因座中,若出现 2 个及 2 个以上有三体特征的峰型,即可诊断该种染色体三体。

[0085] 非三体诊断标准:指所检测基因座中,呈单峰和正常比例的双峰,或出现有三体特征的峰型少于 2 个。

[0086] X 单体诊断标准:TAF9b 基因座呈基因量为 2:1 的双峰, SRY 基因座未出现 Y 染色体峰,并且其余性别基因座均显示为单峰。

[0087] 注释:

[0088] (1) 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 。

[0089] (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。

[0090] 实施例 3:用本试剂盒快速产前诊断目标染色体异常综合征

[0091] 采用临床常规染色体核型分析剩余的羊水、绒毛、血液样本 600 份,其中羊水取样 0.5-1ml,绒毛取样少量(0.1-0.5g),血液样本取样 0.2ml,按实施例 1 最终确定的试剂盒优选组成和检测方法进行盲法检测分析。本试剂盒在 600 份样本中共检测出 3 例 18 三体、3 例 13 三体、5 例 45X、1 例 47XXY、4 例 47XYY、1 例 47XXX、3 例 69XXY 和 1 例 69XXX(均为完全型,无嵌合体和易位型),与金标准染色体核型结果相比,本方法的检测准确性达 100%,无漏检,无扩增失败;每份样本可在 24 小时内获得检测结果,从单个样本检测时间来看,采用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。

[0092] 1 例 13 三体综合征胎儿羊水标本在 D13S258、D13S742 基因座的特征性 STR 等位基因型分析,扩增结果如图 4。D13S258 的基因型呈现为基因量比例近似为 1:2 双等位基因峰;D13S742 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,上述两种基因型都具有 13 三体诊断价值。

[0093] 1 例 Klinefelter 综合征(47XXY)血液标本在 Amelogenin、DXS1187、DXYS267 基因座的特征性 STR 等位基因型分析,扩增结果如图 5 所示。Amelogenin、DXS1187 的基因型呈现为基因量比例近似为 2:1 双等位基因峰;DXYS267 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。上述两种基因型都具有 47XXY 诊断价值。

[0094] 1 例超雄综合征 (47XYY) 胎儿羊水标本在 Amelogenin、DXYS267 基因座的特征性 STR 等位基因型分析, 扩增结果如图 6 所示。Amelogenin、DXYS267 的基因型呈现为基因量比例近似为 1:2 双等位基因峰, 上述两种基因型都具有 47XYY 诊断价值。

[0095] 1 例 X 三体综合征 (47XXX) 胎儿羊水标本在 Amelogenin、DXS1187、DXS6809 基因座的特征性 STR 等位基因型分析, 扩增结果如图 7 所示。Amelogenin 的基因型呈现为单等位基因峰; DXS1187 的基因型呈现为基因量比例近似为 2:1 双等位基因峰; DXS6809 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。上述三种基因型都具有 47XXX 诊断价值。

[0096] 1 例 69XXY 三倍体综合征胚胎绒毛标本在 Amelogenin、TAF9b、X22、D18S499、D13S742 基因座的特征性 STR 等位基因型分析, 扩增结果如图 8a、图 8b 所示。Amelogenin、TAF9b、D18S499 的基因型呈现为基因量比例近似为 2:1 双等位基因峰; X22、D13S742 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。上述两种基因型提示 18、13 号染色体和性染色体都出现三倍型, 具有 69XXY 诊断价值。

[0097] 1 例 69XXX 三倍体综合征胚胎绒毛标本在 Amelogenin、D18S535、DXS1187、DXYS267、D13S305 基因座的特征性 STR 等位基因型分析, 扩增结果如图 9 所示。Amelogenin 的基因型呈现为单等位基因峰; TAF9b 的基因型呈现为基因量近似相等的双等位基因峰; D18S535、DXYS267 的基因型呈现为基因量比例近似为 1:2 或 2:1 的双等位基因峰; DXS1187、D13S305 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。上述基因型具有 69XXX 诊断价值。

[0098] 实施例 4: 判断三体综合征胚胎额外染色体的来源

[0099] 采集实施例 2 中确诊为 18 三体胎儿的父源和母源的外周血样本 (2ml EDTA 抗凝血), 以及本实验室存留的确诊 18 三体的羊水样本及其父源和母源外周血样本, 应用本发明试剂盒中按实施案例 1 进行检测、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。图 10 是 18 三体综合征胎儿羊水标本在 D18S390、D18S535、D18S386 基因座的特征性 STR 等位基因型及多余染色体的来源分析, 其中图 10a 是父亲 DNA 样本的分型结果; 图 10b 是母亲 DNA 样本的分型结果; 图 10c 是羊水 DNA 样本的分型结果, 羊水 DNA 样本在 D18S390 的基因型呈现为基因量比例近似为 2:1 双等位基因峰; D18S535、D18S386 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。上述两种基因型都具有 18 三体诊断价值。由于胚胎的等位基因分别来自于父母亲, 基因型比对显示标本在 D18S390、D18S535、D18S386 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。

[0100] 实施例 5: 用本试剂盒快速产前诊断 Turner 综合征并判断缺失染色体的来源

[0101] 采集实施例 2 中确认为 Turner 综合征 (45X) 的父源和母源的外周血样本 (2ml EDTA 抗凝血), 以及本实验室存留的确诊 Turner 综合征的羊水样本, 应用本发明试剂盒中按实施案例 1 进行检测、分析。结果显示, 本试剂盒通过检测可明确诊断并清晰判断 X 染色体缺失并能分析来源, 有助于下次妊娠指导。图 11 是 Turner 综合征 (45X) 胚胎绒毛标本在 TAF9b、DXS6803、DXS961、XHPTR 基因座的基因型及缺失染色体的来源分析, 其中图 11a 是父亲 DNA 样本的分型结果; 图 11b 母亲 DNA 样本的分型结果; 图 11c、图 11d 是羊水 DNA 样

本的分型结果,羊水 DNA 样本在 Amelogenin 基因座呈现为单等位基因峰,在 SRY 基因座未出现等位基因峰,而在 TAF9b 基因座的基因型呈现为基因量比例近似为 2:1 双等位基因峰;在 DXS6803、DXS961、XHPRT 等性别基因座呈现为单等位基因峰。上述基因型提示缺失一条 X 染色体,具有 45X 综合征诊断价值。由于胚胎的等位基因分别来自于父母亲,基因型比对显示缺失等位基因来源于父亲,即提示胚胎丢失了来源于父亲的性别染色体。

