



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103074434 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201310033217. 8

(22) 申请日 2013. 01. 25

(73) 专利权人 海尔施生物医药股份有限公司
地址 315800 浙江省宁波市小港街道前进村
半港河西 159 号

(72) 发明人 南丽 孙婷婷 吴勇

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 27/447(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101434994 A, 2009. 05. 20, 全文.

CN 102719524 A, 2012. 10. 10, 全文.

刘颖等. 基于四引物扩增受阻突变体系 PCR 的多重乳腺癌相关 SNP 位点检测方法的建立. 《中国科学: 生命科学》. 2012, 第 42 卷(第 2 期), 摘要.

李智等. CYP2C9 基因多态性及其功能意义研

究进展. 《中国临床药理学与治疗学》. 2008, 第 13 卷(第 6 期), 全文.

李立青. 运动相关基因单核苷酸多态性和基因表达的研究. 《中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》. 2009, (第 10 期), 全文.

审查员 王斌

权利要求书1页 说明书7页

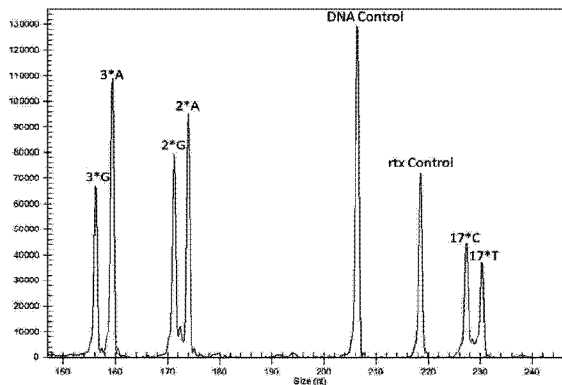
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法, 该试剂盒包括超纯水、X 溶液、10×PCR 缓冲液, PCR 引物、25mM 氯化镁溶液、DNA 聚合酶和阳性对照品, 特点是 PCR 引物包括 CYP2C19 基因上的 3 个 SNP 位点上的不同基因型的正反向扩增引物、DNA 内参的正反向扩增引物及反应内参的正反向扩增引物, 其基因序列如 SEQ IDNO. 1 ~ NO. 13 所示, 其检测包括采集样本并提取核酸的步骤; 以患者核酸为模板进行 PCR 反应的步骤; 最后 GeXP 遗传分析仪毛细电泳分离样品的步骤, 优点是特异性强、灵敏度高、通量高、可靠性强、成本低、无假阴性结果。



1. 一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒,包括超纯水、X 溶液、10× PCR 缓冲液, PCR 引物、25 mM 氯化镁溶液、DNA 聚合酶和阳性对照品,其特征在于所述的 PCR 引物包括以下 CYP2C19 基因上的 3 个 SNP 位点上的不同基因型的正反向扩增引物、DNA 内参的正反向扩增引物及反应内参的正反向扩增引物,其核苷酸序列如下表所示:

基因型/内参	SNP 位点	正向扩增引物	反向扩增引物
rs4244285	2*G	CCAGAGCTTGGCATATTGTATCT	AAGTAATTTGTTATGGGTTCCC
	2*A		CGTAAGTAATTTGTTATGGGTTCTGG
rs4986893	3*G	GATTGTAAGCACCCCTGG	ATGTACTTCAGGGCTTGGTCA
	3*A	GTCGATTGTAAGCACCCCTGAAT	
rs12248560	17*C	TGTGTCTTCTGTTCTCAAAGC	CACGTGAAGGCAGGAATTGT
	17*T	CTATTGTGCTTCTGTTCTCAAAGTAT	
反应内参		CAGACAATCGGCTGCTCTGA	GCTTCAGTGACAACGTCGA
DNA 内参		CCTTATCTTCTCCACAGCT	GACAGCAAGAAAGCGAGCTT

