(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111996244 B
(45)授权公告日 2022.05.06

(21)申请号 202011172626.2

(22)申请日 2020.10.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111996244 A

(43)申请公布日 2020.11.27

(73)专利权人 浙江绍兴鼎晶生物医药科技股份有限公司
地址 312000 浙江省绍兴市柯桥区齐贤街道西环路586号科创大厦A座

(72)发明人 焦海涛 何志辉 葛海鹏 沈伟强

(74)专利代理机构 北京哌智科创知识产权代理事务所(普通合伙) 11745
专利代理师 蒋辉

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6858(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件
CN 111020026 A,2020.04.17
CN 108998517 A,2018.12.14
CN 103320514 A,2013.09.25
CN 107460235 A,2017.12.12
CN 110257510 A,2019.09.20
CN 106399552 A,2017.02.15
CN 110423803 A,2019.11.08
CN 107119107 A,2017.09.01
刘芳,等.毛球标本在人类基因型研究中的应用.《中华检验医学杂志》.2003,第26卷(第6期),第355-357页.

审查员 刘东川

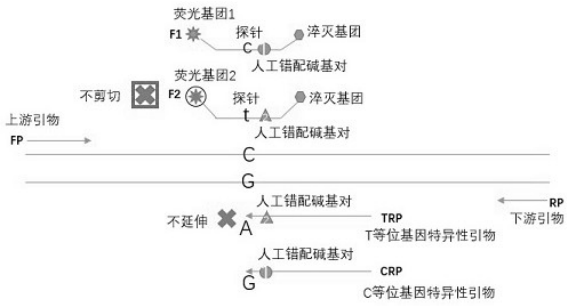
权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图5页

(54)发明名称

一种单核苷酸多态性检测用组合物及其应用

(57)摘要

本发明属于基因荧光探针检测技术领域,具体涉及一种单核苷酸多态性检测用组合物及其应用。单核苷酸多态性检测用组合物含有:不同等位基因间共用的上游引物与下游引物,每种等位基因特异性的等位基因特异性引物,及同各等位基因特异性引物分别互补关联的使用不同荧光标记的探针,探针覆盖单核苷酸多态性位点。采用本发明单核苷酸多态性检测用组合物进行基因检测,可实现单管内多等位基因检测,灵敏度高,又能区分基因的杂合或纯合类型,且无需探针反复优化,节省成本,提高检测通量,结果准确,便于分析。



CN 111996244 B

1.一种单核苷酸多态性检测用组合物,PCR中同时进行一种或多种不同等位基因的定性和/或定量检测,其特征在于,含有:

a.不同等位基因间共用的上游引物与下游引物;

b.每种等位基因特异性的等位基因特异性引物,有:3′端碱基同野生型碱基相同和/或互补的序列,和/或3′端碱基同突变型碱基相同和/或互补的序列;

c.同各等位基因特异性引物分别互补关联的使用不同荧光标记的探针,探针覆盖单核苷酸多态性位点,探针长度为13-30个碱基,荧光基团和淬灭基团分别位于探针的5′端和3′端,探针的3′端进行修饰;

各等位基因特异性引物的3′端与同各等位基因特异性引物互补关联的探针的3′端有2-12个互补碱基;所述各等位基因特异性引物中,同野生型碱基和/或突变型碱基相同和/或互补的碱基位于3′端第1位,3′端的第2-12位引入不少于1个的错配碱基;同各等位基因特异性引物互补关联的探针的对应位置上引入同该错配碱基互补配对的碱基,各等位基因特异性引物同使用不同荧光标记的探针在互补关联的区域完全配对;

d.各等位基因特异性引物同与其互补关联的使用不同荧光标记的探针分别结合于上游引物与下游引物之间的扩增区的两条互补链上。

2.根据权利要求1所述一种单核苷酸多态性检测用组合物,其特征在于,与探针位于同侧的上游引物或下游引物,长度为18-40个碱基,TM值为52-62度,同探针间保留5-10个碱基的间隔,由该引物扩增产物的扩增长度为50-250个碱基;

与等位基因特异性引物位于同侧的上游引物或下游引物,长度为18-40个碱基,TM值为52-62度,勿与等位基因特异性引物重叠,由该引物扩增产物的扩增长度为50-250个碱基。

3.根据权利要求2所述一种单核苷酸多态性检测用组合物,其特征在于,所述同各等位基因特异性引物分别互补关联的探针,GC含量为30%-80%,TM值为65-72度,且TM值分别较上游引物、下游引物及与其互补关联的等位基因特异性引物高5-10度。

4.根据权利要求3所述一种单核苷酸多态性检测用组合物,其特征在于,所述各等位基因特异性引物的5′端引入Taq酶水解抑制修饰,长度为18-40个碱基,TM值分别较上游引物和下游引物低3-5度。

5.根据权利要求1-4任一项所述一种单核苷酸多态性检测用组合物,其特征在于,所述同各等位基因特异性引物分别互补关联的探针的修饰为化合物或非天然核苷酸修饰,化合物包含但不限于MGB,非天然核苷酸包含但不限于LNA或PNA,5′端标记荧光基团和3′端标记淬灭基团选自但不限于以下的类型:FAM、HEX、VIC、ROX、CY5、CY3、BHQ、TAMRA及NFQ。

6.权利要求1-5任一项所述一种单核苷酸多态性检测用组合物在制备核酸相关的定性和/或定量检测用的试剂、和/或试剂盒、和/或基因芯片的应用。

7.根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述核酸相关的定性和/或定量检测包括但不限于单核苷酸多态性检测、和/或基因拷贝数检测、和/或基因拷贝数变异检测。

8.一种核酸相关的定性和/或定量检测用的试剂、和/或试剂盒、和/或基因芯片,其特征在于,含有权利要求1-5任一项所述一种单核苷酸多态性检测用组合物。

一种单核苷酸多态性检测用组合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因荧光探针检测技术领域，具体涉及一种单核苷酸多态性检测用组合物及其应用。

背景技术

[0002] 实时荧光定量PCR技术于1996年由美国Applied Biosystems公司推出，它是一种在PCR扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR扩增时，Taq酶的5'－3'外切酶活性将探针酶切水解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条DNA链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步。该技术不仅实现了对DNA模板的定量，而且具有灵敏度高、特异性和可靠性强、能实现多重反应、自动化程度高、无污染性、实时性和准确性等特点，目前已广泛应用于分子生物学研究。

