



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108441559 B

(45) 授权公告日 2021.01.05

(21) 申请号 201810162200.5  
 (22) 申请日 2018.02.27  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 108441559 A  
 (43) 申请公布日 2018.08.24  
 (73) 专利权人 海门善准生物科技有限公司  
 地址 226133 江苏省南通市海门市临江镇  
 洞庭湖路100号A12楼308室  
 专利权人 上海善准生物科技有限公司  
 (72) 发明人 周彤 胡志元 周伟庆  
 (74) 专利代理机构 上海邦德专利代理事务所  
 (普通合伙) 31312  
 代理人 余昌昊  
 (51) Int. Cl.  
 C12Q 1/6886 (2018.01) (续)  
 (56) 对比文件  
 CN 105339797 A, 2016.02.17  
 WO 2012056047 A1, 2012.05.03  
 CN 102971435 A, 2013.03.13  
 CN 103981273 A, 2014.08.13

CN 106480201 A, 2017.03.08  
 CN 101921858 A, 2010.12.22  
 WO 0208765 A2, 2002.01.31  
 CN 1890381 A, 2007.01.03  
 CN 104093859 A, 2014.10.08  
 US 2003086934 A1, 2003.05.08  
 CN 1950701 A, 2007.04.18  
 CN 106978492 A, 2017.07.25  
 CN 104293910 A, 2015.01.21  
 Benjamin Haibe-Kains等. Comparison of prognostic gene expression signatures for breast cancer. 《BMC Genomics》. 2008, 第9卷 (第394期), 1-9.

李晓青. 基于多基因表达水平的乳腺癌预后预测研究进展. 《中国肿瘤临床》. 2013, 第40卷 (第13期), 807-814.

Sofia Winslow等. Prognostic stromal gene signatures in breast cancer. 《Breast Cancer Research》. 2015, 第17卷 (第23期), 1-13. (续)

审查员 吴海燕

权利要求书1页 说明书10页  
 序列表14页 附图3页

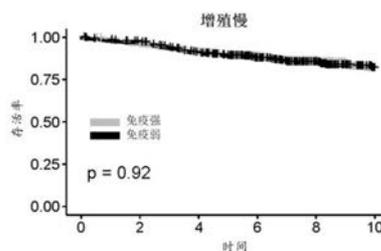
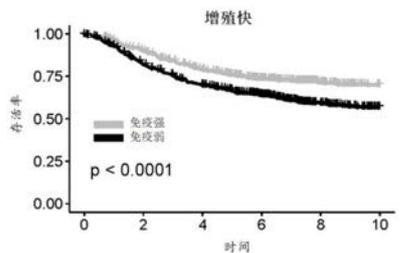
(54) 发明名称

一种免疫相关基因群作为标志物在制备评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的产品中的应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域, 公开了一组可以对高增殖性乳腺癌远处转移风险进行评估的基因群; 公开了由检测这些基因群的基因表达水平的试剂在制备用于评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的体外诊断产品中的应用; 所述体外诊断产品包括定量PCR检测试剂盒; 本发明还公开了利用所述检测试剂盒对高增殖性乳腺癌远处转移风险进行评估的方法。本发明所述方法对高增殖性乳腺癌发生远处转移风险的评估具有较高的准确性, 同时可以预测这类乳腺癌患者对将来

免疫检查点抑制剂的应答。



CN 108441559 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

Marcel Smid等.Subtypes of breast

cancer show preferential site of relapse.

《Cancer Res》.2008,第68卷(第9期),3108-

3114.

1. 一种免疫相关基因群作为标志物在制备评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的产品中的应用,其特征在于,所述免疫相关基因群为高增殖性乳腺癌免疫相关基因群;

所述高增殖性乳腺癌免疫相关基因群为免疫相关基因APOBEC3、CCL5、CCR2、CD2、CD3D、CD52、CD53、CORO1A、CXCL9、GZMA、GZMK、HLA-DMA、HLA-DQA1、IL2RG、LCK、LYZ和PTPRC,为增殖相关基因AURKA、BIRC5、CCNB1、CDC20、MKI67、TOP2A和UBE2C,以及看家基因ACTB、GAPDH、MRPL19和RP LP0;

所述高增殖性乳腺癌为管腔B型、HER2富集型及基底细胞型;

所述评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的方法包括以下步骤:

利用荧光定量PCR方法计算各个相关基因的 $\Delta C_t$ ,计算患者的增殖指数PS和免疫指数IS,根据免疫指数判断高增殖性乳腺癌患者的远处转移风险;具体计算和风险评估标准为:

增殖基因评分 = (AURKA+BIRC5+CCNB1+CDC20+MKI67+TOP2A+UBE2C) / 7;

增殖指数 (PS) =  $36 \times (\text{增殖基因评分} + 1.35)$ , 评分0-100;增殖慢0-49,增殖快50-100;

抗原递呈基因评分 = (CD52+CORO1A+CD53+PTPRC+HLA-DMA+HLA-DQA1+LYZ) / 7;

肿瘤杀伤基因评分 = (APOBEC3G+CCL5+CCR2+CD2+CD3D+CXCL9+GZMA+GZMK+IL2RG+LCK) / 10;

免疫基因评分 =  $0.44 \times \text{抗原递呈基因评分} + 0.56 \times \text{肿瘤杀伤基因评分}$ ;

免疫指数 (IS) =  $33 \times (\text{免疫基因评分} + 1.35)$ , 评分0-100;

其中,IS小于42提示高增殖性乳腺癌免疫弱,发生远处转移的风险高;IS大于等于42提示高增殖性乳腺癌免疫强,发生远处转移的风险低。

2. 一种评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的体外诊断产品,其特征在于,所述体外诊断产品包括特异性检测如权利要求1所述的免疫相关基因群的基因表达水平的试剂。

3. 如权利要求2所述的评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的体外诊断产品,其特征在于,所述体外诊断产品为检测试剂盒。

4. 如权利要求3所述的评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的体外诊断产品,其特征在于,所述检测试剂盒包括扩增如权利要求1所述的免疫相关基因群的引物和探针。

5. 如权利要求4所述的评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的体外诊断产品,其特征在于,所述引物包括正向引物和反向引物,所述正向引物的序列如SEQ ID NO.1~28所示,所述反向引物的序列如SEQ ID NO.29~56所示;所述探针的序列如SEQ ID NO.57~84所示。

## 一种免疫相关基因群作为标志物在制备评估高增殖性乳腺癌 远处转移风险的产品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及评估乳腺癌免疫基因组的定量PCR与分析技术。通过检测一组乳腺癌组织内的免疫相关基因表达,计算免疫指数,帮助评估高增殖性乳腺癌的远处转移风险,同时可作为乳腺癌新辅助、辅助和靶向治疗的疗效预测以及免疫治疗,包括但不限于PD1抑制剂、PDL1抑制剂及CTLA4抑制剂的伴随诊断。

### 背景技术

[0002] 乳腺癌占我国妇女恶性肿瘤发病的第一位,并以每年4%左右的速度逐年增加,据中国肿瘤登记年报统计,2015年浸润性乳腺癌发病人数为27.24万,死亡6.95万例。

[0003] 目前国内外对于手术后的乳腺癌的精准治疗仍面临很大挑战。对于术后后继治疗的患者,如何选择具有针对性的治疗方案,提高治疗效率,需要新的技术手段来帮助医生和病人进行准确的判断。如何对乳腺癌患者进行精确分类,进而指导临床进行有效治疗,并同时避免无效或有害治疗是本发明的主要目标。

