



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105353131 B

(45)授权公告日 2017.04.19

(21)申请号 201510698254.X

(22)申请日 2015.10.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105353131 A

(43)申请公布日 2016.02.24

(73)专利权人 山东大学

地址 250061 山东省济南市历下区文化西路44号

(72)发明人 王磊 姜玮 李伟

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 曹丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(56)对比文件

CN 103940989 A,2014.07.23,

CN 103513027 A,2014.01.15,

CN 104762400 A,2015.07.08,

CN 102586450 A,2012.07.18,

CN 1808101 A,2006.07.26,

CN 102435730 A,2012.05.02,

WO 2004106928 A1,2004.12.09,

WO 0068692 A1,2000.11.16,

WO 2011100669 A2,2011.08.18,

Wei Li et al.Multiplexed Detection of Cytokines Based on Dual Bar-Code Strategy and Single-Molecule Counting.《Analytical Chemistry》.2015,第88卷(第3期),

崔庆新等.单分子检测在生物学和药理学研究中的应用.《生命的化学》.2008,第28卷(第1期),

Kagan Kerman et al.Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology.《Measurement Science and Technology》.2003,第15卷

审查员 李进进

权利要求书1页 说明书6页
序列表5页 附图1页

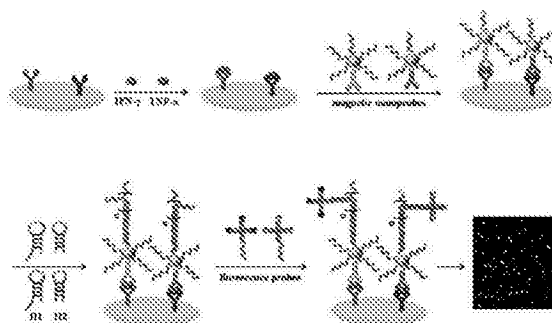
(54)发明名称

基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法,将一个玻璃基底上,通过抗原抗体的相互作用,分别固定目标物。同时,在磁纳米颗粒上修饰二抗和一级编码链,得到磁纳米探针。接着,利用二抗和抗原间的特异性结合作用,将磁纳米探针固定在基底上,形成三明治结构的免疫复合物。磁纳米探针上的一级条码链作为扩增单元触发多分枝的杂交链反应,生成带有多重分支的双链结构。该分支链即为二级编码链。最后,二级编码链与一种多分子标记的荧光探针结合,产生增强的荧光信号,通过清点荧光点的数目对目标物进行定量。该方法实现了细胞因子的多重、灵敏检测,两

种目标物的检测限均为5fM。



CN 105353131 B

1. 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法,其特征是:步骤如下:

(1) 首先将待测样品加入相应抗体包被的基底上,37℃孵育2h;(2) 利用PBS-T和PBS分别清洗后,加入磁纳米探针,37℃孵育2h后,形成三明治式的免疫复合物,除去未反应的磁纳米探针,所述磁纳米探针通过将二抗和寡核苷酸修饰到streptavidin-MNBs上制得;(3) 加入发夹结构混合物和HCR缓冲液,所述HCR缓冲液为50mM Na₂HP0₄,0.5M NaCl,pH6.8,37℃孵育4h,所述发夹结构与磁纳米探针上的寡核苷酸配对形成带有多条分支的长双链结构;(4) 利用PBS-T和PBS分别清洗后,加入荧光探针,37℃孵育4h,所述荧光探针是由四条单链DNA杂交产生的十字形结构,其一端是伸出的悬垂序列,另外三端都标记了荧光基团,所述悬垂序列与带有多条分支的长双链结构结合;(5) 利用PBS-T和PBS分别清洗,加入PBS,通过倒置显微镜数点进行计数。

2. 如权利要求1所述的检测方法,其特征是:所述待测样品为血清样品。

3. 如权利要求1所述的检测方法,其特征是:所述荧光探针是将三条荧光标记的单链DNA和一条长的单链DNA分别用TE缓冲液稀释,然后分别将各单链DNA加入TM缓冲液中,混匀,接着将混合物放入95℃的金属浴中,退火或淬火制得。