[0003] 等位基因特异性扩增法(allele specific amplification，ASA)是Newton等首先建立的用来检测已知突变的方法。其依据的基本原理是：耐热Taq DNA聚合酶缺乏3′－5′外切校正活性的特点。引物3′端的特异碱基分别互补于野生型和突变型等位基因的相对碱基，若此碱基对形成错配，链延伸反应就会因3′，5′-磷酸二酯键形成障碍而受阻，故此法又称扩增受阻突变体系。其扩增结果为："野生"模板阻碍，"突变"引物放大；或"突变"模板阻碍，"野生"引物放大。如果PCR结果能得到特异长度的扩增片段，表明模板DNA上具有与引物3'末端相应的突变。点突变的检出率依赖于反应条件的优化及防止引物与靶DNA错配时可能发生的错配延伸，这可通过调整实验条件如：引物、靶DNA、Taq酶的浓度和反应温度等来提高特异性，在反应体系中加入甲酰胺亦可减少非特异性扩增，还可通过人为地使引物3′末端的第2-4位碱基发生错配来阻止错误延伸。

[0004] 目前针对基因多态性的检测方法很多，如直接测序法，焦磷酸测序法，基因芯片杂交法，高分辨率熔解曲线检测法，荧光定量PCR法，等位基因特异扩增法联合琼脂糖胶电泳检测法，等位基因特异扩增联合荧光定量检测法等。其中最常见方法为测序法，该方法费用较低，但操作耗时长且灵敏度低，受到测序仪器的限制，推广困难；基因芯片杂交法是通过与一组已知序列的核酸探针杂交进行核酸序列测定的方法，技术成本昂贵、复杂；检测灵敏度较低；重复性差；分析范围较狭窄。高分辨率溶解曲线法只需要普通的荧光染料，而不需要特定的探针，但由于SNP位点仅仅为一个碱基的变异，因此对设备要求比较特殊，在临床推广存在一定的困难。传统荧光定量PCR法在临床上应用较为广泛，但该方法探针设计难度大，需要较多的优化设计工作，费时费力，特殊模板如高GC或高AT设计就更加困难，而且检测模式一般采用基因分型(Genotyping)方法进行检测，该模式对样本数量以及多态性分布有一定要求，样本量少时不能对样本基因多态性进行准确检测。等位基因特异扩增联合琼脂糖胶电泳检测法，这种方法不需要昂贵的仪器，但电泳操作，增加了PCR污染的机会，而且耗时费力。等位基因特异扩增联合荧光定量检测法，该方法是分管检测，等位基因特异引物

虽然通过引入错配，可以减少错误延伸，但并不代表不延伸，所以在缺乏竞争情况下，单条等位基因特异引物易导致检测结果不准确或不易判读。

[0005] 因此，建立一种快速有效的检测少量样本的基因多态性的方法，避开复杂的探针优化设计工作，全程闭管检测，降低污染，简单易行，物美价廉，没有特殊昂贵仪器限制，成为亟待解决的问题。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足，本发明提供一种单核苷酸多态性检测用组合物，利用等位基因特异引物及关联探针，把SNP等位基因和不同荧光标记进行关联，实现SNP不同等位基因于单管内同时检测，等位基因特异性引物间相互竞争，提高结果准确度，且能区分是杂合基因(野生或突变)还是纯合基因(野生或突变)；相较于传统SNP检测方法，等位基因特异引物关联探针设计简单，省去探针的反复优化工作，节约成本；尤其适合高GC或高AT等复杂模板的检测；再者，本发明单核苷酸多态性检测用组合物中含有共用的上游引物和下游引物，富集检测模板，提高检测灵敏度；相较于传统的仅检测突变阻断封闭野生模板的方法，简化传统的分管检测为单管检测，又能够获得更多的信息，节省成本的同时提高检测通量，检测结果又更为准确，便于分析。

[0007] 本发明技术方案为，一种单核苷酸多态性检测用组合物，同时进行一种或多种不同等位基因的定性和/或定量检测，含有：

[0008] a.不同等位基因间共用的上游引物与下游引物；

[0009] b.每种等位基因特异性的等位基因特异性引物，有：3′端碱基同野生型碱基相同和/或互补的序列，和/或3′端碱基同突变型碱基相同和/或互补的序列；

[0010] c.同各等位基因特异性引物分别互补关联的使用不同荧光标记的探针，探针覆盖单核苷酸多态性位点。

[0011] 所述各等位基因特异性引物，长度为18-40个碱基，TM值分别较上游引物和下游引物低3-5度，同野生型碱基和/或突变型碱基相同和/或互补的碱基位于3′端第1位，3′端的第2-12位引入不少于1个的错配碱基，作为优选方案，3′端的第2或3位引入1个错配碱基，其余碱基同待测序列一致或互补。针对不同等位基因的各等位基因特异性引物，可以同时引入错配碱基，也可以各自单独引入错配碱基，引入错配碱基的位置可以相同也可以不同，作为优选方案，每条引物引入错配碱基的位置相互错开。

[0012] 错配碱基的引入增强等位基因特异性引物的特异性，即增强扩增的特异性，使得检测结果更为准确，并易于区分判读。错配碱基的引入同时遵循碱基强弱错配原则，如果3′端是“强”错配(A/G或C/T)则需要引入“弱”的错配(C/A或G/T)或不需引入错配即可阻断3′端的扩增，反之亦然：同样，当3′端是“中度”错配(A/A、C/C、G/G或T/T)则需要引入“中度”的错配。

[0013] 所述各等位基因特异性引物的5′端引入Taq酶水解抑制修饰，防止同侧的上游引物或下游引物在延伸时对等位基因特异性引物造成水解，Taq酶水解抑制修饰可以是硫代修饰，但不限于硫代修饰。

[0014] 所述各等位基因特异性引物的TM值分别较上游引物和下游引物低3-5度，提高检测特异性。

[0015] 所述同各等位基因特异性引物分别互补关联的探针的修饰可以是化合物或一些非天然核苷酸修饰，化合物包含但不限于MGB，非天然核苷酸包含但不限于LNA或PNA，提高TM值，缩短探针长度，增强检测特异性。

