



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102220434 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 19

(21) 申请号 201110140461. 5

(22) 申请日 2011. 05. 27

(71) 申请人 危梅娟

地址 518000 广东省深圳市南山区前海路星
海名城五期 3 栋 141

(72) 发明人 危梅娟

(74) 专利代理机构 深圳新创友知识产权代理有
限公司 44223

代理人 江耀纯

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

序列表 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条、PCR 引物
及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条,包括基底,以及固定在基底上的突变检测探针,每一条突变检测探针分别对应包含一个非综合征耳聋的基因突变位点,基因突变位点为以下的至少一个:GJB2 基因的 cDNA35、cDNA176-191、cDNA235、cDNA299-300 位点,GJB3 基因的 cDNA538 位点,mtDNA12srRNA 基因的 cDNA1555、cDNA1494 位点,SLC26A4 基因的 cDNA2168、IVS7-2 位点;每一条突变检测探针包含 15-25 个碱基的序列,在序列的中部位置包含其相对应的非综合征耳聋基因的突变碱基。本发明具有准确性高、价格低廉等优点。

35M	•	176-191M	235M	299-300M	538M	1494M
35N	•	176-191N	235N	299-300N	538N	1494N
1555N	•	2168N	IVS7-2N	1555M	2168M	IVS7-2M

1. 一种用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条,其特征在于:包括基底,以及固定在所述基底上的突变检测探针,每一条所述突变检测探针分别对应包含一个非综合征耳聋的基因突变位点,所述非综合征耳聋的基因突变位点为以下位点中的至少一个:GJB2 基因的 cDNA35、cDNA176-191、cDNA235、cDNA299-300 位点,GJB3 基因的 cDNA538 位点, mtDNA 12s rRNA 基因的 cDNA1555、cDNA1494 位点, SLC26A4 基因的 cDNA2168、IVS7-2 位点;每一条所述突变检测探针包含 15-25 个碱基的序列,在所述序列的中部位置包含其相对应的非综合征耳聋基因的突变碱基。

2. 根据权利要求 1 所述的杂交膜条,其特征在于:所述突变检测探针为 SEQ ID NO. 1~SEQ ID NO. 9 中的至少一个序列或其反向互补序列的 DNA。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的杂交膜条,其特征在于:所述基底上还固定有正常对照探针,其与所述突变检测探针固定在所述基底的不同位置上。

4. 根据权利要求 3 所述的杂交膜条,其特征在于:所述正常对照探针为 SEQ ID NO. 10~SEQ ID NO. 18 中的至少一个序列或其反向互补序列的 DNA。

5. 根据权利要求 4 所述的杂交膜条,其特征在于:每一个所述正常对照探针都对应包含一个所述非综合征耳聋的基因突变位点,其中,SEQ ID NO. 10 对应的基因突变位点为 cDNA35, SEQ ID NO. 11 对应的基因突变位点为 cDNA176-191, SEQ ID NO. 12 对应的基因突变位点为 cDNA235, SEQ ID NO. 13 对应的基因突变位点为 cDNA299-300 位点, SEQ ID NO. 14 对应的基因突变位点为 cDNA538, SEQ ID NO. 15 对应的基因突变位点为 cDNA1494, SEQ ID NO. 16 对应的基因突变位点为 cDNA1555, SEQ ID NO. 17 对应的基因突变位点为 cDNA2168, SEQ ID NO. 18 对应的基因突变位点为 IVS7-2。

6. 根据权利要求 5 所述的杂交膜条,其特征在于:所述突变检测探针和 / 或正常对照探针的 3' 或 5' 端带有氨基标记。

7. 一种用于扩增待检样品基因片段的 PCR 引物,其特征在于:所述 PCR 引物扩增权利要求 1 所述的基因突变位点,所述 PCR 引物为以下 5 对中的至少一对:SEQ ID NO. 19 和 SEQ ID NO. 20 ;SEQ ID NO. 21 和 SEQ ID NO. 22 ;SEQ ID NO. 23 和 SEQ ID NO. 24 ;SEQ ID NO. 25 和 SEQ ID NO. 26 ;SEQ ID NO. 27 和 SEQ ID NO. 28 ;其中 SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27 是上游引物;SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28 是下游引物。

