



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105441558 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201511008844. 1

(22) 申请日 2015. 12. 29

(71) 申请人 上海赛安生物医药科技有限公司
地址 200436 上海市宝山区沪太路 1888 号
文盛楼 1 楼

(72) 发明人 赵新泰 王明 徐明

(74) 专利代理机构 上海海颂知识产权代理事务
所(普通合伙) 31258

代理人 任益

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

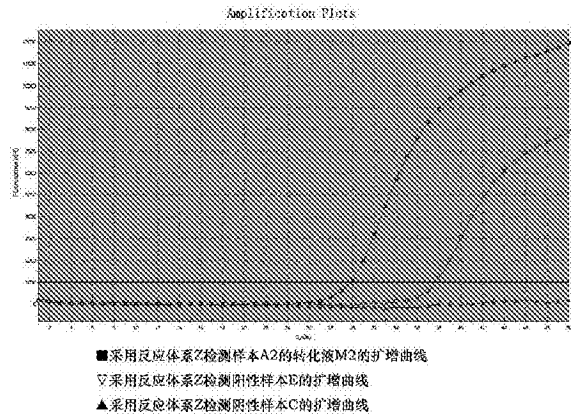
权利要求书2页 说明书11页
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

MGMT 基因甲基化检测引物探针体系及其试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种 MGMT 基因甲基化检测引物探针体系及其试剂盒,包括用于判定基因组 DNA 质量的引物探针组 X、用于判定甲基化转化率的引物探针组 Y 和用于检测 MGMT 基因启动子甲基化情况的引物探针组 Z;引物探针组 X 包括正向引物 a、反向引物 a 和探针 a;引物探针组 Y 包括正向引物 b、反向引物 b 和探针 b;引物探针组 Z 包括正向引物 b、反向引物 b、探针 c 和探针 d;探针 a、探针 b 和探针 c 的 5' 端设有报告荧光基团,探针 a、探针 b、探针 c 和探针 d 的 3' 端设有淬灭荧光基团。本发明的试剂盒实施方案简洁,灵敏度高,准确率高。



1. 一种MGMT基因甲基化检测引物探针,其特征在于:包括用于判定基因组DNA质量的引物探针组X、用于判定甲基化转化率的引物探针组Y和用于检测MGMT基因启动子甲基化情况的引物探针组Z;

所述引物探针组X包括正向引物a、反向引物a和探针a;

所述引物探针组Y包括正向引物b、反向引物b和探针b;

所述引物探针组Z包括正向引物b、反向引物b、探针c和探针d;

所述正向引物a的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示;

所述反向引物a的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示;

所述探针a的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示;

所述正向引物b的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示;

所述反向引物b的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示;

所述探针b的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示;

所述探针c的核苷酸序列如SEQ ID No.7所示;

所述探针d的核苷酸序列如SEQ ID No.8所示;

所述探针a、探针b和探针c的5'端设有报告荧光基团,所述探针a、探针b、探针c和探针d的3'端设有淬灭荧光基团。

2. 根据权利要求1所述的MGMT基因甲基化检测引物探针,其特征在于:各引物应用于PCR反应中的终浓度为0.4 μ M;各探针应用于PCR反应中的终浓度为0.2 μ M。

3. 根据权利要求1或2所述的MGMT基因甲基化检测引物探针,其特征在于:所述探针a、探针b和探针c的5'端设有相互区别的报告荧光基团。

4. 根据权利要求3所述的MGMT基因甲基化检测引物探针,其特征在于:所述相互区别的报告荧光基团有三种,第一种是FAM,第二种是HEX、VIC、TET或Cy3,第三种是Cy5或ROX;所述淬灭荧光基团是BHQ1。

5. 一种采用如权利要求1所述的引物探针的MGMT基因甲基化检测试剂盒。

6. 一种MGMT基因甲基化检测体系,其特征在于:包括用于判定基因组DNA质量的反应体系X、用于判定甲基化转化率的反应体系Y和用于检测MGMT基因启动子甲基化情况的反应体系Z;

所述反应体系X包括正向引物a、反向引物a、探针a、PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂和纯水;

所述反应体系Y包括正向引物b、反向引物b和探针b、PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂和纯水;

所述反应体系Z包括正向引物b、反向引物b、探针c、探针d、PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂和纯水;

所述正向引物a的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示;

所述反向引物a的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示;

所述探针a的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示;

所述正向引物b的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示;

所述反向引物b的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示;

所述探针b的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示;

所述探针c的核苷酸序列如SEQ ID No.7所示;

所述探针d的核苷酸序列如SEQ ID No.8所示;

所述探针a、探针b和探针c的5'端设有报告荧光基团,所述探针a、探针b、探针c和探针d的3'端设有淬灭荧光基团。

7. 根据权利要求6所述的MGMT基因甲基化检测体系,其特征在于:各反应体系的组分中包括十倍浓度的PCR缓冲液1体积,2mM的dNTPs试剂1体积,15mM的MgCl₂溶液1体积,4μM的正向引物1体积,4μM的反向引物1体积,4μM的探针0.5体积,5U/μl的热启动Taq聚合酶0.2体积,其余为纯水;所述PCR缓冲液包括100mM的Tris-HCl和500mM的KCl;所述dNTPs试剂包括dATP、dGTP、dCTP和dTTP。

8. 根据权利要求7所述的MGMT基因甲基化检测体系,其特征在于:各反应体系的组分中还包括DNA模板;所述DNA模板的用量为0.5体积,所述DNA模板的使用浓度为10~50ng/μl。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的MGMT基因甲基化检测体系,其特征在于:所述探针a、探针b和探针c的5'端设有相互区分的报告荧光基团;所述相互区分的报告荧光基团有三种,第一种是FAM,第二种是HEX、VIC、TET或Cy3,第三种是Cy5或ROX;所述淬灭荧光基团是BHQ1。

10. 一种采用如权利要求6所述的检测体系的MGMT基因甲基化检测试剂盒。

MGMT基因甲基化检测引物探针体系及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基因突变的检测产品以及该产品所用到的检测引物和检测体系，属于生物技术领域。

背景技术

[0002] O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)是一种DNA修复酶,是人类细胞中唯一的能去除DNA上鸟嘌呤O⁶位点上致细胞毒性和突变的烷化剂加合物,使损伤的鸟嘌呤恢复,从而能够保护细胞免受抗烷化基团的损害。启动子甲基化是MGMT基因最常见的异常,与MGMT蛋白的表达密切相关,导致该基因转录停止,蛋白表达减少。