[0016] 本发明各等位基因特异性引物针对突变位点的等位基因进行设计，根据等位基因数量可以增减等位基因特异性引物的条数。如本发明实施例所示，基于本发明等位基因特异性引物设计规则设计的用于ApoE基因rs429358(T/C)SNP位点检测的等位基因特异性引物有，rs429358等位基因特异引物1(SEQ ID NO:1)：ACCAGGCGGCCGgA；rs429358等位基因特异引物2(SEQ ID NO:2)：CACCAGGCGGCCGaG；用于MTHFR基因677(C/T)SNP位点检测的等位基因特异性引物有，MTHFR677等位基因特异引物1(SEQ ID NO:7)：GAGAAGGTGTCTGCGGGAtC；MTHFR677等位基因特异引物2(SEQ ID NO:8)：GAGAAGGTGTCTGCGGGAcT。

[0017] 本发明同各等位基因特异性引物分别互补关联的探针，基于荧光共振能量传递原理，一端为荧光基团，另一端为淬灭基团，当探针完整时，5′端荧光基团的发射波长正好是3′端荧光基团的吸收波长，能量被吸收传递到3′端荧光基团(淬灭)而发出其它荧光，仪器检测不到5′端荧光基团激发的荧光信息。

[0018] 为实现单管内SNP的多个不同等位基因检测，同各个等位基因特异性引物分别互补关联的探针分别进行不同荧光标记，实现等位基因和荧光信息的对应转换，单管内不同的等位基因对应生成不同的检测荧光信息，进行单管多重检测。其中，探针上标记的荧光基团和淬灭基团选自但不限于以下的类型：FAM、HEX、VIC、ROX、CY5、CY3、BHQ、TAMRA及NFQ等。

[0019] 所述同各等位基因特异性引物分别互补关联的探针覆盖待测SNP位点，探针的GC含量在30%-80%之间，碱基分布均匀，同待测序列的靶区域以外的DNA无大于70%同源性，避免发生非特异性荧光信号的检出。

[0020] 根据探针设计一般原则，本发明所述同各等位基因特异性引物分别互补关联的探针，可以是普通探针(包含但不限于线性直链的Taqman探针)，也可以是结构探针(包含但不限于具有茎环结构的分子信标和杂交FRET探针)，探针修饰物可以是化合物(MGB)和/或一些非天然核苷酸，修饰位置优选3′端，非天然核苷酸包含但不限于LNA与PNA，增强稳定性。具体如：其3′端修饰可以是MGB修饰，也可以是锁核酸(LNA)修饰，但3′端修饰并不限于以上类型。根据探针的GC含量和探针修饰不同设定不同的探针长度，长度为13-30个碱基，TM值为65-72度，且TM值分别较上游引物、下游引物及与其互补关联的等位基因特异性引物高5-10度。探针应尽量选用修饰提高TM值，缩短探针长度，提高检测特异性，尤其是针对高AT序列。

[0021] 各等位基因特异性引物的3′端同与各等位基因特异性引物分别互补关联的探针的3′端有2-12个互补碱基，实现探针和不同等位基因特异性引物之间的关联，将碱基信号转换为对应的荧光信号；互补碱基的个数优选为2-6个，以降低退火阶段探针和等位基因特异性引物之间的结合力，确保等位基因特异性引物优先和待测序列模板进行退火，保证PCR顺利进行。

[0022] 如上所述，因各等位基因特异性引物的3′端引入错配碱基，同各等位基因特异性引物互补关联的探针的对应位置上引入同该错配碱基互补配对的碱基，保证引物和探针互补区域完全配对，增加探针与其对应的等位基因特异性引物的关联强度，同时避免探针和非对应等位基因特异性引物的非特异性结合。若探针内同引物互补区域GC含量较高，则等

位基因特异性引物引入错配碱基应尽量选用A或T,避免探针GC含量过高,并起到间隔GC碱基的作用,使得碱基分布更加均匀合理。

[0023] 如上所述,探针同与其互补关联的各等位基因特异性引物于互补区域完全配对,和非关联等位基因特异性引物间至少存在两个不匹配碱基,其一是SNP等位基因碱基差异,另一是引入的错配碱基,相较于传统方法不同等位基因的探针间仅相差一个SNP等位基因碱基,本发明设计的探针间至少相差两个碱基,非特异性结合概率大大降低,同时进一步降低设计难度,避免探针的反复优化,节约开发成本。

[0024] 如本发明实施例所示,基于本发明等位基因特异性引物互补关联探针设计规则设计的用于ApoE基因rs429358(T/C)SNP位点检测的探针有,rs429358等位基因特异引物关联探针1(SEQ ID NO:3):5 FAM- ACGTGTcCGGCCG -3-MGB;rs429358等位基因特异引物关联探针2(SEQ ID NO:4):5 VIC- ACGTGCtCGGCCG -3-MGB;用于MTHFR基因677(C/T)SNP位点检测的探针有,MTHFR677等位基因特异引物关联探针1(SEQ ID NO:9):5 FAM-TGATGATGAAATCGGaTC-3-MGB;MTHFR677等位基因特异引物关联探针2(SEQ ID NO:10):5 VIC- TGATGATGAAATCGAgTC -3-MGB。

[0025] 所述不同等位基因间共用的上游引物和下游引物,均为普通无标记引物,长度均为18-40个碱基,TM值均为52-62度,根据程序的退火温度选择合适的TM值,和等位基因特异性引物同侧的上游引物或下游引物勿与等位基因特异性引物重叠,和探针同侧的上游引物或下游引物与探针保留5-10个碱基的间隔,上游引物或下游引物避免自身形成二级结构及引物之间相互配对形成二聚体等,由引物扩增产物的扩增长度均为50-250个碱基,扩增长度优选在150个碱基以内。

[0026] 所述不同等位基因间共用的上游引物和下游引物,起到高效富集检测模板的作用,有效抵消等位基因特异性引物引入的人工错配对扩增效率的负面影响,提高检测灵敏度。

[0027] 如本发明实施例所示,基于本发明等位基因特异性引物互补关联探针设计规则设计的用于ApoE基因rs429358(T/C)SNP位点检测的上/下游引物有,rs429358下游引物(SEQ ID NO:5):CTCGCCGCGGTACTG;rs429358上游引物(SEQ ID NO:6):TGGGCGCGGACATGG;用于MTHFR基因677(C/T)SNP位点检测的上/下游引物有,MTHFR677上游引物(SEQ ID NO:11):GTCTCTTCATCCCTCGCCTT;MTHFR677下游引物(SEQ ID NO:12):ATGTGTCAGCCTCAAAGAAAAGC。