<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 18、13 号和性染色体 STR 基因型的试剂盒

<160> 44

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAG 22

<210>2

<211>23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

GCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG 23

<210>3

<211>25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

CTACAGCAAACCTTCATGTGACAAAA 25

<210>4

<211>27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

TGAGAATGCAGAGAAAGAGAATCTATA 27

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 5

GTTTTGGTTTGCTGGCATCTGTAT 24

<210>6

<211>23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 6

TGGCTTGTCTGGAGGCTTTTCAG 23

<210>7

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 7

GAAGAAGGCACCTTTCAGCTACTC 24

<210>8

<211>23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 8

GTTAGAGGGTGATATGGGGGACT 23

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 9

GTTCACCTTTAGCCATGATTTTGAG 25

<210>10

<211>27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 10

ACTAAATAAAGTCATATCAGCTGCATA 27

<210>11

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 11

TGAGGACCTGTCGTTACGAATG 22

<210>12

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 12

GTTAAGCCACAAAAGCCACCTC 22

<210>13

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 13

TTTGACAGGTAGTTTTGGGTCAGT 24

<210>14

<211>29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 14

GCATCTCTGTAAATTTAGAAATGTGAAA 29

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 15

AATTTTCCTCAAAACAAAAAGGAAC 25

<210>16

<211>25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 16

CAGGAAAAACAATATACACAGAATG 25

<210>17

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 17

ACGCCACTTTTCTAAATGCCAG 22

<210>18

<211>25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 18

TTCTCATTCTTCATGTTCCATCTAC 25

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 19

CCTGCAAAATACAGCTAAAAACTTG 25

<210>20

<211>23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 20

TCATTGGTGTTTCTGTTTGCTGC 23

<210>21

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 21

GCAGTAGCTTTCAGCTTAACTTT 24

<210>22

<211>25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 22

ATTCTTTCTCTCACCCCTGTCTATG 25

<210>23

<211>23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 23

GAGTCAGGAGAATCACTTGGAAC 23

<210>24

<211>25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 24

CCATGAAGTAGCTAAGCAGGTAGAA 25

<210>25

<211>28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 25

GTAATTTCCATTGCCCTATCTTTAAGTT 28

<210>26

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 26

ATTTGAATGTTGCCACACTACTGG 24

<210>27

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 27

TCACCTGGATGACTGTACTTCCCT 24

<210>28

<211>26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 28

GAACAGATTGTAGAAGAACAAGGATG 26

<210>29

<211>24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 29

AACAGCAAACCTTTACAGGGAAAAA 24

<210>30

<211>27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 30

TGTGTTTATTTGTTTGACTCAATGGAT 27

<210>31

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 31

TACCAGGAGGAGAGGGACTACC 22

<210>32

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 32

GGGATGAGAGAGGAAGACAGAG 22

<210>33

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 33

CTTGGCCTCACTTAATGGATGA 22

<210>34

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 34

AAGGAGGACCATGTTTCACTGG 22

<210>35

<211>22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 35

TGGGCTAGGAATGGAAATAGGT 22

<210>36

<211>21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 36

GTGCTGGCAGTTCTGAAGGAT 21

<210>37

<211>25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 37

AGGCAATGTGACTTGAGGAAGAGAG 25

<210>38

<211>27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 38

GAACCCAGTTAGACTTCACTATTCCCA 27

<210>39

<211>25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 39
CCCATTGTTGCTACTTGAGACTTGG 25

<210>40
<211>26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 40
ATGAGAGTTGGAAAGAAAAGGAAAGC 26

<210>41
<211>24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 41
ACTGACAGATTACCCAGAAATGAG 24

<210>42
<211>21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 42
GCATCTGAGCCCAGTTTGAGC 21