[0003] 有研究显示在胶质瘤中MGMT基因启动子甲基化发生率越高,MGMT含量越低,肿瘤恶性程度就越高。MGMT基因启动子甲基化还可用于临床上评估不同胶质瘤患者烷化剂化学治疗疗效。在恶性胶质母细胞瘤中,MGMT启动子甲基化作为预测因子预测烷化剂如替莫唑胺(TMZ)治疗的获益已得到验证,加拿大国家癌症研究所(NCIC)和欧洲癌症研究和治疗组织(EORTC)研究表明MGMT基因启动子甲基化的神经母细胞瘤患者接受替莫唑胺治疗后存活时间显著延长。MGMT基因甲基化是胶质瘤化疗效果好的因素之一,检测胶质瘤病人血清中MGMT基因启动子甲基化状态可用来预测病人的预后及制定个体化的化疗方案,这将在提高化疗疗效,改善病人预后方面有着十分重要的意义。研究也显示结直肠癌生成期间的MGMT表观遗传沉默与CpG岛在其启动子高甲基化有关;此转录后基因沉默造成的结果是O⁶-烷基鸟嘌呤加合物的DNA修复被削弱,并且对烷化剂尤其是达卡巴嗪和其口服前药替莫唑胺的化疗敏感性增加。另外,骨肉瘤MGMT基因甲基化状态与化疗疗效明显负相关,MGMT基因启动子甲基化状态在判断骨肉瘤患者化疗疗效中具有重要意义。

[0004] 目前,检测甲基化的方法包括:1、甲基化敏感的限制性内切酶(Methylation-sensitive restriction Endonuclease,MS-RE)法。但识别的CG序列因酶的识别位点有限故有局限性,且存在酶不完全消化引起的假阳性问题;2、甲基化特异性PCR法(Methylation-specific PCR,MSP),是目前较为常见的检测基因甲基化的方法。MSP法的原理是首先用亚硫酸盐修饰处理基因组DNA,所有未发生甲基化的胞嘧啶都被转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不变。设计针对甲基化和非甲基化序列的引物并进行PCR扩增,最后通过琼脂糖凝胶电泳分析,确定与引物互补的DNA序列的甲基化状态。但是该方法对引物设计要求非常高,一般会因为亚硫酸盐过度的处理,使得模板很难扩增出来。MSP法目前多结合巢式PCR法。巢式PCR是一种变异的聚合酶链反应(PCR),使用两对PCR引物扩增。第一对PCR引物扩增片段和普通PCR相似;第二对引物称为巢式引物(因为他们在第一次PCR扩增片段的内部)结合在第一次PCR产物内部,使得第二次PCR扩增片段短于第一次扩增。巢式PCR的好处在于,如果第一次扩增产生了错误片断,则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。因此,巢式PCR的扩增非常特异。MSP法结合巢式PCR扩增的方法是设计针对没有变化的模板的一组引物;针对变化了的模板的一组引物;看哪组引物能扩增出来从而

判断模板有没有变化,如果模板没变化,就表示模板被甲基化了。MSP法结合巢式PCR扩增的方法能提高单一MSP法的特异性,但操作时间长,且相比MSP法同样存在重亚硫酸盐处理不完全导致的假阳性修饰过程中的pH值要绝对准确、所有试剂要求新鲜配置,并且需要反复摸索找出合适的反应时间,造成整个检测过程繁琐,且不能做到定量检测,存在较高的假阳性率;也存在亚硫酸盐处理过度,造成扩增困难的情况;3、甲基化敏感性解链曲线分析法(MS-High Resolution Melting Curve,MS-HRM),操作繁琐,假阳性率高,且不适于大量样本的检测;4、荧光法(Methylight),由于探针的局限性,一般没有合适的对照体系,假阳性率较高;5、亚硫酸氢盐基因测序法(bisulfite sequencing PCR,BSP),是PCR联合Sanger测序技术,结果准确,但过程繁琐,不适合大批量检测,且价格昂贵不能广泛使用。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种方案简洁,灵敏度高,准确率高的MGMT基因甲基化检测试剂盒,以及其检测引物探针和检测体系。

[0006] 本发明为解决上述技术问题提出的一种技术方案是:一种MGMT基因甲基化检测引物探针,包括用于判定基因组DNA质量的引物探针组X、用于判定甲基化转化率的引物探针组Y和用于检测MGMT基因启动子甲基化情况的引物探针组Z;

[0007] 所述引物探针组X包括正向引物a、反向引物a和探针a;

[0008] 所述引物探针组Y包括正向引物b、反向引物b和探针b;

[0009] 所述引物探针组Z包括正向引物b、反向引物b、探针c和探针d;

[0010] 所述正向引物a的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示;

[0011] 所述反向引物a的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示;

[0012] 所述探针a的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示;

[0013] 所述正向引物b的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示;

[0014] 所述反向引物b的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示;

[0015] 所述探针b的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示;

[0016] 所述探针c的核苷酸序列如SEQ ID No.7所示;

[0017] 所述探针d的核苷酸序列如SEQ ID No.8所示;

[0018] 所述探针a、探针b和探针c的5'端设有报告荧光基团,所述探针a、探针b、探针c和探针d的3'端设有淬灭荧光基团。

[0019] 上述各引物应用于PCR反应中的终浓度为0.4 μ M;各探针应用于PCR反应中的终浓度为0.2 μ M。

[0020] 上述探针a、探针b和探针c的5'端设有相互区分的报告荧光基团。

[0021] 上述相互区分的报告荧光基团有三种,第一种是FAM,第二种是HEX、VIC、TET或Cy3,第三种是Cy5或ROX;所述淬灭荧光基团是BHQ1。

[0022] 本发明为解决上述技术问题提出的一种技术方案是:一种采用上述引物探针的MGMT基因甲基化检测试剂盒。

[0023] 本发明为解决上述技术问题提出的一种技术方案是:一种MGMT基因甲基化检测体系,包括用于判定基因组DNA质量的反应体系X、用于判定甲基化转化率的反应体系Y和用于检测MGMT基因启动子甲基化情况的反应体系Z;

[0024] 所述反应体系X包括正向引物a、反向引物a、探针a、PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂和纯水；

[0025] 所述反应体系Y包括正向引物b、反向引物b和探针b、PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂和纯水；

[0026] 所述反应体系Z包括正向引物b、反向引物b、探针c、探针d、PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂和纯水；