[0028] 本发明上述单核苷酸多态性检测用组合物可用于核酸相关的定性和/或定量检测,如基因突变的检测,包括任何物种的基因突变的种类、和/或突变频率检测,如单核苷酸多态性检测;基因拷贝数的检测,包括DNA或RNA的拷贝数检测、和/或拷贝数变异检测;高通量基因突变和/或基因拷贝数的检测,基于在硅或玻璃等材质上固定互补探针的芯片荧光定量检测技术,但不限于以上列举。

[0029] 本发明还提供一种核酸相关的定性和/或定量检测用的试剂、和/或试剂盒、和/或基因芯片,含有本发明上述的单核苷酸多态性检测用组合物。具体地,本发明单核苷酸多态性检测用组合物可用于实时PCR中特异靶序列的扩增检测,目前适用实时PCR仪器包括:(ABI)公司的7300、7300plus、7500、7500fast、7700、7900、Step one、Step one Plus,Bio-Rad公司的CFX96、IQ Cycler,Roche公司的LightCycler2.0、LightCycler480,Qiagen公司的Rotor-Gene Q,Stratagene公司的Mx3000P和Mx3005P等。

[0030] 本发明提供的单核苷酸多态性检测用组合物可在单管内检测SNP,优势体现在:等位基因特异引物之间存在竞争,使得结果更为准确,特异性更好,优于传统的探针联合等位基因特异性扩增方法中的分管检测:一方面可以节省成本,提高检测通量;另一方面检测结果更为准确,便于分析。

[0031] 即,本发明提供的单核苷酸多态性检测用组合物,实现单管检测SNP的多个等位基因,各等位基因间区分度高,扩增特异性强,结果易判读,避开传统方法需要计算ΔCT来判断结果的不确定性,相比genotyping分析方法对样本数量以及多态性分布有一定要求而言,本发明无此要求;另外,单管多等位基因检测,能有效区分杂合突变还是纯合突变,相较传统只检测突变模板,封阻野生模板的方法来说,一次实验获得了更全面的信息,同时节约检材,对珍贵样本来说变得更加有意义。在单管内多个等位基因特异引物相互竞争,使得检测结果更加准确,这是传统单条等位基因特异引物检测所无法比拟的。

附图说明

[0032] 图1为本发明实施例1原理示意图,以T/C SNP位点为例,检测到荧光基团1的信号。

[0033] 图2为本发明实施例2原理示意图,以T/C SNP位点为例,检测到荧光基团2的信号。

[0034] 图3为实施例1采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计检测ApoE基因rs429358(T/C)SNP位点的纯合野生型结果示意图。

[0035] 图4为实施例1采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计检测ApoE基因rs429358(T/C)SNP位点的纯合突变型结果示意图。

[0036] 图5为实施例1采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计检测ApoE基因rs429358(T/C)SNP位点的杂合型结果示意图。

[0037] 图6为实施例1采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计进行无ApoE基因检测的阴性结果示意图。

[0038] 图7为实施例2采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计检测MTHFR基因677(C/T)SNP位点的纯合野生型结果示意图。

[0039] 图8为实施例2采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计检测MTHFR基因677(C/T)SNP位点的纯合突变型结果示意图。

[0040] 图9为实施例2采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计检测MTHFR基因677(C/T)SNP位点的杂合型结果示意图。

[0041] 图10为实施例2采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计进行无MTHFR基因检测的阴性结果示意图。

具体实施方式

[0042] 为了便于理解本发明,通过以下实施例对本发明进行说明,但不构成对本发明的限制。

[0043] 实施例1:如图1所示,采用等位基因特异引物及其关联探针设计和使用方法,用于ApoE基因rs429358(T/C)SNP位点检测;PCR模板为细胞系基因组DNA。

[0044] 反应液体系配制:H_2O,纯化水,16.7μL;PCR缓冲液(Mg^{2+} plus),5X,5μL;dNTPs(各10mM dATP,dCTP,dGTP;20mM dUTP),10mM,0.5μL;等位基因特异引物1,100uM,0.1μL;等位

基因特异引物2,100uM,0.1μL;等位基因特异引物关联探针1,100uM,0.05μL;等位基因特异引物关联探针2,100uM,0.05μL;上游引物,100uM,0.1μL;下游引物,100uM,0.1μL;UDG酶,1U/μL,0.1μL;聚合酶,5U/μL,0.2μL;总体积23μL。

[0045] 操作步骤:按上述反应液体系配制进行相关液体配制,震荡混匀15秒,快速离心15秒,以每管23μL分装至PCR反应管中,分别加入需要检测的样本2μL,然后小心盖上PCR管盖,快速离心数秒,将PCR反应管放置于实时PCR仪器中。

[0046] 实时PCR反应在AB 7500 FAST上进行。

[0047] 第一阶段:37℃ 2min, 1 个循环;

[0048] 第二阶段:95℃ 5min, 1 个循环;

[0049] 第三阶段:95℃ 15s, 60℃ 1min,40 个循环。

[0050] 本实施例基因引物/探针序列如下:

[0051] rs429358等位基因特异引物1(SEQ ID NO:1):ACCAGGCGGCCGgA;

[0052] rs429358等位基因特异引物2(SEQ ID NO:2):CACCAGGCGGCCGaG;

[0053] rs429358等位基因特异引物关联探针1(SEQ ID NO:3):5 FAM- ACGTGTcCGGCCG -3-MGB;

[0054] rs429358等位基因特异引物关联探针2(SEQ ID NO:4):5 VIC- ACGTGCtCGGCCG -3-MGB;

[0055] rs429358下游引物(SEQ ID NO:5):CTCGCCGCGGTACTG;

[0056] rs429358上游引物(SEQ ID NO:6):TGGGCGCGGACATGG;