<210>43
<211>22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 43

CTGCTATGTTAAGCGTATTCAA 22

<210>44

<211>19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 44

GATCTGCGGGAAGCAAAC 19

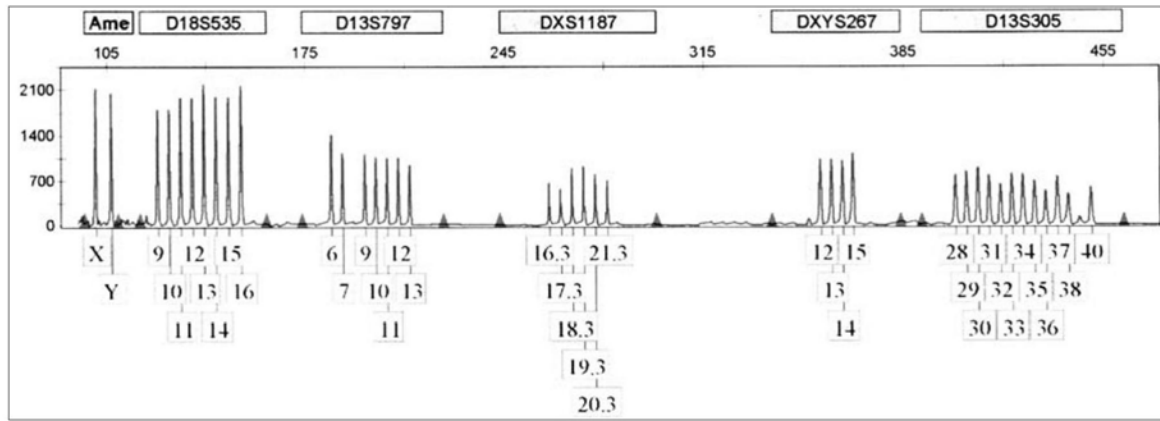


图 1a

