



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103289995 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201210181604. 1

(22) 申请日 2012. 06. 05

(66) 本国优先权数据

201210041475. 6 2012. 02. 23 CN

(71) 申请人 常州楚天生物科技有限公司

地址 213022 江苏省常州市新北区高新科技园创新科技楼北区 421

(72) 发明人 雷向东

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书3页

序列表7页 附图1页

(54) 发明名称

一组具有特征温度熔解曲线的 DNA 标记分子

(57) 摘要

本发明公开了一组具有特征温度熔解曲线的 DNA 标记分子。它们可以用于标记抗原或抗体分子,用于免疫 PCR 检测;或者用于标记别的物质,用于其它相关检测领域。该发明属于生物技术领域。本发明公开的 DNA 标记分子是一段脱氧核糖核酸,它们可以通过 PCR 有效地和专一性地扩增,扩增产物的熔解温度具有明显的差别,跨度从 75.5℃ 到 93℃。用合适的引物扩增对应的标记 DNA 分子,PCR 反应结束后,分析产物的熔解曲线 T_m 值,如果有对应有某一 T_m 值的熔解曲线存在,那就意味着此标记 DNA 对应的被标记物存在。通过这种方式就可以达到检测被标记物的目的。本发明的 DNA 标记可应用于:食品微生物检测(如沙门氏菌、单核细胞增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌等)和其它生物标记检测(如病原体或疾病的生物标记物等)。

1. 一组具有特征性熔解温度的 DNA 分子,其特征在于每一个 DNA 分子的序列由两部分组成,即核心区和间隔区。核心区为 PCR 扩增产物对应的序列,间隔区为核心区两端的序列。间隔区也可以只存在于核心区的 5' 端或 3' 端。间隔区的作用是用 DNA 分子标记被标记物后,核心区依然能够被 DNA 聚合酶接触而有效地扩增,避免因为被标记物体积过大而产生空间障碍,阻碍 DNA 聚合酶扩增核心区。对于体积较小的被标记物,可以不需要间隔区。间隔区的碱基种类(A、T、C、G 或它们的衍生物)和数量序列完全可变,碱基数可由 1 至 n 个 ($n = 0, 1, 2, 3, \dots$),因为间隔区的序列不在 PCR 产物中出现,它们不影响 PCR 产物的熔解温度。同时,不能通过简单的修改该专利公布的核心区序列中碱基的种类或数量来达到避开该专利的保护。任何修改后的分子与本专利公布的序列同源性达到 80% 以上,视为侵权。

2. 根据权利要求1所述的具有特征性熔解曲线温度的DNA标记分子,应用Roche480实时荧光定量PCR仪进行检测,其特征在于核心区可以使用一对PCR引物有效地扩增,而且扩增产物的熔解温度具有明显的差别,跨度从75.5℃到93℃。

3. 根据权利 1 所述的具有特征性溶解温度的 DNA 标记分子,其特征 在于它们可用于标记抗原或者抗体或者其它物质。通过 PCR 扩增标记分子的核心区,通过分析 PCR 产物的溶解温度,定性或定量分析某标记 DNA,从而定性或定量分析被标记物质。

4. 根据权利要求 1 所述的具有特征性熔解温度的 DNA 标记分子,其特征 在于它们可以是 DNA 单链,也可以是 DNA 双链。

5. 根据权利 1 所述具有特征性熔解温度的 DNA 标记分子,其特征不在于它们的核心区序列如下所列。该表也公开了扩增核心区的 5'引物和 3'引物序列,以及核心区的熔解温度。