[0057] 其中,大写粗体是SNP等位基因,小写字母是人工引入的错配碱基。

[0058] 如图3仅出现FAM信号的扩增曲线,说明该基因型为纯合野生型TT;图4仅出现VIC信号的扩增曲线,说明该基因型为纯合突变型CC;图5同时出现FAM与VIC信号的扩增曲线,且Ct值基本一致,说明该基因型为杂合型TC;图6是以超纯水为模板的结果,既没有FAM信号也没有VIC的信号,说明该实验结果可靠。利用该方法,可以在一个管中鉴定同一位点的野生型与突变型基因类型,且不易产生假阳性结果,在鉴定基因多态位点方面,比现有SNP检测方法具有明显的优越性。

[0059] 实施例2:如图2所示,采用等位基因特异的引物互补探针PCR检测技术用于MTHFR基因677(C/T)SNP位点检测;PCR模板为细胞系基因组DNA。

[0060] 反应液体系配制:H_2O,纯化水,16.7μL;PCR缓冲液(Mg^{2+} plus),5X,5μL;dNTPs(各10mM dATP,dCTP,dGTP;20mM dUTP),10mM,0.5μL;等位基因特异引物1,100uM,0.1μL;等位基因特异引物2,100uM,0.1μL;等位基因特异引物关联探针1,100uM,0.05μL;等位基因特异引物关联探针2,100uM,0.05μL;上游引物,100uM,0.1μL;下游引物,100uM,0.1μL;UDG,1U/μL,0.1μL;聚合酶,5U/μL,0.2μL;总体积23μL。

[0061] 操作步骤:按上述反应液体系配制进行相关液体配制,震荡混匀15秒,快速离心15秒,以每管23μL分装至PCR反应管中,分别加入需要检测的样本2μL,然后小心盖上PCR管盖,快速离心数秒,将PCR反应管放置于实时PCR仪器中。

[0062] 实时PCR反应在AB 7500 FAST上进行。

[0063] 第一阶段:37℃ 2min, 1 个循环;

[0064] 第二阶段:95℃ 5min, 1 个循环;

[0065] 第三阶段:95℃ 15s，60℃ 1min,40 个循环。

[0066] 本实施例基因引物/探针序列如下：

[0067] MTHFR677等位基因特异引物1(SEQ ID NO:7):GAGAAGGTGTCTGCGGGAtC;

[0068] MTHFR677等位基因特异引物2(SEQ ID NO:8):GAGAAGGTGTCTGCGGGAcT;

[0069] MTHFR677等位基因特异引物关联探针1(SEQ ID NO:9):5 FAM-TGATGATGAAATCGGaTC-3-MGB;

[0070] MTHFR677等位基因特异引物关联探针2(SEQ ID NO:10):5 VIC-TGATGATGAAATCGAgTC -3-MGB;

[0071] MTHFR677上游引物(SEQ ID NO:11):GTCTCTTCATCCCTCGCCTT;

[0072] MTHFR677下游引物(SEQ ID NO:12):ATGTGTCAGCCTCAAAGAAAAGC;

[0073] 其中,大写粗体是SNP等位基因,小写字母是人工引入的错配碱基。

[0074] 图7仅出现FAM信号的扩增曲线,说明该基因型为纯合野生型CC;图8仅出现VIC信号的扩增曲线,说明该基因型为纯合突变型TT;图9同时出现FAM与VIC信号的扩增曲线,且Ct值基本一致,说明该基因型为杂合型CT;图10是以超纯水为模板的结果,既没有FAM信号也没有VIC的信号,说明该实验结果可靠。利用该方法,可以在一个管中鉴定同一位点的野生型与突变型基因类型,且不易产生假阳性结果,在鉴定基因多态位点方面,比现有SNP检测方法具有明显的优越性。

[0075] 由实施例1和实施例2的检测结果可知,采用本发明等位基因特异引物及其关联探针设计方法设计的单核苷酸多态性检测用组合物,检测单核苷酸多态性,不仅能快速、高效、灵敏的获得检测结果,且其结果的判读非常明确、直观,结果亦是可考、特异的,检出率100%。