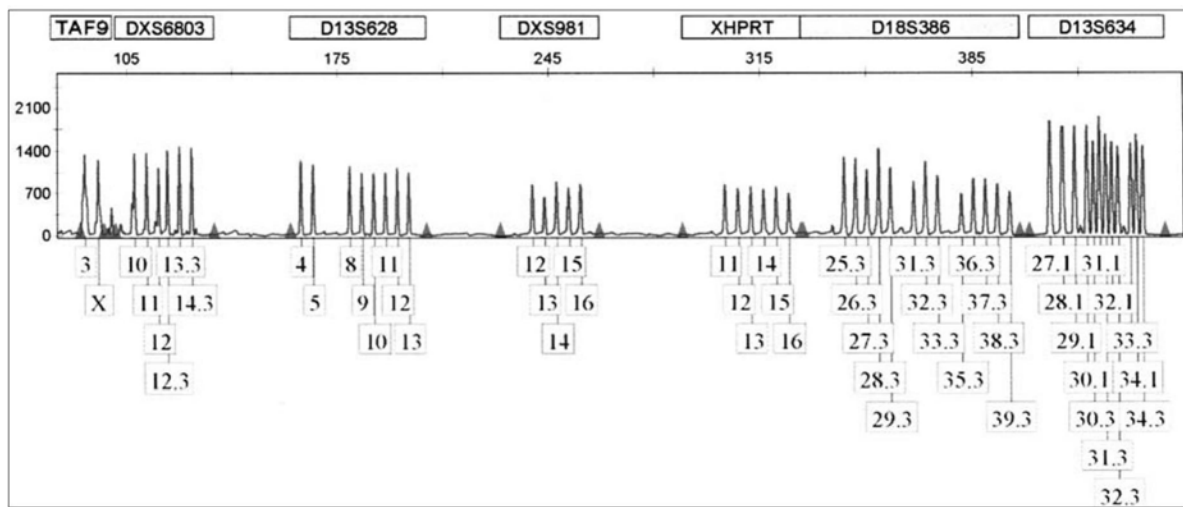


图 1b

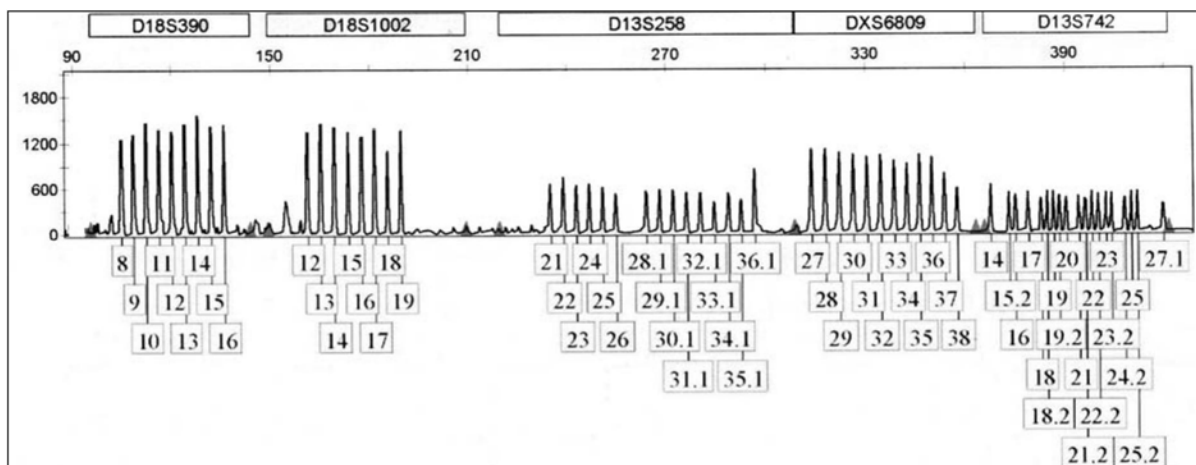


图 1c

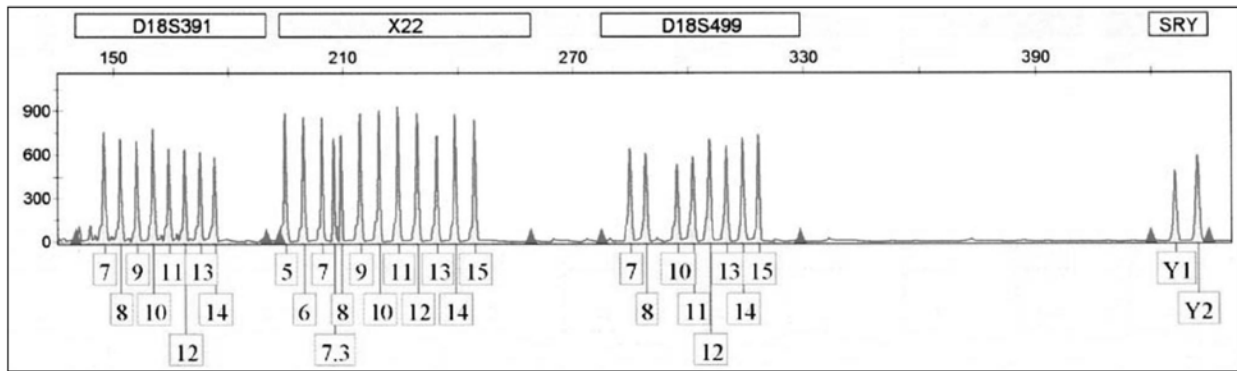


图 1d

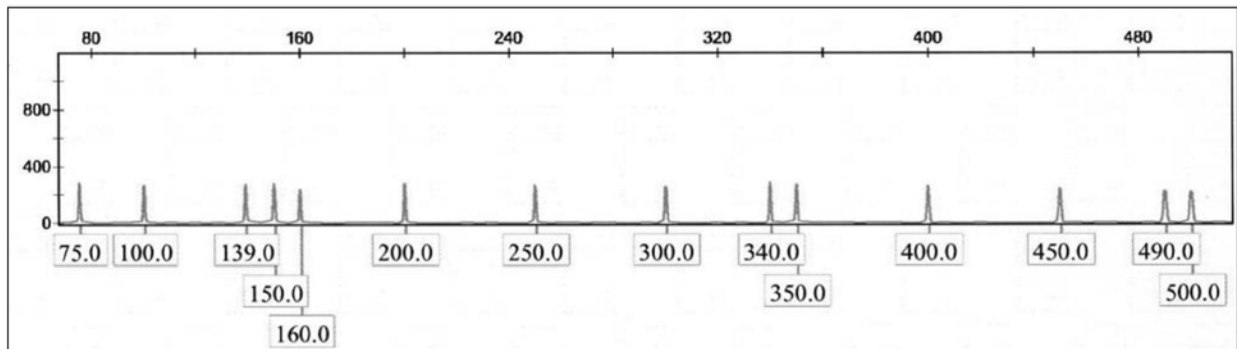


图 2

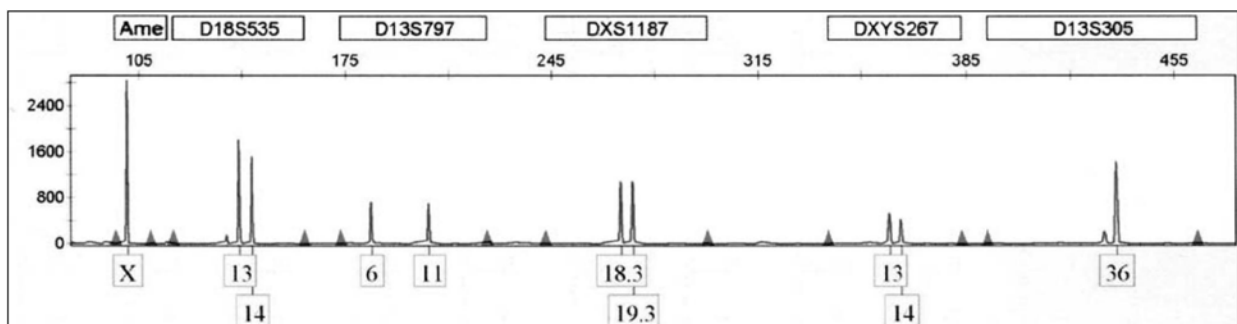


图 3a