[0004] 近年出现的基于基因表达谱和分子生物学特征为基础提出的乳腺癌分子生物学分型,能较好地反映肿瘤的生物行为,具有重要的临床治疗指导意义。当前国际上公认的基于肿瘤基因表达的乳腺癌分子分型产品为北卡罗来纳大学Perou教授与 Prosigna合作共同开发的PAM50,已得到美国FDA批准。PAM50通过检测55个基因表达水平,将乳腺癌分为4种亚型,管腔A型(LuminalA)、管腔B型(LuminalB)、HER2富集型(HER2-enriched)及基底细胞型(Basal-like),并根据亚型及肿瘤增殖指数评估乳腺癌10年内远处转移的危险性。但是,PAM50乳腺癌基因表达分子分型的方法没有将乳腺癌预后及治疗效果密切相关的免疫调控基因纳入其分析系统,使最终的分型评分系统有一定局限性,尤其是结果不能配合指导目前日益受到重视的肿瘤免疫治疗方案。近期的多项研究表明,乳腺癌组织当中的免疫基因表达水平与高增殖性的乳腺癌的远处转移的发生密切相关,包括管腔B型(LuminalB)、HER2富集型(HER2-enriched)及基底细胞型(Basal-like)。这些亚型乳腺癌组织中免疫基因表达水平高可增加对辅助治疗的敏感性并降低远处转移风险,这几种亚型乳腺癌的一个共性就是肿瘤往往表现出很强的增殖性。免疫基因表达水平与低危亚型乳腺癌,如管腔A(LuminalA)型,远处转移则没有相关性,而这一亚型的特点为肿瘤的增殖性较低。近年兴起的肿瘤免疫治疗,包括PD1抑制剂、PDL1抑制剂及CTLA4抑制剂,广泛用于各种实体瘤的治疗。其中,PD1抑制剂Keytruda正在多个乳腺癌治疗的临床实验当中。此类治疗的作用机理为利用抗体阻断肿瘤细胞表达的PDL1与免疫细胞表达的PD1,进而使得免疫细胞能够识别和杀灭肿瘤。发挥作用的前提有两个,一是肿瘤细胞表达足够多的PDL1,目前临床上已广泛开展检测;二是肿瘤组织中的免疫细胞有足够活性,目前临床研究中常常采用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)技术反映肿瘤组织中的免疫功能。总体来讲TIL计数越高,高增殖性乳腺癌的新辅助、靶向及免疫检查点(PD1)抑制剂效果越好。但是以往的TIL临床研究未考虑肿瘤细胞的增殖与免疫系统的交互作用,人工计数的稳定性和重复性也不理想,同时单单计数本

身并不能反映免疫细胞活性。而来源于免疫细胞的免疫基因表达则可反映免疫功能的活跃程度,而且检测结果稳定、可靠。因此,结合肿瘤增殖情况的肿瘤组织中免疫相关基因表达水平可作为新辅助、辅助、靶向及PD1抑制剂治疗的可靠伴随诊断指标。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是针对目前高增殖性乳腺癌(高复发风险型乳腺癌)进行肿瘤组织的免疫指数评估,提供一组评估免疫功能相关基因群及其检测试剂盒,以更加准确预测高复发风险亚型乳腺癌的远处转移风险并指导临床治疗。

[0006] 本发明提供一组评估高增殖性乳腺癌免疫相关基因群,包括17个参与不同免疫功能的免疫相关基因,7个增殖相关基因以及4个看家基因。其中,免疫相关基因 APOBEC3、CCL5、CCR2、CD2、CD3D、CD52、CD53、COR01A、CXCL9、GZMA、GZMK、HLA-DMA、HLA-DQA1、IL2RG、LCK、LYZ和PTPRC,增殖相关基因AURKA、BIRC5、CCNB1、CDC20、MKI67、TOP2A和UBE2C,看家基因ACTB、GAPDH、MRPL19和RPLP0。所述评估高增殖性乳腺癌免疫相关基因群如表1所示。

[0007] 表1乳腺癌免疫相关基因

序号	功能	基因名	基因身份号码 ID
1	看家基因	ACTB	NM_001101
2	看家基因	GAPDH	NM_002046
3	看家基因	MRPL19	NM_014763
4	看家基因	RPLP0	NM_001002
5	免疫基因	APOBEC3G	NM_021822

[0008]

[0009]

6	免疫基因	CCL5	NM_002985
7	免疫基因	CCR2	NM_001123041
8	免疫基因	CD2	NM_001767
9	免疫基因	CD3D	NM_000732
10	免疫基因	CD52	NM_001803
11	免疫基因	CD53	NM_000560
12	免疫基因	CORO1A	NM_001193333
13	免疫基因	CXCL9	NM_002416
14	免疫基因	GZMA	NM_006144
15	免疫基因	GZMK	NM_002104
16	免疫基因	HLA-DMA	NM_002122
17	免疫基因	HLA-DQA1	NM_006120
18	免疫基因	IL2RG	NM_000206
19	免疫基因	LCK	NM_005356
20	免疫基因	LYZ	NM_000239
21	免疫基因	PTPRC	NM_002838
22	增殖基因	AURKA	NM_198433
23	增殖基因	BIRC5	NM_001012271
24	增殖基因	CCNB1	NM_031966
25	增殖基因	CDC20	NM_001255
26	增殖基因	MKI67	NM_002417
27	增殖基因	TOP2A	NM_001067
28	增殖基因	UBE2C	NM_181801

[0010] 本发明还提供了如上所述的免疫相关基因群作为标志物评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的方法。

[0011] 本发明还提供了检测如上所述的免疫相关基因群的基因表达水平的试剂在制备用于评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的体外诊断产品中的应用。

[0012] 本发明还提供了一种评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的体外诊断产品,所述体外诊断试剂包括特异性检测如上所述的免疫相关基因群的基因表达水平的试剂。

[0013] 其中,所述体外诊断产品包括检测试剂盒。

[0014] 本发明提供的评估高增殖性乳腺癌免疫相关基因群的检测试剂盒,所述检测试剂盒包括:扩增本发明所述免疫相关基因群的引物和探针。

[0015] 其中,所述的引物和探针为本领域常规的引物与探针,所述引物和探针较佳地为基因专性高的合成寡聚核苷酸片段,只要能与本发明所述评估高增殖性乳腺癌组织内免疫相关基因群中的基因部分序列互补,并扩增出本发明所述免疫相关基因群的基因即可。较佳地,所述引物和探针的序列如表2所示,其中,所述引物包括正向引物和反向引物,所述正向引物的序列如SEQ ID NO.1~28所示,所述反向引物的序列如SEQ ID NO.29~56所示;所述探针的序列如SEQ ID NO.57~84所示。所述引物和探针的制备方法为本领域常规制备方,较佳地为人工合成。

[0016] 本发明所述检测试剂盒较佳地还包括:总RNA抽提试剂、逆转录试剂和/或定量PCR试剂。

[0017] 其中,所述总RNA抽提试剂为本领域常规的总RNA抽提试剂。

[0018] 其中,所述逆转录试剂是本领域常规的逆转录试剂,较佳地包括dNTP溶液和/或RNA逆转录酶。

[0019] 其中,所述定量PCR试剂为本领域常规使用的试剂,只要能够满足对所得序列进行定量PCR的要求即可。所述定量PCR试剂较佳地为市售可得。所述定量PCR为本领域常规的定量PCR,较佳地,为Taqman-实时荧光定量PCR技术。所述PCR试剂较佳地还包括可供构建定量PCR的文库的试剂。

[0020] 本发明所述检测试剂盒较佳地还包括从检测对象或肿瘤患者体内提取检测样本的器械;更佳地,还包括从检测对象或肿瘤患者体内提取组织或血液的器械,所述器械较佳地为任何能用于取血的采血针、注射器等。

[0021] 其中,所述检测样本为只要能从满足抽提出检测对象的总RNA即可。所述检测样本较佳地为组织样本、血液、血浆和体液中的一种或几种,更佳地为组织样本,更佳地为石蜡组织样本或穿刺活检的新鲜组织样本,优选地为肿瘤细胞含量高的组织。

[0022] 本发明还提供了用于检测如上所述的免疫相关、增殖相关以及看家基因群表达的引物,所述引物包括正向引物和反向引物,所述正向引物的序列如SEQ ID NO.1~28所示,所述反向引物的序列如SEQ ID NO.29~56所示。

[0023] 本发明还提供了用于检测如上所述免疫相关基因群表达的探针组,所述探针的序列如SEQ ID NO.57~84所示,其中,所述探针通过特异性地与如表1所述免疫相关基因群中的基因杂交来检测出所述基因。

