



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106916882 B

(45) 授权公告日 2021.02.02

(21) 申请号 201610152665.3

(22) 申请日 2016.03.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106916882 A

(43) 申请公布日 2017.07.04

(30) 优先权数据
104144049 2015.12.28 TW

(73) 专利权人 华联生物科技股份有限公司
地址 中国台湾新竹市

(72) 发明人 林上琪

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
代理人 许静 黄灿

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12Q 1/6837 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

审查员 周洋

权利要求书2页 说明书9页
序列表12页 附图1页

(54) 发明名称

用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的方法

(57) 摘要

本发明提供一种用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的方法,该方法使用的正向与反向引物皆以等位基因特异性位点为引物的3'端终点,不须使用特殊碱基的引物,并能容易的直接依等位基因特异性位点两旁的序列进行设计,并且结合核酸螯合试剂进行多重聚合酶链锁反应,再以基因型鉴定芯片进行检测。

1. 一种用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的方法,包含:

(a) 利用一对以上的引物组并通过多重单一核苷酸多型性聚合酶链锁反应扩增待测核酸样本以产生扩增产物,其中所述聚合酶链锁反应中加入核酸螯合染剂,且所述核酸螯合染剂为SYBR green核酸染料,在使用ABI快速SYBR green扩增反应混合试剂时,SYBR green的浓度为100倍稀释浓度或200倍稀释浓度,在使用Bio-Rad iQ™SYBR®Green扩增反应超级混合试剂时,SYBR green的浓度为800至1600倍稀释浓度;以及

(b) 以表面固定有辨识所述等位基因特异性的探针的基因型鉴定芯片鉴定所述扩增产物,

其中所述引物组包含至少四条等位基因特异性引物,至少两条等位基因特异性引物与所述核酸样本的正股结合,且该等位基因特异性引物3' 端终点与等位基因特异性位点互补,以及至少两条等位基因特异性引物与所述核酸样本的反股结合,且所述等位基因特异性引物3' 端终点与等位基因特异性位点互补。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(a)的引物组具有接近的熔解温度值。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述待测核酸样本存在于体液和/或组织。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述待测核酸样本存在于血液。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述待测核酸样本存在于血浆。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述待测核酸样本存在于血清。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述基因型鉴定芯片是以芯片荧光扫描仪进行检测。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述引物组的5' 端可再加上修饰标记。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在所述聚合酶链锁反应扩增时,可加入各种特殊修饰碱基。

10. 一种用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的方法,包含:

a) 利用一对以上的引物组并通过多重单一核苷酸多型性聚合酶链锁反应扩增待测核酸样本以产生第一阶段扩增产物,其中所述聚合酶链锁反应中加入核酸螯合染剂,且所述核酸螯合染剂为SYBR green核酸染料,在使用ABI快速SYBR green扩增反应混合试剂时,SYBR green的浓度为100倍稀释浓度或200倍稀释浓度,在使用Bio-Rad iQ™SYBR®Green扩增反应超级混合试剂时,SYBR green的浓度为800至1600倍稀释浓度;

b) 利用5' 端具有修饰标记的通用聚合酶链锁反应引物扩增该第一阶段扩增产物以产生第二阶段扩增产物;以及

c) 以表面固定有辨识该等位基因特异性的探针的基因型鉴定芯片鉴定所述第二阶段扩增产物,

其中步骤b)中的5' 端具有修饰标记的通用聚合酶链锁反应引物序列包含两区域,5' 端区域为一通用聚合酶链锁反应引物序列区域,3' 端区域为等位基因特异性引物区域;其中步骤a)中的引物组包含至少四条等位基因特异性引物,至少两条等位基因特异性引物与该核酸样本的正股结合,且所述等位基因特异性引物3' 端终点与等位基因特异性位点互补,

以及至少两条等位基因特异性引物与所述核酸样本的反股结合,且所述等位基因特异性引物3' 端终点与等位基因特异性位点互补。

11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述步骤(a)的引物组具有接近的熔解温度值。

12. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述修饰标记为荧光、生物素、毛地黄皂苷配基或寡核酸序列。

13. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述待测核酸样本存在于体液和/或组织。

14. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述待测核酸样本存在于血液。

15. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述待测核酸样本存在于血浆。

16. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述待测核酸样本存在于血清。

17. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述引物组的通用聚合酶链锁反应引物序列区域与等位基因特异性引物区域之间可进一步加上密码序列,且所述探针包含该密码序列的互补序列。

18. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述基因型鉴定芯片是以芯片荧光扫描仪进行检测。

用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的方法

技术领域

[0001] 本发明提供一种双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的方法,特别是一种用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的方法。

背景技术

[0002] 人体的基因体包含各种遗传变异,其中单一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)是常被发现的遗传变异。单一核苷酸多型性上不同的核苷酸,可能会改变蛋白质的形状,影响基因的调控反应,进而造成各种遗传性疾病。

[0003] 近年来,高通量的微数组芯片技术已被广泛的应用于个体差异性检测、比较基因体相关分析、连锁不平衡或药物代谢基因相关等研究中。然而,高通量的微数组芯片技术在进行芯片杂交的前处理步骤相当耗时,且芯片扫描后要得到上万个SNP数据的判读过程复杂,同时,该技术的仪器及耗材购置成本相当昂贵。而实时聚合酶链锁反应(real-time polymerase chain reaction)具有较高的专一性、敏感度及准确度,但该技术需要针对个别SNP位点订制的特殊修饰探针的制作成本昂贵,导致整体检测技术的成本较高,不利于大规模的SNP位点检测。因此,目前现有技术缺乏一种有效、快速、较大规模的检测单一核苷酸变异的技术。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的一目的在于提供一种用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性(allele specific)聚合酶链锁反应的方法,包含:(a)利用一对以上的引物组并藉由多重单一核苷酸多型性聚合酶链锁反应(Multiplex SNP PCR)扩增(amplify)待测核酸样本以产生扩增产物,其中该聚合酶链锁反应中加入核酸螯合染剂,且该核酸螯合染剂为SYBR green核苷酸染料;以及(b)以表面固定有辨识该等位基因特异性的探针(probe)的基因型鉴定芯片鉴定该扩增产物,其中该引物组包含至少四条等位基因特异性引物,至少两条等位基因特异性引物与该核酸样本的正股(sense strand)结合,且该等位基因特异性引物3'端终点与等位基因特异性位点互补,以及至少两条等位基因特异性引物与该核酸样本的反股(antisense strand)结合,且该等位基因特异性引物3'端终点与等位基因特异性位点互补。

[0005] 本发明的又一目的在于提供一种用于辨识核苷酸基因多型性的的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性(allele specific)聚合酶链锁反应的方法,包含:(a)利用一对以上的引物组并藉由多重单一核苷酸多型性聚合酶链锁反应(Multiplex SNP PCR)扩增(amplify)待测核酸样本以产生第一阶段扩增产物,其中该聚合酶链锁反应中加入核酸螯合染剂,且该核酸螯合染剂为SYBR green核苷酸染料;(b)利用5'端具有修饰标记的通用聚合酶链锁反应引物(universal PCR primer)扩增该第一阶段扩增产物以产生第二阶段扩增产物;以及(c)以表面固定有辨识该等位基因特异性的探针(probe)的基因型鉴定芯片鉴

定该扩增产物,其中该引物组序列包含两区域,5'端区域为一通用聚合酶链锁反应引物序列区域,3'端区域为等位基因特异性引物区域;其中引物组包含至少四条等位基因特异性引物,至少两条等位基因特异性引物与该核酸样本的正股(sense strand)结合,且该等位基因特异性引物3'端终点与等位基因特异性位点互补,以及至少两条等位基因特异性引物与该核酸样本的反股(antisense strand)结合,且该等位基因特异性引物3'端终点与等位基因特异性位点互补。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种与核酸染料搭配使用的双重等位基因特异性(allele specific)聚合酶链锁反应的引物对,包含:该引物对包含四条等位基因特异性引物,其中两条等位基因特异性引物与核酸样本的正股(sense strand)结合,且该等位基因特异性引物3'端终点与等位基因特异性位点互补,以及至少两条等位基因特异性引物与该核酸样本的反股(antisense strand)结合,且该等位基因特异性引物3'端终点与等位基因特异性位点互补。在本发明的一实施例中,该引物对是应用于基因型鉴定芯片。