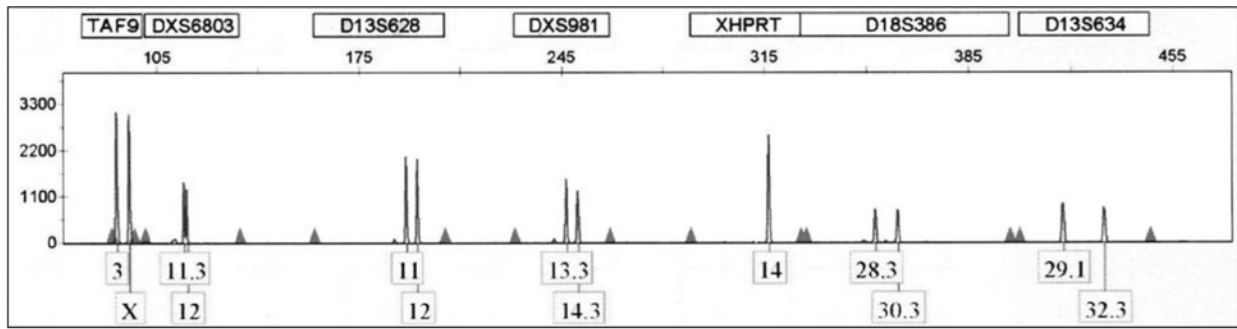


图 3b

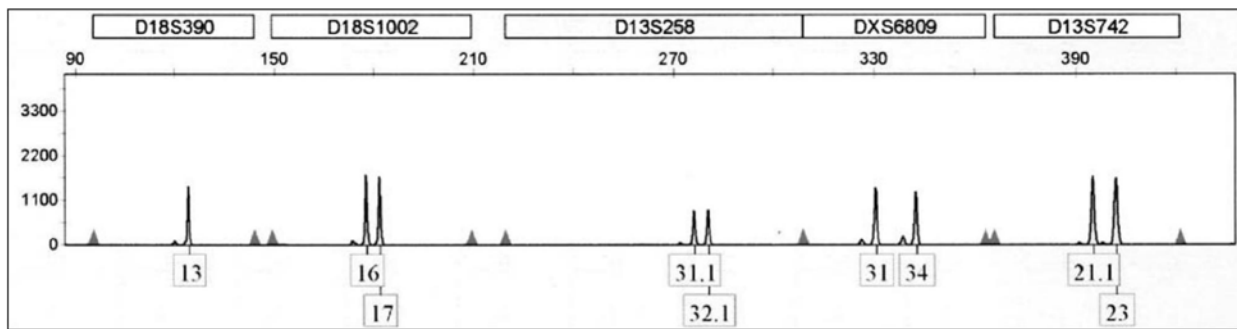


图 3c

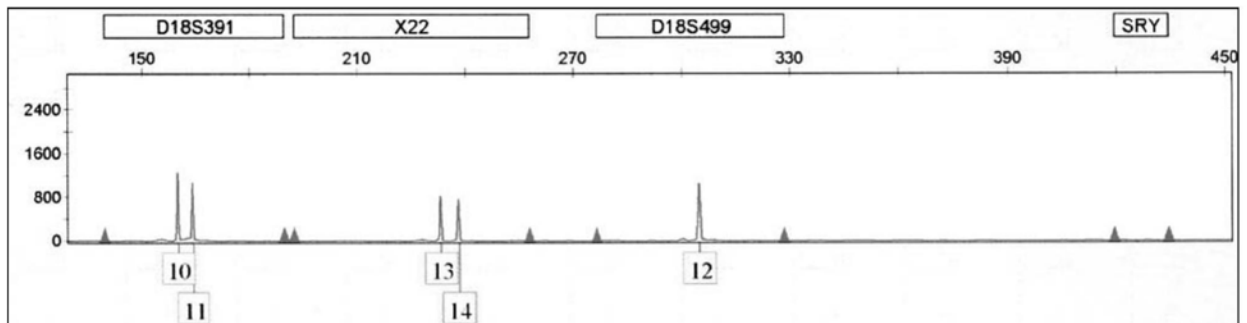


图 3d

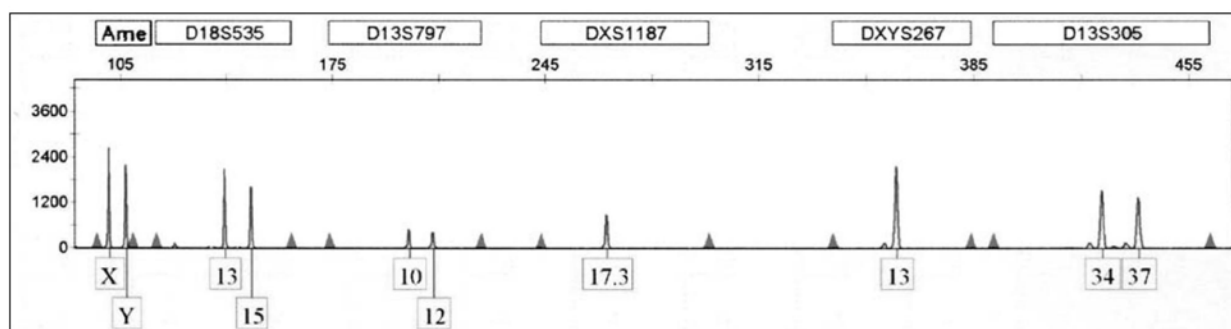


图 3e

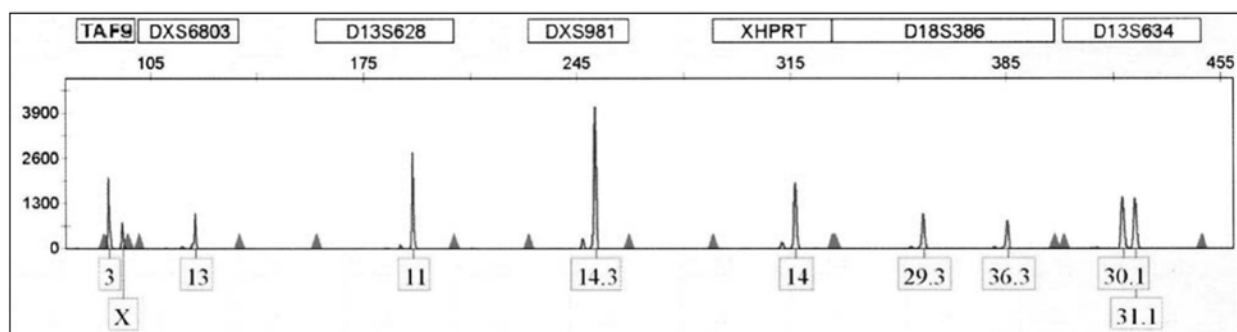


图 3f

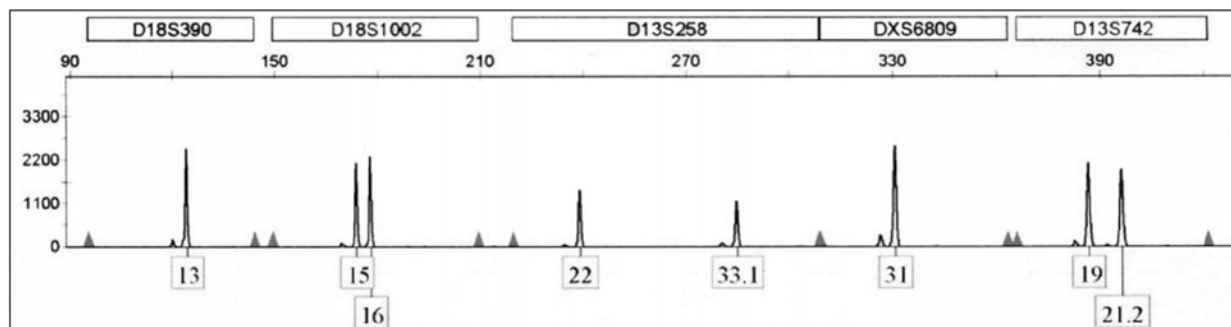


