



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112094905 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(21) 申请号 202011101905.X

(22) 申请日 2020.10.15

(71) 申请人 连步生物科技(南京)有限公司
地址 210000 江苏省南京市栖霞区迈皋桥
创业园科技研发基地寅春路18号-
M1620

(72) 发明人 曾科 刘志红 梁宏伟 刘明慧
蒋松

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218
代理人 傅婷婷 夏平

(51) Int. Cl.
C12Q 1/6883 (2018.01)
G12N 15/11 (2006.01)

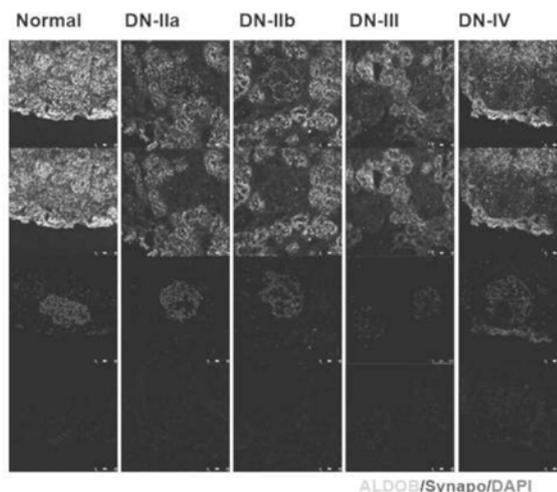
权利要求书2页 说明书7页
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于检测糖尿病肾病相关易感基因
ALDOB的SNP的引物组和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测糖尿病肾病相
关易感基因ALDOB的SNP的引物组和试剂盒。该引
物组合物,选自ALDOB基因rs118168553,
rs146360505,rs1588170400,rs760339672,
rs182003715,rs3739721,rs759204107,
rs141267935位点中任意一种或多种的PCR引物。
所述的试剂盒包含上述引物组合物。本发明发现
的这些突变位点可以作为检测靶点应用于与糖
尿病肾病相关易感基因的SNP筛查试剂盒的制
备。其检测引物可以作为试剂盒的重要组成部分。



ALDOB/Synapo/DAPI

1. 一组ALDOB基因的SNP作为检测靶点在制备糖尿病患者ALDOB基因突变筛查试剂盒中的应用,所述的ALDOB基因的SNP选自以下SNP位点中的一个或多个:rs118168553,rs146360505,rs1588170400,rs760339672,rs182003715,rs3739721,rs759204107,rs141267935。

2. 一组ALDOB基因的SNP作为检测靶点在制备与糖尿病肾病相关易感基因的SNP检测试剂盒中的应用,所述的ALDOB基因的SNP选自以下SNP位点中的一个或多个:rs118168553,rs146360505,rs1588170400,rs760339672,rs182003715,rs3739721,rs759204107,rs141267935。

3. 检测权利要求1中所述的ALDOB基因的SNP的试剂在制备糖尿病患者ALDOB基因突变筛查试剂盒中的应用。

4. 检测权利要求1中所述的ALDOB基因的SNP的试剂在制备与糖尿病肾病相关易感基因的SNP检测试剂盒中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于所述的检测权利要求1中所述的ALDOB基因的SNP的试剂选自Taqman方法,DHPLC技术和质谱分析、单链构象多态性分析、等位基因特异的寡聚核苷酸杂交、DNA芯片、微测序、高温连接酶法、SNaPshot法或DNA测序法检测权利要求1中所述的ALDOB基因的SNP的试剂。

6. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于所述的检测权利要求1中所述的ALDOB基因的SNP的试剂为检测ALDOB基因rs118168553,rs146360505,rs1588170400,rs760339672,rs182003715,rs3739721,rs759204107,rs141267935位点中任意一种或多种的PCR引物。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于所述的PCR引物如下所示:

位点	S	R
rs118168553	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2
rs146360505	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4
rs1588170400	SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 6
rs760339672	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8
rs182003715	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10
rs3739721	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
rs759204107	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14
rs141267935	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16

8. 一种检测与糖尿病肾病相关易感基因的SNP的试剂盒,其特征在于包含ALDOB基因rs118168553,rs146360505,rs1588170400,rs760339672,rs182003715,rs3739721,rs759204107,rs141267935位点中任意一种或多种的PCR引物。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于引物序列如下所示:

位点	S	R
rs118168553	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2
rs146360505	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4
rs1588170400	SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 6
rs760339672	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8
rs182003715	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10
rs3739721	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
rs759204107	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14
rs141267935	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16