T _m 值	引物对序列		核心区序列
	F	R	
75.5℃	TTTCAGAAGGT CTGCCAACA	CCGAATGATTCA CCAATTGATAC	TTTCAGAAGGTCTGCCAACCAACAAAAATGAC TCCAAGATCAAGAATCTTAGTATCAATTGGTGAAT CATTCGGG
79℃	GGTCCACCATT GCATCAGTA	TTGGACAAATCT GTACTCTTTGAC A	GGTCCACCATTGCATCAGTAACATCTATGTTTGGTT TCTGTCCAAAGGGAAGTGTCAAAGAGTACAGATT TGTCAAAATCTACCCACATATCAC
79.5℃	CCCTAACACAG AAGGAAACCA G	TTTCGAGGATAAT AAGGAAACAGC	CCCTAACACAGAAGGAAACCAGTGGTATGACTTT CTTCAAATAGCAGCCACCTTAAAGAAAGTCCTTT GCTGTTTCCTTATTATCTCGAAAATCATTGCATTT TGTGAAAAGGCGGATGGAGAATATTATTGATCAGT GTTTGCAAAGGCCAGCA
80℃	GCTTGATCTCA TACTGGATCCT C	TCAGTGAGAAGG AAGTGGACTCT	GCTTGATCTCATACTGGATCCTCTTGATAGGGTTGC CATAAATGTCGTTTCCAGAGTCCACTTCCTTCTCA CTGACCCTTTGGCCCTGATCA
81℃	TGACCTTCATC CCTACCATTG	GTTTGCGTACTC TGCCTTTGT	TGACCTTCATCCCTACCATTGAAGATACTGGAAAA GCTCTTGTTTGTCAGGCTAAGTTACATATTGATGAC ATGGAATTCGAACCCAAACAAAGGCAGAGTACGC AAACACTTTATGTCAATG
81.5℃	AAGACATACTC CAAACCTTTCC AC	AATTTCGTGTGT GGCGCAGT	AAGACATACTCCAAACCTTTCCACCCCAAATTTAT CAAAGAATCTGAGAGTGATTGAGAGTGGACCACAC TGCGCCAACACAGAAATTAT

82℃	CTGGCAGGGA ACGTCTAATAA	CCCAAACAGTA ACAATCAGTTT	CTGGCAGGGAACGTCTAATAATGGAATGAACTTGT CTGTAAACATCCAGTTTAGACATGCATCGGCAGGA AGTGTGATTGGCAAACTGATTGTTACTGGTTGG GGCCTTGAGAGAGAGGCACTGTAATTTCAAATAA
82.5℃	CCCTGGCTACC TGAGTGAAGA	CTGCGTCCATGC TGTGGT	CCCTGGCTACCTGAGTGAAGATGGAGAAACCAGT GACCACCAGATGAACCACAGCATGGACGCAG
83℃	TGTCTTTCAGC AAGGACTGG	AACTATCTTGGG CTGTGACAAA	TGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCTTCTATCTCTTGT ACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATGA GTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTCAC AGCCCAAGATAGTTAAGTGGG
83.5℃	ATCCACATGGC CATTCTTGT	CCACCTGTACAC AGCCACAG	ATCCACATGGCCATTCTTGTGGATCTGCAGGTGGT AGCTGTTCTGGCTGTGGCTGTGTACAGGTGGATC AGGCCACCCAGCTGGAGCCGAGCATGGGGAG GCATTGGGATAGGCTCTGAGGACGCTCATGCTGCA GACGCTGCACAAGGCACAGACCCAGAGCCTGAG GCGGGCCCCAACATCGTGCCCTGCTCTGAGTGG CTGGTGCTGAGATTGAAACCTGACACTCCTGTGCG GGACTCTCCTGGCCAGGCCCTACTGGCCTTTTCC TTCTCCCTTGCAAGTAGCTGGTGTGAGGATCCTAG ACTGGATTCCCTCCTTTTGGCCG
84.5℃	TGGAGGTGGA GAGCTTTCAG	ACGATGCACCTG TACGATCA	TGGAGGTGGAGAGCTTTCAGTTCATATGGACCAG ACATCACCAAGCTTTTTTGCTGTGATCCCGGAGC GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGGTGCATCGTGCAC ATAAGCCTCGTTATCCCATGTGTGCAAGAAGATAG GTT
85.5℃	CCCAATAAATA TAGGACTGGA GATG	GAGTTCATAGCT GGGCTCCT	CCCAATAAATATAGGACTGGAGATGTCTGAGGCTC ATTCTGCCCTCGAGCCCACCGGGAACGAAAGAGA AGCTCTATCTCCCTCCAGGAGCCAGCTATGAAC TCCTTCTCCACAA
86℃	GGAACAAAGA GGAGCCTGGT	GAGAGGCCAG GTCCTAGAG	GGAACAAAGAGGAGCCTGGTAAAAAACAGCCAA GCCCCAAGACCTCAGCCAGGCAGAAGCTGCTC TAGGACCTGGGCTCTCAGAGGGCTCTTCTGCCAT CCCTTGTCTCCCTGAGGCCATCATCAACAGGACA GAGTTGGAAGAGGAGACTGGGAGGCAGCAAGAG GGGTCACATACCAGCTCAGGGGAGAATGGAGTAC TGTCTCAGTTTCTAACCCTCTGTGCAAGTAAGCA TCTTACAACTGGCTCTTCTCCCTCCTAAGAAG ACCCAAACCTCTGCATAATGGGATTTGGGCTTTGG TACAAGAACTGTGACCCCCAACCTGATAAAAGA GATGGAAGG
86.5℃	AGGAGGCGTT GTCATTGGTA	CCTGGTCCAGAC CACAGAGT	AGGAGGCGTTGTCATTGGTAACCCGGGTGGAGAT GCCCATCCCACAGGTCTTGGAACAGGCCTCCAC TCTGTGGTCTGGACCAGGCAGTTGGCTCTAATCAT AGTTGGGTCTGGGCCAAACGTGTCTTCCAGTCGGT AAG
87℃	AGTGCCTCGAC CACTATGC	TGCAGCTCGCTG TAGTTAGG	AGTGCCTCGACCACTATGCCGCGCTCTTTCCTCGT CAGGAAGCCCTCCGACCCCAATCGGAAGCCTAAC TACAGCGAGCTGCAGGACTCTAATCCAG
87.5℃	GCAGTCAGGC GTGTTGTTC	GA CTGCGTGGAC AGCTACAC	GCAGTCAGGCGTGTGTTCTCAGTGGATCCCGC TGAAGCCTGCGGGCAGGTGCACGTGTAGCTGTC CACGCAGTCCGTGCAGTTGCCCCGTTGCGGCAG GGGTCAGTGGCACACTCGTTGATGTCTCCTCACA GAAAGTGCCCCGGAAGCCGGGCAGGCAGTCGCA GAAGGCCGTGTTGATGCCGTCTGTGCAGGAGCCC CCGTTGTGACACGGGT
88℃	CTGGATCTACT CAGCCAGCAC	ATCCA CTGCTG GACATCA	CTGGATCTACTCAGCCAGCACCTGGAGCGAGGG TACCCCAAGCCACTGACCAGCCTGGGACTGCCCC CTGATGTCCAGCGAGTGGATGCCGCTTTAACTGG AGCAAAAACAAGAAGACATATCTTTGCTGGAG ACAAATTCTGGAG

