



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110423803 A

(43)申请公布日 2019.11.08

(21)申请号 201910725439.3

(22)申请日 2019.08.07

(71)申请人 郑州大学第一附属医院

地址 450052 河南省郑州市二七区建设东
路1号

申请人 北京阅微基因技术有限公司

(72)发明人 张晓坚 朱振峰 杨晶 张奇

朱金瑶 陈初光

(74)专利代理机构 北京兆君联合知识产权代理

事务所(普通合伙) 11333

代理人 胡敬红

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

C12Q 1/6858(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书3页 说明书13页

序列表5页 附图2页

(54)发明名称

氯吡格雷、他汀及阿司匹林相关药物代谢基
因分型检测复合扩增体系及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种氯吡格雷、他汀及阿司匹
林相关药物代谢基因分型检测复合扩增体系及
试剂盒。该扩增体系包括了8个SNP检测位点的各
两个正向引物和一个反向荧光引物,能同时扩增
8个SNP位点。本发明体系的特点是通过多重荧光
Arms-PCR技术,实现一管式扩增8个SNP检测位
点,检测结果可联合对氯吡格雷、他汀和阿司匹
林个性化用药进行辅助诊断。特别的是,本扩增
体系可以实现血液和血卡样本的直接扩增,免除
了提取DNA的步骤;本扩增体系可整合UDG-dUTP
防污染措施,可以有效防止产物污染。本发明检
测体系检测位点全面、操作简便、特异性高、灵敏
度高、可靠性强、成本低,具备大批量检测的能
力。

1. 一种用于氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药指导的基因检测PCR复合扩增体系, 所述PCR复合扩增体系能同时扩增8个SNP检测位点, PCR复合扩增体系包括8个检测位点的引物组合物:

ApoE基因388T>C位点:

正向野生型引物: 5' -GCGGTACTGCACCAGGCGGCCGCA-3' ,

正向突变型引物: 5' -GCGGTACTGCACCAGGCGGCCGCG-3' ,

反向共用引物: 5' -TCGGAAGTGGAGGAACAAGTAC-3' ;

ApoE基因526C>T位点:

正向野生型引物: 5' -CCCGGCCTGGTACTGACCAGGCG-3' ,

正向突变型引物: 5' -CCCGGCCTGGTACTGACCAGGCA-3' ,

反向共用引物: 5' -TCGGAAGTGGAGGAACAAGTAC-3' ;

*2基因681G>A位点:

正向野生型引物: 5' -TTTCCCCTATCATTGATTATTTCCCG-3' ,

正向突变型引物: 5' -TTTCCCCTATCATTGATTATTTCCCA-3' ,

反向共用引物: 5' -AACTAGTCAATGAATCACAGATACGC-3' ;

*3基因636G>A位点:

正向野生型引物: 5' -ATCAGGATTGTAAGCACCCCTGG-3' ,

正向突变型引物: 5' -ATCAGGATTGTAAGCACCCCTGA-3' ,

反向共用引物: 5' -GATATTCACCCCATGGCTGTCTA-3' ;

*17基因-806C>T位点:

正向野生型引物: 5' -GCATTATCTCTTACATCAGAGATG-3' ,

正向突变型引物: 5' -GCATTATCTCTTACATCAGAGATA-3' ,

反向共用引物: 5' -ATCTCTCGGGCTGTTTTCCTTAGATAA-3' ;

PTGS1基因-842A>G位点:

正向野生型引物: 5' -GATAACTGAGCACCTACTACATGCTGGA-3' ,

正向突变型引物: 5' -GATAACTGAGCACCTACTACATGCTGGG-3' ,

反向共用引物: 5' -CAAGTACTTATCTTTTCTAGCCCTC-3' ;

SLC01B1基因388A>G位点:

正向野生型引物: 5' -AGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGAATT-3' ,

正向突变型引物: 5' -AGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGAATC-3' ,

反向共用引物: 5' -CACATGCTGGGAAATTGACAGAAAGTA-3' ;

SLC01B1基因521T>C位点:

正向野生型引物: 5' -GAATCTGGGTCATACATGTGGATATATGT-3' ,

正向突变型引物: 5' -GAATCTGGGTCATACATGTGGATATATGC-3' ,

反向共用引物: 5' -TAGACAAAGGAAAGTGATCATAACA-3' 。

2. 根据权利要求1所述的PCR复合扩增体系, 所述PCR体系中还能扩增3个对照位点: 性别Ame1基因、人类身份识别位点D5S818和Th01, PCR复合扩增体系包括3个对照位点的引物组合物:

对照Ame1位点:

正向引物:5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAG-3' ,
 反向引物:5'-ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG-3' ;
 对照D5S818位点:
 正向引物:5'-GTGGTGTCCCAGATAATCTGTAC-3' ,
 反向引物:5'-GGTGAATAACTCCAAATACTCC-3' ;
 对照Th01位点:
 正向引物:5'-AGGCTCTAGCAGCAGCTCATG-3' ,
 反向引物:5'-CTGGAAATGACACTGCTACAATC-3' 。

3. 根据权利要求1或2所述的PCR复合扩增体系,所述引物上添加有修饰或以修饰碱基取代正常碱基,所述修饰为荧光集团修饰、磷酸化修饰、硫代磷酸化修饰、锁核酸修饰或肽核酸修饰。

4. 根据权利要求1或2所述的PCR复合扩增体系,所述引物3'端-2至-15位改动1至3个碱基或者/和在引物3'端-15位之后的序列进行改动,所述改动包括末端增加其他序列、删除部分末端序列、改变部分碱基序列。

5. 根据权利要求4所述的PCR复合扩增体系,所述8个检测位点和3个对照位点分别由两种颜色的荧光标记,相同荧光标记视为同一组,两组分别为:第一组PTGS1基因-842A>G位点、*3基因636G>A位点、*17基因-806C>T位点、*2基因681G>A位点、D5S818位点;第二组Ame1位点、ApoE基因388T>C位点、SLC01B1基因521T>C位点、SLC01B1基因388A>G位点、ApoE基因526C>T位点、Th01位点。

6. 根据权利要求5所述的PCR复合扩增体系,所述第一组荧光标记为FAM,第二组荧光标记为HEX;所述检测位点的荧光标记位于反向共用引物的5'端,所述对照位点的荧光标记位于正向引物的5'端。

7. 根据权利要求5所述的PCR复合扩增体系,PCR复合扩增体系包括如下引物组合物:

ApoE基因388T>C位点:

正向野生型引物:5'-ACGGTACTGCACCAGGCGGCCGGA-3',

正向突变型引物:5'-GATTCCGGTACTGCACCAGGCGGCCCG-3',

反向共用引物:5'-HEX-TCGGAAGTGGAGGAACAAGTAC-3' ;