[0027] 所述正向引物a的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示；

[0028] 所述反向引物a的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示；

[0029] 所述探针a的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示；

[0030] 所述正向引物b的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示；

[0031] 所述反向引物b的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示；

[0032] 所述探针b的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示；

[0033] 所述探针c的核苷酸序列如SEQ ID No.7所示；

[0034] 所述探针d的核苷酸序列如SEQ ID No.8所示；

[0035] 所述探针a、探针b和探针c的5'端设有报告荧光基团，所述探针a、探针b、探针c和探针d的3'端设有淬灭荧光基团。

[0036] 上述各反应体系的组分中包括十倍浓度的PCR缓冲液1体积，2mM的dNTPs试剂1体积，15mM的MgCl₂溶液1体积，4μM的正向引物1体积，4μM的反向引物1体积，4μM的探针的体积0.5体积，5U/μl的热启动Taq聚合酶0.2体积，其余为纯水；所述PCR缓冲液包括100mM的Tris-HCl和500mM的KCl；所述dNTPs试剂包括dATP、dGTP、dCTP和dTTP。

[0037] 上述各反应体系的组分中还包括DNA模板；所述DNA模板的用量为0.5体积，所述DNA模板的使用浓度为10~50ng/μl。

[0038] 上述探针a、探针b和探针c的5'端设有相互区别的报告荧光基团。所述相互区别的报告荧光基团有三种，第一种是FAM，第二种是HEX、VIC、TET或Cy3，第三种是Cy5或ROX；所述淬灭荧光基团是BHQ1。

[0039] 本发明为解决上述技术问题提出的一种技术方案是：一种采用上述检测体系的MGMT基因甲基化检测试剂盒。

[0040] 本发明具有积极的效果：

[0041] 本发明的检测试剂盒中：1)正向引物a和反向引物a针对未经亚硫酸盐处理的模板进行针对管家基因的引物和探针设计；2)正向引物b和反向引物b针对MGMT启动子甲基化检测区域上下游约200bp范围内进行设计，且针对的模板为经过亚硫酸盐处理的模板；3)探针c针对MGMT启动子甲基化检测区域，模板此处的CG如果变了，就表示MGMT启动子没有被甲基化，探针也结合不上去；如果此处的CG没变，探针可以结合上去，在形成扩增产物过程中当Taq聚合酶扩增到探针结合模板的位点时，其5'-3'核酸外切酶活性切割掉探针5'端的报告基团，游离的报告基团远离淬灭基团，打破能量的传递，激发报告基团产生的荧光信号就可以被荧光检测系统检测到。这样每扩增一条DNA链，就对应有一个游离的荧光分子(报告基团)形成，就会发一次光，保证了荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步，从而可以检测到甲基化情况；4)本试剂盒所述探针均为Taqman探针，探针较长使得两端基团距离较远，会导致荧光淬灭不彻底，而且淬灭基团也会产生不同波长的荧光，都会使得未参与反应的探针

本底偏高。基于此,本发明特别设计只在5'端带淬灭基团的探针d,且探针d为探针c的一部分,其中最优选的方案是探针d的3'端即为探针c的5'端;在传统三步法PCR的基础上,增加低退火温度(52°C,3s)这一步骤有利于未结合到模板上的探针c与探针d能完全结合,可进一步消除荧光背景干扰,即利用了低退火温度有利于短片段的结合。传统PCR三步法中较高退火温度(60°C,15s)时不利于短片段的结合,而利于长探针与模板的结合。探针b位于正向引物b和反向引物b所覆盖的模板区间内,探针a、b、c、d需满足一般探针设计原则;5)因各反应不在同一管内进行,探针a、b、c的报告荧光基团可以采用同一种。

[0042] 本发明的检测试剂盒采用荧光定量法,全程利用简单PCR反应而非传统复杂的巢式PCR反应进行严密的质量控制,层层把控,确保模板DNA的硫化修饰质量,实现高通量、高灵敏度和高准确性的检测。具有以下特点:1)进行基因组DNA质量分析的检测体系X,利用简单PCR反应来控制模板质量,排除了对结果分析的干扰因素;2)采用转化液质量分析的检测体系Y,并巧妙设立98%的阳性对照(含2%待检测基因组DNA),利用简单PCR反应来保证甲基化转化效率;也可参照98%的转化率判定方法,若需要同理经实验也可推定其它转化率如99%的判定步骤;3)进行甲基化检测分析的检测体系Z,多加了一条带有淬灭基团的探针d,探针d为长探针c的一部分,有效消除长探针c自带的荧光背景,进一步保证了检测体系Z的甲基化检测分析的准确性,灵敏度极高;同时,试剂盒在使用时在传统三步PCR基础上,增加在较低退火温度收集荧光信号这一步骤,使增加的这一条带淬灭基团的探针能更好去除未参与反应的探针c的背景色。本发明的检测试剂盒是准确,高通量,高敏感性的MGMT基因CpG岛甲基化检测产品,可适应临床的广泛需求。

附图说明

[0043] 图1是采用反应体系X检测样本A1及其转化液M1的扩增图;

[0044] 图2是采用反应体系Z检测阴性对照C、阳性对照E和样本A1的转化液M1的扩增图;

[0045] 图3是采用反应体系X检测阳性对照D、样本A2及其转化液M2的扩增图;

[0046] 图4是采用反应体系Y检测阳性对照D、样本A2的转化液M2的扩增图;

[0047] 图5是采用反应体系Z检测阴性对照C、阳性对照E和样本A2的转化液M2的扩增图。

具体实施方式

[0048] 下面通过实施例对本发明进行具体的描述,有必要在此指出的是以下实施例只用于对本发明进行进一步说明,不能理解为对本发明保护范围的限制,该领域的技术人员可以根据上述本发明内容对本发明作出一些非本质的改进和调整。下述实施例中,若非特意表明,所用的试剂均为分析纯,所用试剂均可从商业渠道获得。文中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J.萨姆布鲁克等编著的科学出版社2002年出版的《分子克隆实验指南》一书中所述的条件,或按照制造商所建议的条件。除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。

[0049] 实施例1

[0050] 一、试剂盒的组成。

[0051] 本实施例的MGMT基因甲基化检测试剂盒包括混合液X、混合液Y、混合液Z和热启动

酶(Taq Hotstar)。混合液X、混合液Y、混合液Z和热启动酶(Taq Hotstar)分别置于不同的试管中,如表1至表3所示。

[0052] 表1 混合液X的组分表

[0053]

| 组分 | 浓度 | 体积(μ l) |
|------------------------|-------------|--------------|
| PCR缓冲液(PCR Buffer) | 10 \times | 1 |
| dNTPs | 2mM | 1 |
| MgCl ₂ | 15mM | 1 |
| 正向引物a | 4 μ M | 1 |
| 反向引物a | 4 μ M | 1 |
| 探针a | 4 μ M | 0.5 |
| 纯水(ddH ₂ O) | / | 1.5 |
| 合计 | / | 7 |