88.5℃	CAGAGGAGCC TAGTGAGACCA	GTACTGTGGTGG CTGCAGAA	CAGAGGAGCCTAGTGAGACCATGGGCCTGGGAGC TGGGCTGGGAGCCCCTGGCTCAGGCTTCCCCAGC GAAGAGAATGAAGAGTCTCGGATTCTGCAGCCAC CACAGTACTTCTGGGAAGAGGAGGAAGAGCTGAA TGACTCAAGTCTGGACCTGGGACCCACTGCAG
89℃	GAGATGGCAC GGGACACTAC	GGTTGTGGTGGT CTGACAGTT	GAGATGGCACGGGACACTACCTGTGCAACGCCTG CGGGCTCTATCACAAAATGAACGGACAGAACCGG CCCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAG CCAGGAGAGCAGGGACGTCCTGTGCGAACTGTCA GACCACCACAACCACACTCTGGAGGAGGAATGCC AATGGGGACCCTGTCTGCAATGCCTGTGGGCTCTA CTACAAGCTTCACAAT
91.5℃	GGCACATACTC GGTGTAAGG	GAAGGTTCTGTG TCTGCAGTG	GGCACATACTCGGTGTAAGGTGTCCATGGGGCCA GGGGCTGCAGGGTGGCCGGGGTGGGCTGGGAGA GCCAGCCGGCACACAGGGCAGCCTCCTCTGTCAC TGCAGACACAGAACCTTCCATGTCCAGGCAGGAA GGAC
93℃	GAGCCTTGTCG AAGTTCTCC	TCCTGGGCAAGA TGAAGTG	GAGCCTTGTCGAAGTTCTCCTTGACTCGGAAGCT GCTCACTCGGCAGTCGCGCTCCGCGCGGCCGCTG CCCAGCGCCGCAACAGCAAGAGCGCCCACACCC ACTTCATCTTGCCCAGGAATCCGCC

