



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107299154 A

(43)申请公布日 2017.10.27

(21)申请号 201710559840.5

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2017.07.11

(71)申请人 河南农业大学

地址 450002 河南省郑州市金水区文化路  
95号

(72)发明人 宁长申 闫亚群 崔艳艳 赵姗姗  
王晓星 张艳 史柯 菅复春  
张龙现 王荣军 景纪春

(74)专利代理机构 郑州中原专利事务所有限公  
司 41109

代理人 赵磊

(51)Int. Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

C12Q 1/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表1页 附图7页

(54)发明名称

一种羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双  
重PCR专用引物及双重PCR检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物,引物的核苷酸序列为:羊吕氏泰勒虫专用引物T.1u7;如SEQ NO.1和SEQ NO.2所示;嗜吞噬细胞无浆体专用引物SSAP2;如SEQ NO.3和SEQ NO.4所示。羊吕氏泰勒虫专用引物T.1u7的扩增产物大小为962bp,嗜吞噬细胞无浆体专用引物SSAP2的扩增产物大小为641bp。本发明基于*T. luwenshuni*18S rRNA靶基因和*A. phagocytophilum*16S rRNA靶基因建立的双重PCR方法特异性高。该法有着检测速度快,敏感性高,特异性强、高效、低成本等优点,适于两种病原所引起疾病的流行病学调查和临床确诊。

1. 一种羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物,其特征在于:引物的核苷酸序列为:

羊吕氏泰勒虫专用引物T.1u7:

T.1u7F:5' -TGCTGCATTGCATCTTCT-3' ,

T.1u7R:5' -AGGGACGTAATCTGCACAAG-3' ;

嗜吞噬细胞无浆体专用引物SSAP2:

SSAP2F:5' -GCTGAATGTGGGGATAATTTAT-3' ,

SSAP2R:5' -ATGGCTGCTTCCTTTTCGGTTA-3' 。

2. 根据权利要求1所述的羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物,其特征在于:所述羊吕氏泰勒虫专用引物T.1u7的扩增产物大小为962bp,嗜吞噬细胞无浆体专用引物SSAP2的扩增产物大小为641bp。

3. 利用权利要求1所述的羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物进行双重PCR检测的方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 待测样品DNA的提取;

(2) 将引物对T.1u7和SSAP2分别配置成浓度为25 $\mu$ M/L的溶液;

(3) 以待测样品DNA为模板进行双重PCR扩增:

PCR25 $\mu$ L扩增反应体系为:LA Taq DNA Polymeras 0.25 $\mu$ L,10 $\times$ LA Buffer 3.0 $\mu$ L,dNTP Mixture 4.0 $\mu$ L,T.1u7 F和T.1u7 R各0.5 $\mu$ L,SSAP2 F和SSAP2 R各0.5 $\mu$ L,DNA模板2.0 $\mu$ L,灭菌去离子水补足至25 $\mu$ L;

PCR扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性35s,55 $^{\circ}$ C退火35s,72 $^{\circ}$ C延伸35s,运行40个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10min;

(4) 扩增产物的判定方法:PCR反应终止后,取5 $\mu$ L PCR产物,用1%琼脂糖电泳检测扩增结果:扩增得到962bp大小产物则判定为样品中含有羊吕氏泰勒虫,扩增得到641bp大小产物则判定为样品中含有嗜吞噬细胞无浆体。

## 一种羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物及 双重PCR检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物及双重PCR检测方法。

### 背景技术

[0002] 羊泰勒虫病(Ovine And Caprine Theileriosis)是由泰勒科泰勒属的原虫寄生于绵羊和山羊巨噬细胞、淋巴细胞和红细胞内所引起的疾病的总称,属于一种由媒介蜱传播的蜱传性血液原虫病(Neitz W O 1957, Barnett S F 1977, Morel P C et al, 1981)。泰勒虫于1914年第一次在埃及被发现(Littlewood 1915),而中国最早于1958年由杨辅国等报道了四川的羊泰勒虫病(Yang et al, 1958)。该病能引起山羊和绵羊发热、贫血症和黄疸等临床症状,使羊只发育迟缓,产肉量和产毛量显著下降,并可引起羔羊和外来羊只大量死亡,从而限制了地方性养羊业的发展和生产,到目前为止,已有六种羊泰勒虫被报道,分别为致病力较强的莱氏泰勒虫(*Theileria lestoquardi*)、吕氏泰勒虫(*T. luwenshuni*)和尤氏泰勒虫(*T. uilenbergi*),以及对羊致病力很弱或无致病性的绵羊泰勒虫(*T. ovis*)、分离泰勒虫(*T. separata*)和隐藏泰勒虫(*T. recondita*)。其中*T. luwenshuni*、*T. uilenbergi*和*T. ovis*均在国内被发现。根据报道,我国东南地区、西北地区和中部地区的山羊和绵羊均有*T. luwenshuni*感染。

[0003] 嗜吞噬细胞无浆体(*A. phagocytophilum*, AP)于1932年在苏格兰地区首次被发现,引起了羊的不明发热,由于发现该病与牧草中的蜱虫有关,将其称为蜱传热病(TBF)。由*A. phagocytophilum*引起的人粒细胞无形体病(human granulocytic anaplasmosis, HGA)是人兽共患病,最初该病原被称为人粒细胞埃立克体,后来将其重新分类归属于立克次体目,无浆体科,无浆体属,更名为人粒细胞无浆体(*A. phagocytophilum*),*A. phagocytophilum*具有广泛的宿主群,包括人类、野生动物和家畜等,是对人和动物都有较强致病性的人畜共患病原体,属于自然疫源性疾病,可引起反刍动物的急性和慢性传染病,*A. phagocytophilum*能诱导机体立即产生炎症反应和免疫反应,介导免疫活性细胞及炎症因子对宿主细胞的攻击,最终导致免疫抑制及潜在疾病引起的各种继发感染和器官衰竭,患病特征主要表现为胆囊肿大、贫血、黄疸、高热、消瘦,严重者甚至可以导致死亡。

[0004] *A. phagocytophilum*作为一种人和多种动物的人兽共患病病原,具有公共卫生学意义,受到人们的高度重视,嗜吞噬细胞无浆体病的发生呈季节分布,主要发生在媒介硬蜱活动期间,在中国部分地区硬蜱、森林革蜱、长角血蜱等都是嗜吞噬细胞无形体的传播媒介,易感动物和人经感染幼蜱叮咬造成感染传播。我国2006年在安徽省报告发现HGA病病例,此后在山东、湖北、河南、浙江等省陆续有发病报道,在安徽、湖北等省家畜中都检测到*A. phagocytophilum*,在新疆伊犁地区也有家畜感染该病的相关报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物及双重PCR检测方法。