图 3g

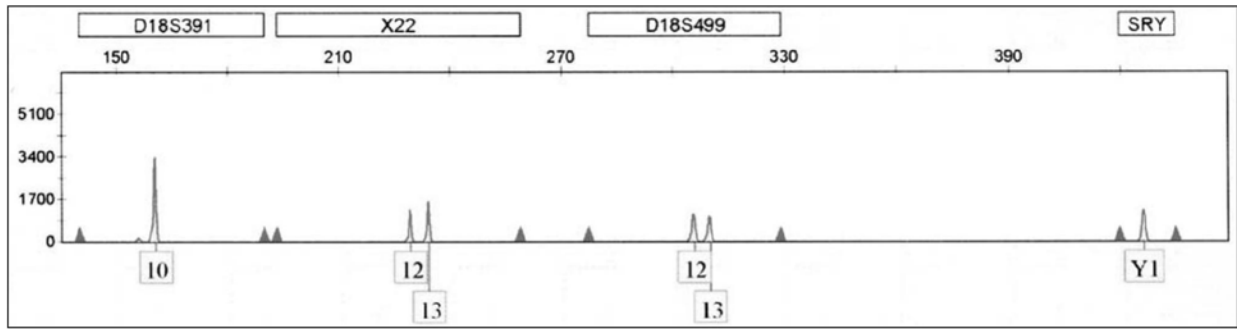


图 3h

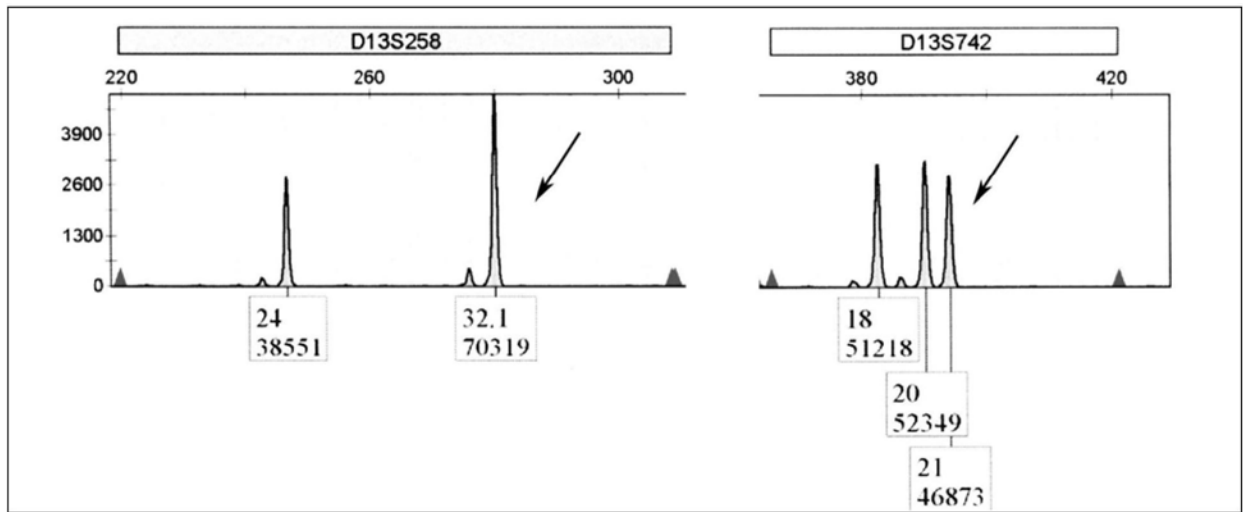


图 4

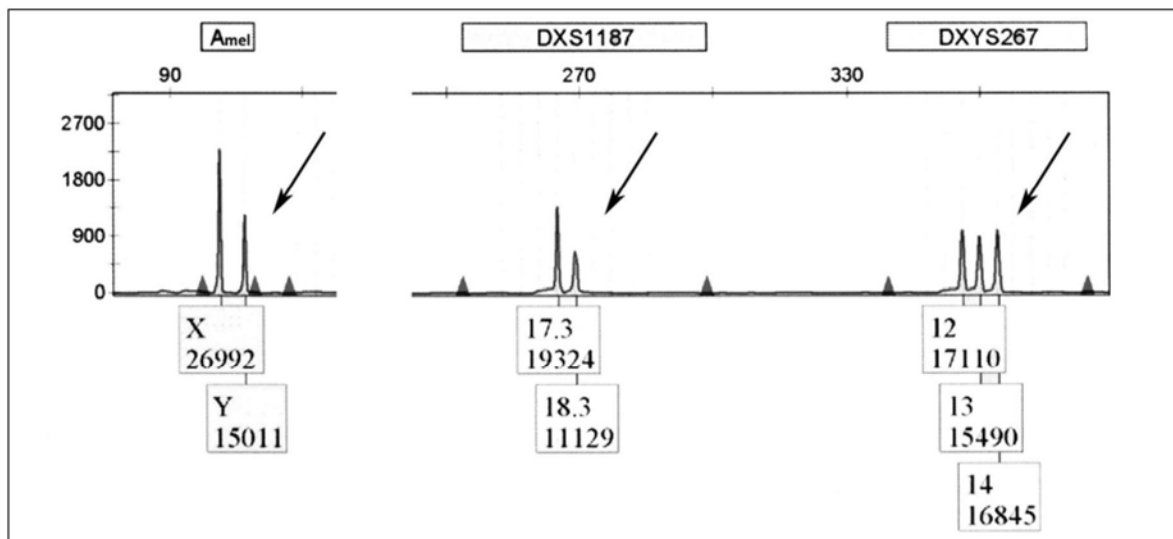


图 5

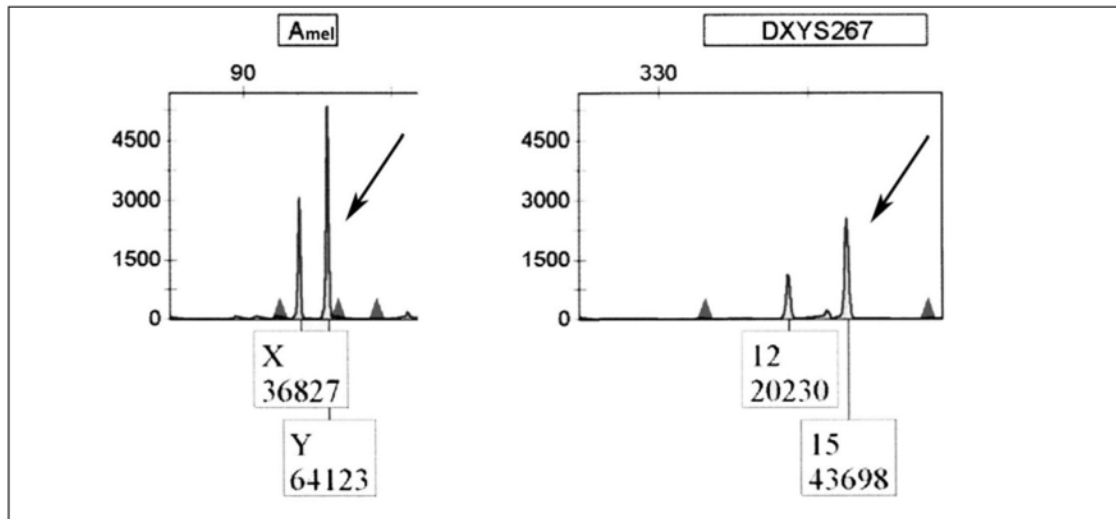


图 6

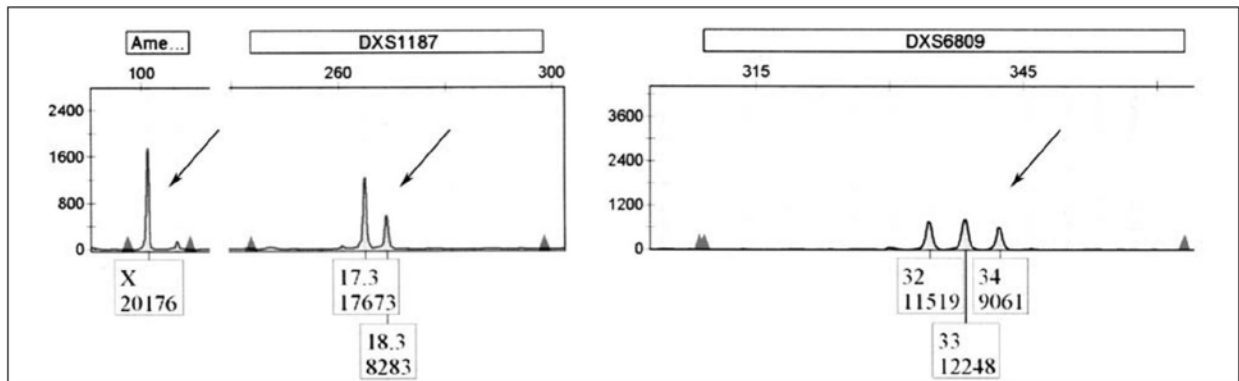