一组具有特征温度熔解曲线的 DNA 标记分子

技术背景：

[0001] 在生物医学领域,免疫分析技术因其灵敏度高,特异性强等优点而广泛应用于科研和临床等多个领域。其基本原理是利用抗原-抗体结合反应的特异性,加上各种标记物的可测量性来达到方便敏感地检测各种体内极微量生物活性物质的存在与否的目的。而常用的标记手段有放射性同位素标记,酶标记,荧光标记,化学性发光标记等。其中荧光、酶和放射性同位素标记技术是目前免疫学应用最广的检测手段,具有较高的灵敏度。虽然每一种标记物质对应的检测技术都有其自身的优越性,但是缺点也一样的存在。比如某些疾病早期抗原及极微量病原微生物抗原检测上,荧光标记及酶标记技术就缺乏足够的灵敏度。放射性同位素标记技术的灵敏度虽然很高,但在实际操作中由于需要特殊的设备和很高的安全性,因此也限制了它的实际应用。PCR 技术自问世以来,经过几十年的发展,已成为分子实验室的一门常规技术,它具有极为灵敏的信号放大功能。正是借鉴了 ELISA 和 PCR 技术的优点,1992 年, Sano 等人将这两种技术结合在一起,发明了一种全新的极其敏感的检测技术,即免疫 PCR。因此,将与抗原结合的特异抗体通过连接分子与 DNA 结合,再经 PCR 扩增时,因为 PCR 具有很强的放大能力,PCR 的过程其实就是放大抗原和抗体结合作用的过程。由此在定量检测抗原时,其灵敏性就要大大高于普通的 ELISA 方法。正是运用 PCR 的高度敏感性来放大抗原抗体反应的特异性,它的出现解决了其它标记技术的不足,使实验中只要有数百个抗原分子即可检测,甚至在理论上可检测到一至数个抗原分子。这种灵敏度使免疫检测技术达到了一个新的高度。目前, DNA 分子作为一种标记物已经广泛的应用于免疫技术领域。

[0002] 免疫 PCR 的整个反应流程分两步骤,第一个步骤是 ELISA 过程,通过这一步骤完成了抗原和抗体的特异性结合,只是与传统的 ELISA 不同的是:免疫 PCR 的抗体不是用传统意义上的荧光,酶,放射性同位素标记,而是由 DNA 单链或双链分子标记。第二个步骤是用特异性的引物扩增标记 DNA,扩增的 DNA 产物可以用荧光定量 PCR 定量检测。

[0003] 如果通过适当的设计与抗原结合的 DNA 序列,将免疫 PCR 技术和 DNA 熔解曲线相结合的话,就形成了一种新颖的多重免疫 PCR 技术,利用这个技术,在 PCR 反应结束之后通过分析产物的熔解曲线就可以判断与标记 DNA 分子对应的待检测物存在与否。所谓熔解曲线是指:PCR 扩增反应完成后,在逐渐增加温度的同时监测每一步的荧光信号强度的变化,随着温度的升高,双链 DNA 逐渐变性解链,所有荧光染料又恢复到游离状态,导致荧光信号降低,用荧光信号改变的负的一次导数与温度作图,就得到了一个熔解温度曲线。在溶解温度上有一特征峰 (T_m , DNA 双链解链 50% 的温度),用这个特征峰就可以确定 PCR 产物特异性。这种多重 PCR 技术简单,快捷,经济。不仅适用于普通 PCR 检测,更适应于多重 PCR 检测。

发明内容：

[0004] 免疫 PCR 技术与 DNA 熔解曲线结合形成一种新颖的多重免疫 PCR 技术。这种技术就可以通过分析 DNA 的熔解曲线的 T_m 值来间接的检测被标记物的存在与否。免疫 PCR 的

一个关键是标记 DNA 分子的设计。它要求标记分子可以有效和专一地通过 PCR 扩增,扩增产物的熔解温度。对于多重免疫 PCR,是否可以简便地区分标记 DNA 分子更是依赖 DNA 标记分子的设计。我们构建了一组具有特征性熔解温度的 DNA 标记分子。选用的标记 DNA 通过大量实验验证,在 PCR 实验过程中,每一个标记 DNA 都能得到特异性的扩增,而且每个分子的 PCR 产物 T_m 值都相差至少 0.5°C ,这样一组 DNA 标记分子为多重免疫 PCR 分析提供了选择的空间。比如针对 4 个被标记物,就可以选择 T_m 值相差 3°C 的 4 个 DNA 分子作为标记,这样就可以保证得到的数据可以通过熔解曲线能很容易的区别开来,也使得那些只有简单熔解曲线分析仪的实验室同样可以得到很可靠的实验结果。

[0005] 实验具体过程如下:

[0006] 1 选用本发明中公开的 DNA 分别用来标记不同的检测抗体,如果待检测抗原或抗体的种类少,选择 T_m 值相差越大的标记 DNA 越好,一种检测抗体对应一种特异 DNA 标记分子。

[0007] 2 将标记 DNA 和检测抗体通过共价键或非共价键连接起来,然后将标记好的检测抗体混合在一起,配制好检测抗体混合物。混合的浓度由抗体的浓度决定。

[0008] 3 将被检测抗原的捕获抗体混合,固定在反应基质上,如酶联免疫吸附反应板或者是微球表面。

[0009] 4 将检测样本加入一段时间,让抗原和捕获抗体充分的结合。孵育结束之后洗涤,然后加入 DNA 标记的检测抗体混合物,合适条件下孵育。

[0010] 5 恒温孵育结束之后,充分洗涤,完全去除未结合的检测抗体。如果过程是在能同时进行 ELISA 和 PCR 的管子中进行的,可直接加入 PCR 混合液进行反应。否则要先通过物理或化学的方法得到标记 DNA 或者含有标记 DNA 的部分,并且将其转移到 PCR 管中,最后再加入必备的试剂(聚合酶,引物, dNTP, buffer, 荧光染料等)进行 PCR 反应。

[0011] 6 PCR 反应结束之后,对 PCR 产物进行熔解曲线的分析。如果是荧光定量 PCR 反应,就可以直接分析熔解曲线,分析获得检测的结果。如果反应是普通的 PCR,反应结束后,将 PCR 管直接转移到熔解曲线分析仪器上分析。如果某个 DNA 标记的特征熔解温度存在,那么就可以断定该 DNA 标记的抗原或者抗体存在,通过分析曲线的覆盖的范围,就可以分析抗原或抗体的相对量。

[0012] 用此标记 DNA 分子进行实验举例(一):

[0013] 本发明描述的方法可以用于多种病原微生物的同时检测或鉴定以及病原微生物,某些遗传病及癌基因的分型鉴定。多种病原微生物的同时检测或鉴定,是在同一 PCR 反应管中同时加上多种病原微生物的特异性引物,进行 PCR 扩增。可用于鉴定出是那一型病原体感染。下面以肝炎病毒多重感染为例来说明具体检测方法:

[0014] 从标记 DNA 分子产品中挑选 A, B, C3 个标记分子,标记 DNA 分子的熔解温度分别是 80°C , 85°C , 90°C 。用各自对应的引物对 a, b, c 分别扩增 A, B, C。将得到的三个 PCR 片段通过化学共价键或非共价键的方式分别标记甲型肝炎病毒,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒特异性抗原的检测抗体。将标记的三个抗体混合组成混合检测抗体。将三种肝炎病毒的各自的抗原特异性捕获抗体混合起来,通过表面吸附的方式固定在酶联免疫和 PCR 双用的管中。用屏蔽缓冲液屏蔽非专一结合位点,然后加入待检测血液样本,孵育一定时间。孵育结束之后,加入检测抗体,孵育,然后充分洗涤保证为结合的检测抗体洗脱干净。最后加入

荧光染料等组分后进行荧光定量 PCR 反应。反应结束之后进行溶解曲线分析,根据溶解曲线出现的峰以及每个峰的大小就可以对这三种病毒进行定性和定量分析。

附图说明:

[0015] 附图 1:具有特征性熔解温度的 DNA 分子示意图

[0016] 该 DNA 分子示意图由两部分组成,即核心区和间隔区。1 为核心区,2 为间隔区。N 为间隔区的碱基种类 (A、T、C、G...), n 为碱基数 ($n = 0, 1, 2, 3, \dots$)。

[0017] 附图 2:基于 DNA 溶解曲线的分析免疫 PCR 的 ELISA 原理图

[0018] 该图以检测三种抗原为例。图中,4,5,6 分别代表三种需要检测的抗原。1,2,3 分别为抗原 4,5,6 的捕获抗体。7,8,9 分别为 4,5,6 的检测抗体。10,11,12 为分别标记在检测抗体 8,9,10 上的标记 DNA。13 为捕获抗体吸附的基质。

[0019] 附图 3:基于 DNA 溶解曲线分析的免疫 PCR 溶解曲线分析图。

[0020] 该图以样品中存在三种检测抗原为例。图中 T_{m1}, T_{m2}, T_{m3} 分别为附图 2 中 DNA 标记 10,11,12 的熔解温度。