4. 如权利要求3所述的检测方法,其特征是:所述三条荧光标记的单链序列为:SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和一条长的单链DNA的序列为:SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:14。

5. 如权利要求1所述的检测方法,其特征是:所述步骤(1)中抗体包被基底的制备方法如下:向硅烷化的玻璃基底加入抗体37℃下过夜孵育;接着,加入质量浓度为5%的BSA溶液在37℃下封闭5-8h。

6. 如权利要求5所述的检测方法,其特征是:加入质量浓度为5%的BSA溶液在37℃下封闭6h。

7. 如权利要求1所述的检测方法,其特征是:所述步骤(2)中磁纳米探针的制备方法:首先,在外加磁场的作用下,将streptavidin-MNBs加入到TTL缓冲液中清洗,清洗完成后加入PBS使其悬浮,取streptavidin-MNBs溶液并加入生物素化的寡核苷酸,37℃下反应,将得到的悬浮液在外加磁场的作用下,用PBS清洗后最终产物即为磁纳米探针。

8. 如权利要求7所述的检测方法,其特征是:所述生物素化的寡核苷酸的序列为:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。

9. 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子检测试剂盒,其特征是:包括被检测细胞因子相应的一抗,硅烷化的玻璃基底,磁纳米探针,所述磁纳米探针通过将二抗和寡核苷酸修饰到streptavidin-MNBs上制得,发夹结构DNA,所述发夹结构DNA具有与所述磁纳米探针的寡核苷酸配对的碱基序列,并且配对形成带有多条分支的长双链结构,荧光探针,所述荧光探针是由四条单链DNA杂交产生的十字形结构,其一端是伸出的悬垂序列,另外三端都标记了荧光基团,所述悬垂序列与带有多条分支的长双链结构结合。

基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法。

背景技术

[0002] 细胞因子是由免疫细胞分泌的一类低分子蛋白,通常在免疫反应中发挥着信号转导的作用。最近,研究发现一些细胞因子介导的信号通路与肿瘤细胞的生存、入侵和转移有关,因此这些细胞因子已被当做癌症诊断和治疗的生物标志物。然而,由于一种癌症可能有多个标志物或者一种标志物可能对应多种癌症,因此利用多种生物标志物对癌症进行检测更加准确可行。

[0003] 常用的细胞因子检测方法是酶联免疫吸附测试(ELISA),该方法需要首先将细胞因子固定在特异性抗体上,然后利用酶或荧光团标记的二抗对其进行检测。但是由于该方法中目标物与信号的比例是1:1,其灵敏度仍然受到限制。另外,对于多重检测来说,这种方法也具有易产生假阳性信号、光谱重叠、淬灭效率不均一和仪器要求复杂等缺点。为了解决这些问题,多分子标记的微球、纳米线、条码策略和杂交链反应等被用于提高细胞因子检测的灵敏度。其中,条码策略具有很高的扩增效率,已被广泛用于生物标志物的灵敏检测。

[0004] 条码分析作为一种灵敏的分析策略,是一种将短的寡核苷酸序列作为替代目标物的生物分析方法。传统的条码分析通常包括磁纳米颗粒和金属纳米颗粒,它们都修饰了识别单元,因此都能够识别目标物并形成三明治结构。另外,金属纳米颗粒上还修饰了大量的寡核苷酸序列,即条码链。由于纳米颗粒的富集作用,少量目标物序列即可被转化为大量条码链,因此这种方法通常具有很高的灵敏度。基于条码扩增策略,Mirkin课题组构建了一个蛋白类癌症标志物的多重检测方法,检测限达170pM。但是由于此类癌症标志物在血清中的含量极低,其灵敏度仍然无法满足实际检测的需要。此外,该方法需要将条码链从纳米颗粒上释放,增加了检测的复杂性。