10. 一种用于检测糖尿病肾病相关易感基因ALDOB的SNP的引物组合物,其特征在于选自ALDOB基因rs118168553,rs146360505,rs1588170400,rs760339672,rs182003715,rs3739721,rs759204107,rs141267935位点中任意一种或多种的PCR引物;优选如下所示的引物:

位点	S	R
rs118168553	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2
rs146360505	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4
rs1588170400	SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 6
rs760339672	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8
rs182003715	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10
rs3739721	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
rs759204107	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14
rs141267935	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16

一种用于检测糖尿病肾病相关易感基因ALDOB的SNP的引物组和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,具体涉及一种用于检测糖尿病肾病相关易感基因ALDOB的SNP的引物组和试剂盒。

背景技术

[0002] 醛缩酶B(ALDOB)基因定位于9q22.3,共9个外显子。醛缩酶B由364个氨基酸残基组成。在正常情况下,此酶催化1-磷酸果糖裂解为二羟丙酮磷酸和D-甘油醛。当ALDOB基因发生突变,使ALDOB结构和活性发生改变,1-磷酸果糖在肝脏、小肠、肾脏等器官积累,进一步导致细胞内包括磷酸化酶、果糖1,6-二磷酸酶、肝醛缩酶和果糖激酶等酶的活性受到抑制,从而使肝脏、小肠、肾脏等器官代谢发生紊乱,导致脏器损伤。截至1995年,Tolan总结在北欧、其他地区和少数民族中已鉴定出醛缩酶B基因有21种突变,其中15种突变为单个碱基取代,共有9个醛缩酶B蛋白中氨基酸被其他氨基酸置换,4个密码子有无义突变,2个剪接缺陷,2个大的缺失和2个4个碱基缺失/1个碱基插入,最常见的突变发生在外显子5和9。2005年,Santen等对72个家庭80例患者筛查果糖不耐受的基因突变,其结果是:最常见的酶蛋白突变A150P占65%,A1750占11%,N33K占8%,其次为360~363delCAAA、R60X、Y204X和865delC,并发现8种新的突变,其中缺失突变:1044~1049delTTCTGG、C345~372del128、C841~842delAC;插入突变:insACACT;拼接突变:113~1G>A、C799+2T>K;无义突变:612T>G(Y204X);错义突变:532T>G(C178R)、851T>C(L284P)。根据这些资料,认为少数ALDOB基因突变的HFI在中欧的患病率为1:26 000(95%可信区间为1:12 600~1:78 000)。Esposito等报告了6种ALDOB基因新的突变:3个错义,1个无义和2个拼接突变[g6846T>CLPI74T、g10236G>T(PV222F)、g10258T>C(PL229p)、g8584C>T、g8180G>C、g10196A>C]。然而ALDOB在亚洲人群,尤其是中国人群中的突变情况至今依然仅有少数的小样本量报道。

[0003] 糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要微血管并发症,也是终末期肾病的最常见病因及心血管事件的独立危险因素之一。糖尿病患者并发DN的病死率是没有并发DN者的30倍。糖尿病患者由于不能摄取过多葡萄糖,而由于果糖的升糖指数很低,其代谢和葡萄糖不同,不会经受胰岛素的调节,因此果糖在临床上常常被用于糖尿病的预防和控制,具有“糖尿病人的理想甜味剂”之称。然而,目前在亚洲,尤其是中国,给糖尿病患者使用果糖时,没有进行ALDOB突变基因的检测,因而忽视了个体存在的对果糖敏感或不耐受的情况。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一组与糖尿病肾病相关易感基因ALDOB的SNP的应用。

[0005] 本发明的另一目的是提供一组与糖尿病肾病相关易感基因ALDOB的SNP检测引物组合。

[0006] 本发明的又一目的是提供检测与糖尿病肾病相关易感基因的SNP的试剂盒。

[0007] 本发明的目的可通过以下技术方案实现：

[0008] 一组ALDOB基因的SNP作为检测靶点在制备糖尿病患者ALDOB基因突变筛查试剂盒中的应用，所述的ALDOB基因的SNP选自以下SNP位点中的一个或多个：rs118168553，rs146360505，rs1588170400，rs760339672，rs182003715，rs3739721，rs759204107，rs141267935。

[0009] 一组ALDOB基因的SNP作为检测靶点在制备与糖尿病肾病相关易感基因的SNP检测试剂盒中的应用，所述的ALDOB基因的SNP选自以下SNP位点中的一个或多个：rs118168553，rs146360505，rs1588170400，rs760339672，rs182003715，rs3739721，rs759204107，rs141267935。

