



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104762301 B
(45)授权公告日 2017. 12. 26

(21)申请号 201510200380.8

(22)申请日 2015.04.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104762301 A

(43)申请公布日 2015.07.08

(73)专利权人 武汉大学
地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72)发明人 郑芳 杨国华 邱雪平 黄一芳
邓冠华 高嘉嘉

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222
代理人 常海涛

(51)Int. Cl.
C12N 15/11(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

Jing Shen et al..Genome-wide DNA Methylation Profiles in Hepatocellular Carcinoma.《Hepatology》.2012,第55卷(第6期),1799-1808.

Xueping Qiu et al..Hypermethylation of ACP1, BMP4, and TSPYL5 in Hepatocellular Carcinoma and Their Potential Clinical Significance.《Dig Dis Sci》.2015,第61卷(第6期),149-157.

Yeonjoo Jung et al..Gene silencing of TSPYL5 mediated by aberrant promoter methylation in gastric cancers.《Laboratory Investigation》.2007,第88卷(第2期),153-160.

审查员 李楠

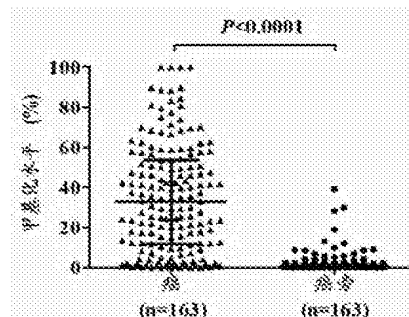
权利要求书1页 说明书6页
序列表7页 附图3页

(54)发明名称

一种检测肝癌风险基因TSPYL5甲基化水平的试剂盒及方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测肝癌风险基因TSPYL5甲基化水平的试剂盒及方法,属于生物技术领域。检测TSPYL5基因甲基化水平的试剂盒包括用于MSRE-qPCR方法的引物对A或用于BSP方法的引物对B,这些引物序列如SEQ ID NO.1-22所示。本发明发现了TSPYL5基因甲基化与肝癌发生的关联性,并鉴定了TSPYL5的甲基化位点。本发明采用特定的甲基化敏感性限制性内切酶结合特定的引物,建立了荧光定量PCR的检测TSPYL5的甲基化方法。通过本发明基于MSRE-qPCR的试剂盒及方法检测TSPYL5甲基化水平,其灵敏度高达83.9%,特异度高达93.25%。



1. 一种基于甲基化敏感性限制性内切酶结合荧光定量PCR检测TSPYL5基因甲基化水平的试剂盒,其特征在于:包含以下引物对:

AF2:5' -ATATCAGAGAAACTCGCCGAG-3' ,

AR2:5' -CACGAACGTACAACGTACCG-3' ;

所述的甲基化敏感性限制性内切酶为HinfI。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:还包含甲基化敏感性限制性内切酶。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:还包含荧光定量PCR试剂。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的试剂盒,其特征在于:还包含甲基化阴性对照和甲基化阳性对照。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于:所述的甲基化阴性对照包括正常人外周血DNA、非甲基化的人类基因组DNA。

6. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于:所述的甲基化阳性对照包括甲基化的人类基因组DNA、靶基因片段甲基化的肝癌细胞系DNA。

一种检测肝癌风险基因TSPYL5甲基化水平的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种检测肝癌风险基因TSPYL5甲基化水平的试剂盒及方法。

背景技术

[0002] DNA甲基化是表观遗传学研究的主要内容之一,研究的是基因碱基序列不发生改变的情况下发生的可逆的遗传性改变,是一种DNA分子复制后共价修饰方式。在真核生物中,DNA甲基化指在DNA甲基转移酶(DNMTs)的作用下,以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体将甲基转移至DNA分子中的特定碱基上的过程,它主要发生在CpG二核苷酸中的胞嘧啶上。在基因组中,CpG二核苷酸分布相对集中的区域称为CpG岛(CpG islands,CGIs),大小在100~1000bp,主要位于基因的启动子区和第一外显子区;CpG岛的异常甲基化可以直接导致相关基因的表达沉默。DNA特定的甲基化模式对于维持基因组稳定性及基因正确的时空表达具有重要意义,甲基化模式的异常改变将会直接参与人类疾病甚至癌症的发生。

