



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110564857 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201911002446.7

(22)申请日 2019.10.21

(71)申请人 北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司

地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区康定街1号国盛科技工业园14号楼三层

(72)发明人 刘沛 王林海

(74)专利代理机构 北京同辉知识产权代理事务所(普通合伙) 11357

代理人 孙艳敏

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12Q 1/6858(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

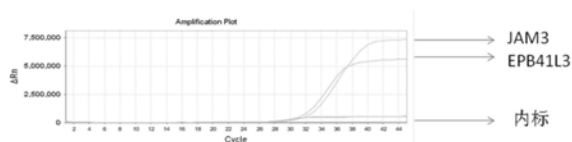
权利要求书2页 说明书14页
序列表5页 附图2页

(54)发明名称

一种用于早期宫颈癌检测的组合物及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种用于早期宫颈癌检测的组合物及试剂盒,该组合物包括EPB41L3基因中3个发生高度甲基化的CpG岛区域和JAM3基因中3个发生高度甲基化的CpG岛区域的扩增引物,能覆盖98%以上不同型别宫颈癌,可以实现一管反应检测多基因多甲基化区域的检测。优选配合特定的MGB探针和简并封闭引物,进一步提高了灵敏度和精准性。整个检测过程无创伤、操作简便、易于判读,通用的qPCR设备即可满足检测,PCR过程采用全封闭形式,避免了交叉污染的可能,同时对两个标志物的三个区段进行检测,结果更加精准,综上因素使该发明具有社会推广性。该检测的高灵敏性适用于无创宫颈癌早期筛查。



1. 一种用于早期宫颈癌检测的组合物,其特征在于,包括针对EPB41L3基因的3对甲基化特异性引物和JAM3基因的3对甲基化特异性引物及1对内参基因引物,其核苷酸序列如下:

EPB41L3基因1正向引物F:GGAGGACGTTATTTTTTTTCGCTC,
EPB41L3基因1反向引物R:AACTAACGCGCGCTAACAAAAAC;
EPB41L3基因2正向引物F:TGGCGCGTTTTGTTTAGAAGTC,
EPB41L3基因2反向引物R:CCTCCCGCAACACCAACCAAAC;
EPB41L3基因3正向引物F:TACGTTTGTAAATTTTAGTATTTTGG,
EPB41L3基因3反向引物R:TTCACCGTTTTAACCAGAAATAATCTCG;
JAM3基因1正向引物F:GGATTTTTTTTCGGGCGGTGG,
JAM3基因1反向引物R:ACACAACACTACTACGAAAATCT,
JAM3基因2正向引物F:CGTTTCGGTTTTTTAAAGTGTTGA,
JAM3基因2反向引物R:TATCACTCAATAAAAACTACACTC;
JAM3基因3正向引物F:GTTGTTTTAGTCGTTTTTCGGAC,
JAM3基因3反向引物R:CGAAACTACTTTTAACTACCCGT。
内参基因(β -actin)正向引物F:GTGATGGAGGAGGTTTAG,
内参基因(β -actin)反向引物R:AAATTACAAAAACCACAA。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,还包括不同基因对应的带荧光标记的探针序列:

EPB41L3基因1探针:
FAM-TTTCGCGTCGGTCGTTTAGTTTATTTTCGAG-BHQ1;
EPB41L3基因2探针:
FAM-TGGCGGGGAAGCGCGGCGCG-BHQ1;
EPB41L3基因3探针:
FAM-AGGTCGAGGCGGGCGGATCGCGAGGT-BHQ1;
JAM3基因1探针:
CY5-AGCGCGGTAGTTGCGGCGTGGGCGTTG-BHQ2;
JAM3基因2探针:
CY5-ATAGGCGTGAGGTATCGCGTTCGGTTA-BHQ2;
JAM3基因3探针:
CY5-TTCGGTCGATCGTGTCGTCGTTATCGTCGT-BHQ2。
内参基因(β -actin)探针:
VIC-CACCACCCAACACACAAT-MGB-BHQ1。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其特征在于,还包括除内参基因外不同基因对应的简并封闭引物:

EPB41L3基因1简并封闭引物:
TYGYGTGGTYGTTTAGTTTATTTYG-C3spacer;
EPB41L3基因2简并封闭引物:
TGGYGGGGAAGYGYGGYGYG-C3spacer;

EPB41L3基因3简并封闭引物:

AGGTYGAGGYGGGYGGATYGYGAGGT-C3spacer;

JAM3基因1简并封闭引物:

AGYGYGGTAGTTGYGGYGTGGGYGTTG-C3spacer;

JAM3基因2简并封闭引物:

ATAGGYGTGAGGTATYGYGTTYGGTTA-C3spacer;

JAM3基因3简并封闭引物:

TTYGGTYGATYGTGTYGTGTTATYGTYGT-C3spacer。

4. 一种用于早期宫颈癌检测的试剂盒,其特征在于,含有权利要求1-3任一所述的组合物,以及PCR反应液;所述PCR反应液包括DNA Taq聚合酶、dNTPs和 Mg^{2+} 、 $10\times$ DNA聚合酶buffer。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,正反向引物每条200-400nM、探针每条100-300nM、简并封闭引物每条400-800nM、DNA Taq聚合酶1U、 $MgCl_2$ 1-10mM。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,PCR反应的扩增模板为Bis-DNA,Bis-DNA的制备方法如下:

(1) 以年龄 ≥ 21 岁女性的宫颈分泌物、宫颈活检组织作为样本,进行细胞DNA的提取,获得OD260/280在1.8~2.0之间的DNA;

(2) DNA进行重亚硫酸盐转化,使DNA中未发生甲基化的5' 胞嘧啶转化为尿嘧啶,而发生甲基化的5' 胞嘧啶不发生改变,最后得到Bis-DNA。

一种用于早期宫颈癌检测的组合物及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸体外诊断领域,尤其是一种用于早期宫颈癌检测的组合物,通过检测特定的基因甲基化对宫颈癌进行早期筛查及其辅助诊断。

背景技术

[0002] 宫颈癌是世界女性第四大易发癌种,2018年约567,600新增病例,同时也是第四位的致死癌种,2018年约有315,000死亡病例。在中国,宫颈癌是目前第五大女性易发癌种,2018年有106,430新增病例,同时在15-44岁女性中是第三大致死癌种。

[0003] 人乳头瘤病毒(HPV,全称为human papillomavirus)是绝大多数宫颈癌发生的元凶,在大约95%的恶性宫颈病变中能鉴别出HPV的基因组DNA。人一生中累积的HPV感染风险高达80%,但大多数的HPV感染只是暂时的,可以通过人体自身的免疫调节被自发地清除掉。小于10%的人群出现HPV超过两年的持续性感染,这种持续性感染通常与高危型HPV病毒有关。15种主要高危型HPV病毒包括HPV 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,以及82。高危型HPV病毒被认为与宫颈上皮内瘤病变(CIN,全称为cervical intraepithelial neoplasia)相关,并最终导致宫颈癌的形成。在15种高危型HPV病毒中,HPV-16是最致癌的种类,是一半宫颈癌发生的主要原因。HPV-18,在许多子宫颈内腺癌中被提及,是第二大致癌类型,在所有的宫颈癌中约占了15%的比例。HPV-31和HPV-33是另外两种常见的类型,约占了8%。

[0004] 目前,接种宫颈癌疫苗是预防HPV病毒的主要手段。HPV疫苗包括2价疫苗(HPV-16和HPV-18),4价疫苗(HPV-16,HPV-11,HPV-16,以及HPV-18),以及9价疫苗(HPV-6,HPV-11,HPV-16,HPV-18,HPV-31,HPV-33,HPV-45,HPV-52,以及HPV-58)。接种HPV疫苗可以预防大于95%的HPV病毒感染,但疫苗的价格较高,且受年龄和区域的限制,同时所有商业疫苗都是预防性的,对已经感染的群体无治疗效果。

[0005] 早期检测是预防宫颈癌的一种有效方法,目前主要的检测手段包括细胞学和HPV检测。细胞学包含传统巴氏涂片法和液基细胞学检查。HPV检测包含HC2检测,Cervister HR HPV检测,Cobas 4800系统检测,以及APtima HPV mRNA检测等。传统的巴氏涂片法检测费用较低,可重复性高,但是制片方法缺陷造成了漏诊或误诊情况较多,且低准确性,低灵敏度,医生阅片量大,主观性较强,易造成误诊。液基细胞学检查在制片方法上较传统涂片法更进步,但仍然需要依靠医生的经验进行结果判定,在灵敏度和特异性上并不会更优于传统涂片法,仍然具有假阴性高的特点。文献报道,细胞学的检测灵敏度大概为30~87%(受医生的经验影响,受取样的影响,受制片的影响等),特异性为61~94%,与组织学诊断的匹配度大概为50%,另一方面假阴性的概率甚至高达50%。而HPV分型检测,是基于对宫颈分泌物的HPV DNA进行鉴别,对高级别的CIN有较高的检测灵敏度,文献报道,HPV检测的灵敏度大概在90%。同时,HPV检测是一个相对简单的过程,对中国这样的人口大国而言,在大规模的检测中具有一定的优势。但由于仅有持续性的HPV感染才和癌前病变密切联系,尽管具有较高的灵敏度,HPV检测也无法区分是否阳性的结果跟临床上的病变相关联,甚至可能导致对

小的细胞异常过度诊断,造成女性不必要的焦虑,这便降低了HPV检测的特异性,文献报道,HPV的特异性大概为60.7%。目前,在30岁女性中,对高危型HPV种类的检测通常跟细胞学检验共同进行来鉴别高级别病变和宫颈癌。但HPV检测和细胞学的联合检测,仅能增加细胞学的灵敏度,却不能增加HPV检测的特异性,因而,需要一种客观、可重复、特异性高的检测方法来更好得协同HPV检测来分辨出可能形成高级别病变的感染。