[0024] 本发明还提供了如上所述的引物或探针组在用于制备评估高增殖性乳腺癌远处转移风险的产品中的应用。

[0025] 本发明中,所述高增殖性乳腺癌主要包括管腔B型、HER2富集型及基底细胞型。

[0026] 本发明还提供了一种所述检测试剂盒的使用方法,其包括以下步骤:

- [0027] (1) 利用本发明所述检测试剂盒提取检测对象的总RNA (totalRNA) ;
- [0028] (2) 将纯化的总RNA反转录为cDNA,然后制成可供定量PCR的DNA测序文库;
- [0029] (3) 对步骤(2)所得DNA测序文库进行实时定量PCR检测。
- [0030] 其中,步骤(1)所述的提取方法为本领域常规方法,较佳地为利用检测试剂盒提取检测对象的新鲜冷冻组织 (Fresh Frozen) 或石蜡包埋组织 (FFPE) 的总RNA。更佳地为利用Roche公司生产的RNA抽提试剂盒 (产品号为Roche CatalogNumber#3270289001) 或Qiagen公司生产的RNA抽提试剂盒 (QiagenRNease FFPE kit,Catalog Number#73504) 来提取。
- [0031] 其中,步骤(2)所述DNA测序文库的构建方法为本领域常规的文库构建方法,所述文库的构建方法较佳地包括以下步骤:
- [0032] 28个基因的特异性引物工作液浓度为10 $\mu$ M,28个基因各取反向引物溶液 0.4 $\mu$ l (终浓度为200nM) 混合,加入10 $\times$ RT-PCR缓冲液2 $\mu$ l (10为稀释倍数),dNTP 混合液4 $\mu$ l (终浓度为500nM),RNA酶抑制剂1 $\mu$ l (10个单位),逆转录酶1 $\mu$ l (4个单位),步骤(1)中提取的RNA模板50ng,其余体积用水补足。将上述扩增体系混合均匀,37 $^{\circ}$ C孵育60分钟。
- [0033] 其中,步骤(3)所述定量PCR检测的方法为本领域常规的方法,较佳地为利用Taqman-实时荧光定量PCR。对17个基因分别进行荧光定量PCR检测,一个基因一个PCR反应。反应体系配制如下:正向、反向两条特异性引物各200nM,10 $\times$ PCR缓冲液 2 $\mu$ l,dNTP混合液1.6 $\mu$ l (200nM),DNA聚合酶0.1 $\mu$ l (0.5个单位),Taqman荧光探针100nM,逆转录产物0.8 $\mu$ l (相当于2ngRNA模板的逆转录产物),其余体积由水补足。扩增反应在95 $^{\circ}$ C 15分钟,95 $^{\circ}$ C 10-15秒,60 $^{\circ}$ C 10-15秒,72 $^{\circ}$ C 10-15秒,进行30个循环,72 $^{\circ}$ C 7分钟。扩增反应结束后,记录每个基因的 $\Delta$ Ct值,代表各个基因的表达水平。
- [0034] 本发明所述检测试剂盒的使用方法较佳地还包括步骤(4),将所得检测结果进行统计分析,根据自主开发并优化的计算方法来进行免疫指数计算,并以此帮助预测不同亚型乳腺癌的远处转移风险。根据步骤(3)中计算得到的各个基因的 $\Delta$ Ct,计算患者的增殖指数 (Proliferation Score,PS) 和免疫指数 (Immune Score,IS),根据免疫指数判断高增殖性乳腺癌患者的远处转移风险,(如10年远处转移复发风险)。具体计算和风险评估标准如下:
- [0035] 增殖基因评分 = (AURKA+BIRC5+CCNB1+CDC20+MKI67+TOP2A+UBE2C) /7
- [0036] 增殖指数 (PS) = 36x (增殖基因评分+1.35),评分0-100;增殖慢0-49,增殖快50-100
- [0037] 抗原递呈基因评分 = (CD52+COR01A+CD53+PTPRC+HLA-DMA+HLA-DQA1+LYZ) /7
- [0038] 肿瘤杀伤基因评分 = (APOBEC3G+CCL5+CCR2+CD2+CD3D+CXCL9+GZMA+GZMK +IL2RG +LCK) /10
- [0039] 免疫基因评分 = 0.44x抗原递呈基因评分+0.56x肿瘤杀伤基因评分
- [0040] 免疫指数 (IS) = 33x (免疫基因评分+1.35),评分0-100;免疫弱0-42,免疫强43-100
- [0041] 复发风险定义:IS小于42提示高增殖性乳腺癌免疫弱,发生远处转移的风险高;IS大于等于42提示高增殖性乳腺癌免疫强,发生远处转移的风险低。
- [0042] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实

例。

[0043] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0044] 本发明的积极进步效果在于:与目前已有的技术相比,本发明首次对高增殖性乳腺癌内的免疫功能进行评估,包括基底细胞型(Basal-like)、HER2富集型(HER2-enriched)和管腔B型(LuminalB),进一步加强了对这一类型乳腺癌风险评估的准确性,同时预测这类乳腺癌患者对将来免疫检查点抑制剂的应答。

#### 附图说明

[0045] 图1肿瘤细胞增殖强的乳腺癌患者远处转移的风险与免疫指数密切相关。免疫强,远处转移风险相对低;免疫弱,远处转移风险相对高。

[0046] 图2肿瘤细胞增殖弱的乳腺癌患者远处转移的风险与免疫指无相关性。无论免疫强或免疫弱,远处转移风险均相对低。

[0047] 图3单细胞测序显示外周血中17个免疫相关基因在不同类型免疫细胞中的表达以及不同类型免疫细胞7个增殖基因表达水平。

[0048] 图4单细胞测序显示17个免疫相关基因和7个增殖基因在肿瘤浸润淋巴细胞(T细胞与单核细胞,T\_cell+Mac+M;B细胞,B\_cell)及肿瘤细胞(乳腺癌组1,BC\_Group1;乳腺癌组2,BC\_Group2;乳腺癌组3,BC\_Group3;乳腺癌样本2,BC02;乳腺癌样本 5,BC05)中的表达水平。

#### 具体实施方式

[0049] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0050] 实施例1评估高增殖性乳腺癌免疫相关基因群的筛选

[0051] 实验方法:

[0052] 通过EPIG基因表达谱分析程序分析14项乳腺癌队列研究中的2034例乳腺癌肿瘤基因表达和临床变量,筛选与乳腺癌远处转移风险密切相关的基因群。首先通过聚类分析计算形成基因特异表达谱,然后计算每个基因与特异表达谱的相关性,以此选择候选基因,并分析候选基因与乳腺癌远处转移风险相关性。结果发现,免疫相关基因与细胞周期基因与乳腺癌远处转移风险相关最为密切。为进一步对所选择的免疫相关基因测试,本发明随机选取每个样本的一半(1017)进行同样过程分析,并重复1000次,对在所有1000次测试都出现的基因加以保留。

[0053] 实验结果:共筛选获得了与乳腺癌远处转移风险相关的151个免疫相关基因,根据每个基因的贡献率及不同功能,最终确定一个包含17个免疫相关基因、7个增殖相关基因及4个看家基因的28基因的测试组合,基因列表见表1。

[0054] 实施例2评估高增殖性乳腺癌免疫相关基因的引物及探针设计。

[0055] 采用荧光定量PCR技术,设计并优化17个免疫相关基因以及4个看家基因的引物和探针,并分别检测100例中国乳腺癌病人新鲜肿瘤组织或石蜡包埋的肿瘤组织中由实施例1所筛选得到的28个基因的表达水平,检测实施例1所筛选得到的基因和引物见表2。

[0056] 表2乳腺癌免疫相关基因引物和探针序列

[0057]