[0003] 甲基化敏感性限制性内切酶技术结合PCR的方法(Methylation-sensitive restriction enzyme digestion and PCR,MSRE-PCR)是基于甲基化敏感性限制性内切酶对甲基化位点不切割的特性,将DNA消化为不同大小的片段后再进行PCR扩增,根据电泳产物差异分析甲基化状态。具体原理参见图1,选用对特异DNA片段甲基化序列敏感的限制性内切酶进行酶切后,以待测甲基化位点外侧序列为扩增起始点进行PCR。该DNA片段若存在甲基化,将会有扩增产物出现;若无甲基化,则不会有任何片段扩增出现。当用甲基化不敏感的内切酶消化产物作为PCR模板时,不论该部位是否甲基化都不应有片段扩出。

[0004] 重亚硫酸盐克隆测序(bisulfite sequencing PCR,BSP)的方法,提取的DNA经亚硫酸氢盐修饰后,未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成胸腺嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变。经过PCR胸腺嘧啶全部转化成胸腺嘧啶。PCR产物琼脂糖电泳后切胶纯化,随后连接到pMD18-T载体,转化大肠杆菌,过夜培养后挑单个阳性克隆提取质粒进行测序,得到每个DNA分子特定区域甲基化位点的分布图,从而得到该区域各个CpG位点的甲基化状态。该方法是一种可靠性及精确度很高的检测甲基化状态的方法,能够明确目的片段中每一个CpG位点的甲基化状态。在寻找有意义的关键性CpG位点上,有其他方法无法比拟的优点。然而该方法耗费时间、资金以及精力,至少要测序10个以上的克隆才能获得可靠数据,需要大量的克隆及质粒提取测序,过程较为繁琐、昂贵。故而难以在临床实现高通量的自动化检测,但却可以作为甲基化检测新方法的对比方法。

[0005] 本试剂盒拟建立基于甲基化敏感性限制性内切酶结合荧光定量PCR(MSRE-qPCR)的方法,将MSRE-PCR方法的后续检测改为荧光定量PCR,可以定量检测微量DNA样品特定基因位点的甲基化水平。该方法使用方便,无需进行亚硫酸氢盐处理,而且对石蜡切片有良好的兼容性。

发明内容

[0006] 基于此,本发明的目的在于提供一种灵敏度高、特异性良好的检测肝癌风险基因 *TSPYL5* 甲基化水平的试剂盒。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0008] 一种用于检测 *TSPYL5* 基因甲基化的荧光定量PCR的方法,包括如下步骤:①提取待测样本基因组DNA;②使用甲基化敏感性限制性内切酶对基因组DNA进行酶切;③使用引物对A对酶切产物进行荧光定量PCR扩增;④对PCR产物的Ct值进行分析;⑤根据分析结果判断样本中 *TSPYL5* 基因的甲基化水平。

[0009] 其中,步骤③中的引物对A优选为以下四对引物中的一对(括号内表示引物对扩增片段的长度):

[0010] AF1:5' -CCCCGCGAGCGCATATCAGAG -3' (176bp),

[0011] AR1:5' -GCAACCGCCGACGTCACGAAC-3' ;

[0012] AF2:5' -ATATCAGAGAACTCGCCGAG-3' (150bp),

[0013] AR2:5' -CACGAACGTACAACGTACCG-3' ;

[0014] AF3:5' -CAGAGAACTCGCCGAGACCTA-3' (231bp),

[0015] AR3:5' -TTCAAAGACACGCTGTGACCCT-3' ;

[0016] AF4:5' -AGCGCATATCAGAGAACT-3' (140bp),

[0017] AR4:5' -GTACCGTCGCGAGAGGACGTGA-3' 。

[0018] 上述引物通过如下方法设计得到:从UCSC数据库获得 *TSPYL5* 基因CpG岛序列,通过分析该序列中的酶切位点,采用在线引物设计软件(<http://simgene.com/Primer3>) primer premier 3.0设计包含2-6个酶切位点的PCR引物。经过反复试验筛选和验证,得到了扩增效率高、特异性好,能够检测样本 *TSPYL5* 基因甲基化水平的引物。

[0019] 一种基于甲基化敏感性限制性内切酶结合荧光定量PCR检测 *TSPYL5* 基因甲基化水平的试剂盒A,包含上述引物对A。

[0020] 所述的试剂盒A还包含甲基化敏感性限制性内切酶。

[0021] 所述的试剂盒A还包含甲基化阴性对照和阳性对照。优选的,阴性对照包括正常人外周血DNA、商业化未甲基化的人类基因组DNA对照;阳性对照包括商业化的完全甲基化的人类基因组DNA、已证实的靶基因片段完全甲基化的肝癌细胞系DNA。