发明内容

[0005] 本发明的目的就是为了解决上述问题,提供一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法,步骤如下:(1)将目标物的抗体固定在硅烷化的玻璃基底上;(2)将目标物和磁纳米探针依次加入到上述的玻璃基底上形成三明治式的免疫复合物,所述磁纳米探针通过将二抗和寡核苷酸修饰到streptavidin-MNBs上制得,所述的寡核苷酸链作为一级条码链;(3)上述的一级条码链作为扩增原件触发多分枝的杂交链反应,产生带有多条分支的长双链结构;(4)所述的长双链结构作为二级条码链与多分子标记的荧光探针结合,产生荧光;(5)通过数点进行计数。

[0008] 具体的:一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法,步骤如下:

[0009] 首先将待测样品(优选血清)加入相应抗体包被的基底上,37℃孵育1-3h(优选

2h),利用PBS-T和PBS分别清洗后,加入磁纳米探针,37℃孵育1-3h(优选2h)后,除去未反应的磁纳米探针;接着,加入发夹结构混合物,和HCR缓冲液,37℃孵育2-4h(优选3h),利用PBS-T和PBS分别清洗后,加入荧光探针,37℃孵育3-5h(优选4h),最后利用PBS-T和PBS分别清洗,加入PBS,在倒置显微镜下进行成像。

[0010] 优选:抗体被基体的制备:向硅烷化的玻璃基底加入抗体37℃下过夜孵育;接着,加入质量浓度(w/v)5%(取5μg BSA粉末加入到100μL PBS缓冲液中即得。)的BSA(牛血清蛋白)溶液在37℃下封闭5-8h(优选6h)。

[0011] 优选:磁纳米探针的制备:首先,在外加磁场的作用下,将streptavidin-MNBs加入到TTL缓冲液中清洗,清洗完成后加入PBS使其悬浮,取streptavidin-MNBs溶液并加入生物素化的条码链(1-bio-strand和2-bio-strand,序列见表1),37℃下反应,将得到的悬浮液在外加磁场的作用下,用PBS清洗后最终产物即为磁纳米探针,加入PBS备用;

[0012] 优选:多分子标记荧光探针的组装:首先将三条荧光标记的单链DNA(1-Ca,1-Cb,1-Cc或2-Ca,2-Cb,2-Cc序列见表1)和一条长的单链DNA(1-Cd或2-Cd序列见表1)分别用TE缓冲液稀释;然后分别将各单链DNA加入TM缓冲液中,混匀;接着将混合物放入95℃的金属浴中,退火或淬火,制得荧光探针。

[0013] 上述的方法应用于非诊断目的体外检测样品。

[0014] 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子检测试剂盒,其特征是:包括被检测细胞因子相应的一抗,硅烷化的玻璃基底,磁纳米探针,所述磁纳米探针被检测细胞因子相应的二抗和寡核苷酸修饰,发夹结构DNA,所述发夹结构DNA具有与所述磁纳米探针的寡核苷酸配对的碱基序列,并且配对形成带有多条分支的长双链结构,荧光探针,所述荧光探针是由四条单链DNA杂交产生的十字形结构,其一端是伸出的悬垂序列,另外三端都标记了荧光基团,所述悬垂序列与带有多条分支的长双链结构结合。

[0015] 本发明的有益效果:

[0016] 本发明的方法首次将条码分析和单分子计数相结合用于蛋白质的检测,方法的灵敏度为5fM,且能够实现复杂样本中两种以及两种以上目标物的同时检测。此外,我们对人血清样本进行了分析,说明这种方法是可靠的,在临床检测中具有很大的应用潜力。

[0017] 该方法不需要将条码链从纳米颗粒上释放,步骤简单。

附图说明

[0018] 图1为本发明方法的原理图;

[0019] 图2为荧光探针的凝胶电泳分析,1-5条带是淬火产物的电泳图像,6-10是由退火产物的电泳图像,分别是1-Cd、1-Cd+1-Cc、1-Cd+1-Cc+1-Cb、1-Cd+1-Cc+1-Ca和1-Cd+1-Cc+1-Cb+1-Ca,M是marker;

[0020] 图3为荧光点数与目标物浓度的线性关系图;