[0010] 检测本发明所述的ALDOB基因的SNP的试剂在制备糖尿病患者ALDOB基因突变筛查试剂盒中的应用。

[0011] 检测本发明所述的ALDOB基因的SNP的试剂在制备与糖尿病肾病相关易感基因的SNP检测试剂盒中的应用。

[0012] 作为本发明的一种优选，所述的检测ALDOB基因的SNP的试剂选自Taqman方法，DHPLC技术和质谱分析、单链构象多态性分析、等位基因特异的寡聚核苷酸杂交、DNA芯片、微测序、高温连接酶法、SNaPshot法或DNA测序法检测权利要求1中所述的ALDOB基因的SNP的试剂。

[0013] 作为本发明的一种优选，所述的检测所述的ALDOB基因的SNP的试剂为检测ALDOB基因rs118168553，rs146360505，rs1588170400，rs760339672，rs182003715，rs3739721，rs759204107，rs141267935位点中任意一种或多种的PCR引物。

[0014] 作为本发明的进一步优选，所述的PCR引物如下所示：

	位点	S	R
[0015]	rs118168553	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2
	rs146360505	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4
	rs1588170400	SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 6
	rs760339672	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8
	rs182003715	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10
[0016]	rs3739721	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
	rs759204107	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14
	rs141267935	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16

[0017] 一种检测与糖尿病肾病相关易感基因的SNP的试剂盒，包含ALDOB基因rs118168553，rs146360505，rs1588170400，rs760339672，rs182003715，rs3739721，rs759204107，rs141267935位点中任意一种或多种的PCR引物。

[0018] 作为本发明的一种优选，引物序列如下所示：

	位点	S	R
	rs118168553	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2
	rs146360505	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4
	rs1588170400	SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 6
[0019]	rs760339672	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8
	rs182003715	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10
	rs3739721	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
	rs759204107	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14
	rs141267935	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16

[0020] 本发明所述的试剂盒,还包括MgCl₂、PCR Enzym、dNTP Mix

[0021] 一种用于检测糖尿病肾病相关易感基因ALDOB的SNP的引物组合物,选自ALDOB基因rs118168553,rs146360505,rs1588170400,rs760339672,rs182003715,rs3739721,rs759204107,rs141267935位点中任意一种或多种的PCR引物;优选如下所示的引物:

	位点	S	R
[0022]	rs118168553	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2
	rs146360505	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4
	rs1588170400	SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 6
	rs760339672	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8
	rs182003715	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10
	rs3739721	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
[0023]	rs759204107	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14
	rs141267935	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16

[0024] 有益效果:

[0025] 本发明通过对中国人群中的糖尿病患者(10年内没有发生糖尿病肾病)和糖尿病肾病患者进行全基因组测序,发现相比于没有发生糖尿病肾病的糖尿病患者,某些ALDOB突变在糖尿病肾病患者中异常的高。这些在没有发生糖尿病肾病的糖尿病患者和糖尿病肾病患者中差异存在的SNP是本发明首次报道。进一步的体内和体外实验研究表明,这些ALDOB突变可能导致果糖代谢异常,从而引起肾脏损伤,通过检测这些位点的突变,可以预测糖尿病患者罹患糖尿病肾病风险。因此我们认为,对糖尿病患者,特别需要进行ALDOB基因突变的检测。如果糖尿病患者携带了ALDOB基因的某些突变,则该患者在日常生活和临床治疗时

需要特别避免果糖的摄入,以避免由于果糖代谢异常导致的糖尿病肾病。

附图说明

[0026] 图1肾组织冰冻切片免疫荧光结果:与正常肾组织相比,ALDOB蛋白在IIa、IIb、III、IV期糖尿病肾病的肾小球中表达均显著下调。

具体实施方式

[0027] 实施例1

[0028] 1.收集199例糖尿病肾病患者和200例10年内无肾病的糖尿病患者血液样本,提取DNA进行全基因组测序,测序结果表明在199例糖尿病患者中,ALDOB的几个突变位点显著高于无肾病的糖尿病患者。分析表明这些位点可能导致ALDOB表达含量/活性降低,从而不能正常代谢果糖,进一步导致肾脏损伤。