[0022] 所述的试剂盒A还包含荧光定量PCR的SYBR Green荧光染料等。

[0023] 上述试剂盒A的使用方法,包括如下步骤:①提取待测样本基因组DNA;②使用甲基化敏感性限制性内切酶对基因组DNA进行酶切;③使用引物对A对酶切产物进行荧光定量PCR扩增;④对PCR产物进行Ct值分析。

[0024] 所述的酶切的体系优选为:DNA 300ng, Buffer (10×) 5μL, 甲基化敏感性限制性内切酶30U, ddH₂O补足至50μL。

[0025] 所述的PCR扩增的反应体系优选为:SYBR Mix (2×) 10μL, 上游引物(F) 0.5μL, 下游引物(R) 0.5μL, ddH₂O 7μL, 酶切产物2μL。

[0026] 所述的PCR扩增的反应条件优选为:95℃ 5min;95℃ 30s,61℃ 30s,72℃ 30s, 35-40 cycles。

[0027] 本发明基于甲基化敏感性限制性内切酶结合荧光定量PCR的试剂盒A可以分为检测系统和监控系统两个部分。检测系统包括上述引物对A,可由其中的任意一种组合而成。

监控系统则包括：①阴性对照包括2种，第1种是已经证实的待测区域为非甲基化的的正常人基因组DNA模板；第2种是商业化的非甲基化人类基因组DNA对照。正常情况下所有阴性对照的甲基化水平应趋近0，否则表明加样过程有污染或者酶切不完全。②阳性对照为商业化的完全甲基化的人类基因组DNA、已证实的靶基因片段完全甲基化的肝癌细胞系DNA；正常反应下阳性对照的甲基化水平应趋近1，否则说明实验失败。

[0028] 另一种用于检测*TSPYL5*基因甲基化的BSP的方法，包括如下步骤：①提取待测样本基因组DNA；②使用亚硫酸氢钠对基因组DNA进行修饰；③使用引物对B对修饰后的DNA进行PCR扩增；④PCR产物克隆测序分析每个CG位点的甲基化情况。

[0029] 其中，步骤③中的引物对B包括外侧引物(W)和内侧引物(N)，其中外侧引物为以下3对中的一对：

[0030] BWF1: 5' -TAAGAGATAATTGGAGGA-3' (465bp)，

[0031] BWR1: 5' -ACCTTTACCCCGATTTTTA-3'；

[0032] BWF2: 5' -ACGTTTCGAGTATTTTTTTTA-3' (498bp)，

[0033] BWR2: 5' -GACCTTTACCCCAATTTTTTA-3'；

[0034] BWF3: 5' -AGATAATTGGAGGAGTTGAAGA-3' (526bp)，

[0035] BWR3: 5' -TACTATAAAAAATCCGAATCGC-3'；

[0036] 内侧引物为以下4对引物中的一对：

[0037] BNF1: 5' -AATAGGTGATGGGGGATAGGT-3' (376bp)，

[0038] BNR1: 5' -CCGCTCATAATAACGACGAAA-3'；

[0039] BNF2: 5' -AGAAAATAGGTGATGGGGGA-3' (383bp)，

[0040] BNR2: 5' -CGACCGCTCATAATAACGAC-3'；

[0041] BNF3: 5' -TTAGAAAATAGGTGATGGGGGATAG-3' (373bp)，

[0042] BNR3: 5' -ATAACGACGAAAACAACCTCAAAAA-3'；

[0043] BNF4: 5' -AATAGGTGATGGGGGATAG-3' (378bp)，

[0044] BNR4: 5' -GACCGCTCATAATAACGAC-3'。

[0045] 上述引物通过如下方法设计得到：从UCSC数据库获得*TSPYL5*基因CpG岛序列，用于BSP方法的引物采用在线甲基化引物设计软件(<http://www.urogene.org/methprimer/>)MethPrimer设计。经过反复试验筛选和验证，得到了扩增效率高、特异性好，能够检测样本*TSPYL5*基因甲基化水平的BSP引物。

[0046] 一种基于亚硫酸氢钠修饰的PCR检测*TSPYL5*基因甲基化水平的试剂盒B，包含上述引物对B。

[0047] 所述的试剂盒B还包含甲基化阴性对照和阳性对照。优选的，阴性对照包括正常人外周血DNA、商业化非甲基化的人类基因组DNA对照；阳性对照包括商业化的甲基化人类基因组DNA、已证实的靶基因片段完全甲基化的肝癌细胞系DNA。