[0021] 图4为不同目标物的荧光响应,1是牛血清白蛋白,2是凝血酶,3是IgG,4是甲胎蛋白,5是癌胚抗原,6是IFN-γ和TNF-α。

具体实施方式

[0022] 试剂和材料人肿瘤坏死因子α(TNF-α)、重组人干扰素γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子α

抗体(anti-TNF- α)、生物素化肿瘤坏死因子 α 抗体(bio-anti-TNF- α)、干扰素 γ 抗体(anti-IFN- γ)、生物素化的干扰素 γ 抗体(bio-anti-IFN- γ)和人Ig G购自Abcam公司。链霉亲和素化的磁球(streptavidin-MNBs,350nm)购自Bangs Laboratories公司。牛血清白蛋白(BSA)购自上海生工生物工程有限公司(上海)。实验中用到的所有溶液都是由超纯水配制,所有核酸序列由英潍捷基有限公司合成(北京)。

[0023] 仪器落射荧光显微镜系统(Olympus Optical Co.Ltd,Tokyo,Japan),主要包括倒置显微镜(Olympus IX 81),卤素灯(Olympus LG-PS2),倒置荧光显微镜控制单元(Olympus IX2-UCB),电子多级放大电感耦合器(Electron Multiplying Charge Coupled Device,EMCCD,Cascade 512B,Roper Scientific,Tuscon,AZ,USA),MetaMorph软件系统(Universal Imaging,Downingtown,PA,USA);精密光学隔振平台(上海亿奥信息光学科技有限公司,上海);超声清洗机(Branson-200型,中美合资必能信超有限公司,上海);DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司,上海);DNP-9052型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司,上海)。

[0024] 抗体包被基底的制备首先制备硅烷化的玻璃基底,然后向基底加入50 μ L相应抗体(anti-IFN- γ and anti-TNF- α ,0.01nM)过夜孵育。接着,加入5%的BSA溶液在37 $^{\circ}$ C下封闭6h。每一步完成后都要分别用PBS-T(0.15M NaCl,7.6mM Na₂HPO₄,2.4mM NaH₂PO₄,0.05%吐温-20,PH 7.4)和PBS(0.15M NaCl,7.6mM Na₂HPO₄,2.4mM NaH₂PO₄,pH 7.4)缓冲液清洗三次,以出去未反应的试剂。

[0025] 磁纳米探针的制备首先,在外加磁场的作用下,将2 μ L streptavidin-MNBs加入到200 μ L TTL缓冲液(100mM Tris,1M LiCl,0.1%Tween-20,pH 8.0)中清洗5次。清洗完成后加入60 μ L PBS使其悬浮。然后,取30 μ L streptavidin-MNBs溶液并加入10 μ L生物素化的条码链(1-bio-strand和2-bio-strand,核苷酸序列见表1),37 $^{\circ}$ C下反应5h。接着,将得到的悬浮液在外加磁场的作用下,用PBS清洗三次。最终产物即为磁纳米探针,加入50 μ L PBS备用。

[0026] 多分子标记荧光探针的组装和电泳验证首先将三条荧光标记的单链DNA(1-Ca,1-Cb,1-Cc or 2-Ca,2-Cb,2-Cc,核苷酸序列见表1)和一条长的单链DNA(1-Cd或2-Cd,核苷酸序列见表1)分别用TE缓冲液(10mM Tris,1mM Na₂EDTA,pH 8.0)稀释至10 μ M。然后分别取10 μ L各单链DNA加入60 μ L TM缓冲液(20mM Tris,50mM MgCl₂,pH 8.0)中,混匀。接着将混合物放入95 $^{\circ}$ C的金属浴中,2min中降至30 $^{\circ}$ C(退火)或立刻放入4 $^{\circ}$ C的冰水中(淬火),继而得到两种方法产生的荧光探针,其终浓度为0.1 μ M。