[0006] 本发明的目的是以下述方式实现的:

一种羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物,引物的核苷酸序列为:

羊吕氏泰勒虫专用引物T.1u7:

T.1u7F:5'-TGCTGCATTGCATCTTCT-3',如SEQ NO.1所示;

T.1u7R:5'-AGGGACGTAATCTGCACAAG-3',如SEQ NO.2所示;

嗜吞噬细胞无浆体专用引物SSAP2:

SSAP2F:5'-GCTGAATGTGGGGATAATTTAT-3',如SEQ NO.3所示;

SSAP2R:5'-ATGGCTGCTTCCTTTTCGGTTA-3',如SEQ NO.4所示。

[0007] 所述羊吕氏泰勒虫专用引物T.1u7的扩增产物大小为962bp,嗜吞噬细胞无浆体专用引物SSAP2的扩增产物大小为641bp。

[0008] 利用上述的羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物进行双重PCR检测的方法,包括以下步骤:

- (1) 待测样品DNA的提取;
- (2) 将引物对T.1u7和SSAP2分别配置成浓度为25 $\mu$ M/L的溶液;
- (3) 以待测样品DNA为模板进行双重PCR扩增:

PCR25 $\mu$ L扩增反应体系为:LA Taq DNA Polymeras 0.25 $\mu$ L,10 $\times$ LA Buffer 3.0 $\mu$ L,dNTP Mixture 4.0 $\mu$ L,T.1u7 F和T.1u7 R各0.5 $\mu$ L,SSAP2 F和SSAP2 R各0.5 $\mu$ L,DNA模板2.0 $\mu$ L,灭菌去离子水补足至25 $\mu$ L;

PCR扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性35s,55 $^{\circ}$ C退火35s,72 $^{\circ}$ C延伸35s,运行40个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10min;

(4) 扩增产物的判定方法:PCR反应终止后,取5 $\mu$ L PCR产物,用1%琼脂糖电泳检测扩增结果:扩增得到962bp大小产物则判定为样品中含有羊吕氏泰勒虫,扩增得到641bp大小产物则判定为样品中含有嗜吞噬细胞无浆体。

[0009] 相对于现有技术,本发明

(1) 操作简单;只需一个反应物体系进行一次扩增可同时检测两种病原,省时省力。

[0010] (2) 结果判定简单;琼脂糖凝胶电泳中出现962bp、641bp两条目的条带,可判断感染两种病原;只出现一条目的条带可判断感染了某一种病原:T.luwenshuni (962bp) 或 A.phagocytophilum (641bp)。

[0011] (3) 本发明基于T.luwenshuni18S rRNA靶基因和A.phagocytophilum16S rRNA靶基因建立的双重PCR方法特异性高。该法有着检测速度快,敏感性高,特异性强、高效、低成本等优点,适于两种病原所引起疾病的流行病学调查和临床确诊。

## 附图说明

[0012] 图1是不同LA Taq酶量双重PCR扩增结果:

M:DL2000Maker;1-9:LA Taq酶量依次为:0.01 $\mu$ L、0.1 $\mu$ L、0.15 $\mu$ L、0.2 $\mu$ L、0.25 $\mu$ L、0.3 $\mu$ L、0.35 $\mu$ L、0.4 $\mu$ L、0.45 $\mu$ L;10:阴性对照。

[0013] 图2是不同10 $\times$ LA Buffer量双重PCR扩增结果:

M:DL2000Maker;1-9:10×LA Buffer量依次为0.5μL、1μL、1.5μL、2μL、2.5μL、3μL、3.5μL、4μL、4.5μL;10:阴性对照。

[0014] 图3是不同dNTP Mixture量双重PCR扩增结果:

M:DL2000Maker;1-9:dNTP Mixture量依次为0.5μL、1.5μL、2μL、2.5μL、3μL、3.5μL、4μL、4.5μL、5μL;10:阴性对照。

[0015] 图4是不同引物量双重PCR扩增结果:

M:DL2000Maker;1-6:引物配比依次为0.4:0.4、0.45:0.55、0.5:0.55、0.5:0.5、0.47:0.53;7:阴性对照。

[0016] 图5是不同循环次数双重PCR扩增结果:

M:DL2000Maker;1-5:循环参数分别为20、25、30、35、40;6:阴性对照。

[0017] 图6是不同温度梯度双重PCR扩增结果:

M:DL2000Maker;1-12:退火温度分别为51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃;13:阴性对照。

[0018] 图7是双重PCR特异性试验结果:

M. DNA标准DL2000:1. T. luwenshuni+AP;2. T. luwenshuni;3. AP;4. T. ovis;5. T. uilenbergi;6. T. annulata;7. A. ovis;8. A. bovis;9. A. marginale;10. B. motasi;11. T. gondii;12. DdH2O。

[0019] 图8是T. luwenshuni敏感性试验:

M:DL2000Maker;1-9样品稀释倍数为:1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ ;10. 阴性对照。

[0020] 图9是A. phagocytophilum敏感性试验:

M:DL2000Maker;1-13样品稀释倍数为:1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-12}$ ;14. 阴性对照。

[0021] 图10是双重PCR敏感性试验:

M:DL2000Maker;1-13样品稀释倍数为:1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-12}$ ;14. 阴性对照。

[0022] 图11是重复性试验双重PCR扩增结果:

M:DL2000Maker;1-3. 重复性;4. 阴性对照。

[0023] 图12是双重PCR检测方法PCR扩增结果:

M:DL2000Maker;1-6. PCR产物;7. 阳性对照;8. 阴性对照。

[0024] 图13是引物T. lu7F/T. lu7RPCR扩增T. luwenshuni 18S rRNA基因结果:

M:DL2000Maker;1-6. PCR产物。

[0025] 图14是引物SSAP2f/SSAP2r PCR扩增A. phagocytophilum16S rRNA基因结果:

M:DL2000Maker;1-5. PCR产物;6. 阳性对照;7. 阴性对照。

## 具体实施方式

[0026] 以下结合实施例对本发明作进一步阐述,便于更好地理解本发明,但并不限制本发明。

[0027] 羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物的设计及双重PCR检测方法

的研究

### 1. 引物设计与合成

利用Clustal X 2.1序列分析软件,将GenBank中的羊Theilerialuwenshuni 18S rRNA序列(登录号:KC735166.1)与其他物种同源序列进行比对,用Primer Premier 5.0软件设计1对种特异性引物T.lu7F/T.lu7R,由上海生工生物工程股份有限公司合成;引用扩增A.phagocytophilum种特异性引物SSAP2f/SSAP2r (Kawahara Met al.,2006),引物详情见表1。

表1 双重PCR引物序列及扩增产物大小

Parasite	Target gene	Primer	Primer sequence	Expected product size (bp)
<i>T.luwenshuni</i>	18S rRNA	T.lu7 F T.lu7 R	5'-TGCTGCAATTGCATCTTCT-3' 5'-AGGGACGTAATCTGCACAAG-3'	962
<i>A.phagocytophilum</i>	16S rRNA	SSAP2 F SSAP2 R	5'-GCTGAAATGTGGGGATAATTAT-3' 5'-ATGGCTGCTTCCTTTCGGTTA-3'	641 Kawahara Met al., 2006

### [0028] 2. PCR反应体系及反应条件优化

对PCR反应体系中的酶、PCR Buffer、dNTP Mixture和引物的最佳浓度进行优化;并对最佳循环参数进行优化。反应体系及条件见表2-3。

表2 双重PCR 25μL扩增反应体系

试剂	第一套 PCR
LA Taq DNA Polymerase	0.25 μL
10 × LA Buffer	3.0 μL
dNTP Mixture	4.0 μL
T.lu7 F	0.5 μL
T.lu7 R	0.5 μL
SSAP2f	0.5 μL
SSAP2r	0.5 μL
DNA 模板	2.0 μL
灭菌去离子水	13.75 μL

表3 双重PCR扩增反应条件

预变性	变性	退火	延伸	循环数	再延伸
94℃	94℃	55℃	72℃	40	72℃
5min	35s	35s	35min		10min

[0029] LA Taq DNA Polymerase量的优化:在其他条件相同的情况下,在25μL反应体系中,LA Taq DNA Polymerase (5U/μL)加量分别为0.01、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45μL进行PCR扩增。结果最佳加量为0.25μL,浓度低影响合成产物量(见图1)。

[0030] 10×LA Buffer量的优化:在其他条件相同的情况下,在25μL反应体系中,10×LAPCR Buffer加量分别为0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5μL进行PCR扩增。结果最佳含量为3μL,过低则影响PCR效率(见图2)。

[0031] dNTP Mixture量的优化:在其他条件相同的情况下,在25μL反应体系中,2.5mM的dNTP Mixture加量分别为0.5、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5μL进行PCR扩增。结果dNTP Mixture的含量为4μL时,扩增效果较好(见图3)。

[0032] 对体系中引物的优化:在其他条件相同的情况下,在25μL反应体系中,浓度为25μM/L的引物T.lu7F/T.lu7R和SSAP2f/SSAP2r加量配比分别为(μL):0.4:0.4;0.4:0.6;0.45:

0.55;0.5:0.55;0.5:0.5;0.47:0.53进行PCR扩增。结果引物T.1u7F/T.1u7的含量为0.5 $\mu$ L, SSAP2f/SSAP2r的含量为0.5 $\mu$ L,扩增效果较好(见图4)。

[0033] 对循环参数的优化:在其他条件相同的情况下,在25 $\mu$ L反应体系中,循环参数分别为20、25、30、35、40进行PCR扩增。结果40个循环为该反应的最适循环参数,随循环次数的增加,扩增的目的条带逐渐增亮(见图5)。

[0034] 最适退火温度的筛选:对吕氏泰勒虫阳性和嗜吞噬细胞无浆体DNA进行温度梯度双重PCR扩增,温度梯度为51 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、57 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、59 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C。根据不同退火温度下目的条带的亮度及有无非特异性条带及交叉二聚体进行综合分析,确定该反应体系的最适退火温度。结果51 $^{\circ}$ C-62 $^{\circ}$ C均有特异性条带扩增,以55 $^{\circ}$ C作为反应参数中PCR的最适退火温度(见图6)

### 3. 产物的回收、克隆及测序

用DNA凝胶回收试剂盒将PCR产物回收,将回收产物与pMD18-T载体连接,转入大肠杆菌DH50 $\alpha$ 感受态细胞中,经蓝白斑筛选得到阳性菌斑扩大培养,阳性菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。应用DNAS<sub>tar</sub> 7.1软件和BLAST工具将测得的核苷酸序列与GenBank中的相关序列进行同源性比较。结果将羊吕氏泰勒虫测序结果与GenBank中登录的相关参考序列的同源性为99.4%-99.9%。嗜吞噬细胞无浆体测序结果与GenBank中登录的相关参考序列的同源性为99.8%-100%。

### [0035] 4. 特异性试验

分别提取吕氏泰勒虫、绵羊泰勒虫、尤氏泰勒虫、环形泰勒虫、绵羊无浆体、牛无浆体、边缘无浆体、莫氏巴贝斯虫、弓形虫的基因组DNA,作为特异性试验的模板。按最佳反应体系及条件进行PCR扩增,来检验该方法的特异性。结果以优化好的双重PCR体系和反应条件,进行特异性试验,羊吕氏泰勒虫基因组DNA出现962bp左右的条带,嗜吞噬细胞无浆体基因组出现641bp左右的条带,而绵羊泰勒虫、尤氏泰勒虫、环形泰勒虫、绵羊无浆体、牛无浆体、边缘无浆体、莫氏巴贝斯虫、弓形虫则未出现条带(见图7)。

### [0036] 5. 敏感性试验

#### (1) 羊吕氏泰勒虫单PCR敏感性试验

用紫外分光光度计测定提取的羊吕氏泰勒虫质粒作为标准模板浓度为291.3ng $\cdot\mu$ L<sup>-1</sup>,D260/D280=1.89,说明所提取的DNA无蛋白和RNA污染,将标准模板按1:10比例连续稀释,按最佳反应体系及条件进行PCR扩增,检测最低DNA检测量。结果显示,PCR可以检测到羊吕氏泰勒虫DNA的最大稀释倍数为1 $\times 10^{-7}$ ,即最低可检测到29.13fg $\cdot\mu$ L<sup>-1</sup>(见图8)。