[0048] 所述的试剂盒B还包含PCR试剂(dNTPs、DNA聚合酶、DNA聚合酶buffer等)以及亚硫酸氢钠修饰过程所需的试剂(亚硫酸氢钠、氢醌、氢氧化钠、乙酸铵、糖原等)。

[0049] 上述试剂盒B的使用方法，包括如下步骤：①提取待测样本基因组DNA；②使用亚硫酸氢钠对基因组DNA进行修饰；③使用引物对B对修饰后的DNA进行PCR扩增(依次使用外侧引物和内侧引物进行巢氏PCR扩增)；④PCR产物克隆测序分析每个CG位点的甲基化情况。

[0050] 所述的PCR扩增的反应体系优选为:Buffer (10×) 5 μ L, dNTPs (10mM) 1 μ L, MgCl₂ (25mM) 4 μ L, Taq (1U/ μ L) 2 μ L, 上游引物(F) 1 μ L, 下游引物(R) 1 μ L, ddH₂O 32 μ L, DNA模板 4 μ L。

[0051] 所述的巢氏PCR扩增外侧、内侧的反应条件均优选为:95 $^{\circ}$ C, 5min; 95 $^{\circ}$ C, 30s, 68 $^{\circ}$ C-56 $^{\circ}$ C, 2cycles/2 $^{\circ}$ C, 45s, 72 $^{\circ}$ C, 45s, 退火温度降至56 $^{\circ}$ C时进行25cycles; 72 $^{\circ}$ C, 10min。

[0052] 本发明发现了*TSPYL5*基因甲基化与肝癌发生的关联性,并鉴定了*TSPYL5*的甲基化位点,结合甲基化敏感性限制性内切酶以及特定的引物,建立荧光定量PCR的检测方法。而且随后采用BSP的方法对这一结论进行了验证。

[0053] 本发明所述的*TSPYL5*基因甲基化检测试剂盒的灵敏度高达80.37%,特异度高达93.25%。

[0054] 本方法利用荧光定量PCR方法检测DNA甲基化,大大提高了检测效率,降低了检测成本。检测结果简单,直观,而且高通量,一次可检测许多样本。

附图说明

[0055] 图1是MSRE-PCR原理图;图中,CH₃表示甲基化,enz表示甲基化敏感性限制性内切酶;左图DNA无甲基化,DNA被切断,无法得到PCR产物;右图DNA有甲基化,DNA保持完整,可以获得PCR产物。

[0056] 图2是实施例1中阴性对照的扩增曲线(a)和熔解曲线(b)图,其中灰色和黑色线分别表示加酶与不加酶体系,每个样两个复孔;RFU代表扩增反应的荧光值;-d(RFU)/dt表示荧光信号改变的负一次导数。

[0057] 图3是实施例1中阳性对照扩增曲线(a)和熔解曲线(b)图,其中灰色和黑色线分别表示加酶与不加酶体系,每个样两个复孔;RFU代表扩增反应的荧光值;-d(RFU)/dt表示荧光信号改变的负一次导数。

[0058] 图4是实施例1采用MSRE-qPCR检测肝癌及癌旁组织中*TSPYL5*基因甲基化水平散点图。

[0059] 图5是实施例1中*TSPYL5*基因甲基化水平区分肝癌与癌旁组织ROC曲线图。

[0060] 图6是实施例2采用BSP克隆测序法检测肝癌及癌旁组织中*TSPYL5*基因甲基化水平箱图。

[0061] 图7是实施例2中肝癌与癌旁组织*TSPYL5*基因各CpG位点甲基化条形图。

具体实施方式

[0062] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容,特举以下实施例详细说明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0063] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。

[0064] 实施例1 *TSPYL5*基因甲基化荧光PCR检测163对肝癌及癌旁组织样本

[0065] 石蜡样本及冰冻组织样本基因组DNA均采用Qiagen公司的试剂盒(QIAamp DNA FFPE Tissue kit;QIAamp DNA Mini Kit)提取。DNA样本的浓度及纯度采用NanoDrop-2000c进行检测。

[0066] 300ng DNA样本采用甲基化敏感性限制性内切酶进行酶切(HinPII),酶切体系为:DNA 300ng,Buffer(10×)5μL,甲基化敏感性限制性内切酶30U,ddH₂O补足至50μL,此即为加酶组。未加酶组的处理除采用ddH₂O替代限制性内切酶外,其余与加酶组全部相同。阴性对照(商业化非甲基化的人类基因组DNA对照)、阳性对照(商业化的完全甲基化的人类基因组DNA)也做同样处理。