[0001]

DNA 序列表：一组具有特征温度熔解曲线的 DNA 标记分子

SEQUENCE LISTING

<110> 常州楚天生物科技有限公司
xiangdong, lei

<120> 一组具有特征温度熔解曲线的 DNA 标记分子

<130> none

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 77

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 1

tttcagaagg tctgccaaaca ccaacaaaaa tgactccaag atcaagaatc ttagtatcaa 60

ttggtgaatc attcggg 77

<210> 2

<211> 96

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 2

gggccaccat tgcacagta acatctatgt ttggtttctg tccaaaggga actgtcaaag 60

agtacagatt tgtccaaaat ctaccccaca tatcac 96

<210> 3

<211> 157

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 3

ccctaacaca gaaggaaacc agtggtatga cttcttcaa aatagcagcc accttaaaga 60

[0002]

aagtccttg ctgttccctt attatcctcg aaaatcattg cattttgtga aaaggcggat 120

ggagaatatt attgatcagt gtttgcaaaa gccagca 157

<210> 4

<211> 93

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 4

gcttgatctc atactggatc ccttgatag ggttgccata aatgtcgtt ccagagtcca 60

cttccctctc actgaccgct ttggccctga tca 93

<210> 5

<211> 123

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 5

tgacctcat ccctaccatt gaagatactg gaaaagctct tgttgtcag gctaagttac 60

atattgatga catggaattc gaacccaaac aaaggcagag tacgcaaaca ctttatgtca 120

atg 123

<210> 6

<211> 89

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 6

aagacatact ccaaaccctt ccacccaaa ttatcaaag aactgagagt gattgagagt 60

ggaccacact gcgccaacac agaaattat 89

<210> 7

<211> 139

<212> DNA

[0003]

<213> 数据库检索

<400> 7

ctggcaggga acgtctaata atggaatgaa ctgtctgta aacatccagt ttagacatgc 60

atcggcagga agtgtgattg gcaaaactga ttgttactgg ttggggcct tgagagagag 120

gcactgtaat ttcaaataa 139

<210> 8

<211> 65

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 8

ccctggctac ctgagtgaag atggagaac cagtgaccac cagatgaacc acagcatgga 60

cgcag 65

<210> 9

<211> 126

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 9

tgtcttcag caaggactgg tctttctatc tctgtacta cactgaattc acccccactg 60

aaaaagatga gtatgcctgc cgttgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta 120

agtggg 126

<210> 10

<211> 332

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 10

atccacatgg ccattcttgt ggatctgcag gtggtagctg ttctggctg tggctgtgta 60

caggtagatc aggccacccc agctggagcc gagcagtggg gaggcattgg gataggctct 120

[0004]

gaggacgctc atgctgcaga cgctgcacaa ggcacagacc cagagcctga ggcgggcccc	180
caacatcgtg cccctgctctg agtggctggt gctgagattg aaacctgaca ctctgtcgg	240
gactctctg gcccaggcct tactggcctt ttcttctcc ctgcaagta gctggtgtga	300
ggatcctaga ctggattccc tctttttgc cg	332
<210> 11	
<211> 142	
<212> DNA	
<213> 数据库检索	
<400> 11	
tggagggtgga gagctttcag ttcatatgga ccagacatca ccaagctttt ttgctgtgag	60
tcccgagcgc tgcagttcag tgatgtaca ggtgcatcgt gcacataagc ctctttatcc	120
catgtgtcga agaagatagg tt	142
<210> 12	
<211> 117	
<212> DNA	
<213> 数据库检索	
<400> 12	
cccaataaat ataggactgg agatgtctga ggctcattct gccctcgagc ccaccgggaa	60
cgaagagaa gctctatctc cctccagga gccagctat gaactccttc tccacaa	117
<210> 13	
<211> 352	
<212> DNA	
<213> 数据库检索	
<400> 13	
ggaacaaaga ggagcctggt aaaaaacagc caagcccca agacctcagc ccaggcagaa	60
gtgtctctag gacctgggcc tctcagaggg ctctctgcc atccctgtgc tcctgaggc	120
catcatcaaa caggacagag ttggaagagg agactgggag gcagcaagag gggtcacata	180