[0076] 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。

[0001] 序列表

[0002] <110> 上海鼎晶生物医药科技股份有限公司

[0003] <120> 一种单核苷酸多态性检测用组合物及其应用

[0004] <141> 2020-09-15

[0005] <160> 12

[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0007] <210> 1

[0008] <211> 14

[0009] <212> DNA

[0010] <213> Artificial Sequence

[0011] <400> 1

[0012] accaggcggc cgga 14

[0013] <210> 2

[0014] <211> 15

[0015] <212> DNA

[0016] <213> Artificial Sequence

[0017] <400> 2

[0018] caccaggcgg ccgag 15

[0019] <210> 3

[0020] <211> 13

[0021] <212> DNA

[0022] <213> Artificial Sequence

[0023] <400> 3

[0024] acgtgtccgg ccg 13

[0025] <210> 4

[0026] <211> 13

[0027] <212> DNA

[0028] <213> Artificial Sequence

[0029] <400> 4

[0030] acgtgctcgg ccg 13

[0031] <210> 5

[0032] <211> 15

[0033] <212> DNA

[0034] <213> Artificial Sequence

[0035] <400> 5

[0036] ctcgccgcgg tactg 15

[0037] <210> 6

[0038] <211> 15

[0039] <212> DNA

[0040] <213> Artificial Sequence

[0041] <400> 6

[0042] tgggcgcgga catgg 15

[0043] <210> 7

[0044] <211> 20

[0045] <212> DNA

[0046] <213> Artificial Sequence

[0047] <400> 7

[0048] gagaaggtgt ctgcgggatc 20

[0049] <210> 8

[0050] <211> 20

[0051] <212> DNA

[0052] <213> Artificial Sequence

[0053] <400> 8

[0054] gagaaggtgt ctgcgggact 20

[0055] <210> 9

[0056] <211> 18

[0057] <212> DNA

[0058] <213> Artificial Sequence

[0059] <400> 9

[0060] tgatgatgaa atcggatc 18

[0061] <210> 10

[0062] <211> 18

[0063] <212> DNA

[0064] <213> Artificial Sequence

[0065] <400> 10

[0066] tgatgatgaa atcgagtc 18

[0067] <210> 11

[0068] <211> 20

[0069] <212> DNA

[0070] <213> Artificial Sequence

[0071] <400> 11

[0072] gtctcttcat ccctcgcctt 20

[0073] <210> 12

[0074] <211> 23

[0075] <212> DNA

[0076] <213> Artificial Sequence

[0077] <400> 12

[0078] atgtgtcagc ctcaaagaaa agc 23

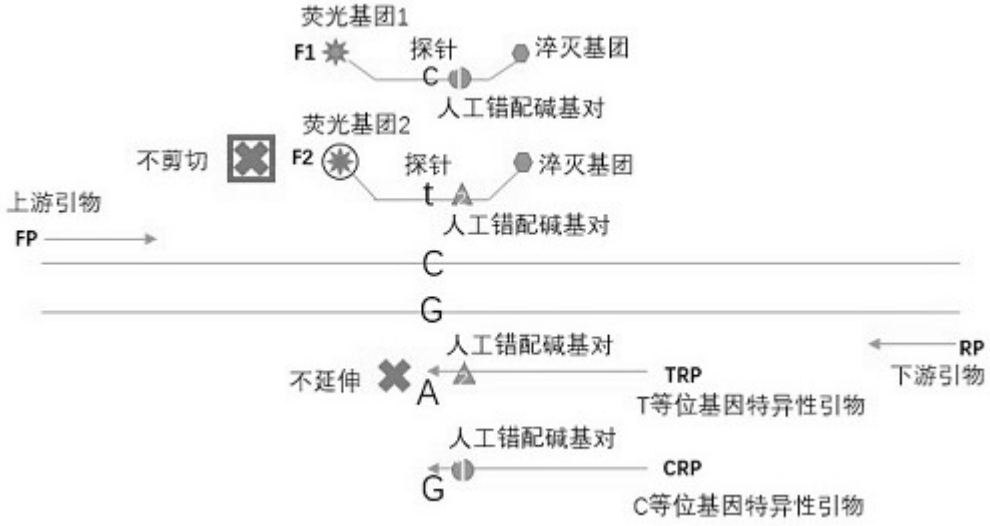

荧光基团1
F1
探针
淬灭基团
C
人工错配碱基对
荧光基团2
不剪切
F2
探针
淬灭基团
t
A
人工错配碱基对
上游引物
FP
C
G
人工错配碱基对
RP
下游引物
不延伸
A
TRP
T等位基因特异性引物
人工错配碱基对
CRP
G
C等位基因特异性引物

图1

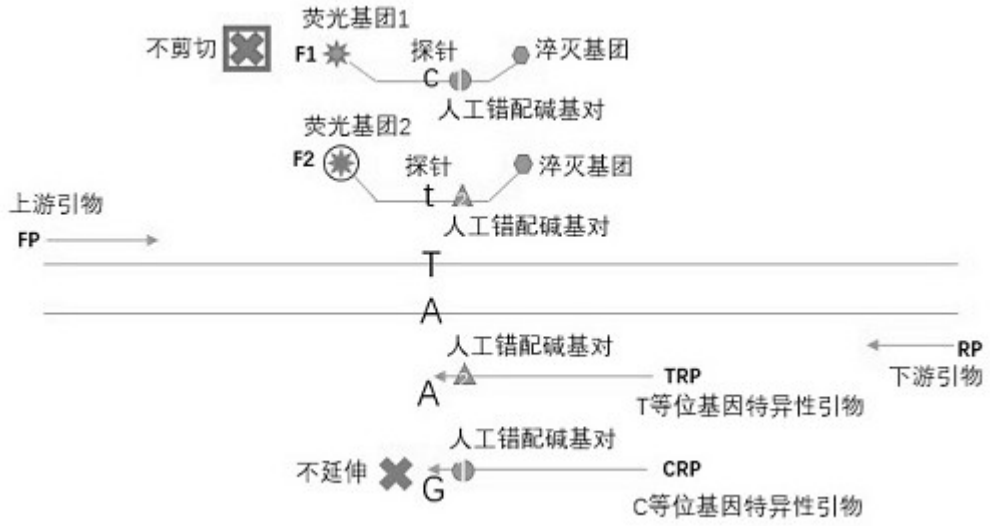

荧光基团1
不剪切
F1
探针
淬灭基团
C
人工错配碱基对
荧光基团2
F2
探针
淬灭基团
t
A
人工错配碱基对
上游引物
FP
T
A
人工错配碱基对
RP
下游引物
A
TRP
T等位基因特异性引物
人工错配碱基对
不延伸
CRP
G
C等位基因特异性引物