[0054] 表2 混合液Y的组分表

| 组分 | 浓度 | 体积 (μ l) |
|-------------------------|-------------|---------------|
| PCR 缓冲液 (PCR Buffer) | 10 \times | 1 |
| dNTPs | 2mM | 1 |
| MgCl ₂ | 15mM | 1 |
| 正向引物 b | 4 μ M | 1 |
| 反向引物 b | 4 μ M | 1 |
| 探针 b | 4 μ M | 0.5 |
| 纯水 (ddH ₂ O) | / | 1.5 |
| 合计 | / | 7 |

[0057] 表3 混合液Z的组分表

[0058]

| 组分 | 浓度 | 体积(μ l) |
|------------------------|-------------|--------------|
| PCR缓冲液(PCR Buffer) | 10 \times | 1 |
| dNTPs | 2mM | 1 |
| MgCl ₂ | 15mM | 1 |
| 正向引物b | 4 μ M | 1 |
| 反向引物b | 4 μ M | 1 |
| 探针c | 4 μ M | 0.5 |
| 探针d | 4 μ M | 0.5 |
| 纯水(ddH ₂ O) | / | 1 |
| 合计 | / | 7 |

[0059] 引物和探针的核苷酸序列如表4所示。

[0060] 表4 引物和探针的核苷酸列表

[0061]

| 引物名称 | 序列号(Sequence No.) | 核苷酸序列(5'-3') |
|------|-------------------|--------------|
|------|-------------------|--------------|

| | | |
|-------|---|-----------------------------|
| 正向引物a | 1 | CCCCTGTCTGCCTCACC |
| 反向引物a | 2 | TCGAACATCCTCATCTCCCC |
| 探针a | 3 | AGGGTCCAGGGTTGGTC |
| 正向引物b | 4 | AAATCTAAAACGAAACGAAACCGA |
| 反向引物b | 5 | GTGCGGAGTTTTTTTTTCGGG |
| 探针b | 6 | GAGTGTTCGGGTCGTTTCGTTTCGG |
| 探针c | 7 | AGAACGTTTTGCGTTTTCGACGTTCCG |
| 探针d | 8 | CGAAACGCAAAACGTTCT |

[0062] 混合液X中包括引物探针组X,混合液Y中包括引物探针组Y,混合液Z中包括引物探针组Z。引物探针组X针对管家基因GAPDH的序列设计且用于检测未转化DNA。引物探针组Y针对MGMT启动子甲基化区域的目标序列设计且用于检测已转化的DNA。

[0063] 其中,正向引物a、反向引物a和探针a是针对人类GAPDH基因设计。探针a的5'端设有ROX修饰(报告荧光基团),探针a的3'端设有BHQ1修饰(淬灭荧光基团)。探针b的5'端设有Hex修饰(报告荧光基团),探针b的3'端设有BHQ1修饰(淬灭荧光基团)。探针c的5'端设有FAM修饰(报告荧光基团),探针c的3'端设有BHQ1修饰(淬灭荧光基团)。探针d的5'端没有设报告荧光基团,探针d的3'端设有BHQ1修饰(淬灭荧光基团)。

[0064] PCR缓冲液(PCR Buffer)、dNTPs、MgCl₂和热启动酶来自Takara公司(货号:R007A)。

[0065] 二、试剂盒的使用方法。

[0066] 本实施例的MGMT基因甲基化检测试剂盒的具体检测步骤如下:

[0067] 1、DNA提取。

[0068] 采用试剂盒(Axygen Multisource Genomic DNA Miniprep c-kit)提取样本DNA,具体的操作参见试剂盒产品说明书。

[0069] 2、样本DNA质量检测。

[0070] 获得样本DNA后,使用微量分光光度计测量浓度,通过测定浓度和OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值控制样本质量,最终加入反应体系中的样本浓度为100ng/μl,1.9 ≥ A₂₆₀/280 ≥ 1.8, A₂₆₀/230 ≥ 1.0。合格的样本DNA液即为样本A,-20℃保存。

[0071] 3、甲基化处理。

[0072] 采用甲基化处理试剂盒(EZ DNA methylation-Gold Kit,ZYMO RESEARCH,美国,产品编号:5005)对样本进行亚硫酸盐处理转化,具体步骤参照甲基化试剂盒说明书,得到转化液M。

[0073] 4、准备样本及对照品。

[0074] 各样本及对照品具体成分如表5所示。

[0075] 表5 样本及对照品说明

[0076]

| 样本 | 说明 |
|----|----------|
| A | 待测DNA样本液 |
| B | 阳性甲基化质粒 |
| C | 阴性甲基化质粒 |

| | |
|---|-----------------------|
| D | 98%样本B+2%样本A |
| E | 1.5625%样本B |
| M | 样本A经甲基化转化试剂盒处理后的对应转化液 |

[0077] B:阳性甲基化质粒。采用常规构建质粒方法构建。从随机样本里提取人类基因组DNA液经亚硫酸盐处理,采用引物正向引物b(按照常规在5'端加酶切点的碱基序列)和反向引物b(按照常规在5'端加酶切点的碱基序列)进行PCR扩增(扩增程序如表9所示),产物测序验证,将MGMT基因启动子没有被转化的产物作为构建阳性质粒的PCR产物1,即其MGMT基因启动子为甲基化形式。将PCR产物1与Puc57质粒(生工A9196,编号:150311R5876-1)相应酶切后的片段1连接,转化至DH-5 α 感受态细菌,LB平板培养,蓝白斑筛选出阳性克隆,测序验证,扩大再培养,提取质粒DNA,经测序验证后,-20 $^{\circ}$ C保存,保存浓度为100ng/ μ l。

[0078] C:阴性甲基化质粒。采用常规构建质粒方法构建。从随机样本里提取人类基因组DNA液经亚硫酸盐处理,采用引物正向引物b(按照常规在5'端加酶切点的碱基序列)和反向引物b(按照常规在5'端加酶切点的碱基序列)进行PCR扩增(扩增程序如表9所示),产物测序验证,将MGMT基因启动子被完全转化的产物作为构建阴性质粒的PCR产物2,即其MGMT基因启动子为非甲基化形式;将PCR产物2与Puc57质粒(生工A9126,编号:150311R5876-1)相应酶切后的片段2连接,转化至DH-5 α 感受态细菌,LB平板培养,蓝白斑筛选出阳性克隆,测序验证,扩大再培养,提取质粒DNA,经测序验证后,-20 $^{\circ}$ C保存,保存浓度为100ng/ μ l。