#### [0037] (2) 嗜吞噬细胞无浆体单PCR敏感性试验

用紫外分光光度计测定提取的嗜吞噬细胞无浆体质粒作为标准模板浓度153.4ng $\cdot\mu$ L<sup>-1</sup>,D260/D280=1.89,说明所提取的DNA无蛋白和RNA污染,将标准模板按1:10比例连续稀释,按最佳反应体系及条件进行PCR扩增,检测最低DNA检测量。结果显示,PCR可以检测到嗜吞噬无浆体DNA的最大稀释倍数为1 $\times 10^{-10}$ ,即最低可检测到15.34ag $\cdot\mu$ L<sup>-1</sup>(见图9)。

#### [0038] (3) 双重PCR检测方法敏感性试验

按双重PCR最佳反应体系及条件进行PCR扩增,检测双重PCR中羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体最低DNA检测量。结果显示,PCR可以检测到羊吕氏泰勒虫DNA的最大稀释倍数为1 $\times 10^{-7}$ ,即最低可检测到29.13fg $\cdot\mu$ L<sup>-1</sup>;嗜吞噬无浆体DNA的最大稀释倍数为1 $\times 10^{-8}$ ,即

最低可检测到 $1.534\text{fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (见图10)。

#### [0039] 6. 重复性试验

以羊吕氏泰勒虫阳性样品和嗜吞噬细胞无浆体阳性样品为模板,用优化好的PCR反应体系及条件进行3次重复检测,检验所建立方法的稳定性。结果用所建立的PCR方法,以羊吕氏泰勒虫阳性样品和嗜吞噬细胞无浆体DNA模板进行3次重复检测,均可扩增出特异片段(见图11)。

#### [0040] 7. 临床应用

用本试验建立的方法对采自洛阳宜阳赵堡乡的54份羊血液DNA样品进行PCR检测,单PCR扩增*T. luwenshuni*阳性率为85.19% (46/54),*A. phagocytophilum*阳性率为83.33% (45/54),混合感染阳性率为72.22% (39/54);双重PCR扩增*T. luwenshuni*阳性率为87.04% (47/54),*A. phagocytophilum*阳性率为55.56% (30/54),混合感染阳性率为50% (27/54);双重PCR引物、反应体系及反应条件分别见表1、2、3,检测统计结果见表4;部分图片见图12-14。

表4 双重PCR与单PCR检测方法临床检测结果

检测方法	检测项目	PCR 检测结果		
		<i>T. luwenshuni</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	混合感染
单 PCR	阳性数/样品数	47/54	45/54	39/54
	感染率%	87.04	83.33	72.22
双重 PCR	阳性数/样品数	47/54	30/54	27/54
	感染率%	87.04	55.56	50

$0.01 < P < 0.05$ 。



## SEQUENCE LISTING

<110> 河南农业大学

<120> 一种羊吕氏泰勒虫和嗜吞噬细胞无浆体双重PCR专用引物及双重PCR检测方法

<130> 1

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

tgctgcattg catcttct 18

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

agggacgtaa tctgcacaag 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gctgaatgtg gggataattt at 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