Symbol	ForwardPrimerSeq	ProbeSeq	ReversePrimerSeq
ACTB	CGCCCGCTGTATAAGAAT GT	AGGCTCCACCATGTTTCAG GGATT	CCACTCTCTTCAAATCCC TCTG
GAPDH	GGAGGTTGACTTGGAAG ACTATG	TCCTGAAATCTTATCTGGC CGGGC	GACAGCCAACATTCCAC TCT
PSMC4	GGAGGTTGACTTGGAAG ACTATG	TCCTGAAATCTTATCTGGC CGGGC	GACAGCCAACATTCCAC TCT
RPLP0	TCATCAACGGGTACAAAC GAG	ACGGATTACACCTTCCCA CTTGCT	GCAGATGGATCAGCCAA GAA

[0058]

APOBEC 3G	CCATCCTTCTCGTCGGA ATAC	CGTCTGGCTGTGCTACGA AGTGAA	AATACACCTGGCCTCGA AAG
CCL5	TGCCACATCAAGGAGTA TTT	AGCAGTCGTCTTTGTCAC CCGAAA	GATGTACTCCCGAACCC ATTT
CCR2	CTTATGTTGCCAGTGTGT TTC	TGATGCAAGCAAGAAAC ACTGGGC	GCCTGAAAGTAGAGCCA TAGTC
CD2	GAGGAGTCGGAGAAATG ATGAG	CCCACCAAATCCAGCTT CAACCC	AGGAGGATGTTGGGAA GTTG
CD3D	CGAGATCGAGATGATGCT CAG	ACTTGTTCCGAGCCCAGT TTCCTC	AGGGAAGGTACAGTTG GTAATG
CD52	GCCACGAAGATCCTACCA AA	TCTTCTCCTACTCACCAT CAGCCT	GTCCTGAGAGTCCAGTT TGTATC
CD53	TTGTCATCGTGGGCTCTAT TATC	TTCCTTGATAGAGCCCAT GCAGCC	CAGCAGGATGAAGAAC GACATA
CORO1A	CTTTGACCCTGACACCAA CA	AAAGTACCGGATTGAGCT GTCACCC	CATGGAGAGATAGTGCA GGAAAG
CXCL9	GCTCAGGCTGACCACTTT AT	AGTCAGCTCTTCTCCATC CTACCACA	GGTGCCTGGAGAGAA GAAA
GZMA	GAGACTCGTGCAATGGAG ATT	CCCTTTGTTGTGCGAGGG TGTTT	CGAGGGTCTCCGCATTT ATT
GZMK	GTCTCTGGAGGTCATGAA TGTG	CCACAAAGCCTGGAATCT ACACCCCT	TTTGTATGAGGCGGGAC AAG
HLA-DM A	GACTGATTCTTCCAGACC AGAG	TGGGCAGGATGTGAGAAA TCTGAGC	CCCAGAGACTTCTACCC TAAGA
HLA-DQ A1	GTGTTTCTGAGACCAGCT TCC	TACCTCACCTTCTCCCTT CTGCT	GCTCCACCTTGCACTCA TAAA
IL2RG	GTTCTGACACAGACAGA CTAC	CAAGCGCCATGTTGAAGC CATCAT	GGCAGCTGCAGGAATAA GA
LCK	AAGCCTGGGATTGACAGA AG	AAGTTCCTCAAGGGCCAG GACTTT	GAGGAGCACACAGAGG TATTAG
LYZ	GGCTTGTCCTCTTTCTGT TA	TCCAGGGCAAGGTCTTTG AAAGGT	GTAGCCATCCATTCCCAA TCT
PTPRC	CGGCTGACTTCCAGATAT GAC	TCCAGAAAAGGCAAAGCC AAATGCC	GCTTTGCCCTGTCACAA ATAC

[0059]

AURKA	GTGTGCCTTAACCTCCCTA TTC	AGTGAAAGTAGCCACGA GAATTGTGCT	CGAACCTTGCCTCCAGA TTAT
BIRC5	TGGGAAGGGTTGTGAATG AG	TGGGCTATGGGTGAGGTT CCAATG	GCTGTCTCTACTTTCCA GGATG
CCNB1	GATGCAGAAGATGGAGCT GAT	TTGAGGAAGAGCAAGCA GTCAGACC	TCCCGACCCAGTAGGTA TTT
CDC20	CAAGGAGAACCAGCCTG AAA	AGACGCCACCAAGAAG GAACATC	GGATCTTGGTTCCTCTA CATC
MKI67	TAACACCATCAGCAGGGA AAG	CCAAACCAGCAGGAGGT GATGAGAA	CTGCACTGGAGTTCCCA TAAA
TOP2A	GACGCTTCGTTATGGGAA GATA	ATGGTTCACATCAAAG GCTTGC	GGGCCAGTTGTGATGGA TAA
UBE2C	TCTGGAATTAGGGAGGGT GAG	AGGATCGTCCTGTGGATC TGGCTA	GGGAAGGCAGAAATCC CTTTAT

[0060] 实施例3利用免疫指数对高增殖性乳腺癌进行远处转移风险评估。

[0061] 取乳腺癌肿瘤组织,抽取肿瘤细胞中的RNA (Roche Catalog Number#3270289001或Qiagen Catalog Number#73504)。对实施例2中所筛选获得的免疫相关基因和增殖基因表达水平进行检测,计算免疫指数并对高增殖性乳腺癌进行远处转移风险评估。

[0062] 实验结果:

[0063] 1、根据增殖指数评估乳腺癌的增值性

[0064] 首先根据7个增殖相关基因的表达计算增殖指数,将乳腺癌病例分为两组,增殖快和增殖慢(图1)。

[0065] 图1为根据乳腺癌增殖指数将乳腺癌分为两组,增殖快和增殖慢。增殖快的乳腺癌远处转移的比例显著高于增殖慢的乳腺癌。

[0066] 2、根据免疫指数对乳腺癌进行远处转移风险预测

[0067] 根据乳腺癌的增殖情况,分别在增殖快和增殖慢的乳腺癌中评估免疫指数对远处转移发生的影响。免疫指数对增殖快的乳腺癌远处转移风险有重要影响。免疫指数强(istrong)的一组病例要较免疫指数弱(iweak)的一组病例10年远处转移的风险低20%左右。预计在增殖快的乳腺癌当中,PD1或PDL1抑制剂的治疗效果在免疫强的一组病例会更好。而免疫指数对增殖慢的乳腺癌远处转移的发生没有影响(图2)。

[0068] 图2为免疫指数在增殖快(上)和增殖慢(下)乳腺癌当中对远处转移发生的影响。

[0069] 实施例4—组定量评估乳腺癌免疫指数基因群及PCR检测试剂盒的使用。

[0070] 步骤1:取检测对象肿瘤或石蜡包埋组织,利用检测试剂盒中的方法获取检测对象含肿瘤细胞高的区域为原始材料。

[0071] 步骤2:提取组织中总RNA。

[0072] 可以使用Roche公司生产的RNA抽提试剂盒(产品号为Roche Catalog Number#3270289001)或者Qiagen公司生产的RNA抽提试剂盒(QiagenRNease FFPE kit,Catalog Number#73504)来提取组织中的RNA。

[0073] 步骤3:建立cDNA文库。

[0074] 构建方法较佳地包括以下步骤:

[0075] 28个基因的特异性引物工作液浓度为10 $\mu$ M,28个基因各取反向引物溶液 0.4 $\mu$ l (终浓度为200nM)混合,加入10 $\times$ RT-PCR缓冲液2 $\mu$ l (10为稀释倍数),dNTP 混合液4 $\mu$ l (终浓度为500nM),RNA酶抑制剂1 $\mu$ l (10个单位),逆转录酶1 $\mu$ l (4个单位),本实施例中步骤2提取的RNA模板50ng,其余体积用水补足。将上述扩增体系混合均匀,37 $^{\circ}$ C孵育60分钟。