[0029] 表1

variation	position	Amino acid [Codon]	正常	糖尿病	糖肾	
rs118168553	9:104192029:G:C	Intron Variant	N/A	0.003	0.053	0.068
rs146360505	9:104187775:G:A	Coding Sequence Variant	T [ACC] > T [ACA]	0.001	0.000	0.008
rs1588170400	9:104187772:T:G	Coding Sequence Variant	V [GTA] > V [GTC]	0.000	0.000	0.003
[0030] rs760339672	9:104189773:G:A	Coding Sequence Variant	I [ATC] > I [ATT]	0.000	0.000	0.003
rs182003715	9:104192118:G:A	Coding Sequence Variant	H [CAC] > H [CAT]	0.000	0.000	0.003
rs3739721	9:104188842:C:G	Coding Sequence Variant	E [GAG] > Q [CAG]	0.001	0.018	0.040
rs759204107	9:104192135:C:T	Coding Sequence Variant	G [GGT] > S [AGT]	0.000	0.000	0.008
rs141267935	9:104192182:C:T	Coding Sequence Variant	R [CGA] > Q [CAA]	0.000	0.000	0.003

[0031] 实施例2

[0032] 2.1抽取受试者1ml血液利用血液DNA提取试剂盒(例如天根公司血液基因组DNA提取系统(0.1~20ml)(DP319))提取血液DNA;

[0033] 2.2配制0.5 μ M(每个引物)PCR引物混合物,里面包含多重反应里每个SNP位点的S(正向引物)和R(反向引物)(表2)。

[0034] 表2

	variation	S	R
	rs118168553	AGTGTGCTTGGAGTTTGCC	GATCGTGGTGGGAATCAAGGT
	rs146360505	AGAAGGCCTTACCAGGAACA	ACATGCCTGCACCAAGAAGTA
[0035]	rs1588170400	AGAAGGCCTTACCAGGAACA	CATGCCTGCACCAAGAAGTAT
	rs760339672	TCTTTTTCAGCCCAAGGGGA	CGCTATCCAGGAAAACGCCA
	rs182003715	GTTTCTGAACAGCTTTCCTGG	CATCGGGGGTGTGATCCTTT
	rs3739721	TTCAACTAGAATTGGGGCCTT	AGACCATGACCTGGAACACTG
	rs759204107	TCCTTCTGGTAGAGGGTCTCG	TCTGTGGACAGTTCCATCAACC
[0036]	rs141267935	CGATGCTCTGGTTGATGGAA	AAACACTGAAGAGAACCGCC

[0037] 2.3 DNA样本 (体积2 μ l; 浓度10ng/ μ l) 已预载于96孔板。向每个空加入PCR反应液 (反应液组成如表3)。

[0038] 表3: PCR反应体系

	试剂	10ul 中的试剂体积(μ l)
	Water, HPLC grade	5.6
	10X PCR Buffer with 20mM	
	MgCl ₂	1
[0039]	25mM MgCl ₂	0.8
	25mM Dntp Mix	0.2
	0.5 μ M Primer Mix	2
	5U/ μ l PCR Enzyme	0.4
	Total volume	10

[0040] 2.4完成后,用膜把板封好,涡旋震荡2min和离心2分钟,条件为3000rpm。

[0041] 2.5将96孔板放上PCR仪进行以下热循环:

[0042] 95 $^{\circ}$ C, 5min

[0043] 40个循环 (95 $^{\circ}$ C, 30s; 60 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 30s)

[0044] 72 $^{\circ}$ C, 5min

[0045] 4℃,保温

[0046] 2.6将PCR产物进行NGS测序,获得序列信息,判定受试者的ALDOB基因携带的突变。

[0047] 2.7检测结果

[0048] 全基因组检测结果如表4所示:

[0049] 表4

		全基因组测序							
		rs118168553	rs146360505	rs1588170400	rs760339672	rs182003715	rs3739721	rs759204107	rs141267935
		9:104192029	9:104187775	9:104187772	9:104189773	9:104192118	9:104188842	9:104192135	9:104192182
[0050]	样本 1	G	G	T	G	G	C	C	C
	样本 2	C	G	T	G	G	C	C	C
	样本 3	G	A	T	G	G	C	C	C
	样本 4	G	G	G	G	G	C	C	C
	样本 5	G	G	T	A	G	C	C	C
	样本 6	G	G	T	G	A	C	C	C
	样本 7	G	G	T	G	G	G	C	C
	样本 8	G	G	T	G	G	C	T	C
	样本 9	G	G	T	G	G	C	C	T

[0051] NGS检测结果如表5所示:

[0052] 表5

		NGS 测序							
		rs118168553	rs146360505	rs1588170400	rs760339672	rs182003715	rs3739721	rs759204107	rs141267935
		9:104192029	9:104187775	9:104187772	9:104189773	9:104192118	9:104188842	9:104192135	9:104192182
[0053]	样本 1	G	G	T	G	G	C	C	C
	样本 2	C	G	T	G	G	C	C	C
	样本 3	G	A	T	G	G	C	C	C
	样本 4	G	G	G	G	G	C	C	C
	样本 5	G	G	T	A	G	C	C	C
	样本 6	G	G	T	G	A	C	C	C
	样本 7	G	G	T	G	G	G	C	C
	样本 8	G	G	T	G	G	C	T	C
	样本 9	G	G	T	G	G	C	C	T

[0054] 由实验结果表明,我们利用NGS检测的突变结果与全基因组测序检测的突变情况100%吻合。

[0055] 实施例3

[0056] 我们对由于ALDOB突变导致的糖尿病肾病患者的肾脏组织切片进行免疫荧光标记

染色,结果(图1)表明,由于ALDOB基因的突变,导致了ALDOB蛋白表达在糖尿病肾病患者组织中显著降低。

序列表

<110> 连步生物科技(南京)有限公司

<120> 一种用于检测糖尿病肾病相关易感基因ALDOB的SNP的引物组和试剂盒

<160> 16

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

agtgtgcttg gagtttgcc 19

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

gatcgtggtg ggaatcaagg t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

agaaggcctt accaggaaca 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

acatgcctgc accaagaagt a 21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

agaaggcctt accaggaaca 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
catgcctgca ccaagaagta t 21
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
tctttttcag cccaagggga 20
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
cgctatccag gaaaacgcca 20
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
gtttctgaac agctttcct gg 22
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
catcgggggt gtgaccttt 20
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
ttcaactaga attggggcct t 21
<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12
agaccatgac ctggaacact g 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 13
tccttctggt agagggtctc g 21
<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 14
tctgtggaca gttccatcaa cc 22
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 15
cgatgctctg gttgatgaa 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 16
aaacactgaa gagaaccgcc 20

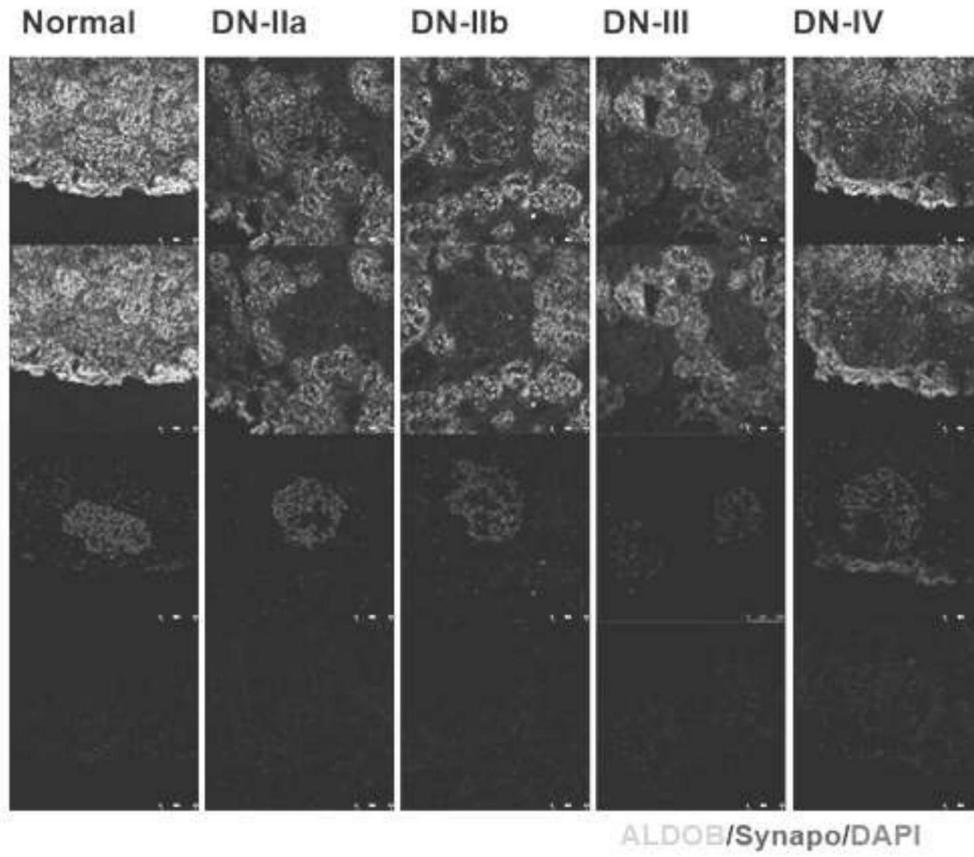


图1