[0067] 针对酶切位点设计PCR引物,采用荧光定量PCR对经过酶切处理(加酶组)及未酶切(未加酶组)的DNA样本、阴性对照和阳性对照进行扩增(每个样本两个复孔)。扩增体系为:SYBR Mix(2×)10μL,上游引物(F)0.5μL,下游引物(R)0.5μL,ddH₂O 7μL,DNA 2μL;其中上下游引物如下:

[0068] 上游引物AF2:5'-ATATCAGAGAACTCGCCGAG-3',

[0069] 下游引物AR2:5'-CACGAACGTACAACGTACCG-3';

[0070] 扩增条件为:95℃ 5min;95℃ 30s,61℃ 30s,72℃ 30s,35 cycles。

[0071] 采用 $100\% \times 2^{\Delta Cq}$ (未加酶组-加酶组)公式计算甲基化的水平,其中 ΔCq (未加酶组-加酶组)表示为加酶组两个复孔Cq值的平均值-未加酶组两个复孔Cq值的平均值。

[0072] 结果发现阴性对照的甲基化水平为0.00%(图2),阳性对照的甲基化水平为100.00%(图3)。癌组织中TSPYL5基因甲基化水平显著高于癌旁组织($P < 0.0001$,图4),而且ROC曲线分析其可以很好的区分癌与癌旁组织,其曲线下面积可以达到91.4%(88.0%-94.8%)(图5),当甲基化水平以7.015%为cut off值时,其灵敏度和特异度分别为80.37%和93.25%。

[0073] 实施例2 BSP克隆测序法检测肝癌及癌旁组织中TSPYL5基因甲基化水平

[0074] 石蜡样本及冰冻组织样本基因组DNA均采用Qiagen公司的试剂盒(QIAamp DNA FFPE Tissue kit;QIAamp DNA Mini Kit)提取。DNA样本的浓度及纯度采用NanoDrop-2000c进行检测。

[0075] 2μg DNA样本采用亚硫酸氢钠进行修饰,阴性对照(商业化非甲基化的人类基因组DNA对照)、阳性对照(商业化的完全甲基化的人类基因组DNA)也做同样处理,具体过程如下:

[0076] (1)取2μg DNA置于2mL EP管中,加入适量高压灭菌水补足体积至50μL;

[0077] (2)加入5.5μL新鲜配制3mol/L NaOH,55℃水浴20min;

[0078] (3)加入新鲜配制的氢醌溶液(0.04mol/L)30μL及亚硫酸氢钠溶液(3.6 mol/L)520μL,加入200μL石蜡油,55℃避光水浴16小时;

[0079] (4)Wizard DNA Clean-up System纯化(按操作说明书进行);

[0080] (5)向上述纯化后的DNA中加入3mol/L NaOH 4μL,37℃水浴15min;

[0081] (6)加入22μL 10M乙酸铵,4μL 20g/L糖原,250μL冰无水乙醇,置于-20℃沉淀过夜;

[0082] (7)回收沉淀的DNA,70%乙醇洗两次,室温干燥后溶解于50μL TE中,置于-20℃保存。

[0083] 针对转化后的序列设计PCR引物,采用巢氏PCR(依次使用外侧引物,内侧引物,序列如下)对修饰后的DNA进行扩增,引物序列具体如下:

[0084] 外侧引物:

[0085] 上游BWF2:5'-ACGTTTCGAGTATTTTTTTTA-3',

[0086] 下游BWR2:5'-GACCTTTACCCCAATTTTTTA-3';

[0087] 内侧引物:

[0088] 上游BNF2:5'-AGAAAATAGGTGATGGGGGA-3',

[0089] 下游BNR2:5'-CGACCGCTCATAATAACGAC-3'。

[0090] 内外侧PCR扩增条件均为:95°C,5min;95°C,30s,68°C-56°C,2cycles/2°C,45s,72°C,45s,退火温度降至56°C时进行25cycles;72°C,10min。

[0091] PCR产物切胶纯化后与pMD18-T载体相连,随后转入DH5 α 感受态中,Amp(+)平板中过夜培养后挑取10个阳性克隆提取质粒测序。对测序结果进行分析,采用100 \times (甲基化的胞嘧啶数量/所有胞嘧啶的数量)计算各位点及各样本的甲基化水平。