[0027] 为了验证该荧光纳米探针的形成和选择最优的合成方法,我们利用12%的聚丙烯酰胺(native-PAGE)对其进行了电泳实验。

[0028] 基于双条码策略和单分子计数的多重分析方法的构建首先将50 μ L目标物(IFN- γ 和TNF- α)加入抗体包被的基底上,37 $^{\circ}$ C孵育2h。利用PBS-T和PBS分别清洗三次后,加入50 μ L磁纳米探针。37 $^{\circ}$ C孵育2h后,利用磁分离技术将未反应的磁纳米探针洗去。接着,加入50 μ L发夹结构混合物(各发夹结构的核苷酸序列见表1),包括10 μ L H1(1-H1和2-H1,0.2 μ M)、10 μ L H2(1-H2和2-H2,0.22 μ M)和30 μ L HCR缓冲液(50mM Na₂HPO₄,0.5NaCl,pH 6.8),37 $^{\circ}$ C下孵育4h。利用PBS-T和PBS分别清洗三次后,加入50 μ L荧光探针,37 $^{\circ}$ C下孵育4h。最后利用PBS-T和PBS分别清洗三次,加入50PBS,在倒置显微镜下进行成像。

[0029] 原理如图1,首先,通过环氧基-羟基反应,将目标物IFN- γ 和TNF- α 的抗体固定在

硅烷化的玻璃基底上,同时,通过将二抗和寡核苷酸修饰到streptavidin-MNBs上制备磁纳米探针。其中,二抗发挥分子识别的作用,寡核苷酸链即为一级条码链。接着,将目标物和磁纳米探针依次加入到基底上,通过抗原抗体间的免疫反应形成三明治式的免疫复合物。接下来,一级条码链作为扩增原件触发多分枝的杂交链反应(mHCR),产生带有多条分支的长双链结构。该分支作为二级条码链能够与多分子标记的荧光探针结合,产生荧光。最后通过倒置显微镜数点进行计数。

[0030] 多分子荧光探针的组装和表征

[0031] 发明人设计了一个标记有三个荧光分子的新型荧光探针,成为多分子标记的荧光探针。该探针是由四条单链DNA杂交产生的十字形结构,其一端是伸出的悬垂序列,另外三段都标记了荧光基团。

[0032] 发明人选择了两种方法,即退火和淬火分别对该探针进行合成,为了表征探针的成功合成并选择最佳方法,我们进行了电泳实验。如图2,5和10条带分别是由退火和淬火得到的荧光探针,从图中可以看出,退火的方法得到的探针条带更亮,说明产率更高。

[0033] 条件优化

[0034] 发明人分别对BSA封闭时间、一级编码链浓度、H1浓度、H2与H1的比例以及荧光探针孵育时间进行了优化。最终选择BSA封闭时间为6h,一级编码链浓度为0.2 μ M,H1浓度为0.2 μ M,H2/H1为1.1,荧光探针孵育时间为4h。

[0035] 方法学验证

[0036] 在最优条件下,发明人首先对方法的灵敏度进行了考察,如图3,在5fM-100fM范围内,荧光点数与目标物的线性关系良好,线性方程分别为 $Y_1=6.207+7.541C_1$ 和 $Y_2=5.034+7.555C_2$,对两种目标物的检测限均为5fM。

[0037] 接着,发明人对方法的特异性进行了考察,如图4,该方法仅对目标物具有较强的荧光响应,对其它目标物的荧光响应较小,说明这个方法具有很好的特异性。

[0038] 最后,发明人利用这种方法对人血清进行了分析,如表2,得到人血清中IFN- γ 和TNF- α 的量分别是 $1.04-1.07 \times 10^{-13}$ mol/L和 $3.29-5.26 \times 10^{-13}$ mol/L,实现了对血清中两种目标物的定量。

[0039] 表1 所用到的核酸序列

[0040]