其中,2*G/2*A 表示该 2 号 SNP 位点有两种可能基因型 G 或 A,两条反向引物分别指检测该 SNP 位点相应基因型 G 或基因型 A 的引物,在检测该 SNP 位点时两条引物要同时加到反应液中,3*G/3*A 表示该 3 号 SNP 位点有两种可能基因型 G 或 A;17*C/17*T 表示该 17 号 SNP 位点有两种可能基因型 C 或 T,PCR 反应体系和条件为 DNA 样品 9.3uL,10× PCR 缓冲液 2 uL,25mM 的氯化镁 4 uL,PCR 引物溶液 2 uL,DNA 聚合酶 0.7 uL,X 溶液 2uL 混匀后加入到 96 孔样品板上进行 PCR 反应,反应条件:94℃ 1 分钟;94℃ 30 秒钟,60℃ 30 秒钟,70℃ 1 分钟,循环 35 次;70℃ 1 分钟;4℃ 直至收取 PCR 产物;其中所述的 X 溶液为包括三磷酸脱氧核苷酸和通用引物,所述的通用引物正向扩增引物序列为 AGGTGACACTATAGAATA;反向扩增引物序列为 GTACGACTCACTATAGGA,所述的通用引物正向扩增引物带荧光标记,PCR 引物溶液中各 PCR 引物浓度均为 200Nm。

2. 根据权利要求 1 所述的一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒,其特征在于:所述的阳性对照品为克隆到载体 pMD18-T 上的 7 个 DNA 片段和 1 个质粒 pcDNA 3.1(+),所述的 7 个 DNA 片段分别为包含有 SNP 位点上 rs4244285 的 G 型基因和 A 型基因、rs4986893 的 G 型基因和 A 型基因、rs12248560 的 C 型基因和 T 型基因及人类基因 beta-globin 的片段。

一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及多重基因检测试剂盒及其检测方法,尤其是涉及一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 细胞色素 P450 (CYP)酶系在药物代谢中占有极其重要地位。CYP2C19 (S- 美芬妥英羟化酶)是 CYP 酶系中占主导地位的酶之一,其遗传多态性影响着许多临床药物的代谢,其活性存在明显的个体差异,对不同个体的药物治疗作用和不良反应及药物的毒性产生重要影响。FDA 已将 17 种药物列入医生需要参考病人的 CYP2C19 的基因多态性信息用药。临床上 CYP2C19 基因多态性检测可以为个体化用药提供依据。

[0003] 目前,国内外已有多个 CYP2C19 基因型检测试剂盒,其主导方法为 DNA 微阵列芯片法。基因芯片是通过微加工技术,将数以万计、乃至百万计的特定序列的 DNA 片段(基因探针),有规律地排列固定于硅片、玻片等支持物上,构成的一个二维 DNA 探针阵列,利用这类芯片与标记的生物样品进行杂交,可对样品的基因表达谱生物信息进行快速定性和定量分析。DNA 芯片:由于高通量等优点在 SNP 检测中得到大量应用,依靠野生型与突变型基因杂交动力学的差异对突变位点进行检测。其优点是 1)高通量并行检测;2)操作简便快速:整个检测只需 4-8 小时基本可以出结果。但也存在如下缺点:1)不同 SNP 位点之间的杂交动力学差异不同,在进行多位点同时检测时条件难以控制;2)技术成本昂贵、复杂:每个样品需要一个芯片,成本大于 ¥1000/ 样品,不利于大规模推广;探针的合成与固定比较复杂,特别是制作高密度的探针阵列,是主要的限速步骤;3)重复性差,准确性低,易出现假阳性、假阴性结果;4)灵敏度较低:芯片法需核酸量较大,一般须先做多重 PCR 扩增,由于引物较多,容易自身产生二聚体,发夹结构,或由于 Tm 值不同,而导致扩增目的片段效率不同,进而影响检测的灵敏度;5)由于芯片的种类较多,难以制定一个统一的质量控制标准。

[0004] GenomeLab™GeXP 多重基因表达遗传分析系统基于贝克曼公司成熟的毛细管电泳分离技术及高灵敏度的激光诱导荧光技术研发而成,一束 8 道的毛细管阵列设计充分利用了 96 孔板的排列特性,降低了使用更大的阵列带来的花费和复杂性。采用多重 PCR 方法,通过 Beckman Coulter 染色标记,在同一个 EP 管中同时分析多个基因的的等位基因型,能快速有效地检测基因的表达状况,克服了上述方法存在的缺陷,具有以下优点:

[0005] 1、高通量:本系统采用双(96 孔)板、自动加样和样品追踪技术,实现单个反应检测 30-40 个位点,可同时做 192 个反应(如 192 个患者样品,每个样品检测 30 种腹泻病毒,30 个位点),一天出结果;对于交叉感染患者,本方法可一次性给出准确报告,避免漏检。

[0006] 2、准确性强:GeXP 系统采用毛细管电泳对 PCR 产物进行分离检测,可将非特异性扩增产物、引物二聚体和特异性扩增产物分离,最大程度降低假阳性;

[0007] 3、敏感性高,结果重复性好:GeXP 系统克服了传统 PCR 扩增方法的不均等扩增造成的偏差,提高了对一套目的基因进行定量的速度和敏感性,采用激光诱导荧光 -PMT,具有超高灵敏度;

[0008] 4、方法简便,使用经济:GeXP 提供从试剂、多重 PCR 引物设计、结果及定量表达谱分析等全套实验方案;每个样品的检测成本少于¥50,利于大规模推广;

[0009] 5、精确定量、灵活性强:可精确定量病原体基因拷贝数,可随时根据需求调整检测的靶基因。

[0010] 6、易于实现自动化:就样品制备而言,Biomek 系列自动液体处理仪可以与 GeXP 分析仪和 Ampligrid 扩增仪完全匹配,集成的条形码阅读器保证了准确的样品追踪和结果报告。

[0011] 目前,国内外还没有关于基于 GeXP 多重基因表达遗传分析系统的 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法的相关研究报道。

发明内容

[0012] 本发明所要解决的技术问题是提供一种特异性强、灵敏度高、通量高、可靠性强、成本低、无假阴性结果的基于 GeXP 多重基因表达遗传分析系统的 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法。

[0013] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒,包括超纯水、X 溶液、10×PCR 缓冲液,PCR 引物、25mM 氯化镁溶液、DNA 聚合酶和阳性对照品,其特征在于所述的 PCR 引物包括以下 CYP2C19 基因上的 3 个 SNP 位点上的不同基因型的正反向扩增引物、DNA 内参的正反向扩增引物及反应内参的正反向扩增引物,其基因序列如下表 1 所示:

[0014] 表 1

[0015]

基因型/内参	SNP 位点	正向引物	反向引物
rs4244285	2*G	CCAGAGCTTGGCATATTGTATCT	AAGTAATTTGTTATGGGTCCC
	2*A		CGTAAGTAATTTGTTATGGGTCCCTGG
rs4986893	3*G	GATTGTAAGCACCCCTGG	ATGTACTTCAGGGCTTGGTCA
	3*A	GTCGATTGTAAGCACCCCTGAAT	
rs12248560	17*C	TTGTGCTTCTGTCTCAAAGC	CACGTGAAGGCAGGAATTGT
	17*T	CTATTGTGCTTCTGTCTCAAAGTAT	
反应内参		CAGACAATCGGCTGCTCTGA	GCTTCAGTGACAACGTCGA
DNA 内参		CTCTTATCTTCCTCCACAGCT	GACAGCAAGAAAGCGAGCTT

[0016] 其中,2*G/2*A 表示该 2 号 SNP 位点有两种可能基因型 G 或 A,两条反向引物分别指检测该 SNP 位点相应基因型 G 或基因型 A 的引物,在检测该 SNP 位点时两条引物要同时加到反应液中,3*G/3*A 表示该 3 号 SNP 位点有两种可能基因型 G 或 A;17*C/17*T 表示该 17 号 SNP 位点有两种可能基因型 C 或 T;上述 rs4244285 片段上 2 号 SNP 位点上的 G 型基因和 A 型基因的正向扩增引物均采用基因序列 SEQ ID NO. 1:CCAGAGCTTGGCATATTGTATCT;rs4986893 片段上 3 号 SNP 位点上的 G 型基因和 A 型基因的反向扩增引物均采用基因序列 SEQ ID NO. 6:ATGTACTTCAGGGCTTGGTCA;rs12248560 片段上 17 号 SNP 位点上的 G 型基因和 A 型基因的反向扩增引物均采用基因序列 SEQ ID NO. 9:CACGTGAAGGCAGGAATTGT。