ApoE基因526C>T位点:

正向野生型引物:5'-GCCGGCCTGGTACACTGCCAGCCG-3',

正向突变型引物:5'-GATTACCGGCCTGGTACACTGCCAGGGA-3',

反向共用引物:5'-HEX-TCGGAAGTGGAGGAACAAGTAC-3' ;

CYP2C19*2基因681G>A位点:

正向野生型引物:5'-TTTCCACTATCATTGACTATTTCCAG-3' ,

正向突变型引物:5'-AGCTTTTCCACTATCATTGATTATTTGCCA-3',

反向共用引物:5'-FAM-AACTAGTCAATGAATCACAGATACGC-3' ;

CYP2C19*3基因636G>A位点:

正向野生型引物:5'-GTTATCAGGATTGTAAGCACCCCCTAG-3',

正向突变型引物:5'-GTTAACAATCAGGATTGTAAGCACCCCATGA-3',

- 反向共用引物:5' -FAM-GATATTCACCCCATGGCTGTCTA-3' ;
CYP2C19*17基因-806C>T位点:
正向野生型引物:5'-ATTGCATTATCTCTTACATCAGTGATG-3',
正向突变型引物:5'-ATTAGGCGCATTATCTCTTACATCAGAGCTA-3', 反向共用引物:5' -FAM-ATCTCTCGGGCTGTTTTCCCTTAGATAA-3' ;
PTGS1基因-842A>G位点:
正向野生型引物:5' -AACTGAGCACCTACTACATGCTGCA-3' ,
正向突变型引物:5'-ATGCAACTGAGCACCTACTACATGCTTGG-3',
反向共用引物:5' -CAAGGTACTTATCTTTTCTAGCCCTC-3' ;
SLC01B1基因388A>G位点:
正向野生型引物:5' -AGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGAAAT-3' ,
正向突变型引物:5'-GATTAGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGATTC-3',
反向共用引物:5' -HEX-CACATGCTGGGAAATTGACAGAAAGTA-3' ;
SLC01B1基因521T>C位点:
正向野生型引物:5'-ATGGGTCATACATGTGGATATACGT-3',
正向突变型引物:5' -GAATCTGGGTCATACATGTGGATATGTGC-3' ,
反向共用引物:5' -HEX-TAGACAAAGGGAAAGTGATCATACA-3' ;
对照Ame1位点:
正向引物:5' -HEX-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAG-3' ,
反向引物:5' -ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG-3' ,
对照D5S818位点:
正向引物:5' -FAM-GTGGTGTCCCAGATAATCTGTAC-3' ,
反向引物:5' -GGTGAATAACTCCAAATACTCC-3' ,
对照Th01位点:
正向引物:5' -HEX-AGGCTCTAGCAGCAGCTCATG-3' ,
反向引物:5' -CTGGAAATGACACTGCTACAATC-3' .
8. 根据权利要求1或2所述的PCR复合扩增体系,所述扩增采用多重等位基因特异性PCR扩增结合定量荧光PCR扩增,所述检测采用毛细管电泳对PCR扩增产物的检测,
9. 一种氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药相关基因多态性检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求1-8任一所述的PCR复合扩增体系。
10. 根据权利要求9所述检测试剂盒,所述试剂盒还包含以下成分:热启动DNA Taq酶、UDG酶和2×Buffer、阳性对照DNA、阴性对照和内标ROX500。

氯吡格雷、他汀及阿司匹林相关药物代谢基因分型检测复合 扩增体系及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于多重荧光PCR技术和毛细管电泳技术。利用该技术同时检测氯吡格雷、他汀和阿司匹林药物代谢速率相关的CYP2C19、ApoE、SLC01B1和PTGS1 4个基因共8个位点多态性,为临床在治疗心血管等疾病的个体化用药中提供参考,属于生物医学领域中的临床分子检测技术。

背景技术

[0002] 心血管疾病发病率在全世界都有逐年增高的趋势,已成为影响人类健康的第一杀手。然而目前临床上常用的心血管疾病治疗药物,由于个体差异,不同患者服用相同剂量的药物所获得的治疗效果明显不同,这使临床医生应用该药物进行治疗时存在一定困扰。越来越多的研究发现遗传变异是造成药效个体差异的重要因素之一。

[0003] 心血管疾病发病率在全世界都有逐年增高的趋势,已成为影响人类健康的第一杀手。然而目前临床上常用的心血管疾病治疗药物,由于个体差异,不同患者服用相同剂量的药物所获得的治疗效果明显不同,这使临床医生应用该药物进行治疗时存在一定困扰。越来越多的研究发现遗传变异是造成药效个体差异的重要因素之一。研究发现,临床上常用的口服抗凝药、调血脂药以及其他预防性药物如阿司匹林等,其服用疗效或剂量均与基因多态性相关。下面就临床上常见几大类药物及其可能影响其用药的相关基因进行简单描述。

[0004] 1、氯吡格雷:氯吡格雷是临床上治疗急性冠状动脉综合征应用最广泛的抗血小板药物,氯吡格雷是药物前体,需经过小肠的吸收和肝脏细胞色素P450的代谢才能转化为有活性的代谢产物。氯吡格雷药物抵抗被认为与遗传因素有关,已有充分研究表明CYP2C19酶在氯吡格雷的代谢中起重要作用。CYP2C19基因存在多个多态性位点,导致个体间CYP2C19酶活存在明显的个体差异。其中CYP2C19*2和CYP2C19*3位点突变均会降低CYP2C19酶的活性,这两种突变可以解释>99%的东方人弱代谢者以及约88%的白种人弱代谢者的表型。而CYP2C19*17位点的突变则使CYP2C19酶活性明显增加,CYP2C19*17携带者有着显著的氯吡格雷强反应性以及出血风险明显增加。

[0005] 2、他汀类药物:他汀类药物是羟甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶抑制剂,为调节血脂药物,用于心血管疾病和中风的一级和二级预防。他汀类的药物相关候选基因主要为影响药动学的溶质载体有机阴离子转运蛋白1B1 (SLC01B1) 和影响其药效学的载脂蛋白E (ApoE)。SLC01B1的基因多态性与辛伐他汀、普伐他汀引起的肌病强相关。ApoE的主要生理功能是通过与LDL受体结合并参与LDL代谢过程,ApoE基因的变异可影响LDL受体结合活性而影响脂质代谢,不同多态性患者服用他汀类药物疗效存在差异。

[0006] 3、阿司匹林:阿司匹林是很多家庭必备药品,有很好的解热镇痛作用,不但可以治疗感冒发热,头痛牙痛,还可用于治疗关节痛、风湿病等。此外,阿司匹林可以抑制血小板聚集,所以也可以作为抗栓基础治疗,主要用于预防和治疗缺血性心脏病、心绞痛、心肺梗塞、