图 7

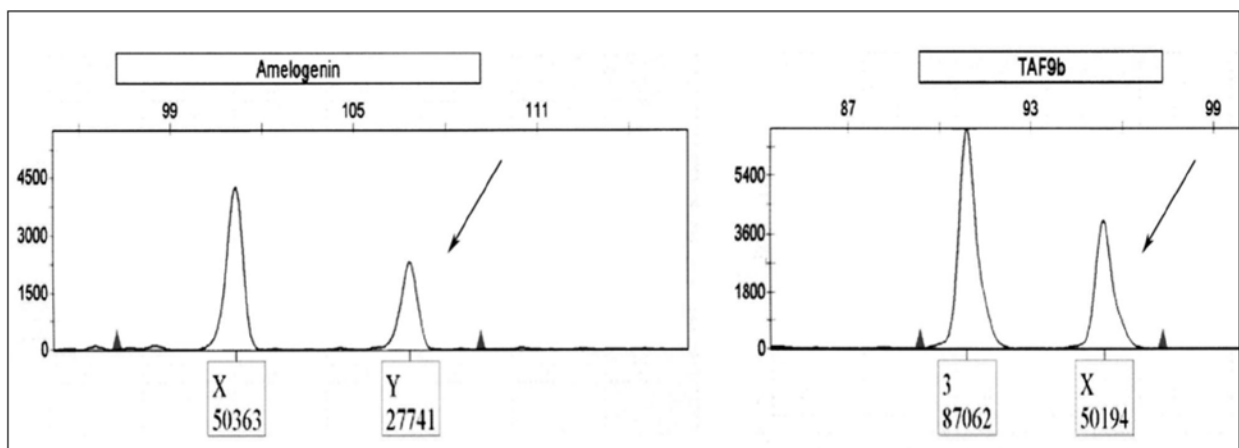


图 8a

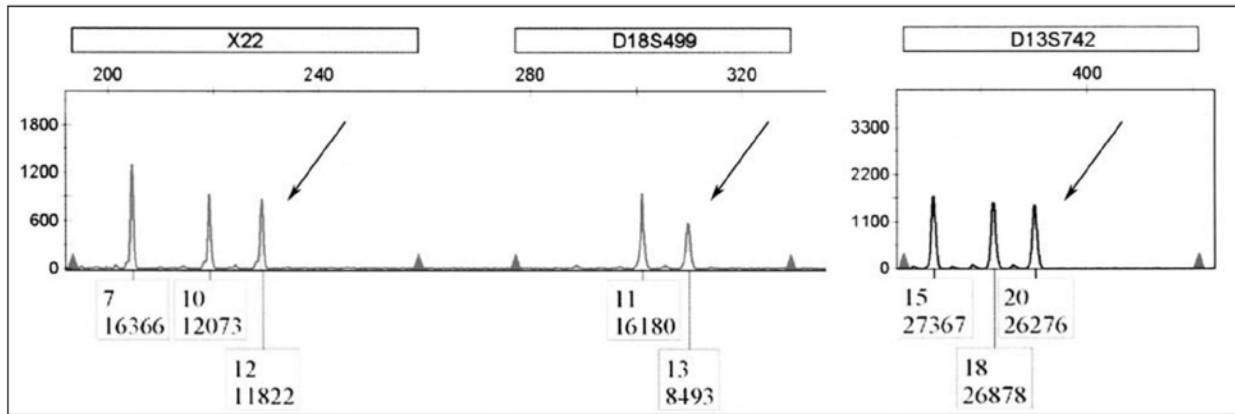


图 8b

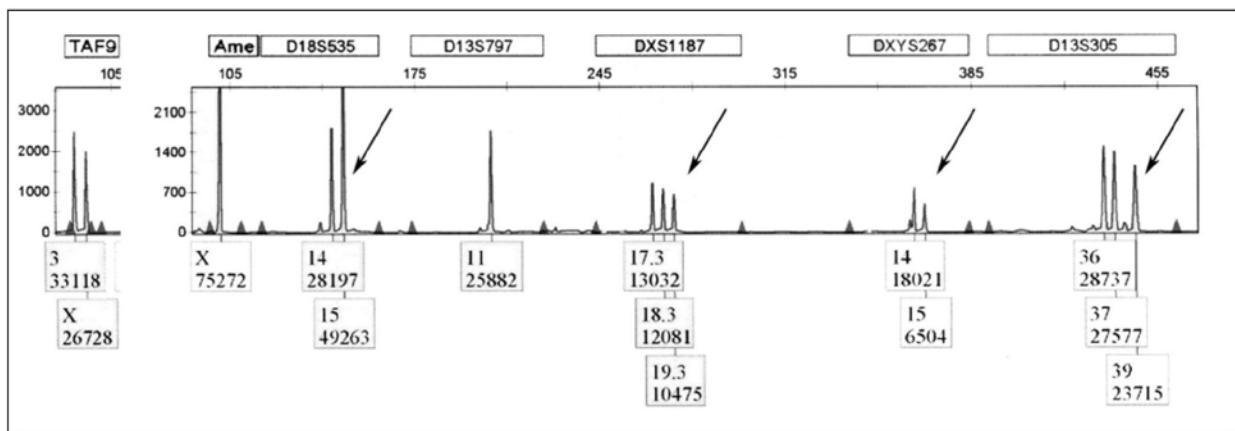


图 9

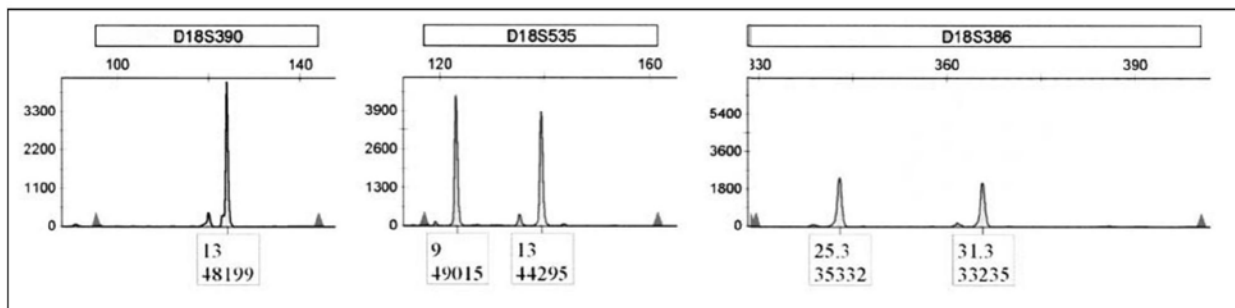


图 10a

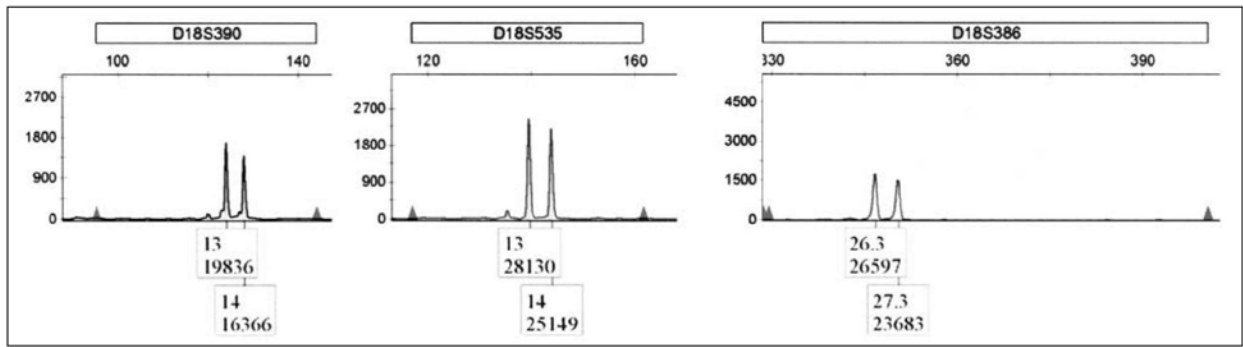