[0006] DNA甲基化作为表观遗传学中的一种,被认为是人类疾病研究最有用的表观标志。有文献表明,从20世纪80年代起,人类基因组中DNA甲基化的过低或过高,几乎和绝大多数甚至是整个的肿瘤相关联。另外,文献表述,从疑似宫颈癌或乳腺癌但病理阴性的女性活检样本中,在很多年后确诊为癌的女性中,DNA甲基化显著高于最终未患癌的女性。2016年,Yan Tian等人在312位高危型HPV阳性的女性中,提取了基因组DNA对某些基因的甲基化情况以及HPV分型的情况进行的实验。结果显示,HPV16/18和甲基化的联合诊断能达到接近100%的宫颈癌阳性鉴别率。而对于非16/18的其他HPV高危型别,越来越多的文献表明,甲基化可能替代细胞学检测协同HPV检测。综上所述,DNA甲基化联合HPV检测,具有很高的特异性以及灵敏度,更好地弥补HPV检测特异性的不足,可作为HPV检测判定的分流,以更精准地确定相应患者是否具有宫颈恶性病变甚至患有宫颈癌。

[0007] DNA异常甲基化是人类肿瘤常见的改变。发生在启动子区以及基因内部的CpG岛异常甲基化是基因失活的最常见机制。目前DNA甲基化检测方法有:甲基化特异性的PCR (Methylation-specific PCR,MSP)、亚硫酸氢盐测序法 (Bisulfite sequencing PCR,BSP)、高分辨率熔解曲线法 (High Resolution Melting,HRM) 和高通量测序方法等。相对于其他的检测方法而言,亚硫酸氢盐测序法 (Bisulfite sequencing PCR,BSP) 是DNA甲基化检测中的“金标准”,检测较为精准,但其检测灵敏度相对较低,且操作较繁琐、成本高。高分辨率熔解曲线法 (High Resolution Melting,HRM) 在PCR扩增中通过观察熔解曲线的变化来判断DNA是否发生甲基化,此类方法结果分析相对复杂,检测灵敏度相对较低。高通量测序检测方法首先对所检测样本的质量要求很高(基因组总量情况,DNA片段化情况),检测位点数量多但数据分析的难度相对较大,检测成本高(检测试剂、二代测序仪等),耗时长(5-7个工作日),对于临床推广相对困难。甲基化特异性的PCR (Methylation-specific PCR,MSP) 检测方法首先对样本质量的要求相对较低(基因组总量可以做到10ng;由于PCR扩增片段在150bp以下,受DNA片段化影响小),检测成本低(普通的荧光定量PCR即可)、耗时较短(一个工作日即可出结果),结果易于分析(不涉及大量数据的处理),是较为常用的DNA甲基化检测方法。

[0008] 临床检测时,宫颈脱落细胞是较为容易获取的组织细胞,在患者采集细胞学或者HPV检测标本时,即可同时进行甲基化的研究,无需额外取样。在宫颈脱落细胞中,正常脱落细胞的背景较高,造成了肿瘤细胞的含量相对较少,如何在高背景下精准地捕捉到甲基化的肿瘤DNA,是甲基化检测的关键也是难点。同时因为重亚硫酸盐转化的损失过高,使得模板DNA含量进一步降低,因此,如何将基因的甲基化高灵敏度、高准确度地检测出来相对较难。因而,对于此类检测试剂的开发需要具备两个方面的要求:高特异性以及高灵敏度。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种高灵敏度和高特异性的早期宫颈癌检测引物组合物,覆

盖98%以上不同型别宫颈癌,克服现有的检测手段高假阴性或者低特异性的问题,作为辅助宫颈癌早期诊断的试剂。

[0010] 本发明提供的用于早期宫颈癌检测的组合物,包括针对EPB41L3基因的3对甲基化特异性引物和JAM3基因的3对甲基化特异性引物及1对内参基因引物,其核苷酸序列如下:

[0011] EPB41L3基因1正向引物F:GGAGGACGTTATTTTTTTTCGCTC (SEQ ID NO.1),

[0012] EPB41L3基因1反向引物R:AACTAACGCGCTAACAAAAAC (SEQ ID NO.2);

[0013] EPB41L3基因2正向引物F:TGGCGGTTTTGTTTAGAAGTC (SEQ ID NO.3),

[0014] EPB41L3基因2反向引物R:CCTCCCGCAACACCAACCAAAC (SEQ ID NO.4);

[0015] EPB41L3基因3正向引物F:TACGTTTGTAATTTTAGTATTTTGG (SEQ ID NO.5),

[0016] EPB41L3基因3反向引物R:TTCACCGTTTAAACCGAAATAATCTCG (SEQ ID NO.6);

[0017] JAM3基因1正向引物F:GGATTTTTTTCGGGCGGTGG (SEQ ID NO.7),

[0018] JAM3基因1反向引物R:ACACAACACTACTACGCAAAATCT (SEQ ID NO.8),

[0019] JAM3基因2正向引物F:CGTTTCGGTTTTTAAAGTGTTGA (SEQ ID NO.9),

[0020] JAM3基因2反向引物R:TATCACTCAATAAAAACTACACTC (SEQ ID NO.10);

[0021] JAM3基因3正向引物F:GTTGTTTTAGTCGTTTTTCGGAC (SEQ ID NO.11),

[0022] JAM3基因3反向引物R:CGAAACTACTTTTAACTACCCGT (SEQ ID NO.12)。

[0023] 内参基因(β -actin)正向引物F:GTGATGGAGGAGGTTTAG (SEQ ID NO.13),

[0024] 内参基因(β -actin)反向引物R:AAATTACAAAAACCACAA (SEQ ID NO.14)。

[0025] 在肿瘤早期筛查的临床应用中最重要的是寻找相关性强的肿瘤标志物,通过基因检测的技术手段实现早期发现肿瘤的目的。DNA甲基化是表观遗传学水平基因表达、细胞发育和细胞分化等过程调控的重要方式。异常的DNA甲基化在癌症发生过程中有重要作用。DNA甲基化主要发生在-C-磷酸-G- (CpG) 位点。EPB41L3和JAM3基因CpG岛的甲基化水平比正常组织或细胞明显升高,即超甲基化现象。本发明即涉及上述两个宫颈癌相关基因标志物。