[0017] 包括三磷酸脱氧核苷酸(dNTPs)和通用引物,所述的通用引物正向扩增引物序列

为 AGGTGACACTATAGAATA ;反向扩增引物序列为 GTACGACTCACTATAGGGA,所述的通用引物正向扩增引物带荧光标记。

[0018] 所述的阳性对照品为克隆到载体 pMD18-T 上的 7 个 DNA 片段和 1 个质粒 pcDNA3.1(+),所述的 7 个 DNA 片段分别为包含有 SNP 位点上 rs4244285 的 G 型基因和 A 型基因、rs4986893 的 G 型基因和 A 型基因、rs12248560 的 C 型基因和 T 型基因及人类基因 beta-globin 的片段。

[0019] 一种利用 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒的检测方法,具体包括以下步骤:

[0020] (1) DNA 样品的收集和提取

[0021] 将刮取到口腔上皮细胞的口腔拭子放入 300 μ L DNA 裂解缓冲液中,在恒温混匀仪中于 95 $^{\circ}$ C,1000rpm 的条件下,处理 5 分钟后取出,室温放置至冷却,然后在样品中加入 30 μ L 提取缓冲液,混匀,12000g 离心 5 分钟,得到的上清液即为 PCR 的 DNA 样品模板;

[0022] (2) 以提取的核酸为模板进行 PCR 反应

[0023] 取 DNA 样品 9.3 μ L,10 \times PCR 缓冲液 2 μ L,25mM 的氯化镁 4 μ L,PCR 引物溶液 2 μ L (每条引物的浓度均为 200nM),DNA 聚合酶 0.7 μ L,X 溶液 2 μ L 混匀后加入到 96 孔样品板上进行 PCR 反应,反应条件:94 $^{\circ}$ C1 分钟;94 $^{\circ}$ C30 秒钟,60 $^{\circ}$ C30 秒钟,70 $^{\circ}$ C1 分钟,循环 35 次;70 $^{\circ}$ C1 分钟;4 $^{\circ}$ C 直至收取 PCR 产物;其中所述的 X 溶液为包括三磷酸脱氧核苷酸和通用引物,所述的通用引物正向扩增引物序列为 AGGTGACACTATAGAATA ;反向扩增引物序列为 GTACGACTCACTATAGGGA,所述的通用引物正向扩增引物带荧光标记,PCR 引物溶液中各 PCR 引物浓度均为 200nM ;所述的 PCR 引物包括以下 CYP2C19 基因上的 3 个 SNP 位点上的不同基因型的正反向扩增引物、DNA 内参的正反向扩增引物及反应内参的正反向扩增引物,其基因序列如序列表中 SEQ ID NO.1 ~ NO.13 所示;

[0024] (4) GeXP 遗传分析仪毛细电泳分离样品

[0025] 取 PCR 产物 0.1-1 μ L,GeXP 遗传分析仪配套的上样缓冲液 30 μ L,DNA 标准品 0.2 μ L,矿物油一滴混合均匀后加入到 96 孔分离液板上进行毛细电泳分离样品,将 GeXP 遗传分析仪的软件获得的图谱与标准图谱对比,获得 CYP2C19 基因的 SNP 位点的等位基因型。

[0026] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明是一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法,本试剂盒及检测方法基于多重 PCR 和毛细电泳技术,利用不同长度的 PCR 特异性扩增片段来鉴定区分 SNP 位点的等位基因型,可同步对基因 CYP2C19 的 3 个 SNP 位点进行检测,用于与 CYP2C19 基因多态性有关的药物用量的指导(见表 2),其一天之内可完成 192 个患者样品的检测,既节约了生产成本和检测成本,又提高了检测效率及缩短了时间;DNA 内参基因的使用可用于监测整个反应系统以及评估 DNA 模板的质量,避免假阴性;反应内参的使用可用于监测整个反应系统、PCR 反应的效率,避免假阴性。