atggctgctt cctttcggtt a 21

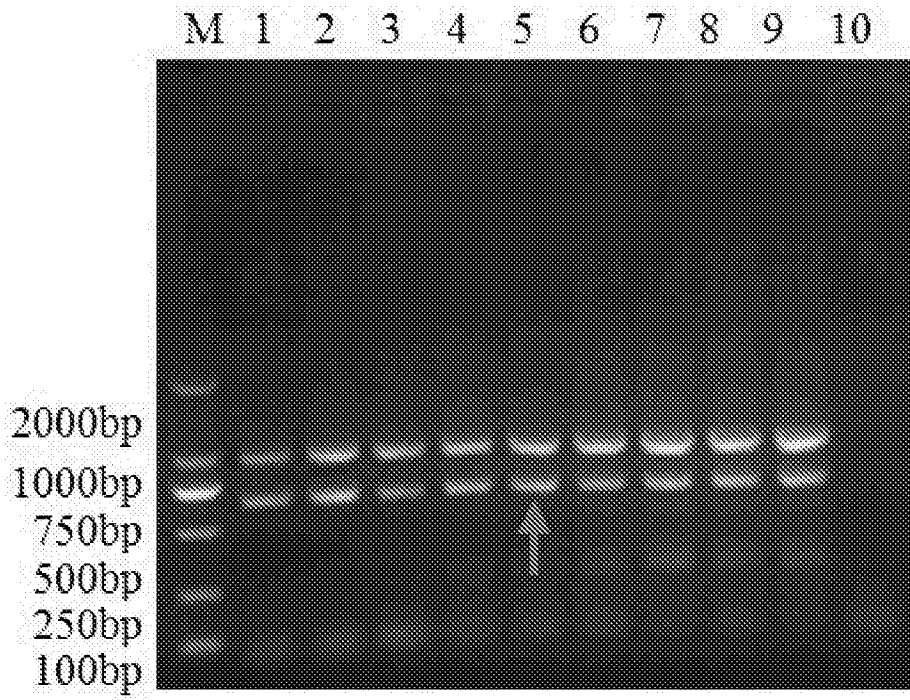


图1

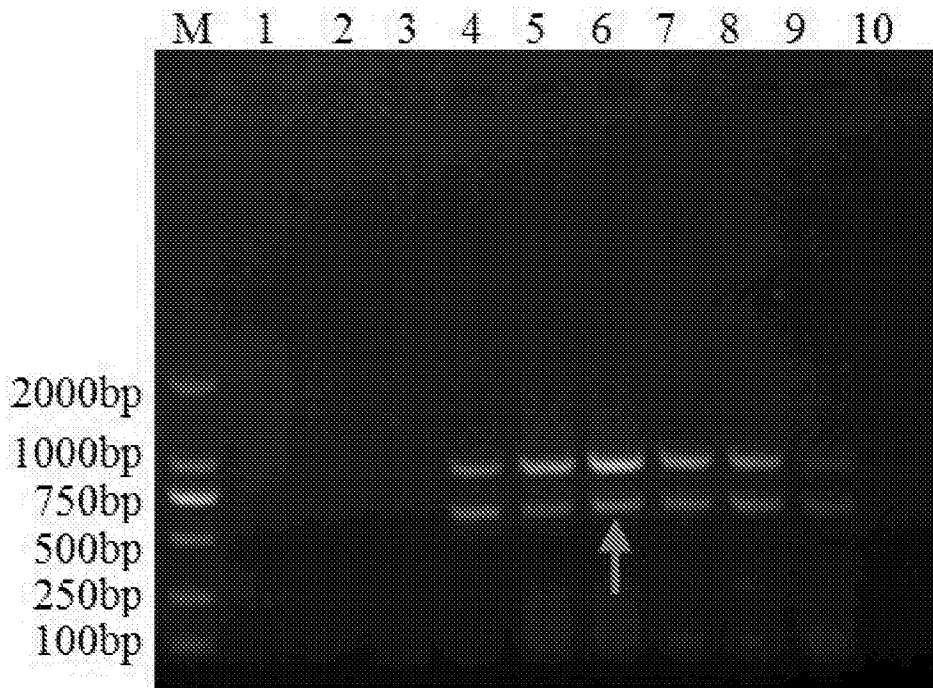


图2

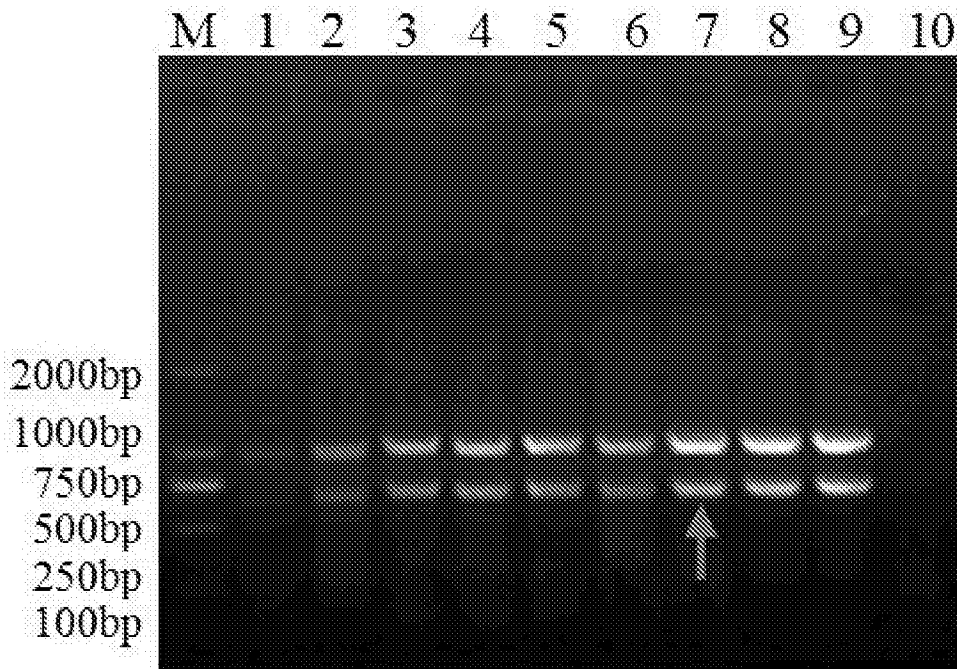


图3