[0026] EPB41L3基因,位于18号染色体上,是4.1蛋白家族中一员,与细胞粘附,细胞运动和细胞生长有关;有数据显示,在宫颈癌中,其甲基化会导致其表达沉默;是检测CIN2、CIN3的最佳标记物,是检测宫颈癌的潜在标志物。JAM3基因位于11号染色体,对于在内皮细胞和上皮细胞中建立和维持细胞极性至关重要;JAM3甲基化标记物对宫颈癌是特异性的并且具有辨别力。数据研究显示,JAM3基因在检出宫颈上皮病变CIN2+的特异性能达到91%,灵敏度能达到63%。而在CIN3+上特异性为78%,灵敏度为72%。EPB41L3基因在检出宫颈上皮病变CIN2+的特异性为79%,灵敏度能达到69%。而在CIN3+上特异性为71%,灵敏度为81%。

[0027] 上述正反向引物组合物,是针对待检样品中EPB41L3基因的3个甲基化区域和JAM3基因的3个甲基化区域,通过大量引物的设计和筛选获得的,多个基因多个甲基化区域形成互补,能覆盖98%以上不同型别宫颈癌,多个标志物组合检测以及配合本发明设置的阳性判断值,增加宫颈癌早期检测的可靠性,最大程度避免了假阳性和假阴性结果的出现。

[0028] 上述引物组合克服了不同引物因结构间差异较大而导致与模板的结合效率不同的问题,以及引物间存在相互抑制作用的问题,利用多重荧光标记手段区分EPB41L3和JAM3基因是否发生甲基化,一个反应体系加入7对引物能同时保证每一对引物之间扩增反应不产生影响,进而能够实现一管反应进行多基因多甲基化区域的检测。特别适用于早期宫颈高危癌前病变及宫颈癌无创筛查的甲基化检测。

- [0029] 优选的,上述组合中,还包括不同基因对应的带荧光标记的探针序列:
- [0030] EPB41L3基因1探针:
- [0031] FAM-TTTCGCGTCGGTCGTTTAGTTTATTTTCGAG-BHQ1 (SEQ ID NO.15);
- [0032] EPB41L3基因2探针:
- [0033] FAM-TGGCGGGGAAGCGCGGCGG-BHQ1 (SEQ ID NO.16);
- [0034] EPB41L3基因3探针:
- [0035] FAM-AGGTCGAGGCGGGCGGATCGCGAGGT-BHQ1 (SEQ ID NO.17);
- [0036] JAM3基因1探针:
- [0037] CY5-AGCGCGGTAGTTGCGGCGTGGGCGTTG-BHQ2 (SEQ ID NO.18);
- [0038] JAM3基因2探针:
- [0039] CY5-ATAGGCGTGAGGTATCGCGTTCGGTTA-BHQ2 (SEQ ID NO.19);
- [0040] JAM3基因3探针:
- [0041] CY5-TTCGGTCGATCGTGTGTCGTTATCGTCGT-BHQ2 (SEQ ID NO.20)。
- [0042] 内参基因(β -actin)探针:
- [0043] VIC-CACCACCCAACACACAAT-MGB-BHQ1 (SEQ ID NO.21)。
- [0044] 除了上述7对正反向扩增引物外,该反应体系中还增加7个上述不同荧光标记的MGB探针,对甲基化进行分型,即探针能够区分EPB41L3和JAM3基因是否发生甲基化。该三种探针序列,均由核苷酸序列5'端标记的荧光报告基团(FAM或VIC),3'端标记荧光淬灭基团(BHQ1)。利用MGB探针设计手段,采取相对较短的探针序列,更有利于甲基化位点的识别,进一步提高检测的特异性和灵敏度。
- [0045] 上述筛选设计获得的探针具有以下优点:1、能够特异性区分CG和TG位点(即甲基化与非甲基化);2、探针与模板结合具备最佳的结合效率(即荧光曲线能够充分表现出来);3、不同标记的探针间及与扩增引物间不存在相互抑制干扰作用;4、MGB修饰的选择,增强探针与模板的结合效率。最终保证探针识别甲基化的特异性以及最终检测甲基化的灵敏度。
- [0046] 优选的,上述组合中,还包括除内参基因外不同基因对应的简并封闭引物:
- [0047] EPB41L3基因1简并封闭引物:
- [0048] TYGYGTYGGTYGTTTAGTTTATTTYG-C3spacer (SEQ ID NO.22);
- [0049] EPB41L3基因2简并封闭引物:
- [0050] TGGYGGGGAAGYGYGGYGYG-C3spacer (SEQ ID NO.23);
- [0051] EPB41L3基因3简并封闭引物:
- [0052] AGGTYGAGGYGGYGGATYGYGAGGT-C3spacer (SEQ ID NO.24);
- [0053] JAM3基因1简并封闭引物:
- [0054] AGYGYGGTAGTTGYGGYGTGGGYGTTG-C3spacer (SEQ ID NO.25);
- [0055] JAM3基因2简并封闭引物:
- [0056] ATAGGYGTGAGGTATYGYGTTYGGTTA-C3spacer (SEQ ID NO.26);
- [0057] JAM3基因3简并封闭引物:
- [0058] TTYGGTYGATYGTGYGTGTTATYGTYGT-C3spacer (SEQ ID NO.27)。
- [0059] 组合中添加探针可以对甲基化进行分型,但DNA在转化过程中存在转化不完全情形,即转化效率不够,存在大量转化前的模板序列;或者在DNA转化之后的Bis-DNA中主要