[0079] D:98%样本B+2%样本A。其配制方法如下:以体积比B(100ng/ μ l):A(100ng/ μ l)=98:2配制即得。

[0080] E:1.5625%样本B。其配制采用如下方法,以下均为体积比:

[0081] 1)以B(100ng/ μ l):C(100ng/ μ l)=1:1配制,得E1,为50%B;

[0082] 2)以E1:C(100ng/ μ l)=1:1配制,得E2,为25%B;

[0083] 3)以E2:C(100ng/ μ l)=1:1配制,得E3,为12.5%B;

[0084] 4)以E3:C(100ng/ μ l)=1:1配制,得E4,为6.25%B;

[0085] 5)以E4:C(100ng/ μ l)=1:1配制,得E5,为3.125%B;

[0086] 6)以E5:C(100ng/ μ l)=1:1配制,得E6,即为1.5625%B。

[0087] M:样本A经甲基化转化试剂盒处理后的对应转化液。保存浓度为20~50ng/ μ l。

[0088] 5、采用混合液X配制成反应体系X进行基因组DNA质量的检测。

[0089] 配制反应体系X,利用荧光PCR定量仪(Agilent 3100)对基因组DNA的质量进行检测分析。反应体系X的组分如表6所示,反应体系X的PCR反应程序如表7所示。

[0090] 表6 反应体系X的组分表

| | 组分 | 浓度 | 体积 (μ l) |
|--------|-------------------------|-------------|---------------|
| [0091] | 混合液 X | | 7 |
| | 热启动酶 (Taq Hotstar) | 5U/ μ l | 0.2 |
| | DNA 模板 (样本) | | 0.5 |
| [0092] | 纯水 (ddH ₂ O) | | 2.3 |
| | 合计 | | 10 |

[0093] 表7 反应体系X的PCR反应程序

| | 过程 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|-----|-----|-------|----------|
| [0094] | 预变性 | 95℃ | 3Min | 50cycles |
| | 变性 | 95℃ | 10Sec | |
| | 退火 | 60℃ | 15Sec | |
| | 延伸 | 68℃ | 30Sec | |

[0095] 在延伸阶段收集ROX荧光信号。

[0096] 采用反应体系X检测样本A,可获得典型S型扩增曲线,可确认反应体系X正常。

[0097] 6、采用混合液Y配制成反应体系Y进行转化液质量分析。

[0098] 配制反应体系Y,利用荧光PCR定量仪(Agilent 3100)对转化液质量进行检测分析。反应体系Y的组分如表8所示,反应体系Y的PCR反应程序如表9所示。

[0099] 表8 反应体系Y的组分表

[0100]

| 组分 | 浓度 | 体积(μl) |
|------------------------|-------|--------|
| 混合液X | | 7 |
| 热启动酶(Taq Hotstar) | 5U/μl | 0.2 |
| DNA模板(样本) | | 1 |
| 纯水(ddH ₂ O) | | 1.8 |
| 合计 | | 10 |

[0101] 表9 反应体系Y的PCR反应程序

| | 过程 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|-----|-----|-------|----------|
| [0102] | 预变性 | 95℃ | 3Min | 50cycles |
| | 变性 | 95℃ | 10Sec | |
| | 退火 | 60℃ | 15Sec | |
| | 延伸 | 68℃ | 30Sec | |

[0103] 在延伸阶段收集HEX荧光信号。

[0104] 采用反应体系Y检测样本B或样本C,若可获得正常S型扩增曲线,可确认反应体系Y正常。

[0105] 7、采用混合液Z配制成反应体系Z进行甲基化检测分析。

[0106] 配制反应体系Z,利用荧光PCR定量仪(Agilent 3100),进行甲基化检测分析。反应体系Z的组分如表10所示,反应体系Z的PCR反应程序如表11所示。

[0107] 表10 反应体系Z的组分表

[0108]

| 组分 | 浓度 | 体积(μl) |
|------------------------|-------|--------|
| 混合液X | | 7 |
| 热启动酶(Taq Hotstar) | 5U/μl | 0.2 |
| DNA模板(样本) | | 1 |
| 纯水(ddH ₂ O) | | 1.8 |
| 合计 | | 10 |

[0109] 表11 反应体系Z的PCR反应程序

| | 过程 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|--------|-------|-------|----------|
| [0110] | 预变性 | 95° C | 3Min | 50cycles |
| | 变性 | 95° C | 10Sec | |
| | 退火 | 60° C | 15Sec | |
| | 延伸 | 68° C | 30Sec | |
| | 收集荧光信号 | 52° C | 3s | |

[0111] 在传统三步PCR反应的基础上,增加在较低退火温度收集FAM荧光信号这一步骤。

[0112] 采用反应体系Z检测样本B和样本D,若均能获得正常S型扩增曲线,则确认反应体系Z工作正常。反应体系Z可检测MGMT启动子区的低至1.5625%的甲基化状态。

[0113] 三、结果判断。

[0114] 以下反应体系X、Y、Z进行检测时,均以不加DNA模板(补足水)的PCR液为空白对照,按以下步骤进行。

[0115] 1、采用反应体系X检测样本A。

[0116] i. 反应体系X检测样本A,若不能获得正常S型扩增曲线,表明样本A的质量不合格,需重新制备后再进行检测;

[0117] ii. 反应体系X检测样本A,若获得正常S型扩增曲线,则进行步骤2的检测。

[0118] 2、反应体系X检测样本M。

[0119] i. 反应体系X检测样本M,若不能获得典型S型扩增曲线,表明临床样本基因组DNA(样本A)的转化液(样本M)无人类基因组残留,转化率100%。可直接进行步骤6的反应体系Z的检测。

[0120] ii. 反应体系X检测样本M,若能获得典型S型扩增曲线,扩增曲线CT值为 CT_{X-M} ,则有两个可能:

[0121] A. 样本A的GAPDH启动区可能为完全甲基化样本;但因反应体系X所采用的引物是针对GAPDH这个管家基因的,管家基因是一类始终保持着低水平的甲基化从而一直处于活性转录状态,样本A的GAPDH启动区不可能完全甲基化,故排除这种可能性。

[0122] B. 样本A的转化未进行完全,必须进行转化率的判定,进行步骤3~5。

[0123] 3、采用反应体系X检测样本D。

[0124] 采用反应体系X检测样本D,可获得正常S型扩增曲线,扩增曲线CT值命名为 CT_{X-D} 。

[0125] 4、采用反应体系Y检测样本D。

[0126] 采用反应体系Y检测样本D,可获得正常S型扩增曲线,扩增曲线CT值为 CT_{Y-D} 。

[0127] 5、采用反应体系Y检测样本M。

[0128] 采用反应体系Y检测样本M,可获得正常S型扩增曲线,扩增曲线CT值为 CT_{Y-M} ,需进行样本A的转化率是否大于98%转化率的判定:

[0129] $\Delta Ct1 = CT_{Y-D} - CT_{X-D}$; $\Delta Ct2 = CT_{Y-M} - CT_{X-M}$ 。

[0130] $\Delta \Delta CT = -(\text{实验组} \Delta CT \text{值} - \text{对照组} \Delta CT \text{值}) = -(\Delta Ct2 - \Delta Ct1)$ 。

[0131] 若 $\Delta \Delta CT > 0$,说明临床样本基因组DNA(样本A)转变为转化液(即样本M)的转化率大于98%,可进行反应体系Z的检测(步骤6)。

[0132] 若 $\Delta \Delta CT < 0$,应重新转化或者更换新的临床样本基因组DNA,重新开始检测。

[0133] 6、采用反应体系Z检测样本M。

[0134] 以样本C为阴性对照,以样本E为阳性对照。

[0135] 采用反应体系Z检测样本M,若获得正常S型扩增曲线,表明样本A的MGMT基因启动子为甲基化;

[0136] 采用反应体系Z检测样本M,若未获得S型扩增曲线,表明样本A的MGMT基因启动子为非甲基化。

[0137] 四、应用示例。

[0138] 1、应用例。

[0139] (1)采用本实施例的试剂盒检测样本A1的MGMT基因启动子甲基化状态。

[0140] 反应体系X检测:采用反应体系X检测样本A1及其转化液M1的扩增图如图1所示。反应体系X检测样本A1,获得正常S型扩增曲线;反应体系X检测转化液M1,不能获得正常S型扩增曲线,表明样本A1转化完全,接下来可直接进行反应体系Z的检测。

[0141] 反应体系Z检测:采用反应体系Z检测样本C(阴性对照)、样本E(阳性对照)和样本A1的转化液M1,扩增图如图2所示。采用反应体系Z检测样本A1的转化液M1,得到S型扩增曲线,可判断样本A1的MGMT基因启动子为甲基化状态。

[0142] (2)采用本实施例的试剂盒检测样本A2的MGMT基因启动子甲基化状态。

[0143] 反应体系X检测:采用反应体系X检测阳性对照样本D2、样本A2及其转化液M2的扩增图如图3所示。

[0144] 反应体系X检测样本A2,获得正常S型扩增曲线;反应体系X检测转化液M2,也获得S型扩增曲线,其扩增曲线CT值为 $CT_{X-M2} = 39.54$,表明样本A2转化不完全,接下来需进行转化率的判定。

[0145] 反应体系X检测样本D2,获得正常S型扩增曲线,扩增曲线CT值为 $CT_{X-D} = 37.55$ 。

[0146] 反应体系Y的检测:采用反应体系Y检测阳性对照样本D2、样本A2的转化液M2的扩增图如图4所示。

[0147] 采用反应体系Y检测样本D2,获得正常S型扩增曲线,其扩增曲线CT值为 $CT_{Y-D} = 33.69$ 。采用反应体系Y检测转化液M2,获得正常S型扩增曲线,扩增曲线CT值为 $CT_{Y-M2} = 30.97$ 。

[0148] $\Delta Ct1 = CT_{Y-D} - CT_{X-D} = 33.69 - 37.55 = -3.86$;

[0149] $\Delta Ct2 = CT_{Y-M2} - CT_{X-M2} = 30.97 - 39.54 = -8.57$ 。

[0150] $\Delta \Delta CT = -(\Delta Ct2 - \Delta Ct1) = 4.71 > 0$,说明临床样本基因组DNA(样本A)转变为转化液(即样本M)的转化率大于98%,再接着进行反应体系Z的检测。

[0151] 反应体系Z检测:采用反应体系Z检测样本C(阴性对照)、样本E(阳性对照)和样本A2的转化液M2,扩增图如图5所示。

[0152] 反应体系Z检测转化液M,若获得正常S型扩增曲线,表明样本A2的MGMT基因启动子为甲基化。

[0153] 2、PCR结果验证。

[0154] 采用亚硫酸氢盐基因测序法检测各样本,测序结果与采用本试剂盒的检测样本1和样本2的结果完全一致。

[0155] 五、试剂盒特性。

[0156] 1、对反应体系X、Y进行扩增效率检测。

[0157] 利用反应体系X、Y,对各自模板进行倍比稀释,进行扩增效率检测,可验证扩增效率一致。

[0158] 2、灵敏度分析:采用本实施例的试剂盒对不同程度甲基化模板的检测,可检测低至1.5625%MGMT启动子区甲基化的阳性质粒。低至1.5625%MGMT启动子区甲基化判定已能满足临床应用需求。

[0159] 3、重复性分析。

[0160] 上述检测反应均采用复孔,每次重复三次,其间的CT值相差不超过0.2个循环。

[0161] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而这些属于本发明的精神所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

- <110> 上海赛安生物医药科技有限公司
- <120> MGMT基因甲基化检测引物探针体系及其试剂盒
- <130> 无
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 17
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 1
cccctgtctg cctcacc 17
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 2
tcgaacatcc tcattctcccc 20
- <210> 3
- <211> 17
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 3
agggtccagg gttggtc 17

| | | |
|-------|-----------------------------|----|
| <210> | 4 | |
| <211> | 24 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工合成 | |
| <400> | 4 | |
| | aaatctaaaa cgaaacgaaa ccga | 24 |
| <210> | 5 | |
| <211> | 21 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工合成 | |
| <400> | 5 | |
| | gtgcggagtt ttttttcgg g | 21 |
| <210> | 6 | |
| <211> | 26 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工合成 | |
| <400> | 6 | |
| | gagtgtttgg gtcgtttcgt ttcgg | 26 |
| <210> | 7 | |
| <211> | 25 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工合成 | |
| <400> | 7 | |
| | agaacgtttt gcgtttcgac gttcg | 25 |
| <210> | 8 | |
| <211> | 18 | |
| <212> | DNA | |