脑血栓形成。

[0007] 综上,药物遗传多态性可表现为药物代谢酶的多态性、药物转运蛋白的多态性,以及药物作用受体或靶点多态性等。这些多态性可能导致了許多药物治疗中药效和不良反应的个体差异,通过对患者特定药物相关位点基因型的检测,指导制定每个患者的治疗方案,使患者获得最佳治疗效果,避免药物不良反应,达到用药个体化的目的。

[0008] 目前用于检测基因多态性的方法很多,如直接测序法、荧光定量PCR法、基因芯片法、高通量测序等。这些检测方法均存在各种不同程度的缺陷,如操作过程繁琐、重复性差、结果不易判读、检测位点少、检测通量低、检测周期长、检测费用高等。1、直接测序法:设计测序引物,提取DNA进行PCR扩增与产物测序。该方法的主要缺点在于:(1) PCR反应前需要对样本进行提取DNA,检测质量与浓度,操作复杂,存在混淆样本的风险。(2) 检测多个位点时一个样本需要进行多个反应,检测成本高,对模板量的需求高,操作强度大,并容易造成操作错误和污染。(3) PCR反应后需要对产物进行纯化和测序化学反应等步骤。总体来说就是步骤繁琐,试验周期长,成本高,不利于临床大面积推广。2、RFLP分析法:基于基因突变导致的限制性内切酶识别位点的改变,如位点丢失或产生新位点,通过PCR扩增某一特定片段,再利用限制性内切酶进行酶切反应,电泳观察片段的大小,但其具有酶切位点局限性,并且难以进行高通量平行分析。3、荧光定量PCR:实时荧光定量PCR操作简单快速,实验灵敏度高,结果快捷可量化等优点,但是该技术存在样品易污染,易发生交叉反应,假阳性率高。且通常的荧光定量PCR只能利用一至四个荧光通道,于是最多只能检测4个位点,不能满足多个SNP位点的同时检测。4、基因芯片(gene chip):基因芯片是通过微加工技术,将数以万计甚至百万计的特定序列的基因探针,有规律地排列固定与硅片、玻片等支持物上,构成一个二维DNA探针阵列,利用这类芯片与标记的生物样品进行杂交,可对样品的基因表达谱生物信息进行定性和定量分析。其可进行高通量检测,但该方法费用高,对模板需求量大,操作及数据分析复杂,耗时长。

[0009] 因此有必要建立一种同时快速检测这三种基因突变的方法,为医院及其它医疗机构提供一种操作简单、特异性强、灵敏度高、通量高、可靠性强和成本低的检测方案。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种与氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药相关基因多态性检测的复合扩增体系。该体系具有操作简单、特异性强、灵敏度高、通量高、可靠性强和成本低的检测特点。

[0011] 一种用于氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药指导的基因多态性检测PCR复合扩增体系,在该PCR复合扩增体系中能同时对以下8个检测位点进行扩增:CYP2C19*2基因681G>A位点、CYP2C19*3基因636G>A位点、CYP2C19*17基因-806C>T位点、ApoE基因388T>C位点、ApoE基因526C>T位点、SLC01B1基因521T>C位点、SLC01B1基因388A>G位点、PTGS1基因-842A>G位点;所述该PCR复合扩增体系中含有扩增该检测位点的引物组合物:

[0012] ApoE基因388T>C位点:

[0013] 正向野生型引物:5'-GCGGTACTGCACCAGGCGGCCGCA-3',

[0014] 正向突变型引物:5'-GCGGTACTGCACCAGGCGGCCGCG-3',

[0015] 反向共用引物:5'-TCGGAAGTGGAGGAACAAGTAC-3';

- [0016] ApoE基因526C>T位点：
[0017] 正向野生型引物：5' -CCCGGCCTGGTACTGACTGCCAGGCG-3'，
[0018] 正向突变型引物：5' -CCCGGCCTGGTACTGACTGCCAGGCA-3'，
[0019] 反向共用引物：5' -TCGGAAGTGGAGGAACAAGTAC-3'；
[0020] CYP2C19*2基因681G>A位点：
[0021] 正向野生型引物：5' -TTTCCCACTATCATTGATTATTTCCCG-3'，
[0022] 正向突变型引物：5' -TTTCCCACTATCATTGATTATTTCCCA-3'，
[0023] 反向共用引物：5' -AACTAGTCAATGAATCACAGATACGC-3'；
[0024] CYP2C19*3基因636G>A位点：
[0025] 正向野生型引物：5' -ATCAGGATTGTAAGCACCCCTGG-3'，
[0026] 正向突变型引物：5' -ATCAGGATTGTAAGCACCCCTGA-3'，
[0027] 反向共用引物：5' -GATATTCACCCCATGGCTGTCTA-3'；
[0028] CYP2C19*17基因-806C>T位点：
[0029] 正向野生型引物：5' -GCATTATCTCTTACATCAGAGATG-3'，
[0030] 正向突变型引物：5' -GCATTATCTCTTACATCAGAGATA-3'，
[0031] 反向共用引物：5' -ATCTCTCGGGCTGTTTTCTTAGATAA-3'；
[0032] PTGS1基因-842A>G位点：
[0033] 正向野生型引物：5' -GATAACTGAGCACCTACTACATGCTGGA-3'，
[0034] 正向突变型引物：5' -GATAACTGAGCACCTACTACATGCTGGG-3'，
[0035] 反向共用引物：5' -CAAGTACTTATCTTTTCTAGCCCTC-3'；
[0036] SLC01B1基因388A>G位点：
[0037] 正向野生型引物：5' -AGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGAATT-3'，
[0038] 正向突变型引物：5' -AGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGAATC-3'，
[0039] 反向共用引物：5' -CACATGCTGGGAAATTGACAGAAAGTA-3'；
[0040] SLC01B1基因521T>C位点：
[0041] 正向野生型引物：5' -GAATCTGGGTCATACATGTGGATATATGT-3'，
[0042] 正向突变型引物：5' -GAATCTGGGTCATACATGTGGATATATGC-3'，
[0043] 反向共用引物：5' -TAGACAAAGGGAAAGTGATCATAA-3'。
[0044] 在该PCR复合扩增体系中还能扩增下述对照位点：性别Amel基因、人类身份识别位点D5S818和Th01，所述该PCR复合扩增体系中含有扩增该对照位点的引物组合物：
[0045] 对照Amel位点：
[0046] 正向引物：5' -CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAG-3'，
[0047] 反向引物：5' -ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'；
[0048] 对照D5S818位点：
[0049] 正向引物：5' -GTGGTGTCCAGATAATCTGTAC-3'，
[0050] 反向引物：5' -GGTGAATAACTCCAAATACTCC-3'；
[0051] 对照Th01位点：
[0052] 正向引物：5' -AGGCTCTAGCAGCAGCTCATG-3'，
[0053] 反向引物：5' -CTGGAAATGACACTGCTACAACCTC-3'。