是甲基化和非甲基化模板序列的混合物,且非甲基化模板序列占据绝大多数比例。因此在最终得到的Bis-DNA中是转化前的模板序列、转化后的甲基化序列(转化完全和转化不完全)及转化后的非甲基化序列的混合物。在PCR扩增过程中,目的片段的引物容易与未发生甲基化的基因片段结合,并发生突破扩增,从而产生非特异性条带,影响扩增效果,相比于普通的PCR扩增不同的是,甲基化特异检测试剂盒还包括重亚硫酸盐转化过程,并且由于甲基化程度的不同,加上转化效率的不同,CpG岛位置碱基存在多种组合形式。

[0060] 为了将Bis-DNA中的甲基化序列在整个模板序列中凸显出来,以便上述探针能够更好地识别结合,优选引入简并封闭引物。简并封闭引物特异性与非甲基化基因片段以及部分不完全甲基化片段以及转化前的模板片段结合,进而封闭除甲基化序列之外的所有片段,从而使甲基化片段释放出来,使目的引物只与甲基化片段结合,进一步提高PCR扩增效率、检测灵敏度以及特异性。

[0061] 本发明使用上述6个简并封闭引物,全面封闭转化前序列和转化后非甲基化序列,封闭Bis-DNA中除甲基化序列之外的模板,将甲基化序列释放出来,不影响探针的结合效率,不影响整个体系的扩增效率,更好地起到封闭作用,降低引物使用量,增强扩增的特异性及灵敏度,增强探针检测的灵敏度。

[0062] 本发明还提供了一种用于早期宫颈癌检测的试剂盒,其含有以上任一所述的组合物,以及PCR反应液;所述PCR反应液包括DNA Taq聚合酶、dNTPs和 Mg^{2+} 、 $10\times$ DNA聚合酶buffer。

[0063] 优选的,上述试剂盒中,各成分的用量比例为:正反向引物每条200-400nM、探针每条100-300nM、简并封闭引物每条400-800nM、DNA Taq聚合酶1U、 $MgCl_2$ 1-10mM。

[0064] 由于本发明的试剂盒PCR反应是在同一管中进行,是多重引物的反应体系,因此PCR反应液的选择尤其重要,上述各成分的用量比例,能够充分发挥每一对引物的扩增效率,减少引物间的抑制作用,保证引物和探针的組合的扩增效率。

[0065] 优选的,上述试剂盒中,PCR反应的扩增模板为Bis-DNA,Bis-DNA的制备方法如下:

[0066] (1) 以年龄 ≥ 21 岁女性的宫颈分泌物、宫颈活检组织作为样本,进行细胞DNA的提取,获得OD260/280在1.8~2.0之间的DNA;

[0067] (2) DNA进行重亚硫酸盐转化,使DNA中未发生甲基化的5'胞嘧啶转化为尿嘧啶,而发生甲基化的5'胞嘧啶不发生改变,最后得到Bis-DNA。

[0068] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0069] 本发明试剂盒检测EPB41L3和JAM3基因甲基化的位点不仅包括基因的启动子区域,还包括基因的编码区域,由于宫颈癌型别多样性以及HPV感染多样性,选择多基因多区域甲基化的检测能够提高对宫颈癌检测的覆盖度,多基因多区域进行互补检测。该试剂盒在分子水平上对于宫颈癌早期筛查具有很强针对性,具有检测特异性、高灵敏度、准确性高等优点,这样对于早期可能的宫颈癌患者及早的进行预防以及采取相应的治疗措施。

[0070] 本发明试剂盒主要采用多重荧光MGB探针和简并封闭技术手段,通过探针与甲基化序列特异性结合,以及优化的反应体系,对EPB41 L3和JAM3基因甲基化位点精确检测。对比于用PCR特异性引物进行检测的方法,利用探针对甲基化位点进行识别,具有更高的灵敏度、精准性。并且在MGB探针的基础上,引入简并封闭引物技术。本发明采用这种技术进行相关基因的甲基化检测,操作简便、易于判读,对仪器的要求不高,并且整个PCR过程采用全封

闭形式,避免了交叉污染的可能,使结果更加精准。试剂盒检测的高灵敏性适用于宫颈癌的早期筛查。

附图说明

[0071] 图1为实施例1甲基化检测试剂盒检测162例样本所得ROC曲线;

[0072] 图2为HPV高危型别联合实施例1甲基化检测试剂盒检测162例样本所得ROC曲线;