[0005]

ccagctcagg ggagaatgga gtactgtctc agtttctaac cactctgtgc aagtaagcat 240

cttacaactg gctcttctc cctcactaa gaagacccaa acctctgcat aatgggattt 300

gggctttggt acaagaactg tgacccccaa cctgataaa agagatggaa gg 352

<210> 14

<211> 141

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 14

aggaggcggt gtatttgga acccggtgg agatgccat cccacagtc ttggaacagg 60

cgctccactc tgtgtctgg accaggcagt tggctctaat catagtggg tctgggcaa 120

acgtgtcttc cagtcggtaa g 141

<210> 15

<211> 97

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 15

agtgcctcga ccactatgcc gcgtctttc ctgctcagga agccctccga ccccaatcgg 60

aagcctaact acagcgagct gcaggactct aatccag 97

<210> 16

<211> 221

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 16

gcagtcagcg gtgtgttct cacagtggat cccgtgaag cctgcggggc aggtgcacgt 60

gtagtgtcc acgcagtcg tgcagttggc cccgttcgg caggggtcac tggcacactc 120

gttgatgtcc tcttcacaga aagtccccg gaagccgggc aggcagtcgc agaaggccgt 180

[0006]

gttgatgccg tctgtgcagg agccccctgt gtgacacggg t	221
<210> 17	
<211> 150	
<212> DNA	
<213> 数据库检索	
<400> 17	
ctggatctac tcagccagca ccctggagcg agggtagccc aagccactga ccagcctggg	60
actgccccct gatgtccagc gagtggatgc cgcctttaac tggagcaaaa acaagaagac	120
atacatcttt gctggagaca aattctggag	150
<210> 18	
<211> 168	
<212> DNA	
<213> 数据库检索	
<400> 18	
cagaggagcc tagtgagacc atgggcctgg gagctgggct gggagcccc ggctcaggct	60
tccccagcga agagaatgaa gagtctcgga ttctgcagcc accacagtac ttctgggaag	120
aggaggaaga gctgaatgac tcaagtctgg acctgggacc cactgcag	168
<210> 19	
<211> 221	
<212> DNA	
<213> 数据库检索	
<400> 19	
gagatggcac gggacactac ctgtgcaacg cctgcgggct ctatcacaaa atgaacggac	60
agaaccggcc cctcataaag cccaagcgaa ggctgtctgc agccaggaga gcagggacgt	120
cctgtgcgaa ctgtcagacc accacaacca caetctggag gaggaatgcc aatggggacc	180
ctgtctgcaa tgcctgtggg ctctactaca agcttcacaa t	221

[0007]