[0092] 本实施例通过采用BSP克隆测序法对实施例1中的部分肝癌及癌旁组织中*TSPYL5*基因甲基化水平进行检测。结果发现癌组织*TSPYL5*基因启动子区CpG岛的甲基化水平高于癌旁组织($P<0.0001$,图6),而且癌组织中*TSPYL5*基因扩增片段中每个CpG位点的甲基化水平高于癌旁组织(图7)。

[0093] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0094] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 武汉大学

<120> 一种检测肝癌风险基因 TSPYL5 甲基化水平的试剂盒及方法

<130> 1

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AF1

<400> 1

ccccgcgagc gcatatcaga g

21

[0001]

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AR1

<400> 2

gcaaccgceg acgtcaegaa c

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AF2

<400> 3

	atatcagaga aactcgccga g	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> AR2	
	<400> 4	
	cacgaacgta caactgtacc g	21
	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> AF3	
[0002]	<400> 5	
	cagagaaact cgccgagacc ta	22
	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> AR3	
	<400> 6	
	ttcaaagaca cgctgtgacc ct	22
	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	

	<223> AF4	
	<400> 7	
	agcgcataatc agagaaact	19
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> AR4	
	<400> 8	
	gtaccgctcgc gagaggacgt ga	22
	<210> 9	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
[0003]	<220>	
	<223> BWF1	
	<400> 9	
	taagagataa ttggagga	18
	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BWR1	
	<400> 10	
	acctttaccc cgattttta	19
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	

	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BWF2	
	<400> 11	
	acgttcgagt atttttttta	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BWR2	
	<400> 12	
	gacctttacc ccaattttta	20
[0004]	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BWF3	
	<400> 13	
	agataattgg aggagttgaa ga	22
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BWR3	
	<400> 14	
	tactataaaa aatccgaatc gc	22

	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BNF1	
	<400> 15	
	aataggtgat ggggatagg t	21
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BNR1	
	<400> 16	
	ccgtcataa taacgacgaa a	21
[0005]		
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BNF2	
	<400> 17	
	agaaaatagg tgatggggga	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BNR2	
	<400> 18	

	cgaccgctca taataacgac	20
	<210> 19	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BNF3	
	<400> 19	
	ttagaaaata ggtgatgggg gatag	25
	<210> 20	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BNR3	
[0006]	<400> 20	
	ataacgacga aaacaacttc aaaaa	25
	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> BNF4	
	<400> 21	
	aataggatgat ggggatag	19
	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	

<223> BNR4

[0007]