8. 根据权利要求 7 所述的 PCR 引物,其特征在于:所述的扩增产物分别包括如下位点:引物 SEQ ID NO. 19 和 SEQ ID NO. 20 扩增 GJB2 基因的 cDNA35、cDNA176-191、cDNA235、cDNA299-300 位点,引物 SEQ ID NO. 21 和 SEQ ID NO. 22 扩增 GJB3 基因的 cDNA538 位点,引物 SEQ ID NO. 23 和 SEQ ID NO. 24 扩增 mtDNA 12S rRNA 基因的 cDNA1555、cDNA1494 位点,引物 SEQ ID NO. 25 和 SEQ ID NO. 26 扩增 SLC26A4 基因的 cDNA2168 位点,引物 SEQ ID NO. 27 和 SEQ ID NO. 28 扩增 SLC26A4 基因的 IVS7-2 位点。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的 PCR 引物,其特征在于:所述上游引物和 / 或下游引物的 5' 端带有生物素或荧光标记。

10. 一种用于诊断非综合征耳聋的试剂盒,其特征在于:包含权利要求 1 所述的用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条,以及含有权利要求 7 所述的用于扩增待检样品基因片段的 PCR 引物的 PCR 反应液。

用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条、PCR 引物及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及到一种用于医学上用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条,本发明还涉及一种用于扩增待检样品基因片段的聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, 缩写词为 PCR)引物;本发明还涉及一种用于诊断非综合征耳聋的试剂盒。

背景技术

[0002] 耳聋是一种最常见的人类感觉系统缺陷,因其病因复杂、发生率高和治疗困难等原因而长久地困扰着广大患者及其周围人群,极大地影响着相互交流和生活质量。重度耳聋在新生儿中发生率高达 1/800~1/1000,全世界将近有七千万人罹患 55 分贝以上的听力减退。

[0003] 造成耳聋有多方面的原因,遗传因素是主要原因。耳聋可以由单一基因突变或不同基因的复合突变引起。也可由环境因素、或基因与环境两者共同作用而致。耳聋可分综合征型和非综合征型,伴随有其他组织器官的病变的耳聋属于综合征型听力缺损(syndromic hearing impairment, SHI),不伴有其他症状的耳聋属于非综合征型听力缺损(nonyndromic hearing impairment, NSHI)。而 70%的遗传性耳聋表现为非综合征耳聋(即除耳聋外不伴有其他症状和体征)。至 2011 年 1 月 1 日止,与非综合征耳聋相关的 25 个常染色体隐性基因、36 个常染色体显性基因、2 个 X 连锁基因已被克隆,而每个基因中又散在数目众多的耳聋突变位点,因而具有较高的基因和位点遗传异质性。最近,在国内开展的大规模耳聋分子流行病学研究表明,相当一部分非综合征耳聋仅由为数不多的几个基因突变引起,如 GJB2、SLC26A4, mtDNA 12s rRNA 及 GJB3 等,这为我们大规模开展耳聋基因筛查及诊断提供了理论依据。

[0004] 目前,传统基因诊断方法包括酶切,限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP),直接测序等,这些方法或者不能定性,或者耗时费力、所需设备和耗材昂贵,更重要的是这些方法难以同时对不同基因的多个突变位点进行检测。而基因芯片法虽然能同时对不同基因位点进行检测,但它所需设备和耗材昂贵,不适用于在临床大规模推广,应用受到限制。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是:弥补上述现有技术的不足,提出一种用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条、一种用于扩增待检样品基因片段的 PCR 引物,以及一种用于诊断非综合征耳聋的试剂盒;本发明具有高通量、高效率、价格低廉、使用方便等优点,有利于实现临床快速检测 and 大规模人群筛查。

[0006] 本发明的一种用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条采用以下的技术方案:

所述用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条,其特征在于:包括基底,以及固定在所述基底上的突变检测探针,每一条所述突变检测探针分别对应包含一个非综合征耳聋的基因突变位点,所述非综合征耳聋的基因突变位点为以下位点中的至少一个:GJB2 基因的 cDNA35、

cDNA176-191、cDNA235、cDNA299-300 位点, GJB3 基因的 cDNA538 位点, mtDNA 12s rRNA 基因的 cDNA1555、cDNA1494 位点, SLC26A4 基因的 cDNA2168、IVS7-2 位点; 每一条所述突变检测探针包含 15-25 个碱基的序列, 在所述序列的中部位置包含其相对应的非综合征耳聋基因的突变碱基。

[0007] 优选的, 所述突变检测探针为 SEQ ID NO. 1~ SEQ ID NO. 9 中的至少一个序列或其反向互补序列的 DNA。

[0008] 优选的, 所述基底上还固定有正常对照探针, 其与所述突变检测探针固定在所述基底的不同位置上。

[0009] 优选的, 所述正常对照探针为 SEQ ID NO. 10~ SEQ ID NO. 18 中的至少一个序列或其反向互补序列的 DNA。

[0010] 优选的, 每一个所述正常对照探针都对应包含一个所述非综合征耳聋的基因突变位点, 其中, SEQ ID NO. 10 对应的基因突变位点为 cDNA35, SEQ ID NO. 11 对应的基因突变位点为 cDNA176-191, SEQ ID NO. 12 对应的基因突变位点为 cDNA235, SEQ ID NO. 13 对应的基因突变位点为 cDNA299-300 位点, SEQ ID NO. 14 对应的基因突变位点为 cDNA538, SEQ ID NO. 15 对应的基因突变位点为 cDNA1494, SEQ ID NO. 16 对应的基因突变位点为 cDNA1555, SEQ ID NO. 17 对应的基因突变位点为 cDNA2168, SEQ ID NO. 18 对应的基因突变位点为 IVS7-2。

[0011] 优选的, 所述突变检测探针和 / 或正常对照探针的 3' 或 5' 端带有氨基标记。

[0012] 本发明的一种用于扩增待检样品基因片段的 PCR 引物采用以下的技术方案:

所述用于扩增待检样品基因片段的 PCR 引物扩增权利要求 1 所述的基因突变位点, 所述 PCR 引物为以下 5 对中的至少一对: SEQ ID NO. 19 和 SEQ ID NO. 20; SEQ ID NO. 21 和 SEQ ID NO. 22; SEQ ID NO. 23 和 SEQ ID NO. 24; SEQ ID NO. 25 和 SEQ ID NO. 26; SEQ ID NO. 27 和 SEQ ID NO. 28; 其中 SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27 是上游引物; SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28 是下游引物。

[0013] 优选的, 所述的扩增产物分别包括如下位点: 引物 SEQ ID NO. 19 和 SEQ ID NO. 20 扩增 GJB2 基因的 cDNA35、cDNA176-191、cDNA235、cDNA299-300 位点, 引物 SEQ ID NO. 21 和 SEQ ID NO. 22 扩增 GJB3 基因的 cDNA538 位点, 引物 SEQ ID NO. 23 和 SEQ ID NO. 24 扩增 mtDNA 12S rRNA 基因的 cDNA1555、cDNA1494 位点, 引物 SEQ ID NO. 25 和 SEQ ID NO. 26 扩增 SLC26A4 基因的 cDNA2168 位点, 引物 SEQ ID NO. 27 和 SEQ ID NO. 28 扩增 SLC26A4 基因的 IVS7-2 位点。

[0014] 优选的, 所述上游引物和 / 或下游引物的 5' 端带有生物素或荧光标记。

[0015] 本发明的一种用于诊断非综合征耳聋的试剂盒采用以下的技术方案:

所述用于诊断非综合征耳聋的试剂盒, 包含上述的用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条, 以及含有上述用于扩增待检样品基因片段的 PCR 引物的 PCR 反应液。