序列(5'-3')	
1-bio-strand:	AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin (SEQ ID NO:1)
2-bio-strand:	CGT CGG CAT CTG ATC ACG CGC TTA TTT TTT TTT-biotin (SEQ ID NO:2)
1-H1:	TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG TAT ATA TAA TAA CCC ACC CGA CCG (SEQ ID NO:3)
1-H2:	AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG (SEQ ID NO:4)
2-H1:	TAA GCG CGT GAT CAG ATG CCG ACG TGC TGG CGT CGG CAT CTG ATC ACG AAA AAA TGT CTG GCC TCT CTA CCT GAT (SEQ ID NO:5)
2-H2:	CGT CGG CAT CTG ATC ACG CGC TTA CGT GAT CAG ATG CCG ACG CCA GCA (SEQ ID NO:6)
1-Ca:	AA ATG AAT AGC GGT CAG ATC CGT ACC TAC TCG-Cy5 (SEQ

[0041]

	ID NO:7)
1-Cb:	AA CAT ACG TAC AGC ACC GCT ATT CAT- Cy5 (SEQ ID NO:8)
1-Cc:	AA GTT CGC AAT ACG GCT GTA CGT ATG-Cy5 (SEQ ID NO:9)
1-Cd:	CGA GTA GGT ACG GAT CTG CGT ATT GCG AAC TTT TTT CGG TCG GGT GGG TTA TTA T (SEQ ID NO:10)
2-Ca:	AA ATG AAT AGC GGT CAG ATC CGT ACC TAC TCG-FAM (SEQ ID NO:11)
2-Cb:	AA CAT ACG TAC AGC ACC GCT ATT CAT-FAM (SEQ ID NO:12)
2-Cc:	AA GTT CGC AAT ACG GCT GTA CGT ATG-FAM (SEQ ID NO:13)
2-Cd:	CGA GTA GGT ACG GAT CTG CGT ATT GCG AAC TTT TTT ATC AGG TAG AGA GGC CAG AC (SEQ ID NO:14)

[0042] 表2 人血清定量检测

[0043]

样本	目标物	浓度 (mol/L)	RSD (n=3)
1	IFN- γ	1.06×10^{-13}	6.2%
	TNF- α	5.26×10^{-13}	3.2%
2	IFN- γ	1.04×10^{-13}	7.5%
	TNF- α	3.29×10^{-13}	2.7%
3	IFN- γ	1.07×10^{-13}	4.7%
	TNF- α	4.32×10^{-13}	5.6%

[0044] 上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范

围的限制,所属领域技术人员应该明白,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

SEQUENCE LISTING

<110> 山东大学

<120> 基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法

<130> 2015

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33

[0001]

<212> DNA

<213> 1-bio-strand

<400> 1

agtctaggat tcggcgtggg ttaattttt ttt-biotin 33

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> 2-bio-strand

<400> 2

cgtcggeatc tgatcacgcg cttattttt ttt-biotin 33

	<210> 3	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 1-H1	
	<400> 3	
	ttaacccaag ccgaatecta gactcaaagt agtctaggat tcggcgtgta tatataataa	60
	cccacccgac cg	72
	<210> 4	
	<211> 48	
[0002]	<212> DNA	
	<213> 1-H2	
	<400> 4	
	agtctaggat tcggcgtggg ttaacacgcc gaatcctaga ctactttg	48
	<210> 5	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 2-H1	
	<400> 5	
	catctgatca cgaaaaatg tetggcctct ctacctgat	39

<210> 6		
<211> 48		
<212> DNA		
<213> 2-H2		
<400> 6		
cgteggcadc tgaicacgcg cttacgtgat cagatgccga cgccagca		48
<210> 7		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> 1-Ca		
[0003]		
<400> 7		
aatgaatag cggtcagadc cgtacctact cg-Cy5		32
<210> 8		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> 1-Cb		
<400> 8		
aacatacgta cagcaccgct atfcac-Cy5		26
<210> 9		

	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 1-Cc	
	<400> 9	
	aagttcgcaa tacggctgta cgtatg -Cy5	26
	<210> 10	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 1-Cd	
	<400> 10	
[0004]	cgagtaggta cggatctgcg tattgcgaac tttttcggg eggggtgggtt attat	55
	<210> 11	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 2-Ca	
	<400> 11	
	aaatgaatag cggtcagatc cgtacctact cg-FAM	32
	<210> 12	
	<211> 26	
	<212> DNA	