<210> 20

<211> 139

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 20

ggcacatact cgggtgaagg tgtccatggg gccaggggct gcagggtggc cggggtgggc 60

tgggagagcc agccggcaca cagggcagcc tcctctgtca ctgcagacac agaaccttcc 120

atgtccaggc aggaaggac 139

<210> 21

<211> 127

<212> DNA

<213> 数据库检索

<400> 21

gagccttgtc gaagttctcc ttgactcgga agctgctcac tcggcagtcg cgctccgcgc 60

ggccgctgcc cagcgccgcc aacagcaaga gcgcccacac ccacttcac ttgccagga 120

atccgcc 127

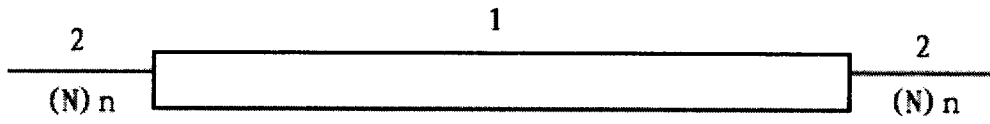


图 1

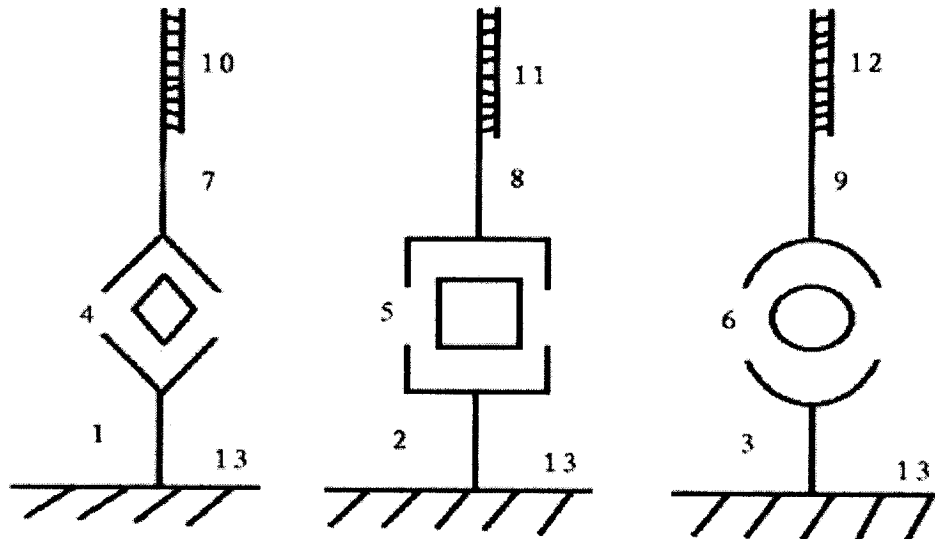


图 2

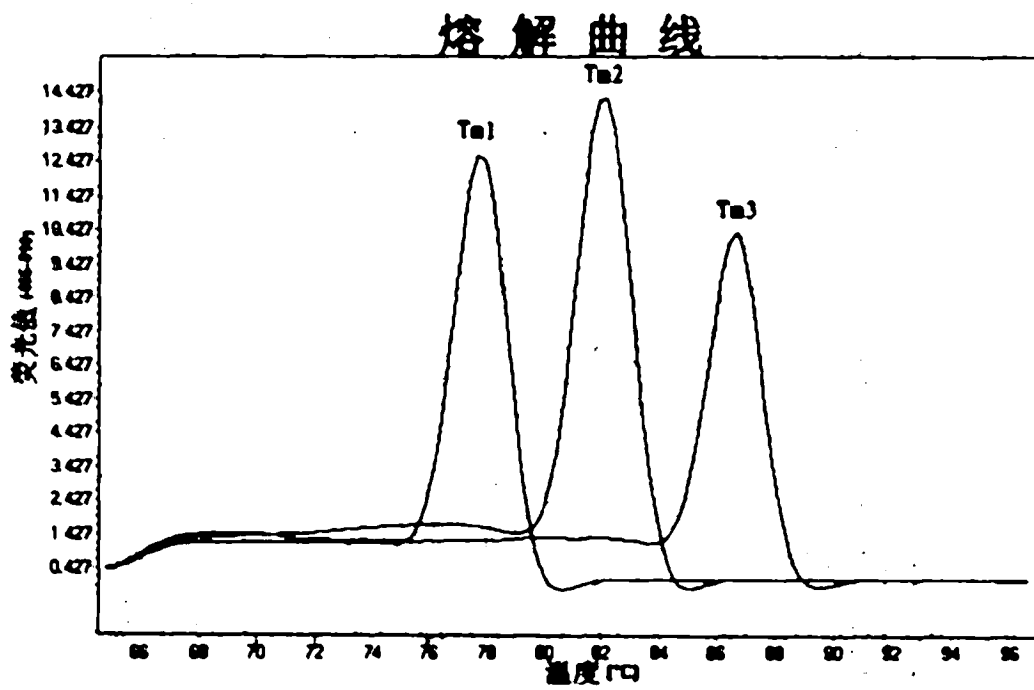


图 3

专利名称(译)	一组具有特征温度溶解曲线的DNA标记分子		
公开(公告)号	CN103289995A	公开(公告)日	2013-09-11
申请号	CN201210181604.1	申请日	2012-06-05
[标]发明人	雷向东		
发明人	雷向东		
IPC分类号	C12N15/11 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	Y02A50/451		
优先权	201210041475.6 2012-02-23 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一组具有特征温度溶解曲线的DNA标记分子。它们可以用于标记抗原或抗体分子，用于免疫PCR检测；或者用于标记别的物质，用于其它相关检测领域。该发明属于生物技术领域。本发明公开的DNA标记分子是一段脱氧核糖核酸，它们可以通过PCR有效地和专一性地扩增，扩增产物的溶解温度具有明显的差别，跨度从75.5°C到93°C。用合适的引物扩增对应的标记DNA分子，PCR反应结束后，分析产物的溶解曲线T_m值，如果有对应有某一T_m值的溶解曲线存在，那就意味着此标记DNA对应的被标记物存在。通过这种方式就可以达到检测被标记物的目的。本发明的DNA标记可应用于：食品微生物检测(如沙门氏菌、单核细胞增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌等)和其它生物标记检测(如病原体或疾病的生物标记物等)。