[0027] 综上所述,本发明是基于 GeXP 多重基因表达遗传分析系统的 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法,同步对基因 CYP2C19 的 3 个 SNP 位点进行检测,检测敏感性高,特异性好,降低了常规 PCR 扩增的假阳性率,还能够有效解决常规 PCR 的易污染问题;具有非竞争性内对照体系,可靠性强,无假阴性结果,本发明利用美国贝克曼库尔特有限公司的 GeXP 遗传分析系统,该系统具有灵敏度高、特异性强、快速、高通量的技术优势,将为医院及其它医疗机构提供一种灵敏、准确、快速且低成本的 CYP2C19 基因多态性检测方案。

附图说明

[0028] 图 1 为 GeXP 遗传分析仪的毛细电泳分离样品结果标准图谱。

具体实施方式

[0029] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0030] 本发明一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒,该试剂盒中包括以下试剂:

[0031] 1)PCR 引物(PCR Primer Mix)

[0032] 2)25mM 氯化镁(MgCl₂)

[0033] 3)DNA 聚合酶(Taq DNA Polymerase)

[0034] 4)X 溶液(Solution X)

[0035] 5)PCR 缓冲液(PCR Buffer)

[0036] 6) 阳性对照品(Positive Control)

[0037] 上述 PCR 引物包括以下 CYP2C19 基因上的 3 个 SNP 位点上不同基因型的正反向扩增引物、DNA 内参的正反向引物及反应内参的正反向引物,其基因序列如表 1 所示:

[0038] 表 1 CYP2C19 基因多态性检测寡核苷酸序列

[0039]

基因型/内参	SNP 位点	正向引物	反向引物
rs4244285	2*G	CCAGAGCTTGGCATATTGTATCT	AAGTAATTTGTTATGGGFTCCC
	2*A		CGTAAGTAATTTGTTATGGGTCCTGG
rs4986893	3*G	GATTGTAAGCACCCCTGG	ATGTACTTCAGGGCTTGGTCA
	3*A	GTCGATTGTAAGCACCCCTGAAT	
rs12248560	17*C	TTGTGCTTCTGTCTCAAAGC	CACGTGAAGGCAGGAATTGT
	17*T	CTATTGTGCTTCTGTCTCAAAGTAT	
反应内参		CAGACAATCGGCTGCTCTGA	GCTTCAGTGACAACGTCGA
DNA 内参		CTCTTATCTTCCTCCACAGCT	GACAGCAAGAAAGCGAGCTT

[0040] 其中,2*G/2*A 表示该 2 号 SNP 位点有两种可能基因型 G 或 A,两条反向引物分别指检测该 SNP 位点相应基因型 G 或基因型 A 的引物,在检测该 SNP 位点时两条引物要同时加到反应液中,3*G/3*A 表示该 3 号 SNP 位点有两种可能基因型 G 或 A;17*C/17*T 表示该 17 号 SNP 位点有两种可能基因型 C 或 T。上述 rs4244285 片段上 2 号 SNP 位点上的 G 型基因和 A 型基因的正向扩增引物均采用基因序列 SEQ ID NO.1:CCAGAGCTTGGCATATTGTATCT;rs4986893 片段上 3 号 SNP 位点上的 G 型基因和 A 型基因的反向扩增引物均采用基因序列 SEQ ID NO.6:ATGTACTTCAGGGCTTGGTCA;rs12248560 片段上 17 号 SNP 位点上的 G 型基因和 A 型基因的反向扩增引物均采用基因序列 SEQ ID NO.9:CACGTGAAGGCAGGAATTGT。

[0041] 上述试剂盒可同步对 CYP2C19 基因上的 3 个 SNP 位点(3 个 SNP 位点分别为 rs4244285、rs4986893 和 rs12248560)上的不同基因型进行检测,利用不同长度的 PCR 特异性扩增片段来鉴定区分 SNP 位点的等位基因型,用于与 CYP2C19 基因多态性有关的药物用量的指导,不同等位基因型组合及其表现型如表 2 所示:

[0042] 表 2 等位基因型组合及其对应的表现型

[0043]

表现型	等位基因组合示例
UM (Ultrarapid metabolizer) 超快代谢型	*1/*17, *17/*17
EM (Extensive metabolizer) 快代谢型	*1/*1
IM (Intermediate activity) 中代谢型	*1/*2, *1/*3
PM (Poor metabolizer) 弱代谢型	*2/*2, *2/*3, *3/*3

[0044] 其中,代谢越快的表现型对应的用药量越少。

[0045] 上述 X 溶液为三磷酸脱氧核苷酸(dNTPs)和通用引物,所述的通用引物正向扩增引物序列为 AGGTGACACTATAGAATA;反向扩增引物序列为 GTACGACTCACTATAGGGA,所述的通用引物正向扩增引物带荧光标记。

[0046] 上述试剂盒设置一个由质粒构建的阳性对照品,涵盖所有靶标,用于监测 PCR 反应体系和核苷酸引物的质量。该阳性对照品为克隆到载体 pMD18-T 上的 7 个 DNA 片段和 1 个质粒 pcDNA3.1(+),所述的 7 个 DNA 片段分别为包含有 SNP 位点上 rs4244285 的 G 型基因和 A 型基因、rs4986893 的 G 型基因和 A 型基因、rs12248560 的 C 型基因和 T 型基因及人类基因 beta-globin 的片段。

[0047] 上述试剂盒设置了一个针对人 DNA 的内参,用于监测 DNA 样品的质量;同时设置了一个以质粒 pcDNA3.1 为模板的反应内参,用于监测 PCR 反应的正常进行(表 1)。

[0048] 质粒 pcDNA3.1(+) 作为反应内参,质控整个反应。

[0049] 具体实施例二

[0050] 本发明一种 CYP2C19 基因多态性检测方法,具体步骤如下:

[0051] 1、生产基于 GeXP 多重基因表达遗传分析系统的 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒,试剂盒中包括的组分同上述实施例 1;

[0052] 2、DNA 样品的收集和提取

[0053] 将刮取到口腔上皮细胞的口腔拭子放入 300 μ L DNA 裂解缓冲液中,在恒温混匀仪中于 95 $^{\circ}$ C,1000rpm 的条件下,处理 5 分钟后取出,室温放置至冷却,然后在样品中加入 30 μ L 提取缓冲液,混匀,12000g 离心 5 分钟,得到的上清液即为 PCR 的 DNA 样品模板;

[0054] 3、以提取的核酸为模板进行 PCR 反应

[0055] 1) 按以下比例在 96 孔样品板/八连管上加入试剂和样品(PCR 板,见表 3),并设置一个阳性对照反应:

[0056] 表 3 PCR 反应试剂和样品混合比例

[0057]

PCR 反应试剂	量/孔(μ L)
25mM MgCl ₂	4
10 \times PCR 缓冲液	2

PCR 引物	2
X 溶液	2
DNA 聚合酶	0.7
DNA 样品 / 阳性对照品	9.3
Total	20

[0058] 注：上述阳性对照品为克隆到载体 pMD18-T 上的 7 个 DNA 片段和 1 个质粒 pcDNA3.1(+). 这 7 个 DNA 片段分别为包含有 SNP 位点 rs4244285G/A、rs4986893G/A、rs12248560C/T 和人类基因 beta-globin 的片段。质粒 pcDNA3.1(+). 作为反应内参，质控整个反应。X 溶液为三磷酸脱氧核苷酸(dNTPs)和通用引物，所述的通用引物正向扩增引物序列为 AGGTGACACTATAGAATA；反向扩增引物序列为 GTACGACTCACTATAGGGA，所述的通用引物正向扩增引物带荧光标记。

[0059] 2) 混匀后按以下温度进行热循环反应(见表 5)：

[0060] 表 5 PCR 反应条件

[0061]