<213> 人工合成

<400> 8

cgaaacgcaa aacgttct

18

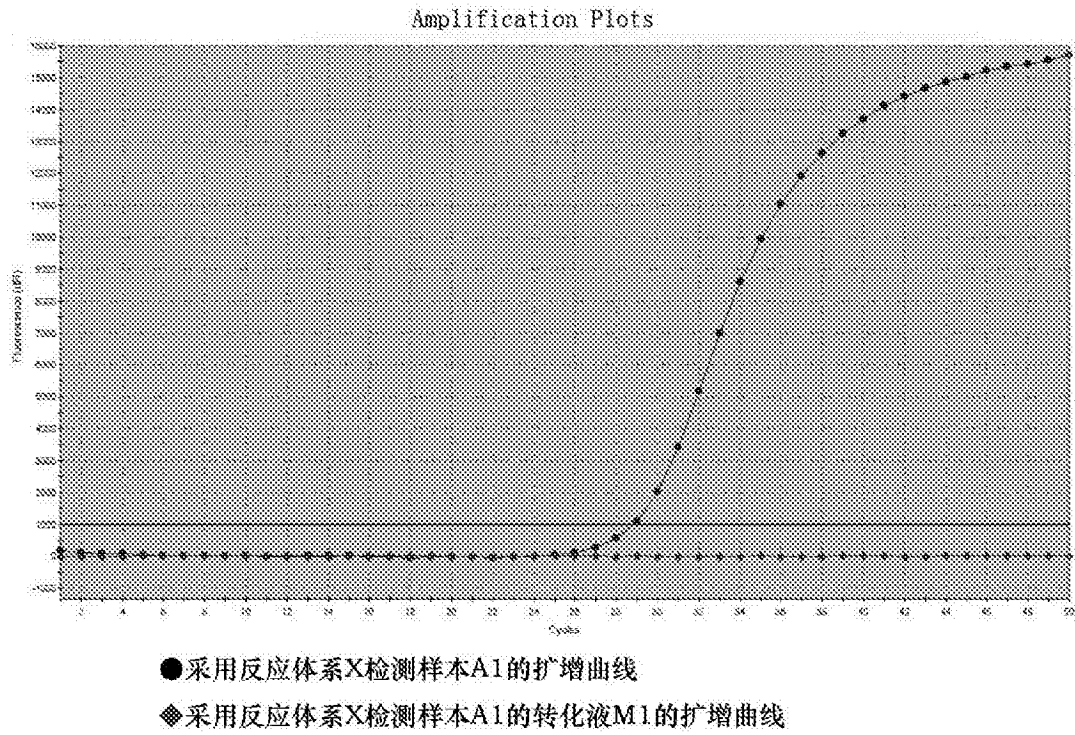


图 1

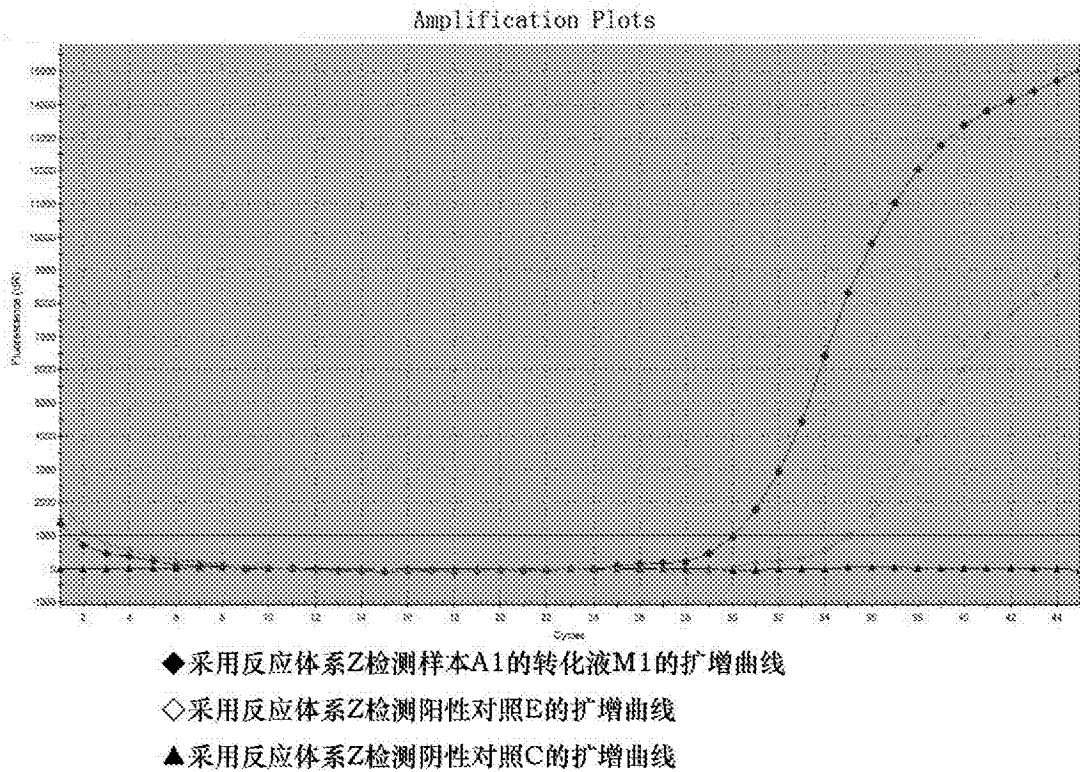


图 2