[0016] 本发明与现有技术对比的有益效果是: 本发明是基于 PCR-膜条杂交技术的基因检测方法, 由于固定在基底上的突变检测探针的大致中间位置包含有非综合征耳聋的基因突变位点, 通过 PCR 加膜条杂交技术能直接对待检者的基因型进行确诊, 对正常、突变杂合子、突变纯合子等很容易判断, 具有高通量、高效率、价格低廉、使用方便等优点。

附图说明

[0017] 图 1 是本发明实施例的未检出非综合征耳聋基因突变样品结果示例,其基因型为 :N/N ;

图 2 是本发明实施例的非综合征耳聋基因突变杂合子样品结果示例,其基因型为 :35M/N ;

图 3 是本发明实施例的非综合征耳聋基因突变纯合子样品结果示例,其基因型为 :35M/35M ;

图 4 是本发明实施例的非综合征耳聋基因双重突变杂合子样品结果示例,其基因型为 :35M/235M。

具体实施方式

[0018] 下面对照附图和结合优选具体实施方式对本发明进行详细的阐述。

[0019] 1、杂交膜条的制备

1.1、9 条突变检测探针和 9 条正常对照探针的制备

按照表 1 和表 2 中的序列合成 18 条探针,突变检测探针和 / 或正常对照探针的 3' 或 5' 端带氨基标记,合成的方法为现有的常规的 DNA 合成法。

[0020] 表 1 :

突变检测探针的 DNA 序列		
序列编号	突变检测探针名称	序列
SEQ ID NO.1	35M	5'-CGATCCTGGGGGTGTGA-3'
SEQ ID NO.2	176-191M	5'-CCTGCAGCCAGCTACGATCAC-3'
SEQ ID NO.3	235M	5'-CTAIGGGCCTGCAGCTG-3'
SEQ ID NO.4	299-300M	5'-CTACCGGAGACGAGAAGAAGA-3'
SEQ ID NO.5	538M	5'-CTACATTGCCTGACCTACCG-3'
SEQ ID NO.6	1494M	5'-CCGTCACCCTTCTCAAGTATAC-3'
SEQ ID NO.7	1555M	5'-TAGAGGAGGCAAGTCGTAACA-3'
SEQ ID NO.8	2168M	5'-TGACGGTCCGTGATGCTA-3'
SEQ ID NO.9	IVS7-2M	5'-TTATTTCGGACGATAATTGCT-3'

表 2 :

正常对照探针的 DNA 序列		
序列编号	探针名称	序列
SEQ ID NO.10	35N	5'-GATCCTGGGGGGTGTGA-3'
SEQ ID NO.11	176-191N	5'-CAGGCTGCAAGAACGTGTGCTAC-3'
SEQ ID NO.12	235N	5'-CTATGGGCCCTGCAGCT-3'
SEQ ID NO.13	299-300N	5'-CTACCGGAGACATGAGAAGAAG-3'
SEQ ID NO.14	538N	5'-CTACATTGCCCGACCTACC-3'
SEQ ID NO.15	1494N	5'-CCGTCACCCTCCTCAAGTAT-3'
SEQ ID NO.16	1555N	5'-GAGGAGACAAGTCGTAACATGG-3'
SEQ ID NO.17	2168N	5'-TGACGGTCCATGATGCTATAC-3'
SEQ ID NO.18	IVS7-2N	5'-GTTTTATTTTCAGACGATAATTGCT-3'

注：“M”代表突变检测探针，“N”代表正常对照探针。

[0021] 每一条所述突变检测探针分别对应包含一个非综合征耳聋的基因突变位点，非综合征耳聋的基因突变位点为以下位点：GJB2 基因的 cDNA35、cDNA176-191、cDNA235、cDNA299-300 位点，GJB3 基因的 cDNA538 位点，mtDNA 12s rRNA 基因的 cDNA1555、cDNA1494 位点，SLC26A4 基因的 cDNA2168、IVS7-2 位点，每一条突变检测探针包含 15-25 个碱基的序列，在序列的中部位置包含其相对应的非综合征耳聋基因的突变碱基。