[0076] 步骤4:采用定量PCR方法检测基因表达水平。

[0077] 所述定量PCR的方法为本领域常规的方法,Taqman-实时荧光定量PCR。对17个基因分别进行荧光定量PCR检测,一个基因一个PCR反应。

[0078] 其中,ABI7500Taqman反应体系配制如下:正向、反向两条特异性引物各200nM,10 $\times$ PCR缓冲液2 $\mu$ l,dNTP混合液1.6 $\mu$ l (200nM),DNA聚合酶0.1 $\mu$ l (0.5个单位),Taqman荧光探针100nM,逆转录产物0.8 $\mu$ l (相当于2ngRNA模板的逆转录产物),其余体积由水补足。

[0079] 扩增反应在95 $^{\circ}$ C 15分钟,95 $^{\circ}$ C 10秒,60 $^{\circ}$ C 10秒,72 $^{\circ}$ C 10秒,进行30个循环,72 $^{\circ}$ C 7分钟。扩增反应结束后,记录每个基因的Ct值,代表了各个基因的表达水平。

[0080] 步骤5:结果分析。根据17个免疫相关基因表达水平,计算免疫指数。

[0081] 实施例5单细胞测序技术证实免疫相关基因表达来源于肿瘤浸润淋巴细胞而非肿瘤细胞

[0082] 在筛选免疫相关基因时,我们综合考虑了其对高增值性乳腺癌远处转移的影响大小以及在不同类型免疫细胞中的表达。单细胞测序结果显示17个免疫相关基因在外周血中8种不同的免疫细胞中差异性表达,主要可分为抗原递呈细胞表达高、肿瘤杀伤细胞表达高和所有免疫细胞均低表达基因。增殖基因表达水平显示,所有外周血免疫细胞均处于非增殖状态(图3)。而在乳腺肿瘤组织中分离出来的肿瘤浸润淋巴细胞和单纯肿瘤细胞的单细胞测序结果显示,17个免疫相关基因仅在肿瘤浸润淋巴细胞(T细胞组和B细胞)中表达,而在肿瘤细胞中不表达,说明肿瘤组织中免疫相关基因表达是来源于肿瘤浸润淋巴细胞,而非肿瘤细胞。而增殖基因则仅在部分淋巴细胞和肿瘤细胞表达,说明仅部分淋巴细胞和肿瘤细胞处于增殖活跃状态(图4)。国际上目前通常采用肿瘤浸润淋巴细胞计数来预测乳腺癌预后及治疗效果,其缺陷在于无法区分增殖活跃具有免疫活性和处于休眠不具有免疫活性的淋巴细胞,同时也未考虑肿瘤增殖活性与免疫系统的交互作用,其预测效果有局限性。我们将免疫基因与增殖基因表达相结合,可以更加准确评估肿瘤组织免疫功能活性及其对乳腺癌复发的影响。

[0083] 对于本领域技术人员而言,显而易见的是,在不脱离本发明所附权利要求所披露的范围和精神的前提下,可以进行多种修改和变型,并且这些修改和变型均落入本发明权利要求的保护范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 海门善准生物科技有限公司
- [0003] 上海善准生物科技有限公司
- [0004] <120> 乳腺癌免疫指数基因群及其体外诊断产品和应用
- [0005] <160> 84
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(人工序列)
- [0011] <400> 1
- [0012] cgccccgctgt ataagaatgt 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 23
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(人工序列)
- [0017] <400> 2
- [0018] ggaggttgac ttggaagact atg 23
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 23
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(人工序列)
- [0023] <400> 3
- [0024] ggaggttgac ttggaagact atg 23
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 21
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(人工序列)
- [0029] <400> 4
- [0030] tcatcaacgg gtacaaacga g 21
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 22
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(人工序列)
- [0035] <400> 5
- [0036] ccatcctttc tcgtcggaat ac 22
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 21

- [0039] <212> DNA  
[0040] <213> 人工序列(人工序列)  
[0041] <400> 6  
[0042] tgcccacatc aaggagtatt t 21  
[0043] <210> 7  
[0044] <211> 22  
[0045] <212> DNA  
[0046] <213> 人工序列(人工序列)  
[0047] <400> 7  
[0048] cttatgttgc ccagtgtggt tc 22  
[0049] <210> 8  
[0050] <211> 22  
[0051] <212> DNA  
[0052] <213> 人工序列(人工序列)  
[0053] <400> 8  
[0054] gaggagtcgg agaaatgatg ag 22  
[0055] <210> 9  
[0056] <211> 21  
[0057] <212> DNA  
[0058] <213> 人工序列(人工序列)  
[0059] <400> 9  
[0060] cgagatcgag atgatgctca g 21  
[0061] <210> 10  
[0062] <211> 20  
[0063] <212> DNA  
[0064] <213> 人工序列(人工序列)  
[0065] <400> 10  
[0066] gccacgaaga tcctaccaa 20  
[0067] <210> 11  
[0068] <211> 23  
[0069] <212> DNA  
[0070] <213> 人工序列(人工序列)  
[0071] <400> 11  
[0072] ttgtcatcgt gggctctatt atc 23  
[0073] <210> 12  
[0074] <211> 20  
[0075] <212> DNA  
[0076] <213> 人工序列(人工序列)  
[0077] <400> 12

[0078] ctttgaccct gacaccaaca 20  
[0079] <210> 13  
[0080] <211> 20  
[0081] <212> DNA  
[0082] <213> 人工序列(人工序列)  
[0083] <400> 13  
[0084] gctcaggctg accactttat 20  
[0085] <210> 14  
[0086] <211> 21  
[0087] <212> DNA  
[0088] <213> 人工序列(人工序列)  
[0089] <400> 14  
[0090] gagactcgtg caatggagat t 21  
[0091] <210> 15  
[0092] <211> 22  
[0093] <212> DNA  
[0094] <213> 人工序列(人工序列)  
[0095] <400> 15  
[0096] gtctctggag gtcataaatg tg 22  
[0097] <210> 16  
[0098] <211> 22  
[0099] <212> DNA  
[0100] <213> 人工序列(人工序列)  
[0101] <400> 16  
[0102] gactgattct tccagaccag ag 22  
[0103] <210> 17  
[0104] <211> 21  
[0105] <212> DNA  
[0106] <213> 人工序列(人工序列)  
[0107] <400> 17  
[0108] gtgtttctga gaccagcttc c 21  
[0109] <210> 18  
[0110] <211> 22  
[0111] <212> DNA  
[0112] <213> 人工序列(人工序列)  
[0113] <400> 18  
[0114] gttcctgaca cagacagact ac 22  
[0115] <210> 19  
[0116] <211> 20

- [0117] <212> DNA  
[0118] <213> 人工序列(人工序列)  
[0119] <400> 19  
[0120] aagcctggga ttgacagaag 20  
[0121] <210> 20  
[0122] <211> 21  
[0123] <212> DNA  
[0124] <213> 人工序列(人工序列)  
[0125] <400> 20  
[0126] ggcttgcct cttttctggt a 21  
[0127] <210> 21  
[0128] <211> 21  
[0129] <212> DNA  
[0130] <213> 人工序列(人工序列)  
[0131] <400> 21  
[0132] cggctgactt ccagatatga c 21  
[0133] <210> 22  
[0134] <211> 22  
[0135] <212> DNA  
[0136] <213> 人工序列(人工序列)  
[0137] <400> 22  
[0138] gtgtgcctta acctccctat tc 22  
[0139] <210> 23  
[0140] <211> 20  
[0141] <212> DNA  
[0142] <213> 人工序列(人工序列)  
[0143] <400> 23  
[0144] tgggaagggt tgtgaatgag 20  
[0145] <210> 24  
[0146] <211> 21  
[0147] <212> DNA  
[0148] <213> 人工序列(人工序列)  
[0149] <400> 24  
[0150] gatgcagaag atggagctga t 21  
[0151] <210> 25  
[0152] <211> 20  
[0153] <212> DNA  
[0154] <213> 人工序列(人工序列)  
[0155] <400> 25