步骤	温度	时间
1 预变性	94°C	1 分钟
2 变性	94°C	30 秒钟
3 退火	60°C	30 秒钟
4 延伸	70°C	1 分钟
5 最后延伸	70°C	1 分钟
6 保存	4°C	持续：直至收取 PCR 产物

[0062] 4、GeXP 遗传分析仪毛细电泳分离样品

[0063] 1) 制备 GeXP 样品(见表 6)：

[0064] 表 6 GeXP 样品混合比例

[0065]

GeXP 样品	量 / 孔
上样缓冲液(从贝克曼库尔特公司购得, 货号 :608083)	30 μ L
DNA 大小标准 400	0.2 μ L
PCR 产物	0.1-1 μ L

矿物油	1 滴
-----	-----

[0066] 2) 毛细电泳分离样品

[0067] 将 GeXP 样品加入 96 孔毛细管电泳分离板上适当数目的孔中进行毛细管电泳分离;毛细管电泳分离是一类以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力的新型液相分离技术,具体程序为 90℃变性 120 秒,进样电压 2kv,30 秒,分离电压 6kv,35 分钟。

[0068] 5、结果分析(见 GenomeLab GeXP 遗传分析仪说明书)

[0069] 根据 GeXP 遗传分析仪自有软件上默认的参数对结果进行片段大小分析,其横坐标表示片段大小,纵坐标为信号强弱。将 GeXP 遗传分析仪的软件获得的图谱与标准图谱对比,获得 CYP2C19 基因上的 3 个 SNP 位点的等位基因型,用于与 CYP2C19 基因多态性有关的药物用量的指导。标准图谱如图 1 所示,其结果能准确检测出 CYP2C19 基因上的 3 个 SNP 位点基因表达水平,各目标片段大小间隔适中,且信号不至于过饱和,各靶标间信号相对持平,且没有宽峰、双峰等现象。(图谱结果是否如上述描述)

[0070] 具体实施例三

[0071] 检测试剂盒灵敏度、特异性分析

[0072] 灵敏度分析:将阳性对照品按一定拷贝数倍比稀释后,经 PCR 扩增和毛细管电泳检测直至检测不到信号,该拷贝数即为最低检测线,也就是试剂盒的灵敏度。该试剂盒的灵敏度为 50 拷贝。

[0073] 特异性分析:单重 PCR 扩增经毛细管电泳检测为目标片段大小的单峰。

[0074] 上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

[0001]

序 列 表

<110> 海尔施生物医药股份有限公司

<120> 一种 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒及其检测方法

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CYP2C19 基因的 rs4244285 片段上 2 号 SNP 位点 G 型基因的正向扩增引物;
CYP2C19 基因的 rs4244285 片段上 2 号 SNP 位点 A 型基因的正向扩增引物

<400> 1

5' - CCAGAGCTTGGCATATTGTATCT -3'

23

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CYP2C19 基因的 rs4244285 片段上 2 号 SNP 位点 G 型基因的反向扩增引物

<400> 2

5' - AAGTAATTTGTTATGGGTTCCC -3'

22

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0002]

- <223> CYP2C19 基因的 rs4244285 片段上 2 号 SNP 位点 A 型基因的反向扩增引物
 <400> 3
 5' - CGTAAGTAATTTGTTATGGGTTCTGG -3' 27
- <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
- <223> CYP2C19 基因的 rs4986893 片段上 3 号 SNP 位点 G 型基因的正向扩增引物
 <400> 4
 5' - GATTGTAAGCACCCCTGG -3' 19
- <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
- <223> CYP2C19 基因的 rs4986893 片段上 3 号 SNP 位点 A 型基因的正向扩增引物
 <400> 5
 5' - GTCGATTGTAAGCACCCCTGAAT -3' 24
- <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
- <223> CYP2C19 基因的 rs4986893 片段上 3 号 SNP 位点 G 型基因的反向扩增引物;
 CYP2C19 基因的 rs4986893 片段上 3 号 SNP 位点 A 型基因的反向扩增引物
 <400> 6
 5' - ATGTACTTCAGGGCTTGGTCA -3' 21

[0003]

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CYP2C19 基因的 rs12248560 片段上 17 号 SNP 位点 C 型基因的正向扩增引物