[0054] 所述引物的序列上添加有修饰或以修饰碱基取代正常碱基,所述修饰为荧光基团修饰、磷酸化修饰、硫代磷酸化修饰、锁核酸修饰或肽核酸修饰。

[0055] 所述引物3'端-2至-15位改动1至3个碱基或/和在引物3'端-15位之后的序列进行改动,所述改动包括末端增加其他序列、删除部分末端序列、改变部分碱基序列。

[0056] 所述8个SNP位点和3个对照位点分别由两种颜色的荧光标记,相同荧光标记视为同一组,两组分别为:第一组PTGS1基因-842A>G位点、CYP2C19*3基因636G>A位点、CYP2C19*17基因-806C>T位点、CYP2C19*2基因681G>A位点、D5S818位点;第二组Ame1位点、ApoE基因388T>C位点、SLCO1B1基因521T>C位点、SLCO1B1基因388A>G位点、ApoE基因526C>T位点、Th01位点。

[0057] 所述第一组荧光标记为FAM,第二组荧光标记为HEX。

[0058] 所述8个SNP位点的荧光标记位于反向共用引物的5'端,所述对照位点的荧光标记位于正向引物的5'端。

[0059] 所述氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药相关基因联合检测体系,能同时扩增4个基因的8个多态性位点和3个对照位点。该体系中包含11个位点及在体系中的分组见表1:

[0060] 表1检测位点列表

	基因	Rs 号	位点
第一组 荧光	<i>PTGS1</i>	<i>rs10306114</i>	-842 A>G
	<i>CYP2C19</i>	<i>rs4986893</i>	*3: 636 G>A
	<i>CYP2C19</i>	<i>rs12248560</i>	*17: -806 C>T
	<i>CYP2C19</i>	<i>rs4244285</i>	*2: 681 G>A
	<i>D5S818</i>	-	-
第二组 荧光	<i>Ame1</i>	-	-
	<i>ApoE</i>	<i>rs429358</i>	388 T>C
	<i>SLCO1B1</i>	<i>rs4149056</i>	521 T>C
	<i>SLCO1B1</i>	<i>rs2306283</i>	388 A>G
	<i>ApoE</i>	<i>rs7412</i>	526 C>T
	<i>Th01</i>	-	-

[0062] 所述第一组荧光标记为FAM,第二组荧光标记为HEX,其中所述两组位点从上往下的顺序均为实际检测结果图中从小到大的片段排列顺序。

[0063] 优选方案:

[0064] ApoE基因388T>C位点:

[0065] 正向野生型引物: 5'-ACGGTACTGCACCAGGCGGCCGGA-3',

[0066] 正向突变型引物: 5'-GATTCCGGTACTGCACCAGGCGGCCCG-3',

[0067] 反向共用引物: 5'-HEX-TCGGAAGTGGAGGAACAAGTAC-3' ;

[0068] ApoE基因526C>T位点:

- [0069] 正向野生型引物: 5'-GCCGGCCTGGTACACTGCCAGCCG-3',
- [0070] 正向突变型引物: 5'-GATTACCGGCCTGGTACACTGCCAGGGA-3',
- [0071] 反向共用引物: 5'-HEX-TCGGAAGTGGAGGAACAAGTAC-3' ;
- [0072] CYP2C19*2基因681G>A位点:
- [0073] 正向野生型引物: 5'-TTTCCCCTATCATTGACTATTTCCAG-3'
- [0074] 正向突变型引物: 5'-AGCTTTTCCCCTATCATTGATTATTTGCCA-3'
- [0075] 反向共用引物: 5'-FAM-AACTAGTCAATGAATCACAGATACGC-3'
- [0076] CYP2C19*3基因636G>A位点:
- [0077] 正向野生型引物: 5'-GTTATCAGGATTGTAAGCACCCCTAG-3'
- [0078] 正向突变型引物: 5'-GTTAACAATCAGGATTGTAAGCACCCCATGA-3'
- [0079] 反向共用引物: 5'-FAM-GATATTCACCCCATGGCTGTCTA-3'
- [0080] CYP2C19*17基因-806C>T位点:
- [0081] 正向野生型引物: 5'-ATTGCATTATCTCTTACATCAGTGATG-3'
- [0082] 正向突变型引物: 5'-ATTAGGCGCATTATCTCTTACATCAGAGCTA-3'
- [0083] 反向共用引物: 5'-FAM-ATCTCTCGGGCTGTTTTCTTAGATAA-3'
- [0084] PTGS1基因-842A>G位点:
- [0085] 正向野生型引物: 5'-AACTGAGCACCTACTACATGCTGCA-3' ,
- [0086] 正向突变型引物: 5'-ATGCAACTGAGCACCTACTACATGCTTGG-3', 反向共用引物: 5'-CAAGGTACTTATCTTTTCTAGCCCTC-3' ;
- [0087] SLC01B1基因388A>G位点:
- [0088] 正向野生型引物: 5'-AGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGAAAT-3'
- [0089] 正向突变型引物: 5'-GATTAGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGATTC-3'
- [0090] 反向共用引物: 5'-HEX-CACATGCTGGGAAATTGACAGAAAGTA-3'
- [0091] SLC01B1基因521T>C位点:
- [0092] 正向野生型引物: 5'-ATGGGTCATACATGTGGATATACGT-3'
- [0093] 正向突变型引物: 5'-GAATCTGGGTCATACATGTGGATATGTGC-3'
- [0094] 反向共用引物: 5'-HEX-TAGACAAAGGGAAAGTGATCATACA-3'
- [0095] 对照Ame1位点:
- [0096] 正向引物: 5'-HEX-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAG-3'
- [0097] 反向引物: 5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'
- [0098] 对照D5S818位点:
- [0099] 正向引物: 5'-FAM-GTGGTGTCCAGATAATCTGTAC-3'
- [0100] 反向引物: 5'-GGTGAATAACTCAAATACTCC-3'
- [0101] 对照Th01位点:
- [0102] 正向引物: 5'-HEX-AGGCTCTAGCAGCAGCTCATG-3'
- [0103] 反向引物: 5'-CTGGAAATGACACTGCTACAACCTC-3' 。
- [0104] 本发明所述检测体系,采用的是等位基因特性PCR (allele-specific PCR, ASPCR)