[0073] 图3为实施例1甲基化检测试剂盒检测到EPB41L3和JAM3基因均有甲基化位点的阳性样品时的荧光显示结果。

具体实施方式

[0074] 为了使本技术领域人员更好地理解本发明方案,下面结合具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。

[0075] 实施例1检测宫颈癌相关基因EPB41L3和JAM3基因甲基化的试剂盒的检测试验

[0076] 试剂盒组分如下表1:

[0077] 表1

| 组分 | 主要成分 |
|--------------|--|
| DNA PCR扩增MIX | DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 、10×DNA 聚合酶 buffer 等 |
| 引物探针混合液 | EPB41L3 基因 1/2/3 正反向引物、探针、简并封闭引物和 JAM3 基因 1/2/3 引物、探针、简并封闭引物, 内参基因引物探针 |
| 阳性质控品 | 人工合成的 EPB41L3 和 JAM3 基因甲基化片段 |
| 阴性质控品 | 人工合成的 EPB41L3 和 JAM3 基因非甲基化片段 |

[0079] 选取已知病理结果的162例宫颈脱落细胞样本:102例鉴定为为宫颈癌样本;60例为低级别上皮内病变(CIN1)样本。

[0080] 1、对上述162例宫颈脱落细胞样本进行提取细胞DNA。在提取完成后,使用Nanodrop-300微量分光光度计对样本浓度和OD260/280进行测定,OD260/280在1.8~2.0之间。

[0081] 2、细胞DNA提取完成,对提取好的DNA进行重亚硫酸盐转化,未甲基化的胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U),而甲基化的胞嘧啶(C)不变。得到纯化好的bis-DNA。

[0082] 3、配制PCR反应液:DNA聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 、10×DNA聚合酶buffer、EPB41L3和JAM3基因1引物探针、EPB41L3和JAM3基因2引物探针、EPB41L3和JAM3基因3引物探针、内参基因引物探针、EPB41L3和JAM3基因1简并封闭引物、EPB41L3和JAM3基因2简并封闭引物、EPB41L3和JAM3基因3简并封闭引物。

[0083] 4、PCR反应条件为:96℃预变性5min;94℃变性15s,60退火延伸35s,45个循环。

[0084] 5、PCR反应体系的配置

[0085] DNA PCR扩增MIX:

[0086] 表2

| | | |
|--------|--------------------------|-------------|
| [0087] | 组分 | 一人份加入量 (μL) |
| | DNA聚合酶 (1U/μL) | 0.25 |
| | dNTPs (25mM) | 2 |
| | Mg ²⁺ (1.5mM) | 3-3.5 |
| | 10×DNA聚合酶buffer | 2.5 |

[0088] PCR扩增反应体系:

[0089] 表3

| | | |
|--------|--------------------------------|-----------------|
| [0090] | 组分 | 一人份加入量 (μL) |
| | DNA PCR扩增MIX | 12.5 |
| | EPB41L3基因1/2/3-F (各100μM) | 0.05+0.05+0.05 |
| | EPB41L3基因1/2/3-R (各100μM) | 0.05+0.05+0.075 |
| | EPB41L3基因1/2/3-FP (各100μM) | 0.02+0.01+0.02 |
| | JAM3基因1/2/3-F (各100μM) | 0.05+0.05+0.05 |
| | JAM3基因1/2/3-R (各100μM) | 0.05+0.05+0.05 |
| | JAM3基因1/2/3-FP (各100μM) | 0.02+0.01+0.02 |
| | EPB41L3基因Blocker1/2/3 (各100μM) | 0.15+0.15+0.15 |
| | JAM3基因Blocker1/2/3 (各100μM) | 0.2+0.15+0.15 |
| | 内参基因-F (100μM) | 0.03 |
| | 内参基因-R (100μM) | 0.03 |
| | 内参基因-FP (100μM) | 0.02 |
| | 纯化水 | 8.745 |
| | 模板 | 2 |

[0091] PCR扩增程序如下:

[0092] 第一扩增阶段:96℃预变性5min;

[0093] 第二扩增阶段:94℃变性15s,60℃退火延伸35s,45个循环;

[0094] 信号收集,60℃收集FAM、VIC以及CY5信号。

[0095] 6、结果判读

[0096] (1) 满足内标通道有S型扩增曲线,且Ct值≤35,EPB41L3和JAM3基因通道无S型扩增曲线 Δ Ct值>8.3,则判定结果为阴性;[0097] (2) 满足内标通道有S型扩增曲线,且Ct值≤35,EPB41L3或JAM3基因通道至少一个通道检测Ct值≤45, Δ Ct值≤8.3,则判定结果为阳性;

[0098] (3) 若内标通道无S型扩增曲线或Ct值>35,则判定结果无效,建议重新提取样本进行检测。

[0099] 7、检测结果分析

[0100] 利用上述试剂盒反应体系检测来自北京协和医院共162例样本,其中包括宫颈癌样本102例,低级别上皮内病变(CIN1)样本60例,检测结果如下表。

[0101] 表4. 162例样本的检测结果

[0102]

| 样本编号 | 病理亚型 | 甲基化结果 | Hr-HPV 结果 | HPV 联合甲基化结果 |
|------|------|-------|-----------|---------------|
| 1 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 2 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 3 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 4 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 5 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 6 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 7 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 8 | CIN1 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 9 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 10 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 11 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 12 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 13 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 14 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 15 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |

[0103]

| | | | | |
|----|------|----|----|---------------|
| 16 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 17 | CIN1 | 阳性 | 阴性 | —— |
| 18 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 19 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 20 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 21 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 22 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 23 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 24 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 25 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 26 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 27 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 28 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 29 | CIN1 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 30 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 31 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 32 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 33 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 34 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 35 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 36 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 37 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 38 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 39 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 40 | CIN1 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 41 | CIN1 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 42 | CIN1 | 阳性 | 阴性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 43 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 44 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |

[0104]

| | | | | |
|----|------|----|----|---------------|
| 45 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 46 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 47 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 48 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 49 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 50 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 51 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 52 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 53 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 54 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 55 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 56 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 57 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 58 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 59 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 60 | CIN1 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 61 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 62 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 63 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 64 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 65 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 66 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 67 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 68 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 69 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | —— |
| 70 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 71 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 72 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 73 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |

[0105]

| | | | | |
|-----|-----|----|----|---------------|
| 74 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 75 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 76 | 宫颈癌 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 77 | 宫颈癌 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 78 | 宫颈癌 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 79 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | —— |
| 80 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 81 | 宫颈癌 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 82 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 83 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 84 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 85 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 86 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 87 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 88 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | —— |
| 89 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | —— |
| 90 | 宫颈癌 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 91 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 92 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | —— |
| 93 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 94 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 95 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 96 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 97 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 98 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 99 | 宫颈癌 | 阴性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阴性 |
| 100 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 101 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 102 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |

[0106]

| | | | | |
|-----|-----|----|----|---------------|
| 103 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 104 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 105 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 106 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 107 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 108 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 109 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 110 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 111 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 112 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 113 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 114 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 115 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 116 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 117 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 118 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 119 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 120 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 121 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 122 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 123 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 124 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 125 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 126 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 127 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 128 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 129 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 130 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 131 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |

[0107]

| | | | | |
|-----|-----|----|----|---------------|
| 132 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 133 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 134 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 135 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | —— |
| 136 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 137 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 138 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 139 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 140 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 141 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 142 | 宫颈癌 | 阳性 | 阴性 | —— |
| 143 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 144 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 145 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 146 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 147 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 148 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 149 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 150 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 151 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 152 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 153 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 154 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 155 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 156 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 157 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 158 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| 159 | 宫颈癌 | 阴性 | 阴性 | —— |
| 160 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |

| | | | | | |
|--------|-----|-----|----|----|---------------|
| [0108] | 161 | 宫颈癌 | 阳性 | 阳性 | HPV 阳性, 甲基化阳性 |
| | 162 | 宫颈癌 | 阳性 | 阴性 | —— |

[0109] 对照临床病理结果,使用本甲基化检测试剂盒得到的ROC曲线面积为0.924(如图1所示),特异性为91.7%,灵敏度为93.1%。

[0110] 对上述样本同时进行高危型HPV的检测验证(型别包括:HPV16、18、6、11、31、52、45、33、35、51、39、59、68、56、58、66),HPV检测的灵敏度为94.1%,特异性为23.3%。而在高危型HPV阳性的患者中,联合甲基化的ROC曲线为0.952(如图2所示),对应的特异性为93.5%,灵敏度为96.9%。

[0111] 从以上结果可以看出,本试剂盒尽管在检测灵敏度上略低于HPV检测,但是在检测特异性上较HPV检测具有很大的提升。同时在HPV阳性的样本中,甲基化的联合检测能够进一步地提升灵敏度和特异性。由此,本试剂盒在很大程度上,能够更好地进行宫颈癌的检测,同时很好地解决HPV检测造成过度诊断,过度焦虑的现象,具有很高的社会价值。

[0112] 另外,本发明仅使用两个目标基因的六个检测位点的上下游引物、简并封闭引物和探针,即可覆盖98%以上型别的宫颈癌,漏检率低,灵敏度和特异性均在91%以上,检出准确性高,可广泛应用于临床检测。

[0113] 本文中应用了具体个例对发明构思进行了详细阐述,以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离该发明构思的前提下,所做的任何显而易见的修改、等同替换或其他改进,均应包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司

<120> 一种用于早期宫颈癌检测的组合物及试剂盒

<130> 11

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ggaggacgtt atttttttttc gctc 24

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

aactaacgcg cgctaacaaa aac 23

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

tggcgcgttt tgtttagaag tc 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

cctcccgcaa caccaaccaa ac 22

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

tacgtttgta attttagtat tttgg 25

<210> 6

<211> 27

<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 6
ttcacccgttt taaccgaaat aatctcg 27
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 7
ggattttttt cgggcggtgg 20
<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 8
acacaacact actacgcaa atct 24
<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 9
cgtttcggtt ttttaaagtg ttga 24
<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 10
tatcactcaa taaaaaacta cactc 25
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 11
gttgtttttag tcgttttcgg ac 22
<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 12

cgaaaactac ttttaactac ccgt 24
<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 13
gtgatggagg aggttttag 18
<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 14
aaattacaaa aaccacaa 18
<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 15
tttcgcgtcg gtcgtttagt ttatttcgag 30
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 16
tggcggggaa gcgcggcgcg 20
<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 17
aggctcaggc gggcggatcg cgaggt 26
<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 18
agcgcggtag ttgcggcgtg ggcgttg 27
<210> 19
<211> 27