[0022] 每一个正常对照探针都对应包含一个非综合征耳聋的基因突变位点，其中，SEQ ID NO. 10 对应的基因突变位点为 cDNA35，SEQ ID NO. 11 对应的基因突变位点为 cDNA176-191，SEQ ID NO. 12 对应的基因突变位点为 cDNA235，SEQ ID NO. 13 对应的基因突变位点为 cDNA299-300 位点，SEQ ID NO. 14 对应的基因突变位点为 cDNA538，SEQ ID NO. 15 对应的基因突变位点为 cDNA1494，SEQ ID NO. 16 对应的基因突变位点为 cDNA1555，SEQ ID NO. 17 对应的基因突变位点为 cDNA2168，SEQ ID NO. 18 对应的基因突变位点为 IVS7-2。

[0023] 1.2、杂交膜条的制备

a. 用打印机在基底（本实施例中为尼龙膜）上打印位点阵列，并标明相应位点的探针名称，正常对照探针与突变检测探针固定在基底的不同位置上；

b. 用 5% 的 EDAC 溶液泡膜 30 分钟，以活化尼龙膜表面的羧基；

c. 分别用探针稀释液（10mmol/L Tris, pH8.0）将 18 条探针稀释至 5 μmol/L；

d. 按尼龙膜条上打印的位点阵列，将 18 条探针按探针名称对应分别点加在尼龙膜相应位点上，探针上的氨基与尼龙膜表面的羧基发生交联反应；

e. 待尼龙膜条干燥后，用 0.1mol/L 的 NaOH 泡膜 5 分钟，以封闭尼龙膜表面未反应的羧基；

f. 用纯水洗涤尼龙膜，干燥后备用。

[0024] 表 3：尼龙膜条上的探针阵列如下：

35M	176-191M	235M	299-300M	538M	1494M
35N	176-191N	235N	299-300N	538N	1494N
1555N	2168N	IVS7-2N	1555M	2168M	IVS7-2M

注：“M”代表突变检测探针，“N”代表正常对照探针。

[0025] 2、PCR 引物扩增

根据本项目待检的 9 个突变位点的位置关系,设计了 5 对引物分别进行扩增,如表 4 所示,其中 SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 23、SEQ ID NO. 25、SEQ ID NO. 27 是上游引物,分别简称为 HL1F、HL2F、HL3F、HL4F、HL5F;SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28 是下游引物,分别简称为 HL1R、HL2R、HL3R、HL4R、HL5R;该表中,引物 HL1F 和 HL1R 扩增 GJB2 基因的 cDNA35、cDNA176-191、cDNA235、cDNA299-300 位点,引物 HL2F 和 HL2R 扩增 GJB3 基因的 cDNA538 位点,引物 HL3F 和 HL3R 扩增 mtDNA 12S rRNA 基因的 cDNA1555、cDNA1494 位点,引物 HL4F 和 HL4R 扩增 SLC26A4 基因的 cDNA2168 位点,引物 HL5F 和 HL5R 扩增 SLC26A4 基因的 IVS7-2 位点,如表 4 所示:

表 4:

上游引物	下游引物	扩增基因	包含的检测位点的突变类型
HL1F	HL1R	GJB2	35delG、176-191del16、235delC、299-300delAT
HL2F	HL2R	GJB3	538C>T
HL3F	HL3R	mtDNA 12S rRNA	1555A>G、1494C>T
HL4F	HL4R	SLC26A4	2168A>G
HL5F	HL5R	SLC26A4	IVS7-2A>G

上游引物和 / 或下游引物的 5' 端带有生物素或荧光素(如 Cy3、Cy5 等)标记。本发明实施例为对下游引物(HL1R、HL2R、HL3R、HL4R、HL5R)进行生物素标记,其 PCR 扩增后的产物可与本发明实施例中的探针杂交,PCR 引物的 DNA 序列如表 5 所示。

[0026] 表 5:

PCR 引物的 DNA 序列		
序列编号	PCR 引物名称	序列 (5'-3')
SEQ ID NO.19	HL1F	AGAGCAAACCGCCCAGAGTAGAA
SEQ ID NO.20	HL1R	GAAGATGACCCGGAAGAAGATGCT
SEQ ID NO.21	HL2F	GCCCCCTGCCCAACATCGTG
SEQ ID NO.22	HL2R	GTGGCAGCGGCAGGTGGAAGC
SEQ ID NO.23	HL3F	TTAAGGGTCGAAGGTGGATTAG
SEQ ID NO.24	HL3R	TGGTTTGGCTAAGGTTGTCTGGTA
SEQ ID NO.25	HL4F	AATGCGGGTTCCTTGACGACA
SEQ ID NO.26	HL4R	AAATGGAACCTTGACCCTCTTGA
SEQ ID NO.27	HL5F	CAGCATTATTGGTTGACA
SEQ ID NO.28	HL5R	CCCTTGGGATGGATTTA

2. 1、提取模板 DNA :使用其它商业化试剂盒从病人的血液中提取模板 DNA。

[0027] 2. 2、合成 10 条引物 :合成的方法为现有的常规的 DNA 合成法。

[0028] 2. 3、配制 PCR 反应液 :配制成 25 μ L/ 人份的 PCR 反应液,每人份的 PCR 反应液中各成份及浓度分别为 :10 条引物浓度分别为 0. 2 μ mol/L、Taq 酶为 0. 1U/ μ L、1 \times PCR Buffer、MgCl₂ 为 1. 5mmol/L、dNTP 为 0. 2mmol/L、模板 DNA 1~10ng/ μ L 。

[0029] 2. 4、PCR 扩增 :PCR 扩增的反应程序为 :95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟 ;95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,55 $^{\circ}$ C 复性 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 秒,循环 35 次 ;72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 分钟。PCR 扩增后的产物包含待测病人的 DNA 片段。

[0030] 3、杂交及显色

3. 1. 杂交

将 PCR 扩增后的产物与步骤 1. 2 中的尼龙膜条加入到 12mL 的杂交液(2 \times SSC、0. 1%SDS, pH7. 4) 中,在杂交箱中 42 $^{\circ}$ C 杂交 2~4 小时以上。

[0031] 3. 2. 洗膜

将尼龙膜条转移到预热至 42 $^{\circ}$ C 的洗液(0. 5 \times SSC、0. 1%SDS, pH7. 4) 中,于 42 $^{\circ}$ C 洗涤 15 分钟。

[0032] c. 过氧化物酶(Peroxidase, 缩写词为 POD) 孵育

将膜条放入新鲜配制的 0. 25U/mL 的链霉亲合素 -POD (streptin-POD) 溶液中,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟,使链霉亲合素与 PCR 产物中的生物素结合,POD 连接到 PCR 产物上,洗去多余的 streptin-POD。

[0033] d. 显色

现配显色液(0. 1mol/L 柠檬酸钠、0. 1mg/mL TMB、0. 0015% H₂O₂),将膜条放入显色液中避光显色 15 分钟,有杂交产物的膜条相应探针位置处会显蓝色斑点。

[0034] 4、结果判断

如图 1-4 所示,膜条的显色结果,通过肉眼判断,以各位点显色信号的有无来判断待检

样品是否存在基因突变,以及是突变纯合子还是杂合子。若尼龙膜条上所有正常对照探针对应的位置显色,所有突变检测探针对应的位置都不显色,则可判断为该检测样品未检出突变,基因型简写为 N/N (如图 1)。若有一个突变检测探针对应的位置显色,且所有的正常对照探针对应的位置都显色,则该样品可判断为突变杂合子,基因型简写为 M/N,并在 M 前加上发生突变的位点(如图 2)。若有一个突变检测探针对应的位置显色,且其相对应的正常对照探针对应的位置不显色,则该样品可判断为突变纯合子,基因型简写为 M/M,并在两个 M 前都加上发生突变的位点(如图 3)。若有两个突变检测探针对应的位置显色,且其相对应的两个正常对照探针对应的位置也都显色,则该样品可判断为双重突变杂合子,基因型简写为 M/M,并在两个 M 前分别加上两个突变位点(不分先后)(如图 4)。