结合定量荧光PCR(Quantitative Fluorescent PCR, QF-PCR)的方法对目的位点进行扩增,通过毛细管电泳进行扩增产物的检测,完成对目的位点分型的检测。对于每个检测位点设置三条引物,对两种分型分别设置一条不同长度的特异引物,以及一条荧光标记的下游引物。每条特异引物只能与对应基因型的DNA模板结合并进行扩增。完成PCR扩增和毛细管电泳检测后,通过特定荧光标记、特定长度的扩增产物的有无即可判定样本特定位点是否存在特定基因型。

[0105] 上述氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药相关基因联合检测体系所对应的检测试剂盒,包括酶混合液、扩增缓冲液、引物混合物,或以上成分的预混液(PCR Master Mix)。

[0106] 所述试剂盒还包含以下成分:热启动DNA Taq酶、UDG酶和2×Buffer、阳性对照DNA、阴性对照和内标ROX500。

[0107] 所述氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药相关基因联合检测体系的使用方法,主要包括以下步骤:PCR扩增、遗传分析仪检测扩增产物、数据分析、检测结果的判断。

[0108] 本发明方法的特点:

[0109] 1) 使用遗传分析仪通过毛细管电泳检测扩增产物:

[0110] 遗传分析仪检测平台是广泛使用的主流检测平台之一,通过毛细管电泳对荧光标记的扩增产物进行检测,检测的主要技术优势在于:

[0111] ①,检测灵敏度高。

[0112] 毛细管电泳结合使用荧光染料大幅提高了检测灵敏度,比琼脂糖电泳检测灵敏度高100倍以上。能更灵敏地检测到扩增产物,并且明确区分扩增野生型和突变型。另一方面,由于检测灵敏度高,为复合PCR扩增反应提供了更大调整空间。更重要的是,由于检测灵敏度高,降低了对PCR扩增产物量的要求,可以降低PCR反应模板用量、可以降低PCR扩增循环数,节约检材。

[0113] ②,检测分辨率高。

[0114] 在通常利用的100-500bp检测范围内可清晰、有效地区分1bp差异。如此高的分辨率使得不会由于产物大小接近而产生误判,也避免了非特异扩增引起的结果误判。另一方面,高分辨率还使得同时检测更多位点成为可能。

[0115] ③,可以同时检测2种荧光信号检测。更进一步拓展了检测范围,使得同时检测更多位点成为可能。

[0116] ④,检测速度快(40分钟)、需要操作少、可自动化大批量检测。

[0117] ⑤,检测结果可利用软件自动分析判型。

[0118] 2) 通过一个多重复合PCR扩增体系能够同时扩增多个位点:

[0119] 本专利利用一个多重复合PCR扩增体系,实现与心血管个性化用药有关4个基因8个多态性位点的检测。其优势在于:

[0120] ①,极大降低操作强度和检测成本。只一个PCR扩增和一个遗传分析仪检测反应即可完成全部检测。

[0121] ②,单管扩增检测,最大程度上避免了污染和样品混淆等错误。

[0122] 3) 位点全面:

[0123] 本体系涵盖了与氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药相关基因多态性位点8个,可以为多种药物的个性化用药提供参考,为临床医生提供了更多的患者信息。

[0124] 4) 直扩体系与防污染措施:

[0125] 本扩增体系可以直接使用血液、血卡等检材扩增,免除了DNA提取的步骤,操作更加简便,适合于批量操作。另体系中加入了UDG-dUTP防污染措施,可以有效防止产物污染,避免引起假阳性结果。

[0126] 综上,本专利技术路线应用于氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药相关基因多态性联合检测。主要优点包括:每个样品只需一个扩增检测反应,一管反应可以得到8个位点的检测结果,相对于市面上的其它检测方法极大降低了操作强度;4小时内可得到结果。

[0127] 本发明与现有技术相比具有下列优点和效果:

[0128] 1、本发明基于多重PCR和毛细管电泳技术,一管式扩增,同时对与氯吡格雷、他汀和阿司匹林这三类药物代谢相关的4个基因,8个SNP位点进行检测,用于与这4个基因多态性有关的药物用量的指导,既节约了生产成本和检测成本,又提高了检测效率;此外引入Ame1性别位点为内参照用于监测整个反应系统以及评估模板的质量,避免假阴性结果,引入D5S818、Th01两个个体识别位点为内对照,监测操作中可能出现的样本之间的交叉污染。

[0129] 2、增加了CYP2C19*17分型(超快代谢型)检测,分型功能更加全面;

[0130] 3、本发明可以实现血液和血卡的直接扩增,无需任何处理,免除了提取DNA的步骤,同时整合UDG酶-dUTP防污染体系,缩短了样本处理时间,减少了污染的发生;

[0131] 4、本发明利用测序仪检测平台,通过毛细管电泳对荧光标记的扩增产物进行检测,灵敏度高,操作简单,分型结果直观易判读。整个流程3小时内完成全部检测,人工操作时间小于30分钟;

[0132] 5、本发明检测通量高,具备大批量扩增检测能力。

附图说明

[0133] 图1为遗传分析仪对样品A的血液扩增产物进行检测的结果图谱,

[0134] 图2为遗传分析仪对样品A的DNA扩增产物进行检测的结果图谱。

具体实施方式

[0135] 下面结合实施例对本发明做进一步的详细说明。

[0136] 实施例:一种氯吡格雷、他汀及阿司匹林个性化用药相关基因联合检测试剂盒及其对血液和DNA样本进行扩增检测的方法

[0137] 一、检测体系

[0138] 试剂盒包含PCR Master Mix、阳性对照、阴性对照、内标。其中PCR Master Mix主要组分包含热启动DNA Taq酶、UDG酶、扩增缓冲液及各位点引物等。

[0139] 根据等位基因特异性PCR原理,每条特异引物只能与对应基因型的DNA模板结合并进行扩增。为此目的,对各引物进行了一系列特定的改动或修饰。为了协调扩增效率、改进产物峰型、便于毛细管电泳检测,也对引物进行了一系列特定的改动或修饰。本实施例所采用的经过改进优化的引物序列如下:

[0140] ApoE基因388T>C位点:

[0141] 正向野生型引物:5'-ACGGTACTGCACCAGGCGGCCGGA-3',

[0142] 正向突变型引物:5'-GATTCCGGTACTGCACCAGGCGGCCCCG-3',

- [0143] 反向共用引物:5' -HEX-TCGGA^AACTGGAGGAACA^AACTGAC-3' ;
- [0144] ApoE基因526C>T位点:
- [0145] 正向野生型引物:5'-GCCGGCCTGGTACACTGCCAGCCG-3',
- [0146] 正向突变型引物:5'-GATTACCGGCCTGGTACACTGCCAGGGA-3',
- [0147] 反向共用引物:5' -HEX-TCGGA^AACTGGAGGAACA^AACTGAC-3' ;
- [0148] CYP2C19*2基因681G>A位点:
- [0149] 正向野生型引物:5' -TTTCCC^AACTATCATTGACTATTTCCAG-3'
- [0150] 正向突变型引物:5'-AGCTTTTCCCACTATCATTGATTATTTGCCA-3'
- [0151] 反向共用引物:5' -FAM-AACTAGTCAATGAATCAGATACGC-3'
- [0152] CYP2C19*3基因636G>A位点:
- [0153] 正向野生型引物:5'-GTTATCAGGATTGTAAGCACCCCCTAG-3'
- [0154] 正向突变型引物:5'-GTTAACAATCAGGATTGTAAGCACCCCATGA-3'
- [0155] 反向共用引物:5' -FAM-GATATTCACCCCATGGCTGTCTA-3'
- [0156] CYP2C19*17基因-806C>T位点:
- [0157] 正向野生型引物:5'-ATTGCATTATCTCTTACATCAGTGATG-3'
- [0158] 正向突变型引物:5'-ATTAGGCGCATTATCTCTTACATCAGAGCTA-3'
- [0159] 反向共用引物:5' -FAM-ATCTCTCGGGCTGTTTTCTTAGATAA-3'
- [0160] PTGS1基因-842A>G位点:
- [0161] 正向野生型引物:5' -AACTGAGCACCTACTACATGCTGCA-3' ,
- [0162] 正向突变型引物:5'-ATGCAACTGAGCACCTACTACATGCTTGG-3',
- [0163] 反向共用引物:5' -CAAGGTACTTATCTTTTCTAGCCCTC-3' ;
- [0164] SLC01B1基因388A>G位点:
- [0165] 正向野生型引物:5' -AGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGAAAT-3'
- [0166] 正向突变型引物:5'-GATTAGGTCGATGTTGAATTTTCTGATGATTC-3'
- [0167] 反向共用引物:5' -HEX-CACATGCTGGGAAATTGACAGAAAGTA-3'
- [0168] SLC01B1基因521T>C位点:
- [0169] 正向野生型引物:5'-ATGGGTCATACATGTGGATATACGT-3'
- [0170] 正向突变型引物:5' -GAATCTGGGTCATACATGTGGATATGTGC-3'
- [0171] 反向共用引物:5' -HEX-TAGACAAAGGGAAAGTGATCATACA-3'
- [0172] 对照Ame1位点:
- [0173] 正向引物:5' -HEX-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAG-3'
- [0174] 反向引物:5' -ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'
- [0175] 对照D5S818位点:
- [0176] 正向引物:5' -FAM-GTGGTGTCCCAGATAATCTGTAC-3'
- [0177] 反向引物:5' -GGTGAATAACTCCAAATACTCC-3'
- [0178] 对照Th01位点:
- [0179] 正向引物:5' -HEX-AGGCTCTAGCAGCAGCTCATG-3'

[0180] 反向引物:5' -CTGGAAATGACACTGCTACAACCTC-3'。

[0181] 注:1. “-”单下划线代表各引物在引物3'端-2至-15位改动1至3个碱基。

[0182] 2. “=”双下划线代表各引物可以在引物3'端-15位之后的序列进行改动,包括末端增加其他序列、删除部分末端序列、改变部分碱基序列。

[0183] 3.所有检测位点反向共用引物均在5'端进行FAM或HEX荧光标记。

[0184] 4.对照位点正向引物均在5'端进行FAM或HEX荧光标记。

[0185] 二、检测方法

[0186] 步骤1:PCR扩增反应

[0187] 1) PCR预混溶液分装(在试剂准备区完成)

[0188] 振荡混匀PCR预混溶液(PCR Master Mix),预计进行4个检测数,每个PCR反应管分装19 μ L。

[0189] 2) 加入模板(在标本制备区完成)

[0190] 检测模板为血液样本和DNA样本,向对应PCR反应管中加入模板,1 μ L血液样本、1 μ L DNA样品、1 μ L阳性对照和1 μ L阴性对照。

[0191] 3) PCR扩增(在扩增区完成)

[0192] 将各反应管放入PCR扩增仪反应槽内,设置反应体系为20 μ L。

[0193] 按表2反应程序进行PCR扩增:

[0194] 表2PCR扩增反应程序

[0195]	UDG 酶消化	50 °C, 10 分钟	
	变性	95 °C, 5 分钟	
	扩增	98 °C, 10 秒	32 个循环
		60 °C, 30 秒	
		72 °C, 30 秒	
	扩增后延伸	72 °C, 10 分钟	
	低温保存	4 °C 或 15 °C	

[0196] 步骤2:扩增产物进行毛细血管电泳检测

[0197] 配制混有分子量内标和甲酰胺的上样混合液:(0.5 μ L分子量内标+8.5 μ L甲酰胺) \times 检测样品数,涡旋振荡混匀10-15秒;用移液器给每个检测孔分装9 μ L的甲酰胺和内标混合物;取1 μ L扩增产物加入甲酰胺和内标混合物里,盖上封板胶盖。如果需要可以使用离心机短暂离心将样品中的气泡除掉;把样品放置95 $^{\circ}$ C变性3分钟,迅速放置冰浴上3分钟。按照遗传分析仪用户使用手册步骤进行检测。检测建议设置进样时间为10秒、进样电压为3kV、运行时间为1800秒。

[0198] 步骤3:数据分析

[0199] 向GeneMapper软件中导入相关文件,包括Panel、Bin、对应的Analysis Method、ROX500内标。输入样品源数据(.fsa文件),在相关参数选择栏中选定之前导入的文件,分析数据。

[0200] 步骤4:检测结果的判定

[0201] 如图所示,图1为血液样本的扩增检测结果图,图2为DNA样本的扩增结果图,其中图中野生型SNP标识为“WT”,突变型则标识为“Mu”。Ame1位点男性样本显示为“XY”,女性样

本则显示为“X”。

[0202] 各位点分型结果如下表3:

[0203] 表3样本检测结果

[0204]

检测基因	检测位点	血液样本检测结果	DNA 样本检测结果
<i>ApoE</i>	<i>ApoE</i> : 388T>C	TT	TT
	<i>ApoE</i> : 526C>T	CT	CT
<i>CYP2C19</i>	<i>CYP2C19</i> *2: 681G>A	GA	GA
	<i>CYP2C19</i> *3: 636G>A	GG	GG
	<i>CYP2C19</i> *17: -806C>T	CC	CC
<i>PTGS1</i>	<i>PTGS1</i> : -842A>G	AA	AA
<i>SLCO1B1</i>	<i>SLCO1B1</i> : 388A>G	GG	GG
	<i>SLCO1B1</i> : 521T>C	TC	TC
<i>Amel</i>	X/Y	XY	XY