- [0156] caaggagaac cagcctgaaa 20  
[0157] <210> 26  
[0158] <211> 21  
[0159] <212> DNA  
[0160] <213> 人工序列(人工序列)  
[0161] <400> 26  
[0162] taacaccatc agcagggaaa g 21  
[0163] <210> 27  
[0164] <211> 22  
[0165] <212> DNA  
[0166] <213> 人工序列(人工序列)  
[0167] <400> 27  
[0168] gacgcttcgt tatgggaaga ta 22  
[0169] <210> 28  
[0170] <211> 21  
[0171] <212> DNA  
[0172] <213> 人工序列(人工序列)  
[0173] <400> 28  
[0174] tctggaatta gggagggtga g 21  
[0175] <210> 29  
[0176] <211> 22  
[0177] <212> DNA  
[0178] <213> 人工序列(人工序列)  
[0179] <400> 29  
[0180] ccactctctt caaatccctc tg 22  
[0181] <210> 30  
[0182] <211> 20  
[0183] <212> DNA  
[0184] <213> 人工序列(人工序列)  
[0185] <400> 30  
[0186] gacagccaac attccactct 20  
[0187] <210> 31  
[0188] <211> 20  
[0189] <212> DNA  
[0190] <213> 人工序列(人工序列)  
[0191] <400> 31  
[0192] gacagccaac attccactct 20  
[0193] <210> 32  
[0194] <211> 20

- [0195] <212> DNA  
[0196] <213> 人工序列(人工序列)  
[0197] <400> 32  
[0198] gcagatggat cagccaagaa 20  
[0199] <210> 33  
[0200] <211> 20  
[0201] <212> DNA  
[0202] <213> 人工序列(人工序列)  
[0203] <400> 33  
[0204] aatacacctg gcctcgaaag 20  
[0205] <210> 34  
[0206] <211> 21  
[0207] <212> DNA  
[0208] <213> 人工序列(人工序列)  
[0209] <400> 34  
[0210] gatgtactcc cgaaccatt t 21  
[0211] <210> 35  
[0212] <211> 22  
[0213] <212> DNA  
[0214] <213> 人工序列(人工序列)  
[0215] <400> 35  
[0216] gcctgaaagt agagccatag tc 22  
[0217] <210> 36  
[0218] <211> 20  
[0219] <212> DNA  
[0220] <213> 人工序列(人工序列)  
[0221] <400> 36  
[0222] aggaggatgt tgggaagttg 20  
[0223] <210> 37  
[0224] <211> 22  
[0225] <212> DNA  
[0226] <213> 人工序列(人工序列)  
[0227] <400> 37  
[0228] agggaaggta cagttgtaa tg 22  
[0229] <210> 38  
[0230] <211> 23  
[0231] <212> DNA  
[0232] <213> 人工序列(人工序列)  
[0233] <400> 38

[0234] gtcctgagag tccagtttgt atc 23  
[0235] <210> 39  
[0236] <211> 22  
[0237] <212> DNA  
[0238] <213> 人工序列(人工序列)  
[0239] <400> 39  
[0240] cagcaggatg aagaacgaca ta 22  
[0241] <210> 40  
[0242] <211> 23  
[0243] <212> DNA  
[0244] <213> 人工序列(人工序列)  
[0245] <400> 40  
[0246] catggagaga tagtgcagga aag 23  
[0247] <210> 41  
[0248] <211> 20  
[0249] <212> DNA  
[0250] <213> 人工序列(人工序列)  
[0251] <400> 41  
[0252] ggtgcactgg agagaagaaa 20  
[0253] <210> 42  
[0254] <211> 20  
[0255] <212> DNA  
[0256] <213> 人工序列(人工序列)  
[0257] <400> 42  
[0258] cgagggtctc cgcatttatt 20  
[0259] <210> 43  
[0260] <211> 20  
[0261] <212> DNA  
[0262] <213> 人工序列(人工序列)  
[0263] <400> 43  
[0264] tttgtatgag gcgggacaag 20  
[0265] <210> 44  
[0266] <211> 22  
[0267] <212> DNA  
[0268] <213> 人工序列(人工序列)  
[0269] <400> 44  
[0270] cccagagact tctaccetaa ga 22  
[0271] <210> 45  
[0272] <211> 21

- [0273] <212> DNA  
[0274] <213> 人工序列(人工序列)  
[0275] <400> 45  
[0276] gctccacctt gcagtcataa a 21  
[0277] <210> 46  
[0278] <211> 19  
[0279] <212> DNA  
[0280] <213> 人工序列(人工序列)  
[0281] <400> 46  
[0282] ggcagctgca ggaataaga 19  
[0283] <210> 47  
[0284] <211> 22  
[0285] <212> DNA  
[0286] <213> 人工序列(人工序列)  
[0287] <400> 47  
[0288] gaggagcaca cagaggtatt ag 22  
[0289] <210> 48  
[0290] <211> 21  
[0291] <212> DNA  
[0292] <213> 人工序列(人工序列)  
[0293] <400> 48  
[0294] gtagccatcc attcccaatc t 21  
[0295] <210> 49  
[0296] <211> 21  
[0297] <212> DNA  
[0298] <213> 人工序列(人工序列)  
[0299] <400> 49  
[0300] gctttgccct gtcacaaata c 21  
[0301] <210> 50  
[0302] <211> 21  
[0303] <212> DNA  
[0304] <213> 人工序列(人工序列)  
[0305] <400> 50  
[0306] cgaaccttgc ctccagatta t 21  
[0307] <210> 51  
[0308] <211> 22  
[0309] <212> DNA  
[0310] <213> 人工序列(人工序列)  
[0311] <400> 51

- [0312] gctgtctcta ctttccagga tg 22  
[0313] <210> 52  
[0314] <211> 20  
[0315] <212> DNA  
[0316] <213> 人工序列(人工序列)  
[0317] <400> 52  
[0318] tcccgaccca gtaggtatatt 20  
[0319] <210> 53  
[0320] <211> 22  
[0321] <212> DNA  
[0322] <213> 人工序列(人工序列)  
[0323] <400> 53  
[0324] ggatcttggc ttectetaca tc 22  
[0325] <210> 54  
[0326] <211> 21  
[0327] <212> DNA  
[0328] <213> 人工序列(人工序列)  
[0329] <400> 54  
[0330] ctgcactgga gttcccataa a 21  
[0331] <210> 55  
[0332] <211> 20  
[0333] <212> DNA  
[0334] <213> 人工序列(人工序列)  
[0335] <400> 55  
[0336] gggccagttg tgatggataa 20  
[0337] <210> 56  
[0338] <211> 22  
[0339] <212> DNA  
[0340] <213> 人工序列(人工序列)  
[0341] <400> 56  
[0342] gggaaggcag aaatcccttt at 22  
[0343] <210> 57  
[0344] <211> 24  
[0345] <212> DNA  
[0346] <213> 人工序列(人工序列)  
[0347] <400> 57  
[0348] aggctccacc atgttcaggg attt 24  
[0349] <210> 58  
[0350] <211> 24

- [0351] <212> DNA  
[0352] <213> 人工序列(人工序列)  
[0353] <400> 58  
[0354] tcctgaaatc ttatctggcc gggc 24  
[0355] <210> 59  
[0356] <211> 24  
[0357] <212> DNA  
[0358] <213> 人工序列(人工序列)  
[0359] <400> 59  
[0360] tcctgaaatc ttatctggcc gggc 24  
[0361] <210> 60  
[0362] <211> 24  
[0363] <212> DNA  
[0364] <213> 人工序列(人工序列)  
[0365] <400> 60  
[0366] acggattaca ccttcccact tgct 24  
[0367] <210> 61  
[0368] <211> 24  
[0369] <212> DNA  
[0370] <213> 人工序列(人工序列)  
[0371] <400> 61  
[0372] cgtctggctg tgctacgaag tga a 24  
[0373] <210> 62  
[0374] <211> 24  
[0375] <212> DNA  
[0376] <213> 人工序列(人工序列)  
[0377] <400> 62  
[0378] agcagtcgtc tttgtcaccc gaaa 24  
[0379] <210> 63  
[0380] <211> 24  
[0381] <212> DNA  
[0382] <213> 人工序列(人工序列)  
[0383] <400> 63  
[0384] tgatgcaagc aagaaacact gggc 24  
[0385] <210> 64  
[0386] <211> 24  
[0387] <212> DNA  
[0388] <213> 人工序列(人工序列)  
[0389] <400> 64