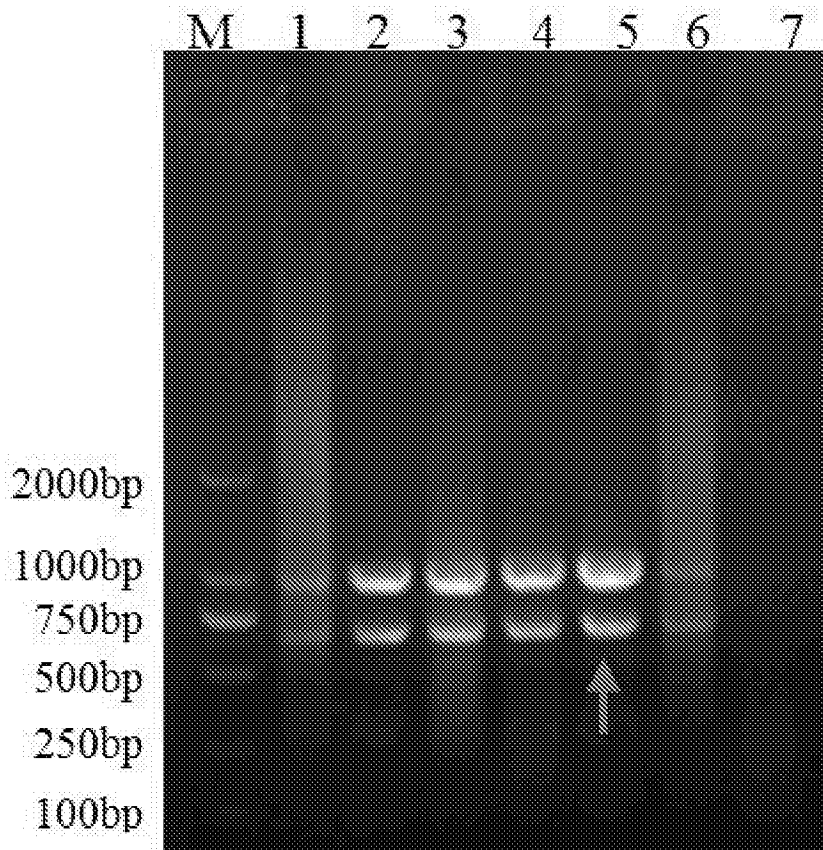


图4

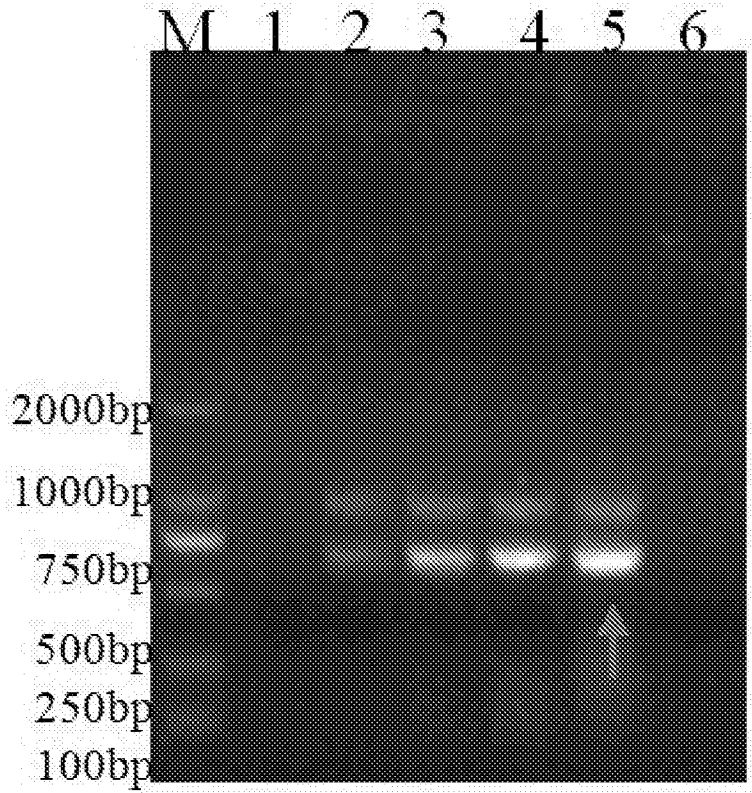


图5

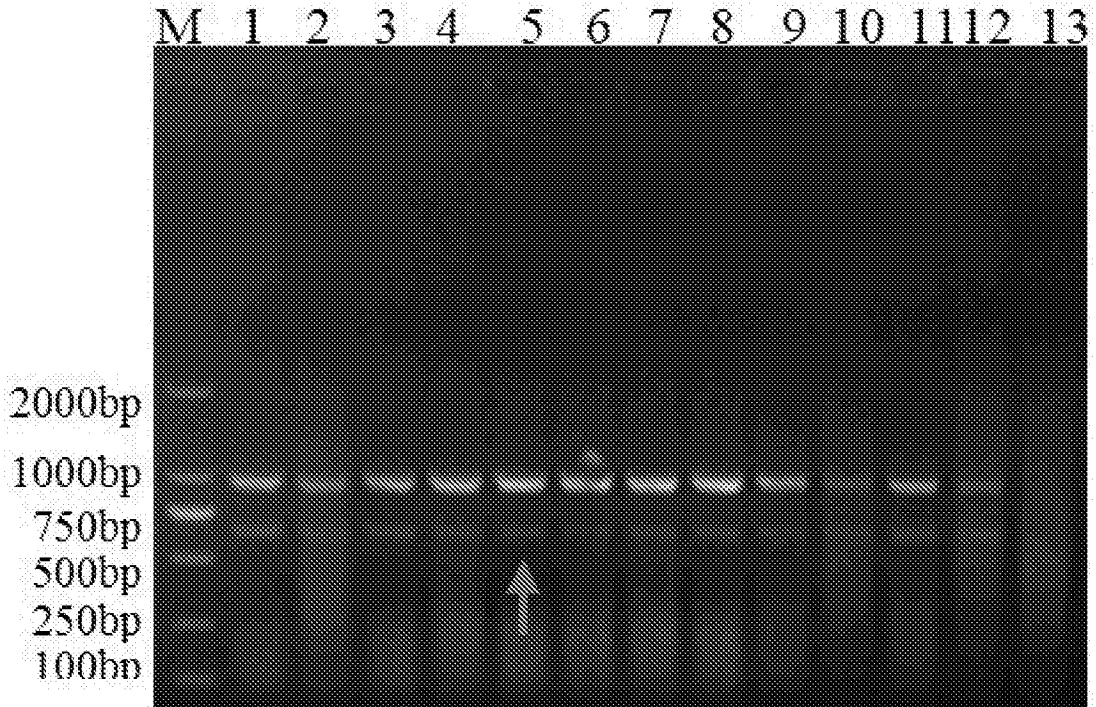


图6

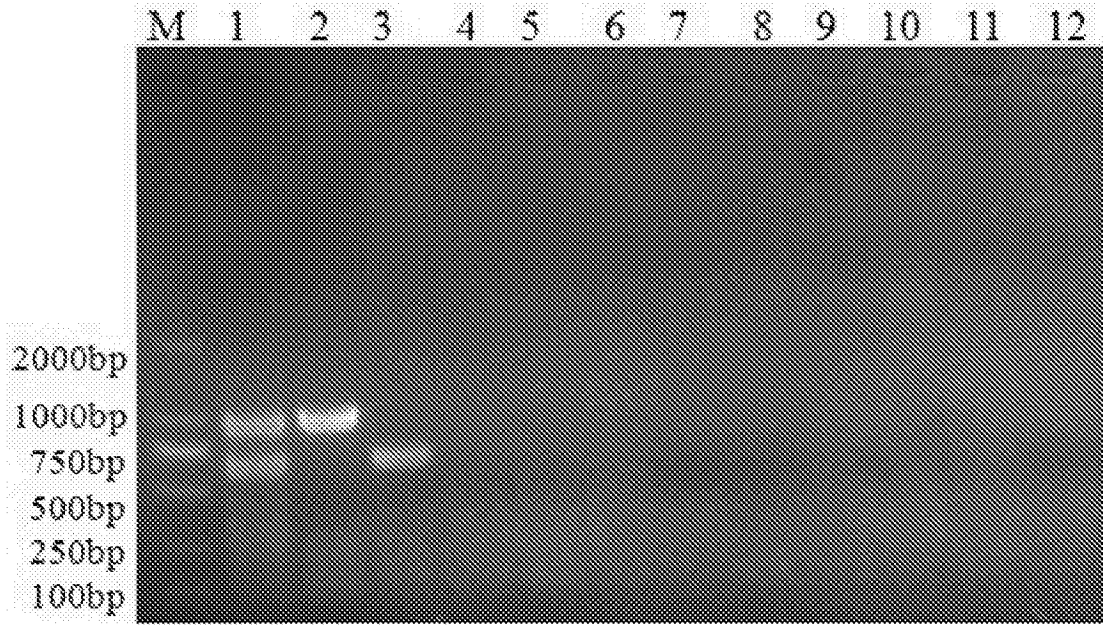