图2

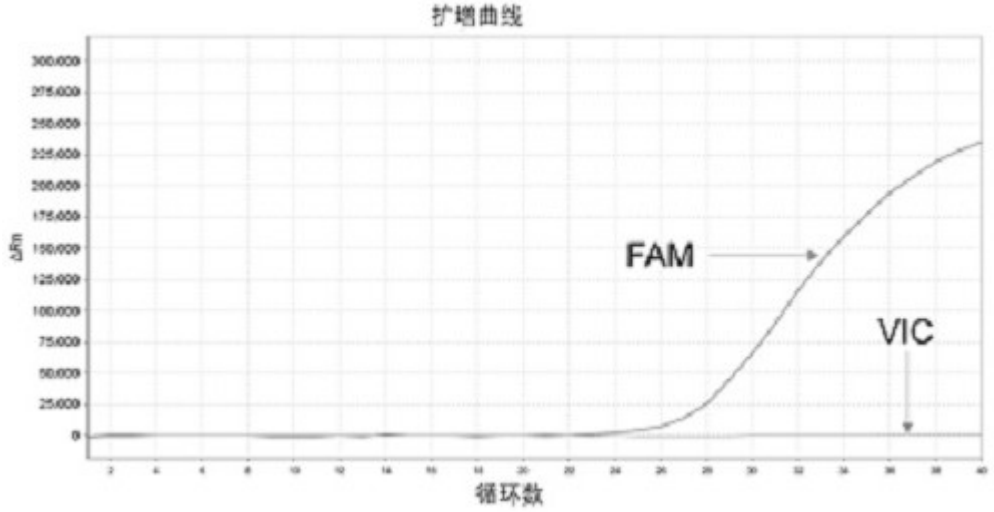

扩增曲线
ΔRn
FAM
VIC
循环数

图3

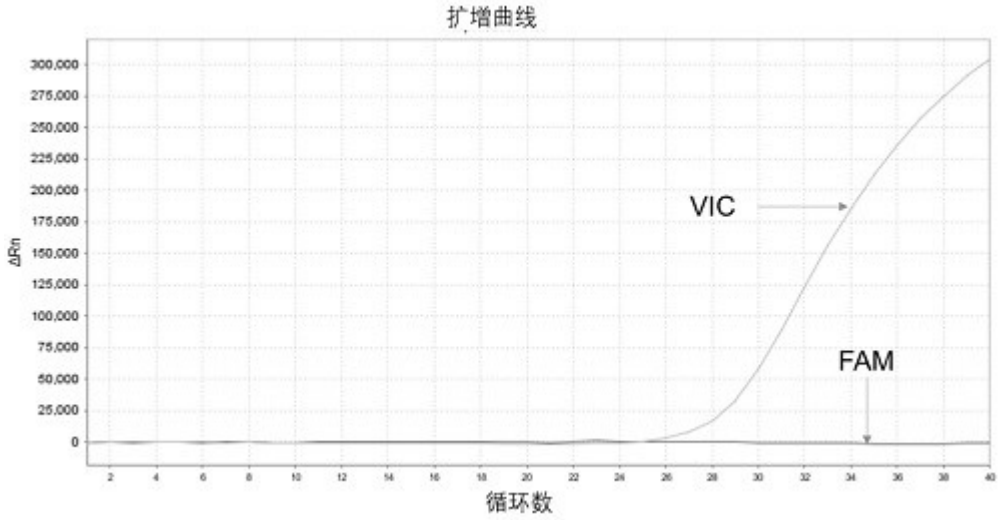

扩增曲线
ΔRn
300,000
275,000
250,000
225,000
200,000
175,000
150,000
125,000
100,000
75,000
50,000
25,000
0
VIC
FAM
循环数

图4

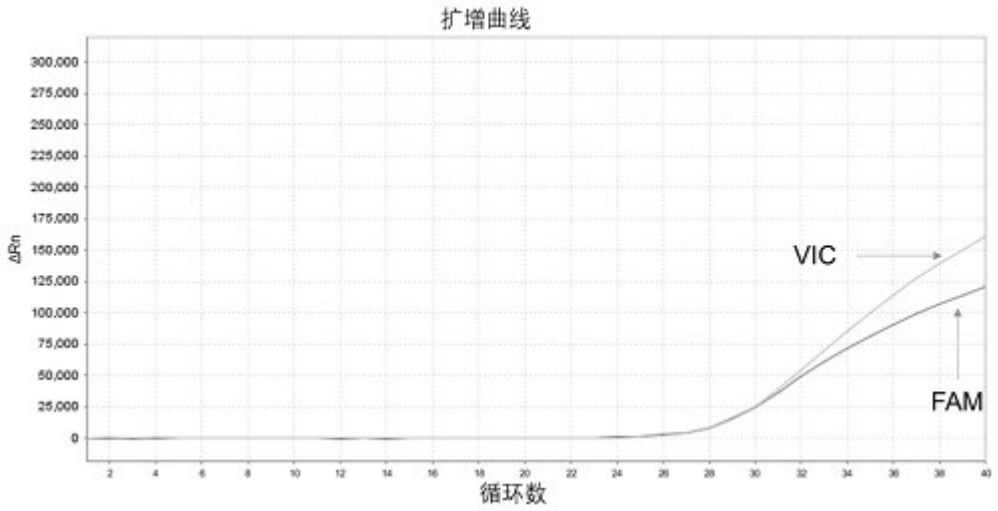


图5

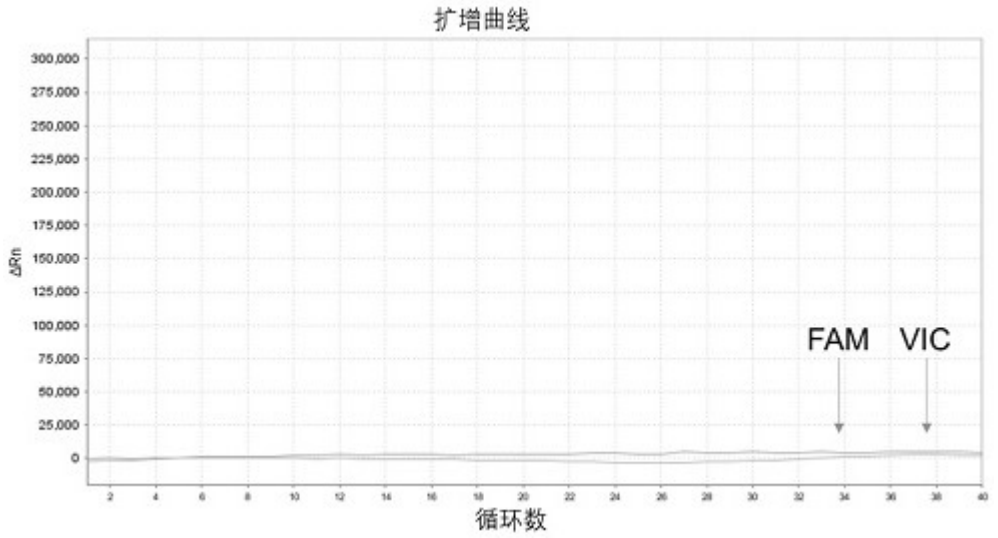


图6

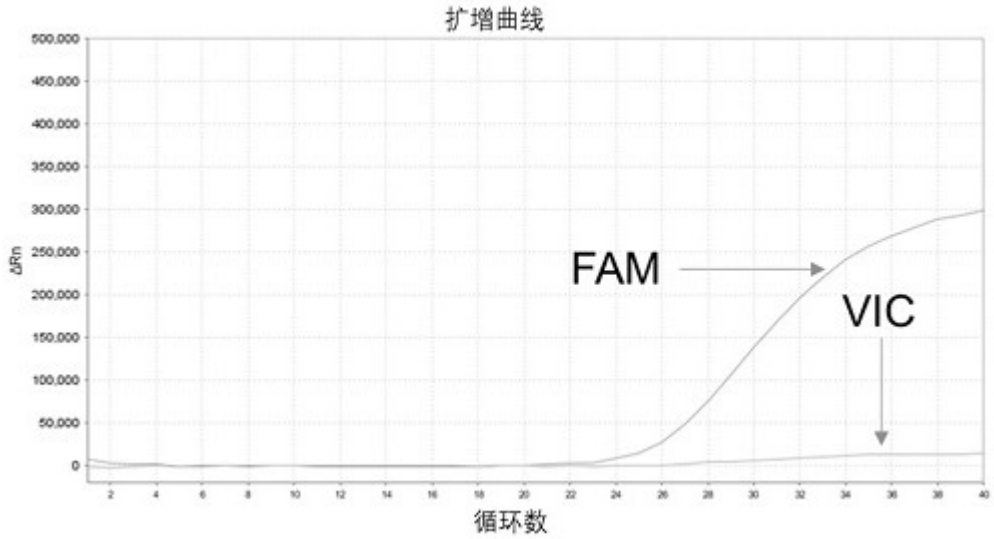

扩增曲线
500,000
450,000
400,000
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
ΔRn
FAM
VIC
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
循环数