[0035] 本发明实施例中的以上所述 4 种情况为绝大多数病例可能出现的情况,若结果超出上述 4 种情况,在确认实验操作无误的情况下,应每个病例具体分析结果。

[0036] 针对中国人中最常见的 9 种遗传性非综合征耳聋基因突变类型,通过将含有 9 种遗传性非综合征耳聋基因突变位点的突变检测探针固定在膜条上,与待检者相应 DNA 片段的 PCR 产物杂交,可同时检测导致遗传性非综合征耳聋的 35delG、176-191del16、235delC、299-300delAT、538C>T、1555A>G、1494C>T、2168A>G、IVS7-2A>G 这 9 种突变类型。本发明是基于 PCR-膜条杂交技术的基因检测方法,能直接对待检者的基因型进行确诊,具有准确性高、特异性强,能检出基因隐性携带者等优点。因此,应在婚检或孕检中使用该方法对准父母进行基因检测,然后根据情况,必要时对胎儿进行产前检测,这样就可以大大减少遗传性非综合征耳聋患儿的出生。

[0037] 本发明是基于 PCR-反向点杂交技术的基因检测方法,能直接对待检者的基因型进行确诊,具有准确性高、特异性强,能检出基因隐性携带者等优点。用本方法进行检测不需要贵重的专用仪器,只需要 PCR 实验室常规的设备即可,适用于在国内医院大范围推广使用。

[0038] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,做出若干等同替代或明显变型,而且性能或用途相同,都应当视为属于本发明的保护范围。

序列表

<110> 危梅娟

<120> 用于诊断非综合征耳聋的杂交膜条、PCR 引物及试剂盒

<130> 1110067JYC

<160> 28

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

cgatcctggg ggtgtga 17

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

Cctgcagcca gctacgatca c 21

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

Ctatggcct gcagctg 17

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4
ctaccggaga cgagaagaag a 21

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 5
ctacattgcc tgacctaccg 20

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 6
ccgtcacctt tctcaagtat ac 22

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 7
tagaggaggc aagtcgtaac a 21

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 8
tgacggtccg tgatgcta 18

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

ttatttcgga cgataattgc t 21

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

gacacctgggg ggtgtga 17

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

caggctgcaa gaacgtgtgc tac 23

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

ctatgggccc tgcagct 17

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13
ctaccggaga catgagaaga ag 22

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 14
ctacattgcc cgacctacc 19

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 15
ccgtcacct cctcaagtat 20

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 16
gaggagacaa gtcgtaacat gg 22

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 17
tgacggtcca tgatgctata c 21

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 18
gttttatttc agacgataat tgct 24

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 19
agagcaaacc gccagagta gaa 23

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 20
gaagatgacc cggaagaaga tgct 24

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 21
gccccctgcc ccaacatcgt g 21

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 22
gtggcagcgg caggtggaag c 21

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 23

ttaagggtcg aaggtggatt tag 23

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 24

tggtttggct aaggttgtct ggta 24

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 25

aatgcgggtt ctttgacgac a 21

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 26

aaatggaacc ttgaccctct tga 23

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 27
cagcattatt tggttgaca 19

<210> 28
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 28
cccttgggat ggattta 17

35M	176-191M	235M	299-300M	538M	1494M
35N ●	176-191N ●	235N ●	299-300N ●	538N ●	1494N ●
1555N ●	2168N ●	IVS7-2N ●	1555M	2168M	IVS7-2M

图 1

35M ●	176-191M	235M	299-300M	538M	1494M
35N ●	176-191N ●	235N ●	299-300N ●	538N ●	1494N ●
1555N ●	2168N ●	IVS7-2N ●	1555M	2168M	IVS7-2M

图 2

35M ●	176-191M	235M	299-300M	538M	1494M
35N	176-191N ●	235N ●	299-300N ●	538N ●	1494N ●
1555N ●	2168N ●	IVS7-2N ●	1555M	2168M	IVS7-2M

图 3

35M ●	176-191M	235M ●	299-300M	538M	1494M
35N ●	176-191N ●	235N ●	299-300N ●	538N ●	1494N ●
1555N ●	2168N ●	IVS7-2N ●	1555M	2168M	IVS7-2M

图 4