<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 19
ataggcgtga ggtatcgcgt tcggtta 27
<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 20
ttcggtcgat cgtgtcgtcg ttatcgtcgt 30
<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 21
caccacccaa cacacaat 18
<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 22
tygygtyggt ygtttagttt atttyg 26
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 23
tggyggggaa gygyggygyg 20
<210> 24
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 24
aggtygaggy ggggyggatyg ygaggt 26
<210> 25
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 25

agygyggtag ttgyggygtg ggygttg 27

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 26

ataggygtga ggtatygygt tyggtta 27

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 27

ttyggtygat ygtgtygtyg ttatygtygt 30

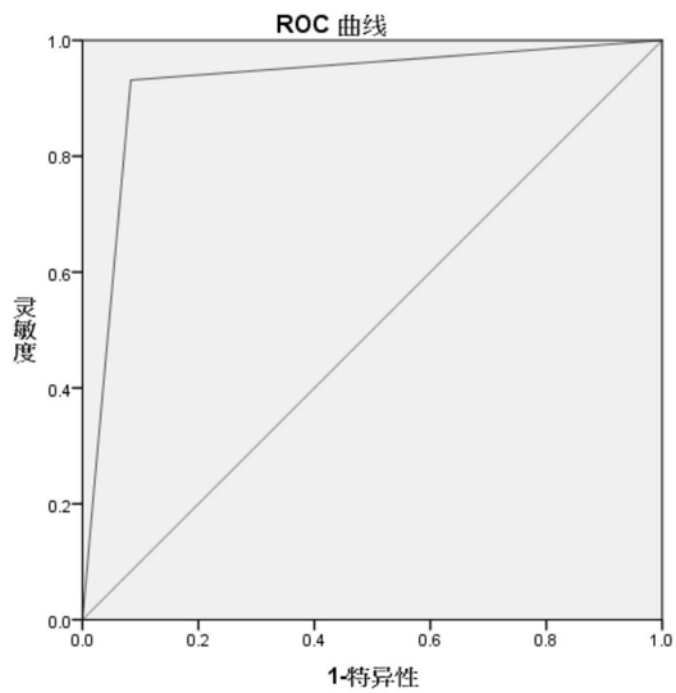


图1

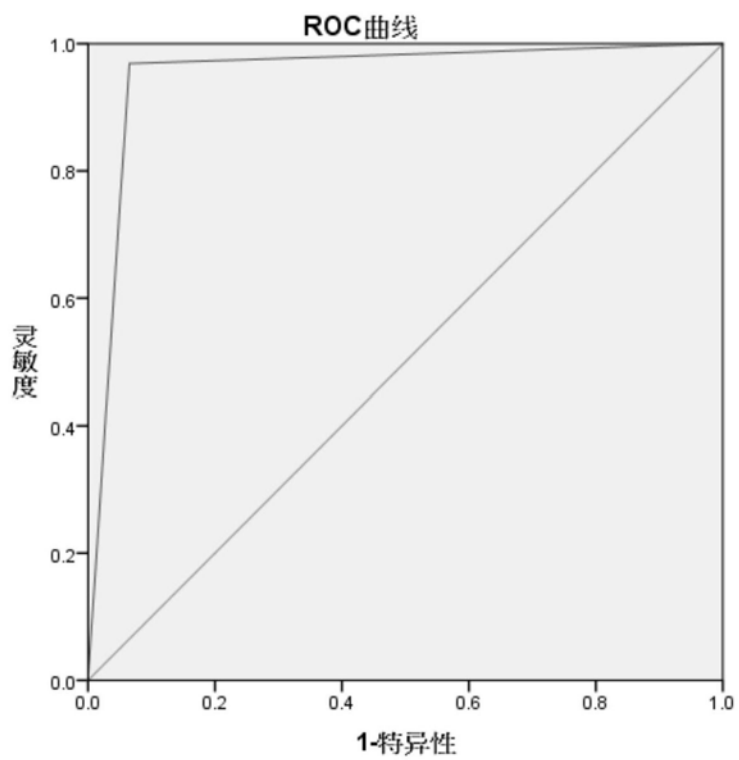


图2

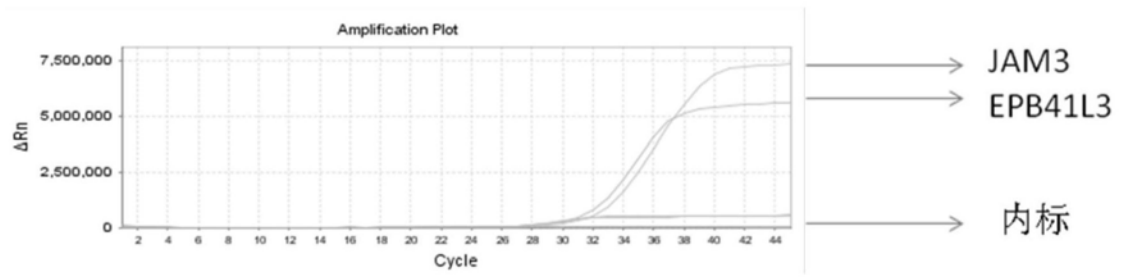


图3