- [0390] cccaccaaatt tccagcttca accc 24  
[0391] <210> 65  
[0392] <211> 24  
[0393] <212> DNA  
[0394] <213> 人工序列(人工序列)  
[0395] <400> 65  
[0396] acttggttccg agcccagttt cctc 24  
[0397] <210> 66  
[0398] <211> 25  
[0399] <212> DNA  
[0400] <213> 人工序列(人工序列)  
[0401] <400> 66  
[0402] tcttctctct actcaccatc agcct 25  
[0403] <210> 67  
[0404] <211> 24  
[0405] <212> DNA  
[0406] <213> 人工序列(人工序列)  
[0407] <400> 67  
[0408] ttccttgata gagcccatgc agcc 24  
[0409] <210> 68  
[0410] <211> 25  
[0411] <212> DNA  
[0412] <213> 人工序列(人工序列)  
[0413] <400> 68  
[0414] aaagtaccgg attgagctgt caccc 25  
[0415] <210> 69  
[0416] <211> 26  
[0417] <212> DNA  
[0418] <213> 人工序列(人工序列)  
[0419] <400> 69  
[0420] agtcagctct tctccatcct accaca 26  
[0421] <210> 70  
[0422] <211> 23  
[0423] <212> DNA  
[0424] <213> 人工序列(人工序列)  
[0425] <400> 70  
[0426] ccctttgttg tgcgagggtg ttt 23  
[0427] <210> 71  
[0428] <211> 25

- [0429] <212> DNA  
[0430] <213> 人工序列(人工序列)  
[0431] <400> 71  
[0432] ccacaaagcc tggaatctac accct 25  
[0433] <210> 72  
[0434] <211> 25  
[0435] <212> DNA  
[0436] <213> 人工序列(人工序列)  
[0437] <400> 72  
[0438] tgggcaggat gtgagaaatc tgagc 25  
[0439] <210> 73  
[0440] <211> 24  
[0441] <212> DNA  
[0442] <213> 人工序列(人工序列)  
[0443] <400> 73  
[0444] tacctcacct tectcccttc tgct 24  
[0445] <210> 74  
[0446] <211> 24  
[0447] <212> DNA  
[0448] <213> 人工序列(人工序列)  
[0449] <400> 74  
[0450] caagcgccat gttgaagcca tcat 24  
[0451] <210> 75  
[0452] <211> 24  
[0453] <212> DNA  
[0454] <213> 人工序列(人工序列)  
[0455] <400> 75  
[0456] aagttcctca agggccagga cttt 24  
[0457] <210> 76  
[0458] <211> 24  
[0459] <212> DNA  
[0460] <213> 人工序列(人工序列)  
[0461] <400> 76  
[0462] tccagggcaa ggtctttgaa aggt 24  
[0463] <210> 77  
[0464] <211> 24  
[0465] <212> DNA  
[0466] <213> 人工序列(人工序列)  
[0467] <400> 77

[0468] tccagaaagg caaagccaaa tgcc 24  
[0469] <210> 78  
[0470] <211> 27  
[0471] <212> DNA  
[0472] <213> 人工序列(人工序列)  
[0473] <400> 78  
[0474] agtgaaagta gccacgagaa ttgtgct 27  
[0475] <210> 79  
[0476] <211> 24  
[0477] <212> DNA  
[0478] <213> 人工序列(人工序列)  
[0479] <400> 79  
[0480] tgggctatgg gtgaggttcc aatg 24  
[0481] <210> 80  
[0482] <211> 25  
[0483] <212> DNA  
[0484] <213> 人工序列(人工序列)  
[0485] <400> 80  
[0486] ttgaggaaga gcaagcagtc agacc 25  
[0487] <210> 81  
[0488] <211> 24  
[0489] <212> DNA  
[0490] <213> 人工序列(人工序列)  
[0491] <400> 81  
[0492] agacgccac caagaaggaa catc 24  
[0493] <210> 82  
[0494] <211> 25  
[0495] <212> DNA  
[0496] <213> 人工序列(人工序列)  
[0497] <400> 82  
[0498] ccaaaccagc aggaggtgat gagaa 25  
[0499] <210> 83  
[0500] <211> 24  
[0501] <212> DNA  
[0502] <213> 人工序列(人工序列)  
[0503] <400> 83  
[0504] atggttccca catcaaagc ttgc 24  
[0505] <210> 84  
[0506] <211> 24

- 
- [0507] <212> DNA  
[0508] <213> 人工序列(人工序列)  
[0509] <400> 84  
[0510] aggatcgtcc tgtggatctg gcta 24