<213> 2-Cb	
<400> 12	
aacatacgta cagcaccgct attcat-FAM	26
<210> 13	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 2-Cc	
[0005]	
<400> 13	
aagttcgcaa tacggetgta cgtatg-FAM	26
<210> 14	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> 2-Cd	
<400> 14	
cgagtaggta cggatctgcg tattgccaac tttttatca ggtagagagg ccagac	56

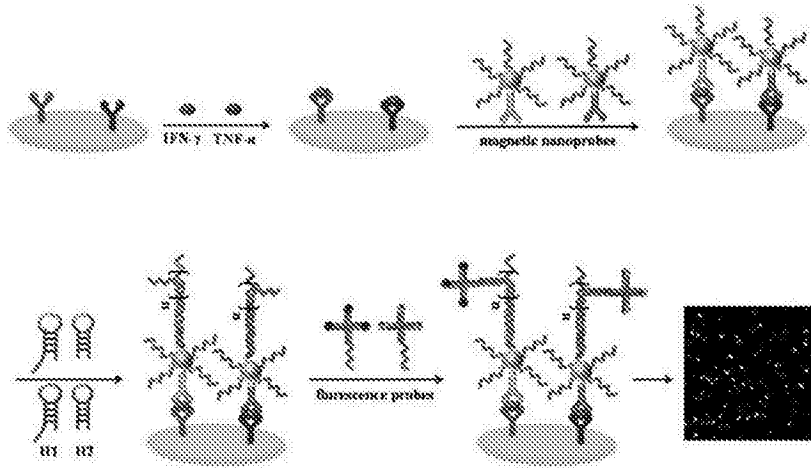


图1

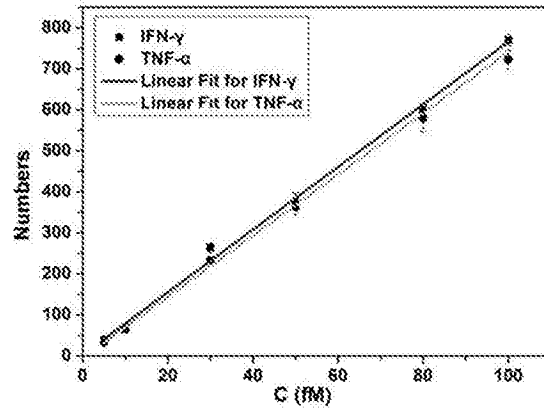
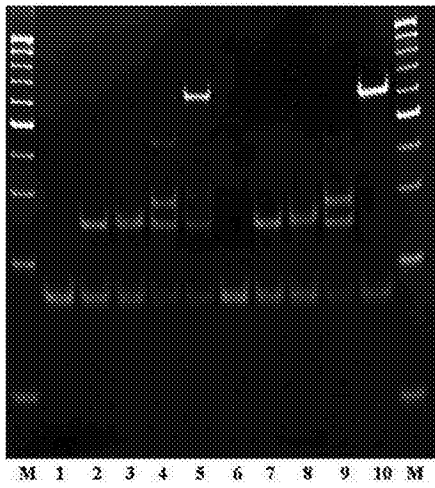


图3

图2

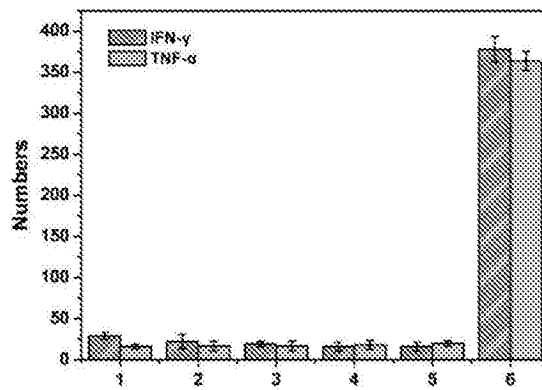


图4