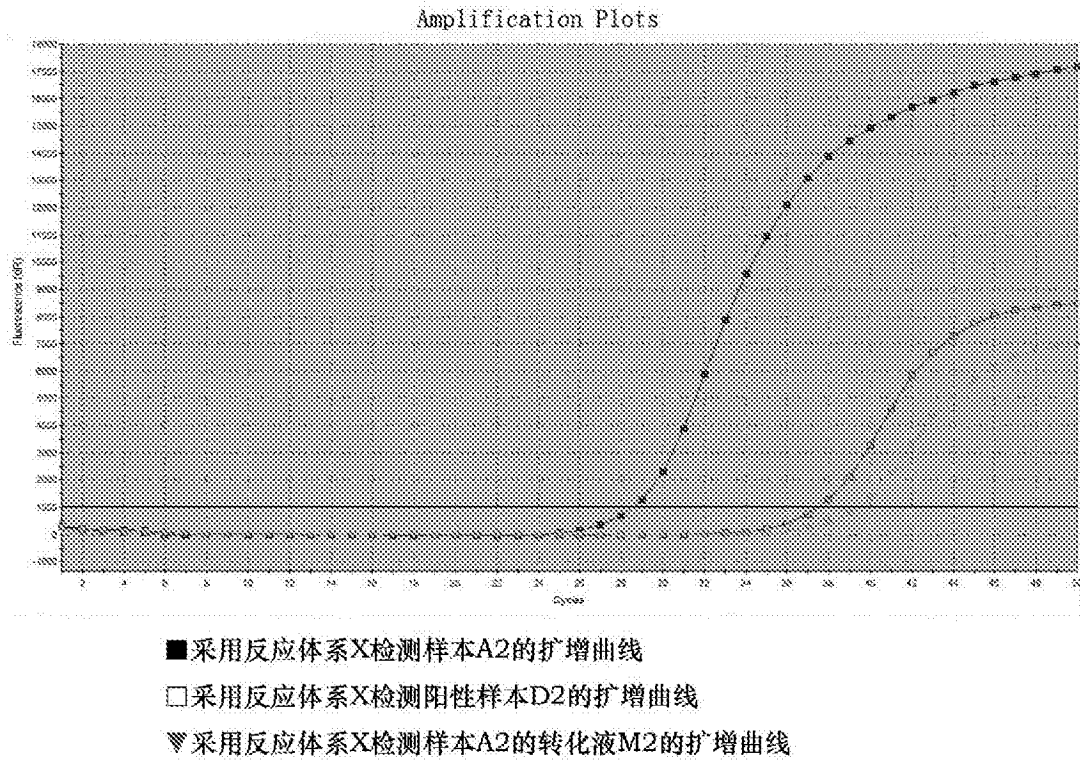


图 3

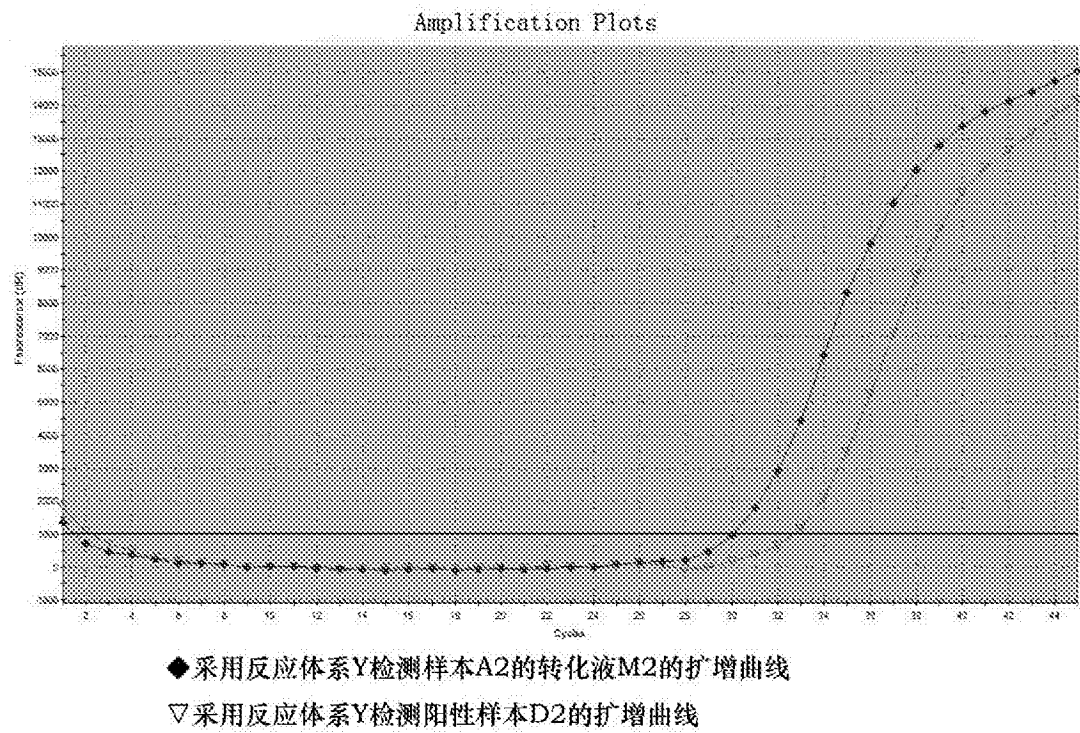


图 4

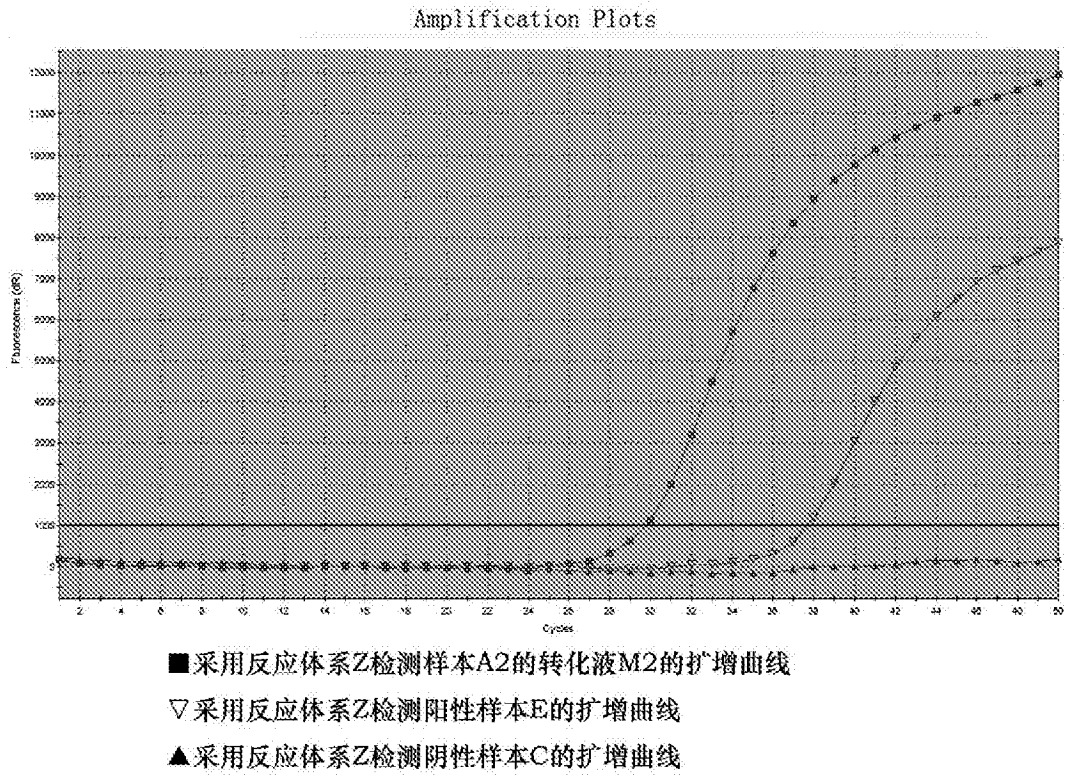


图 5