图7

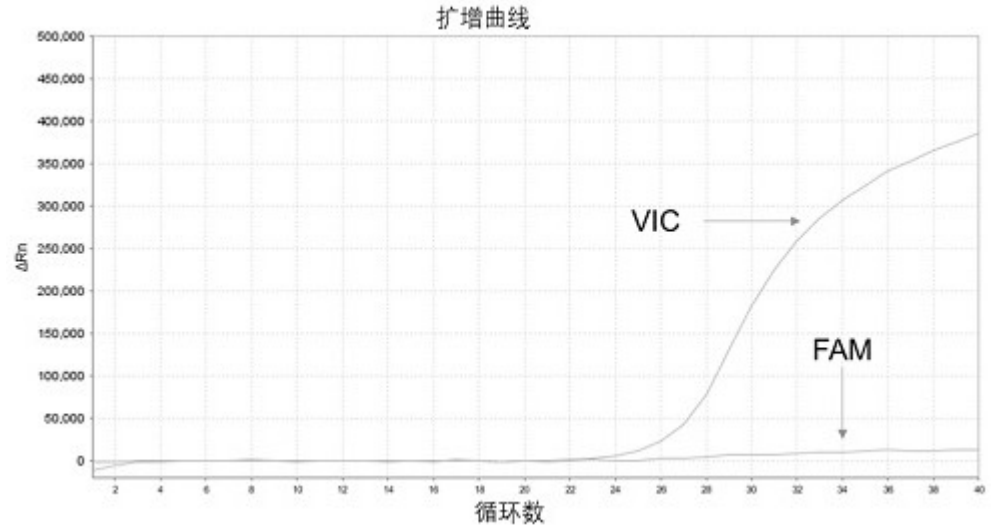

扩增曲线
500,000
450,000
400,000
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
ΔRn
VIC
FAM
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
循环数

图8

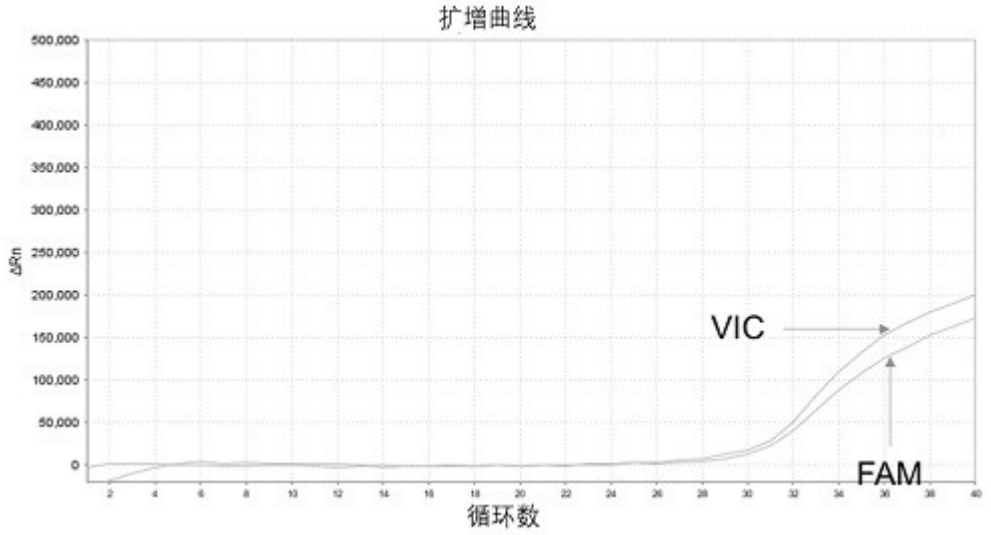

扩增曲线
500,000
450,000
400,000
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
ΔRn
VIC
FAM
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40
循环数

图9

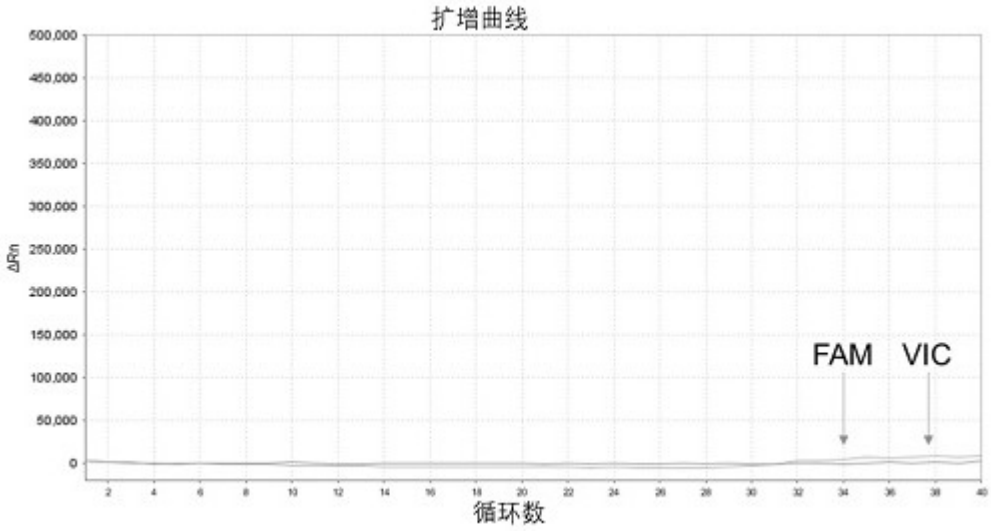

扩增曲线
500,000
450,000
400,000
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
ΔRn
FAM
VIC
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40
循环数

图10