图7

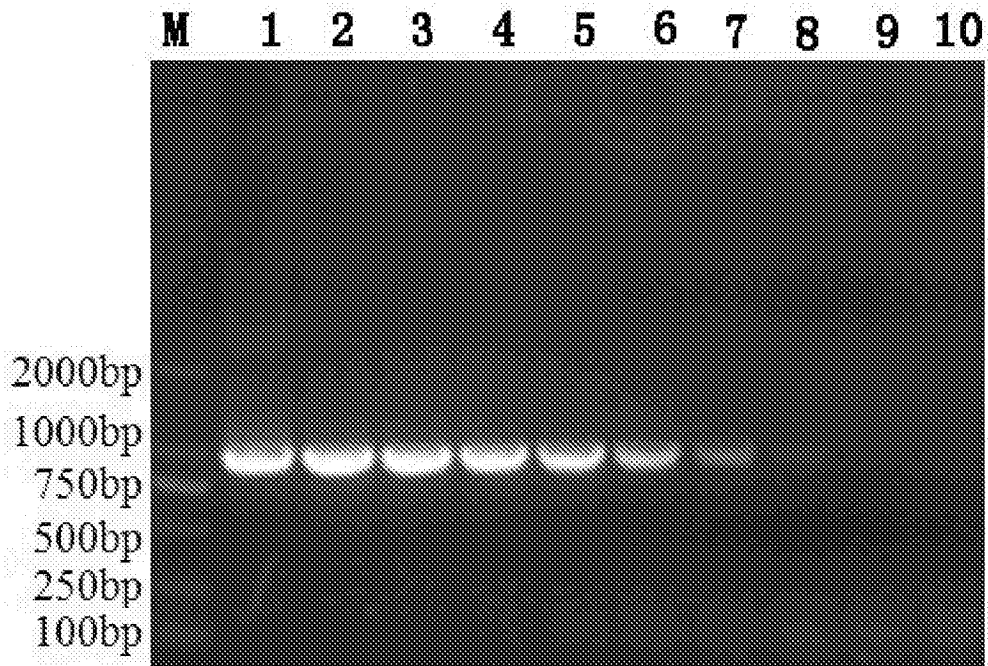


图8

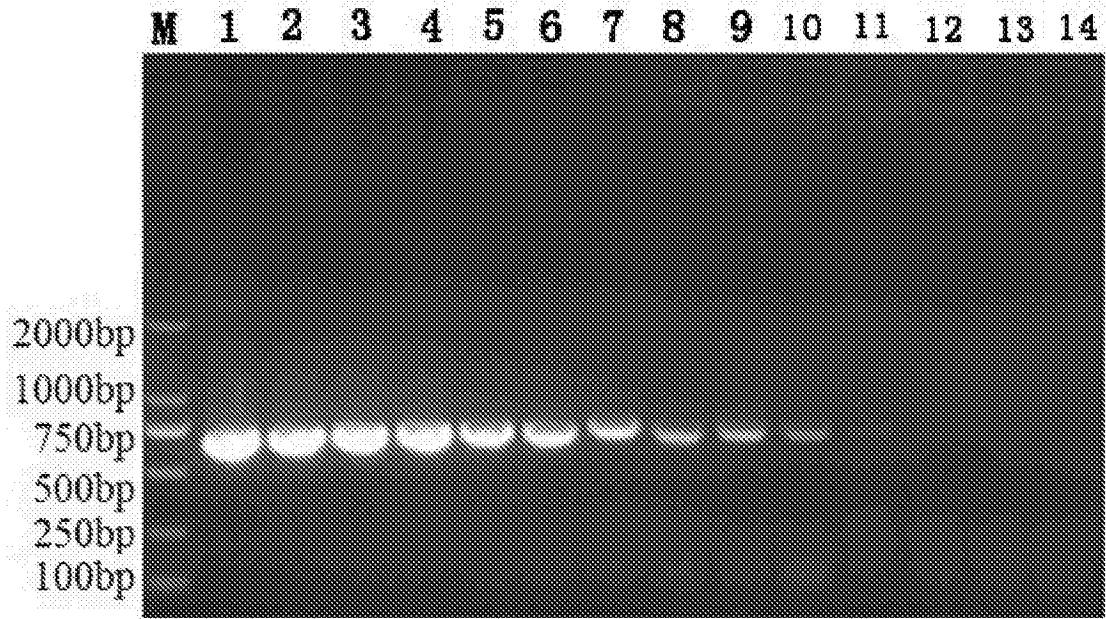


图9

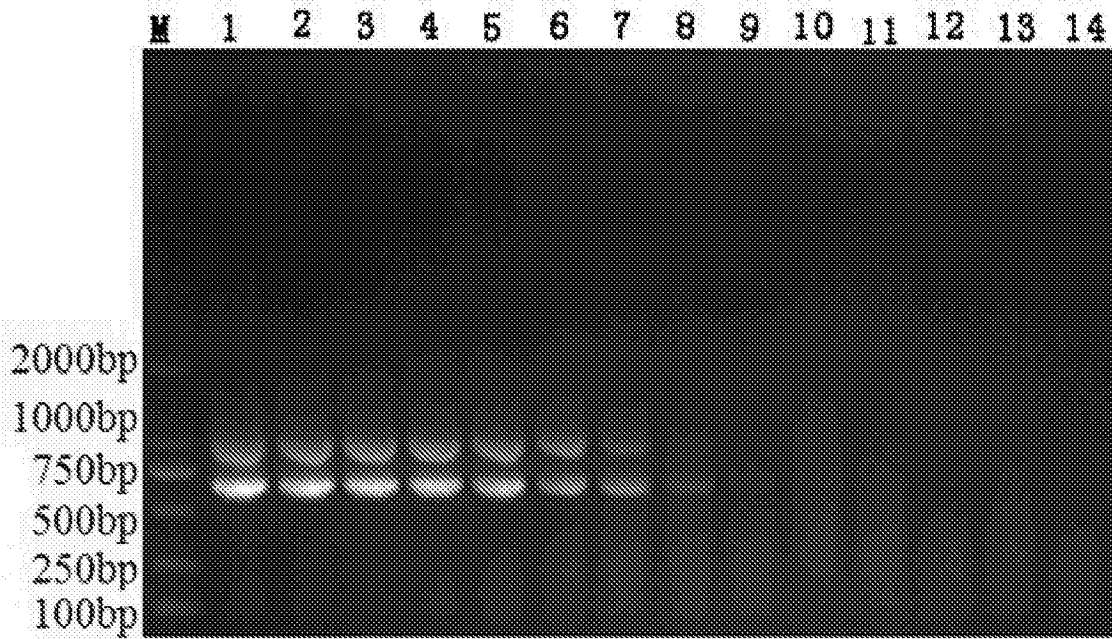


图10