图 10b

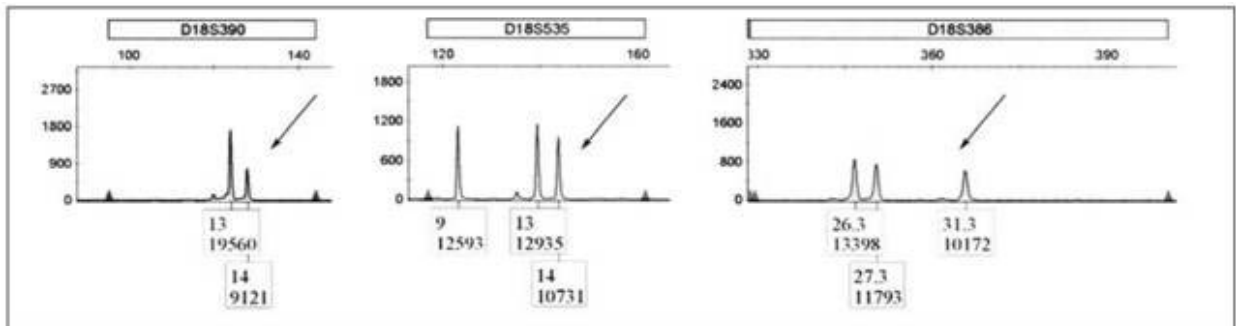


图 10c

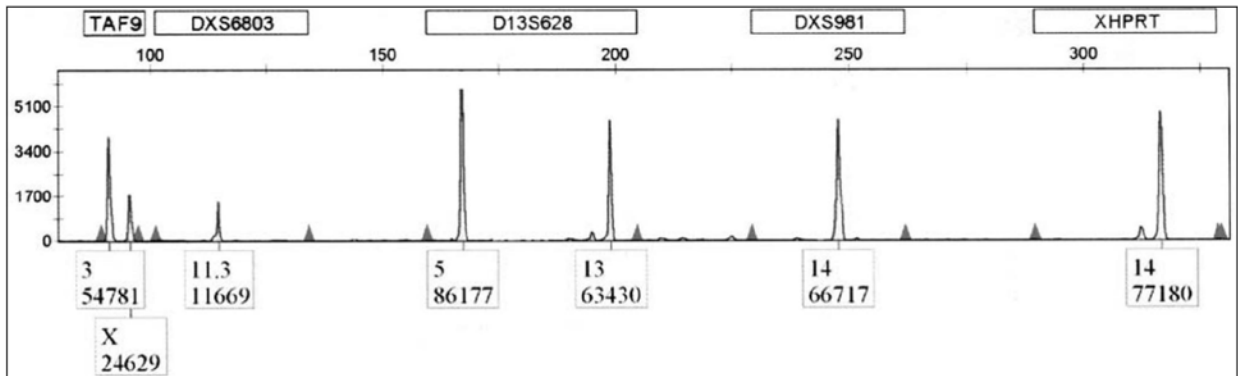


图 11a

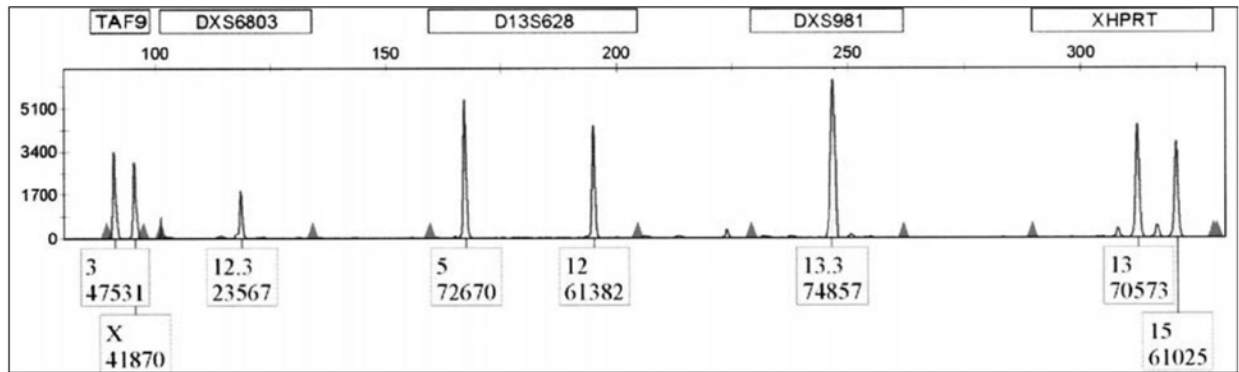


图 11b

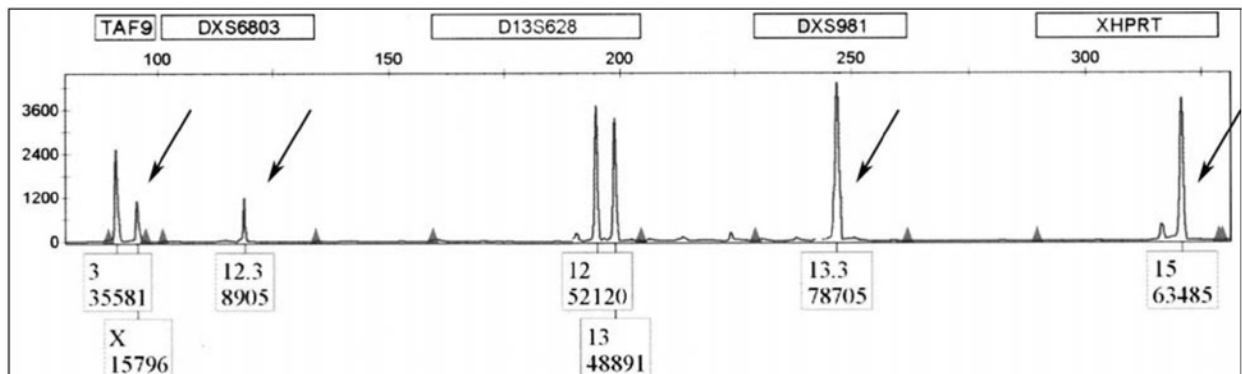


图 11c

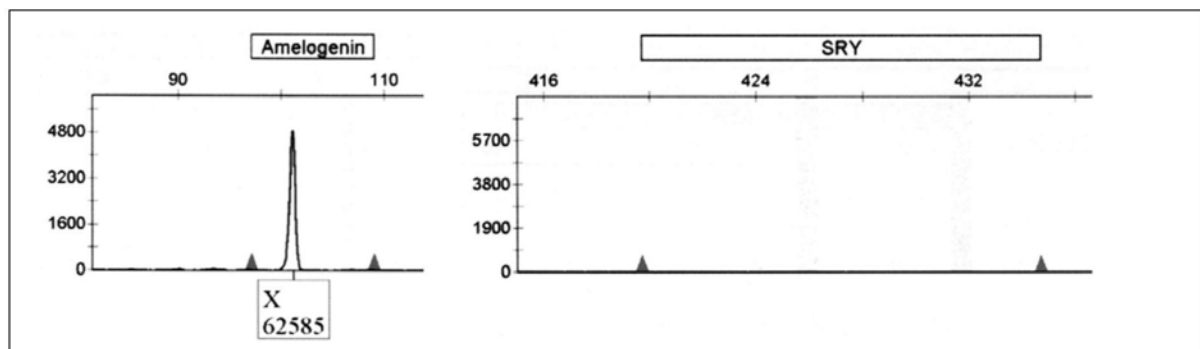


图 11d