<400> 7

5' - TTGTGTCTTCTGTTCTCAAAGC -3'

22

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CYP2C19 基因的 rs12248560 片段上 17 号 SNP 位点 T 型基因的正向扩增引物

<400> 8

5' - CTATTGTGTCTTCTGTTCTCAAAGTAT -3'

27

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CYP2C19 基因的 rs12248560 片段上 17 号 SNP 位点 C 型基因的反向扩增引物;
CYP2C19 基因的 rs12248560 片段上 17 号 SNP 位点 T 型基因的反向扩增引物

<400> 9

5' - CACGTGAAGGCAGGAATTGT -3'

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

[0004]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反应内参正向扩增引物	
<400> 10	
5' - CAGACAATCGGCTGCTCTGA -3'	20
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反应内参反向扩增引物	
<400> 11	
5' - GCTTCAGTGACAACGTCGA -3'	19
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> DNA 内参正向扩增引物	
<400> 12	
5' - CTCTTATCTTCCTCCCACAGCT -3'	22
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> DNA 内参反向扩增引物	
<400> 13	
5' - GACAGCAAGAAAGCGAGCTT -3'	20

[0005]

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通用引物正向扩增引物

<400> 14

5' - AGGTGACACTATAGAATA-3'

18

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通用引物反向扩增引物

<400> 15

5' - GTACGACTCACTATAGGGA-3'

19

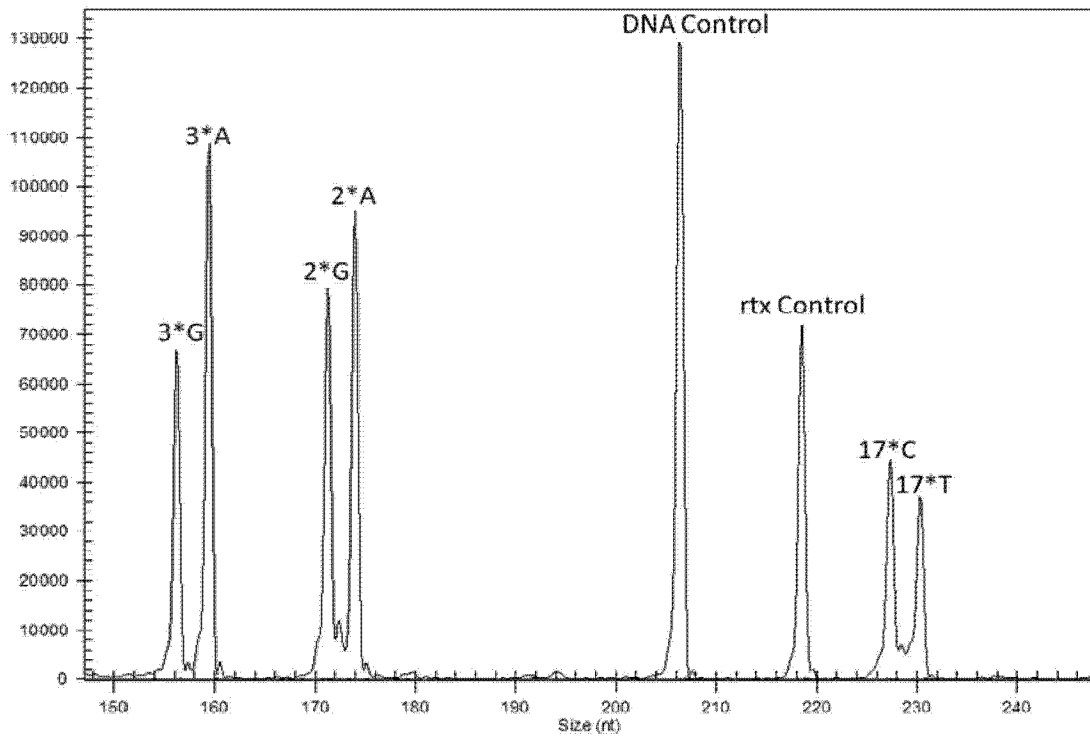


图 1