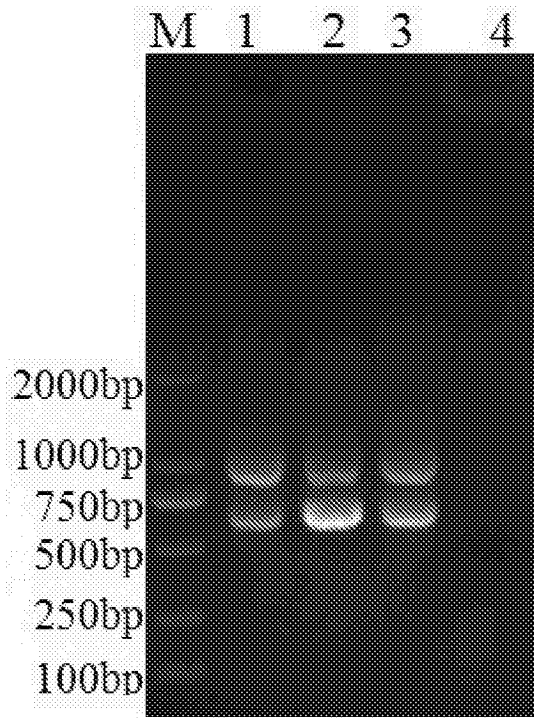


图11

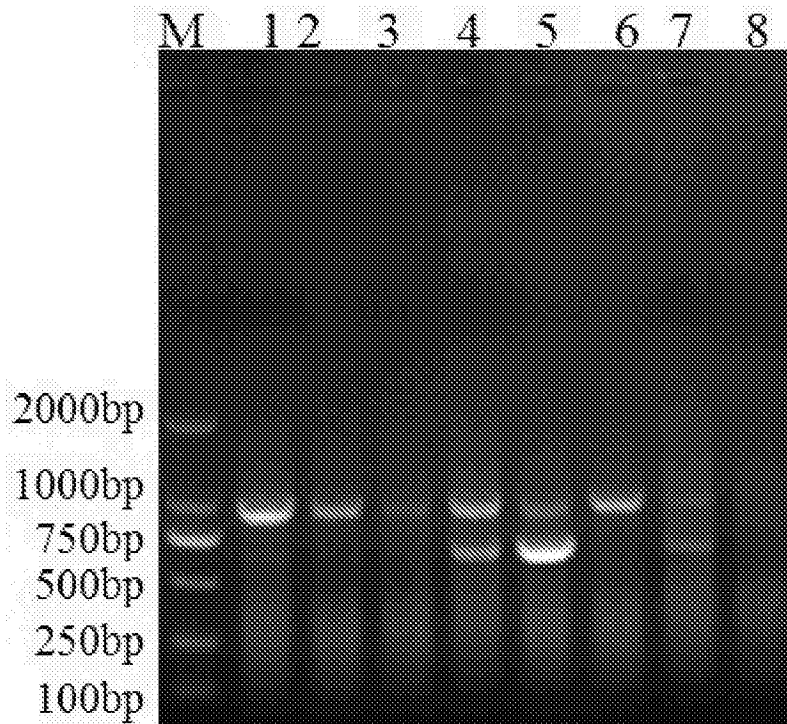


图12

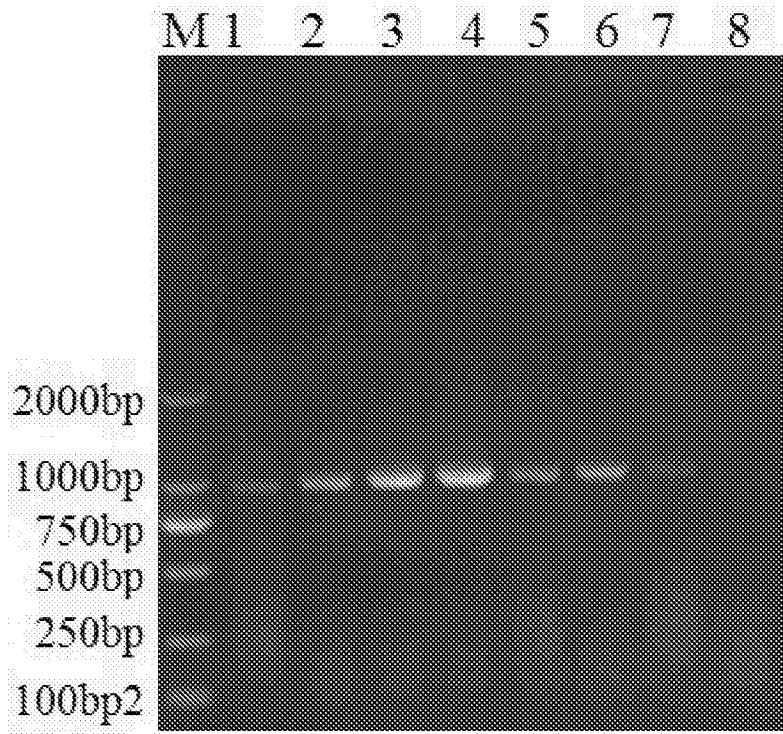


图13

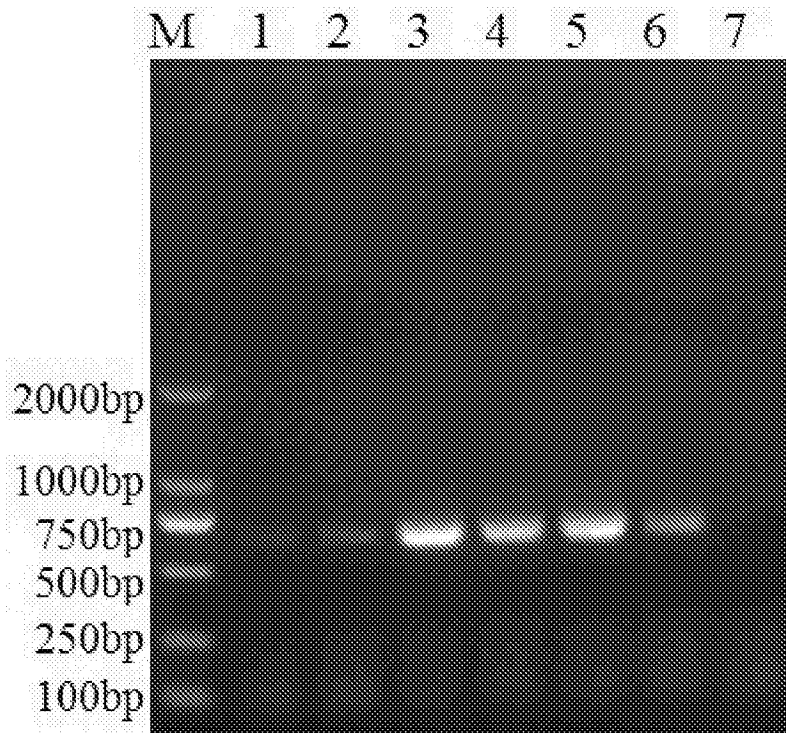


图14