<400> 22

gaccgctcat aataacgac

19

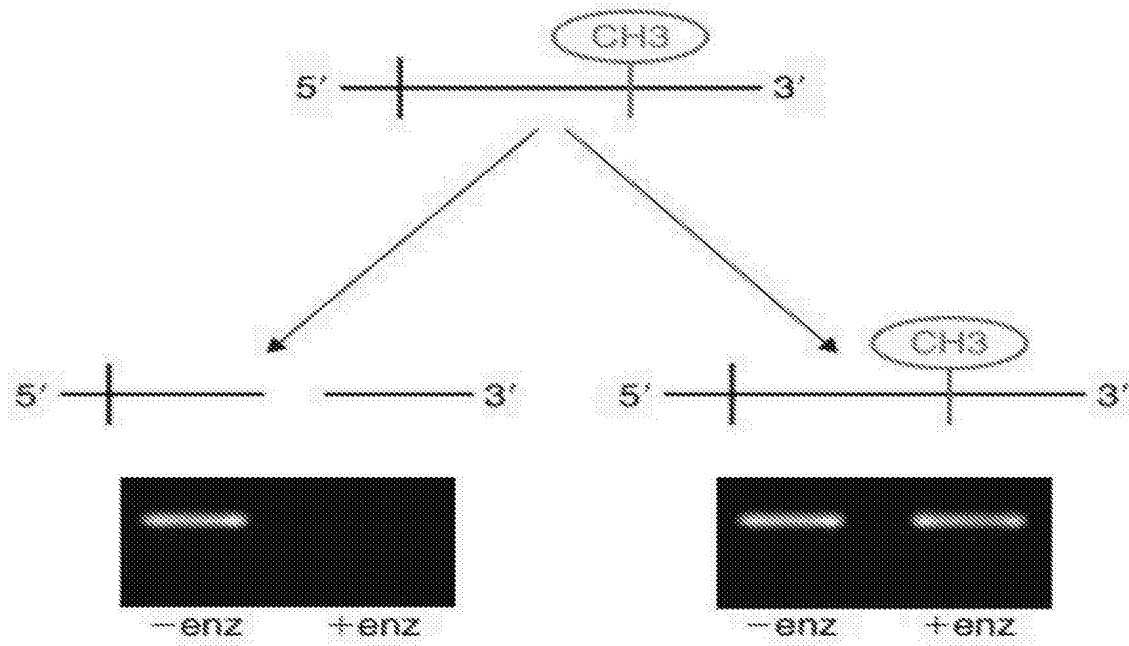


图1

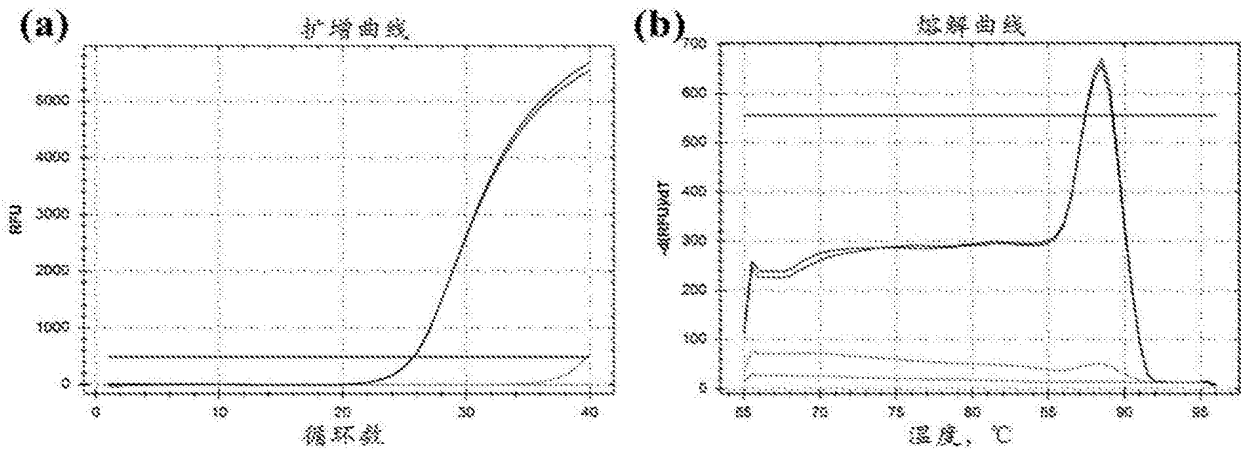


图2

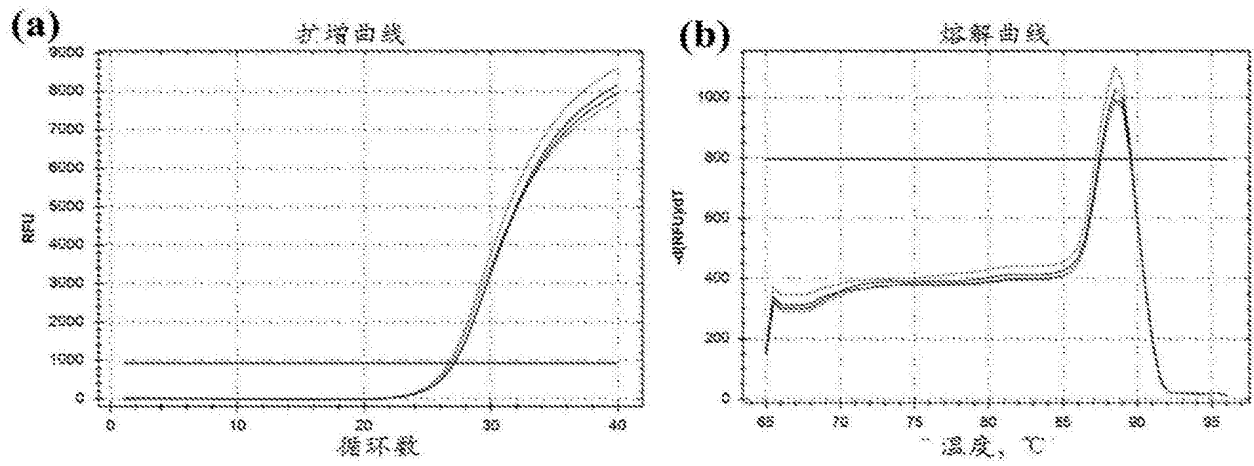


图3