[0205] 由此可分别获得血液样本和DNA样本4个基因8个多态性位点的基因型,结果显示本体系对血液和DNA可兼容扩增且对结果无影响。

[0206] 临床医师可根据所检测的基因型对患者使用到的药物进行个性化用药。具体的个性化用药指导方案如下表4:

[0207] 表4用药指导方案

[0208]

相关药物	基因	检测结果		表型	临床用药建议
氯吡格雷		*1/*1	*2:GG *3:GG *17:CC	快 (EM)	常规标准剂量 (75mg/d)。
		*1/*2	*2:GA	中 (IM)	常规剂量疗效降低。可考虑增加剂量或选用不经代谢的抗血小板药物 (如替格瑞洛、普拉格雷等)。
		*1/*3	*3:GA		
		*2/*17	*2:GA *17:CT		
		*3/*17	*3:GA *17:CT		
		*2/*2	*2:AA	慢 (PM)	常规剂量疗效差, 血栓风险增加。可选用不经代谢的抗血小板药物 (如替格瑞洛、普拉格雷等)。加用西洛他唑, 双联抗血小板治疗改为三联治疗。
		*2/*3	*2:GA *3:GA		
		*3/*3	*3:GA		
		*1/*17	*17:CT	超快 (UM)	常规剂量心血管事件风险降低, 出血风险增加。可用常规剂量, 实时观察是否有出血。
		*17/*17	*17:TT		
他汀类药物	SLCO1B1	*1a/*1a	388:AA 521:TT	正常肌病风险	常规剂量
		*1a/*1b	388:AG 521:TT		

[0209]

		*1b/*1b	388:GG 521:TT	中等肌病风险	中等剂量
		*1a/*5	388:AA 521:TC		
		*1a/*15	388:AG 521:TC		
		*1b/*5	388:AG 521:TC		
		*1b/*15	388:GG 521:TC		
		*5/*5	388:AA 521:CC		
	*5/*15	388:AA 521:CC			
	*15/*15	388:GG 521:CC			
	APOE	E2/E2	388:TT 526:TT	注意黄斑变性、 III类高脂血症	阿托伐他汀、普伐他汀和洛伐他汀 有效，普罗布考和辛伐他汀无效
		E2/E3	388:TT 526:CT		
		E3/E3	388:TT 526:CC	无明显倾向性	所有他汀类药物均有效
		E2/E4	388:TC 526:CT		
E3/E4		388:TC 526:CC			
E4/E4		388:CC 526:CC	增加冠心病、心 梗、脑梗、老年 痴呆患病风险		
阿司匹 林	PTGS1	AA	-842:AA	应答较好	可按正常剂量使用。
		AG	-842:AG	应答中等	可按正常剂量使用。
		GG	-842:GG	抵抗高风险	可增加剂量使用。

[0210] 基于本实施例的样本基因分型检测结果，可对该患者的用药进行如下方案的调整：

[0211]

基因	基因型	表型	用药指导
<i>ApoE</i>	E2/E3	注意黄斑变性、III 类高脂血症	阿托伐他汀、普伐他汀和洛伐他汀有效， 普罗布考和辛伐他汀无效。
<i>SLCO1B1</i>	*1b/*15	中等肌病风险	他汀用量保持中等即可。
<i>CYP2C19</i>	*1/*2	中等代谢能力 (IM)	氯吡格雷常规剂量疗效降低。可考虑增 加剂量或选用不经代谢的抗血小板药物（如 替格瑞洛、普拉格雷等）。
<i>PTGS1</i>	AA	应答较好	可按正常剂量使用。

[0212] 综上所述，本发明的技术要领及特点，其目的在于让熟知此技术的业内人士能够了解本发明的内容并能以此实施。本发明的内容并不局限在上述的实施例中，凡根据本发

明技术思想实质所作的等效变化或修饰,都在本发明的保护范围之内。

序列表

<110>	北京阅微基因技术有限公司	
<120>	氯吡格雷、他汀及阿司匹林相关药物代谢基因分型检测复合扩增体系及试剂盒	
<141>	2019-08-07	
<160>	30	
<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	1	
	gcggtactgc accaggcggc cgca	24
<210>	2	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	2	
	gcggtactgc accaggcggc cgcg	24
<210>	3	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	3	
	tcggaactgg aggaacaact gac	23
<210>	4	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	4	
	cccggcctgg tacactgcca ggcg	24
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	5	
	cccggcctgg tacactgcca ggca	24
<210>	6	

<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 6	
tcggaactgg aggaacaact gac	23
<210> 7	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 7	
tttcccaacta tcattgatta tttcccg	27
<210> 8	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 8	
tttcccaacta tcattgatta tttccca	27
<210> 9	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 9	
aactagtcaa tgaatcacag atacgc	26
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 10	
atcaggattg taagcacccc ctgg	24
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 11	
atcaggattg taagcacccc ctga	24
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	

<400> 12	
gatattcacc ccatggctgt cta	23
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 13	
gcattatctc ttacatcaga gatg	24
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 14	
gcattatctc ttacatcaga gata	24
<210> 15	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 15	
atctctcggg ctgttttct tagataa	27
<210> 16	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 16	
gataactgag cacctactac atgctgga	28
<210> 17	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 17	
gataactgag cacctactac atgctggg	28
<210> 18	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 18	
caaggtaactt atcttttcta gccctc	26
<210> 19	

<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	19	
	aggtcgatgt tgaattttct gatgaatt	28
<210>	20	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	20	
	aggtcgatgt tgaattttct gatgaatc	28
<210>	21	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	21	
	cacatgctgg gaaattgaca gaaagta	27
<210>	22	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	22	
	gaatctgggt catacatgtg gatatatgt	29
<210>	23	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	23	
	gaatctgggt catacatgtg gatatatgc	29
<210>	24	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	24	
	tagacaaagg gaaagtgatc ataca	25
<210>	25	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	

<400> 25	
ccctgggctc tgtaaagaat ag	22
<210> 26	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 26	
atcagagctt aaactgggaa gctg	24
<210> 27	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 27	
gtggtgtccc agataatctg tac	23
<210> 28	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 28	
ggtgaataac tccaaatact cc	22
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 29	
aggctctagc agcagctcat g	21
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 30	
ctggaaatga cactgctaca actc	24