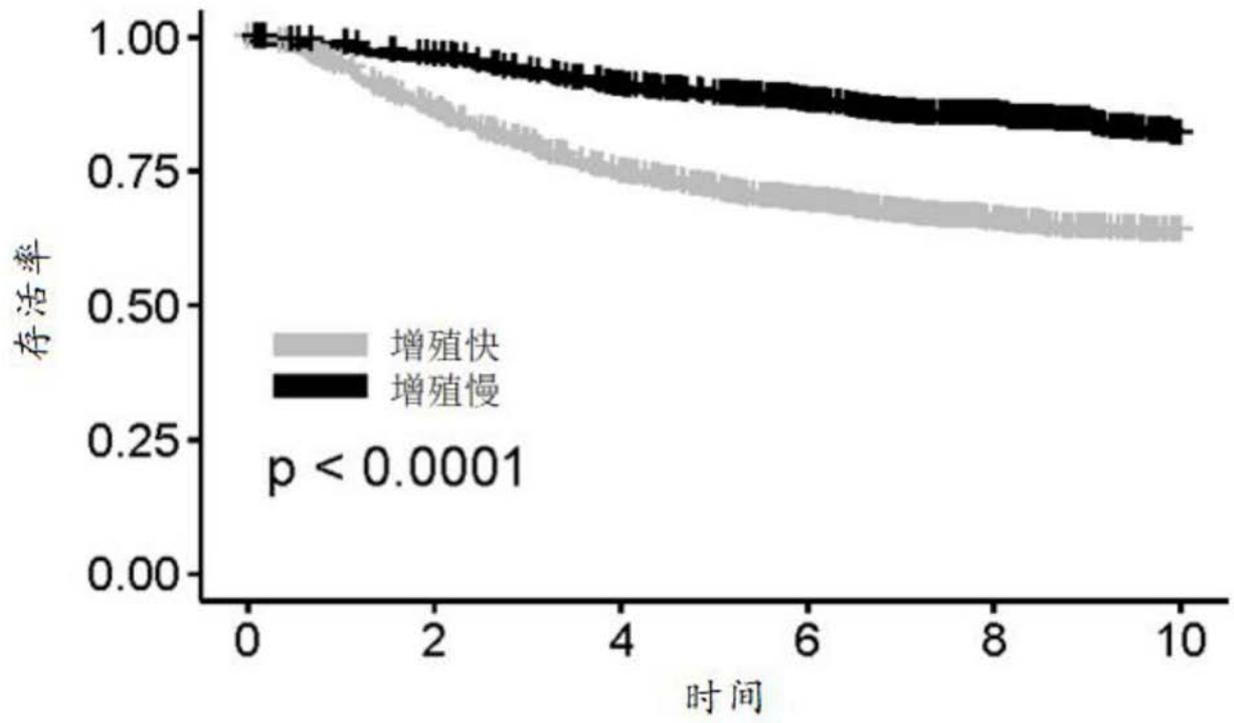


图1

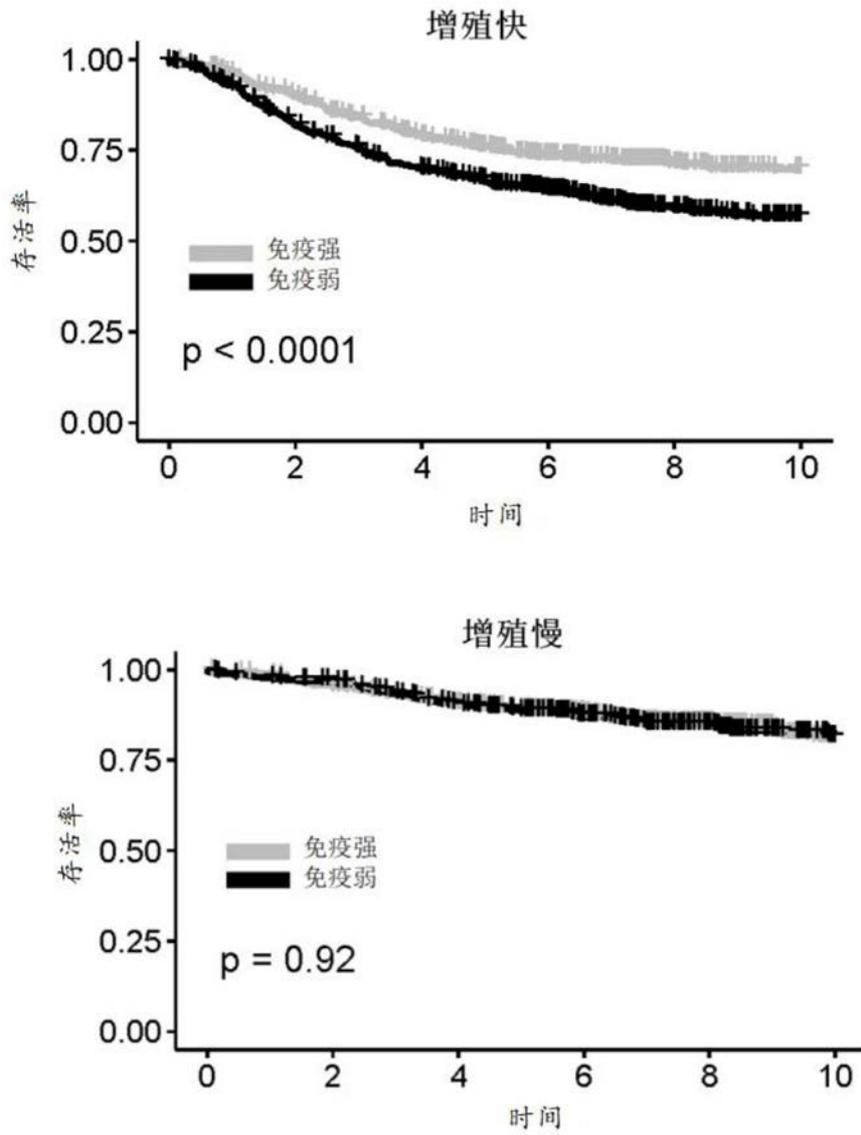


图2

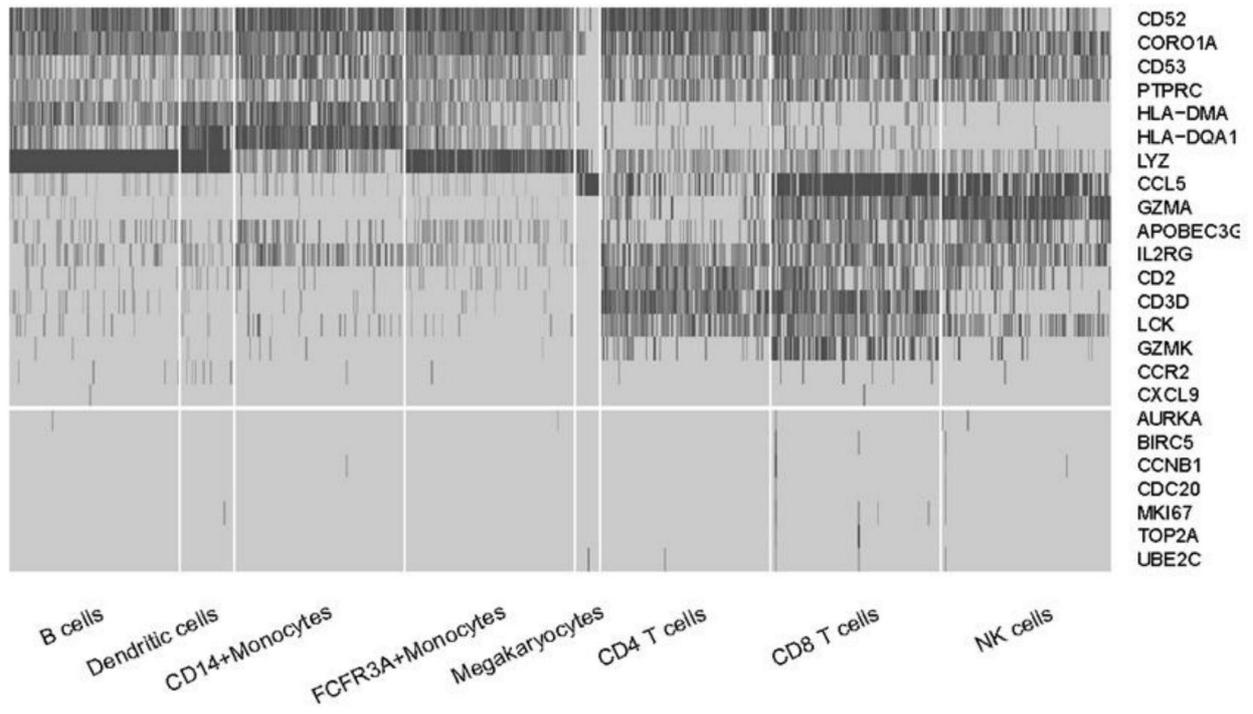


图3

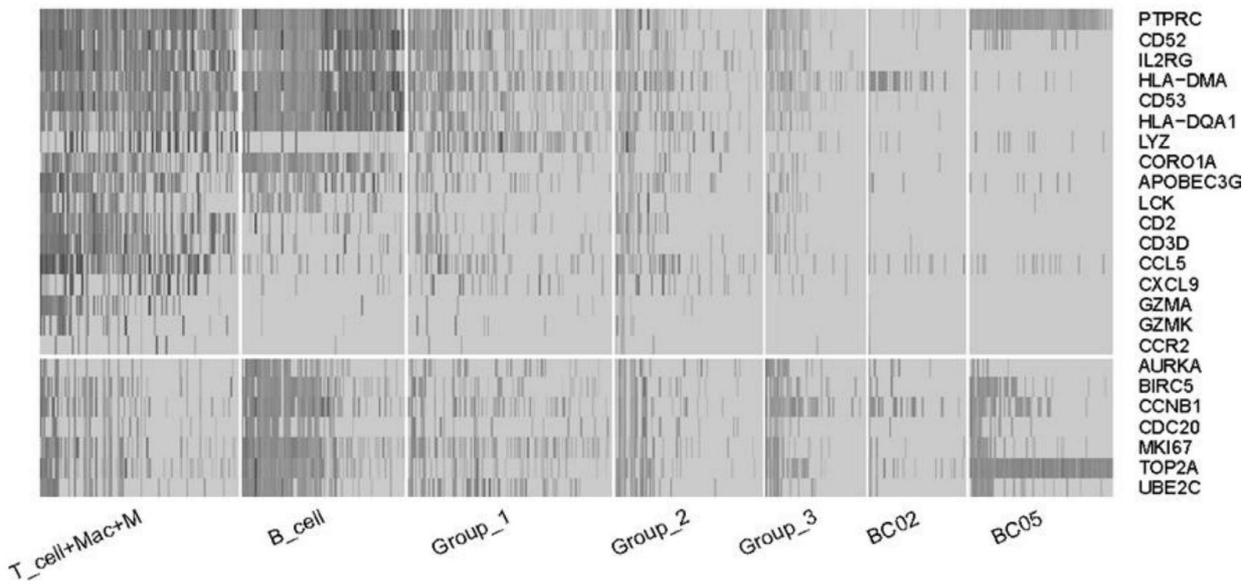


图4