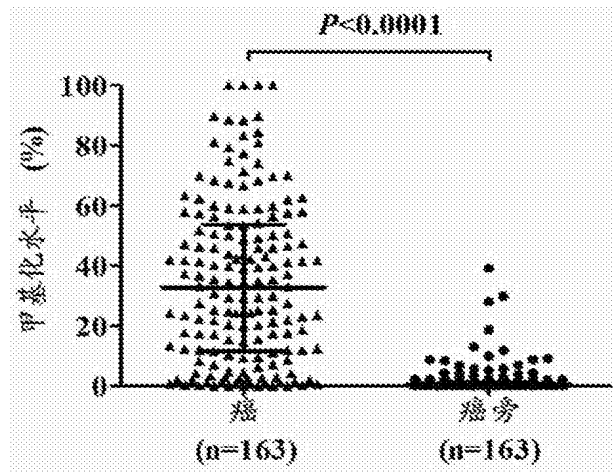


图4

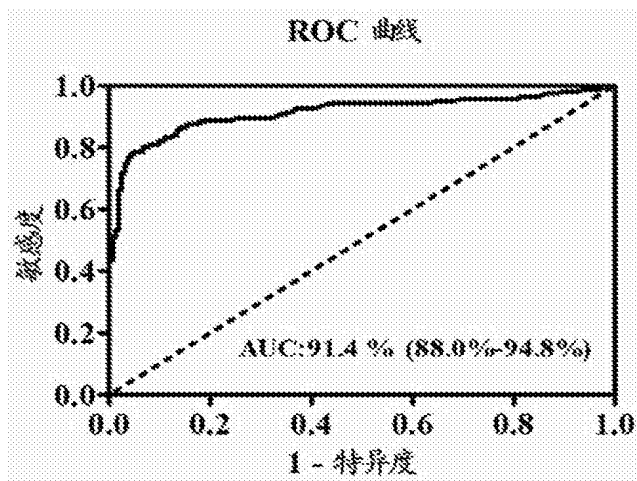


图5

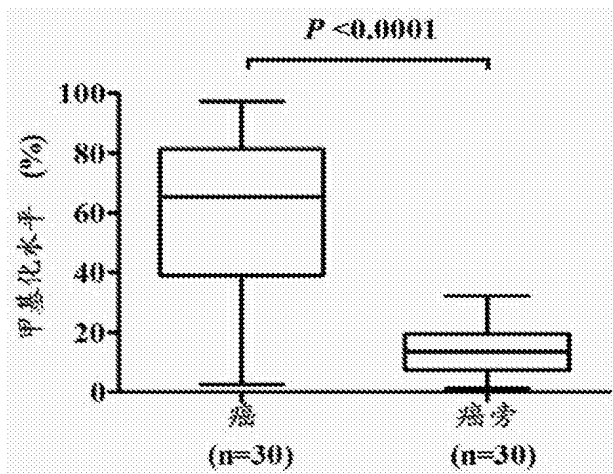


图6

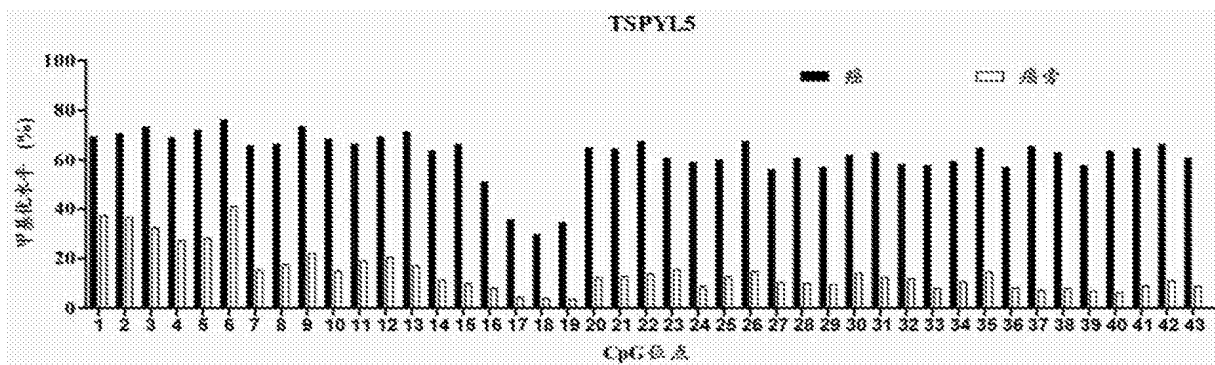


图7