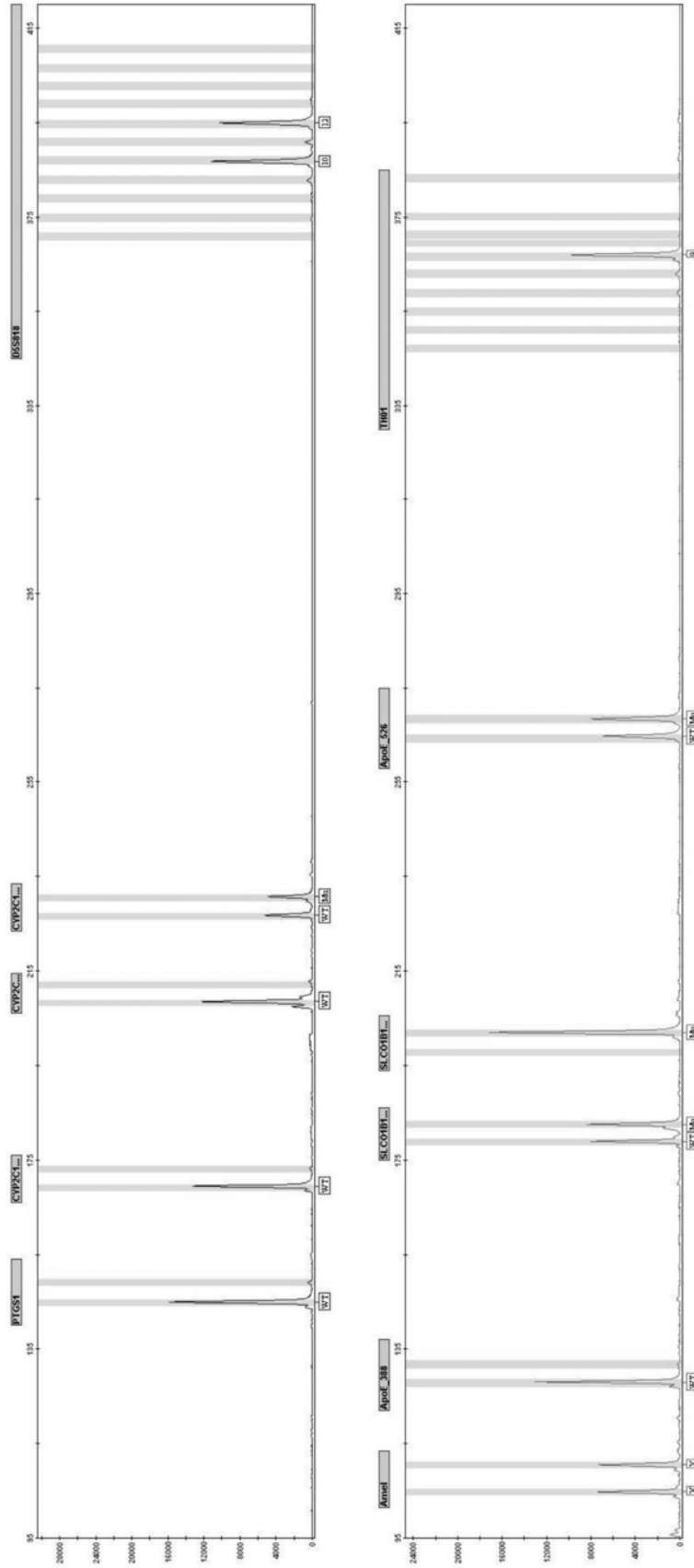


图1

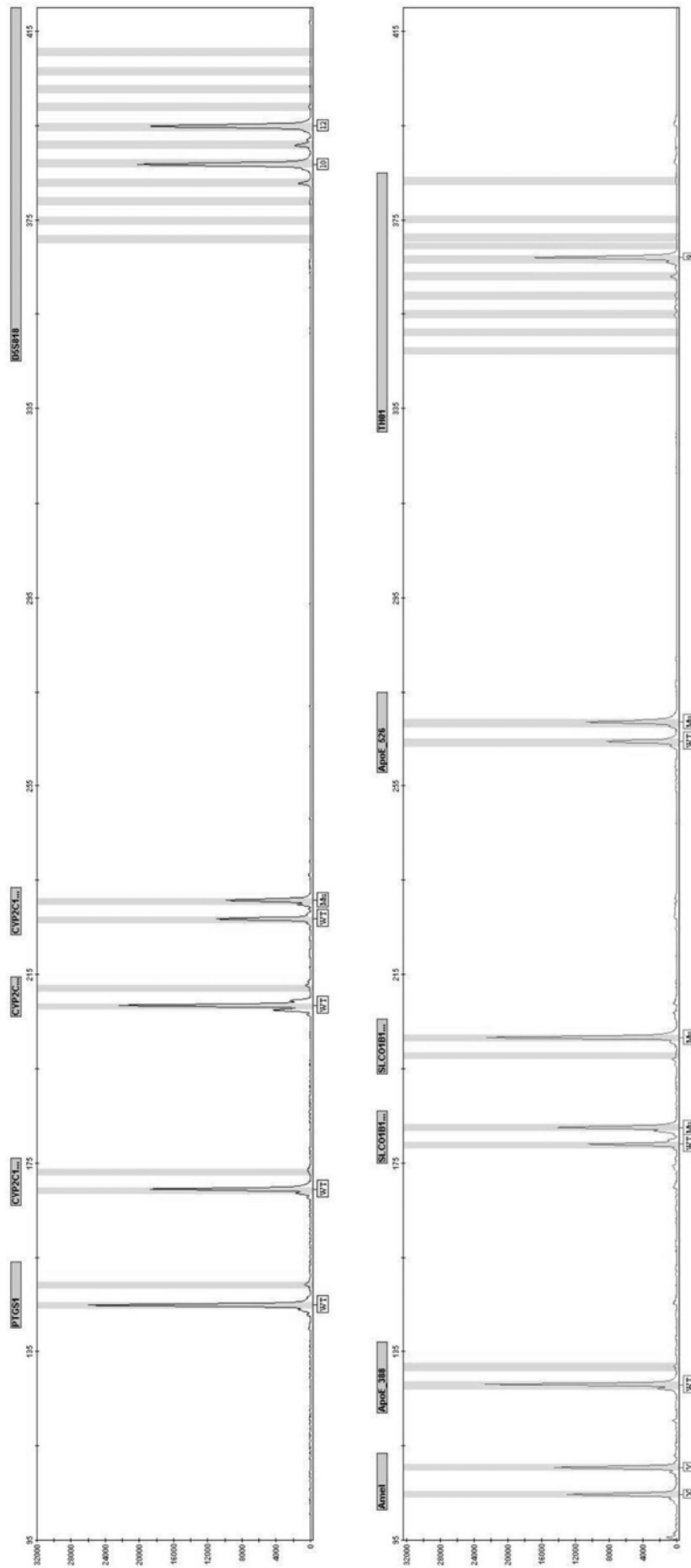


图2