[0007] 本发明的再一目的在于提供一种与核酸螯合染剂搭配的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的引物对,包含:所述引物对包含四条等位基因特异性引物,其中两条等位基因特异性引物与核酸样本的正股结合,且所述等位基因特异性引物3'端终点与等位基因特异性位点互补,以及至少两条等位基因特异性引物与该核酸样本的反股(antisense strand)结合,且所述等位基因特异性引物3'端终点与等位基因特异性位点互补,引物对的5'端区域为一通用聚合酶链锁反应引物序列区域。

[0008] 在本发明的一实施例中,所述核酸螯合染剂为SYBR green核酸染料。

[0009] 在本发明的一实施例中,其中该引物对具有接近的熔解温度(melting temperature, T_m)值。

[0010] 在本发明的一实施例中,其中该修饰标记是为荧光、生物素(biotin)、毛地黄皂甘配基(digoxigenin, DIG)或寡核酸序列。

[0011] 在本发明的一实施例中,其中该基因型鉴定芯片是以芯片荧光扫描仪进行检测。

[0012] 在本发明的一实施例中,其中该核酸样本是存在于选自于由血液、血清、血浆、体液及组织所组成群组。

[0013] 在本发明的一实施例中,其中该引物组的通用聚合酶链锁反应引物序列区域与等位基因特异性引物区域之间可进一步加上密码(barcode)序列,且该探针包含该密码序列的互补序列。

[0014] 因此,本发明提供一种用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性(allele specific)聚合酶链锁反应的方法,结合SYBR green核酸染料进行多重单一核苷酸多型性聚合酶链锁反应(Multiplex SNP PCR),再以基因型鉴定芯片检测放大产物。本发明方法所使用的正向(forward)与反向引物(reverse)皆以等位基因特异性位点为引物的3'端终点,不须使用特殊碱基的引物,并能容易的直接依等位基因特异性位点两旁的序列进行设计,故本发明的方法是不须使用特殊合成引物且引物设计简单的应用于基因型鉴定芯片检测的方法,并具有同时检测多个等位基因特异性位点的优点。

[0015] 以下将配合图式进一步说明本发明的实施方式,下述所列举的实施例是用以阐明本发明,并非用以限定本发明的范围,任何熟习此技艺者,在不脱离本发明的精神和范围内,当可做些许更动与润饰,因此本发明的保护范围当视后附的申请专利范围所界定者为

准。

附图说明

[0016] 图1为本发明的双重等位基因特异性引物(double allele specific primer)设计的示意图。

具体实施方式

[0017] 本发明提供一种用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性(allele specific)聚合酶链锁反应的方法,其是使用的正向(forward)与反向引物(reverse)皆以等位基因特异性位点为引物的3' 端终点,不须使用特殊碱基的引物,并能容易的直接依等位基因特异性位点两旁的序列进行设计,并且结合螯合试剂(interchelating agent)进行多重(multiplex)聚合酶链锁反应,再以单一核苷酸(single nucleotide polymorphism,SNP)芯片进行检测。

[0018] 定义

[0019] 本文中所述的核酸为DNA或RNA分子。

[0020] 本文中所述的核苷酸为核酸的基本组成单位。

[0021] 实施例1本发明的引物设计

[0022] 本发明的用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应方法,分别进行等位基因特异性位点的第一阶段扩增反应以及通用引物(universal primer)的第二阶段扩增反应;再以一表面固定有辨识探针(probe)的微数组芯片区别该等位基因特异性位点的放大产物。

[0023] 本发明的方法主要的技术特征在于双重等位基因特异性引物的设计,相较于传统聚合酶链锁反应是利用正向引物与变异性位点一端的一条DNA模板链互补,反向引物与变异性位点另一端的另一条DNA模板链互补。本发明的方法所使用正向与反向引物皆以变异性位点为引物的3' 端终点,不须使用特殊碱基的引物,直接依等位基因特异性位点两侧的序列进行设计。在本实施例中,本发明以5个SNP位点作为举例,包含rs29232、rs401681、rs667282、rs2072590以及rs2131877,但不限于此。需注意的是,一起进行多重(multiplex)SNP聚合酶链锁反应的引物需接近的熔解温度(melting temperature, T_m)值, T_m 公式= $4(G+C)+2(A+T)$ 。

[0024] 以rs29232为例,如图1及表一所示,rs29232为A/G基因型变异,直接依该基因型变异的位点两侧的序列进行设计,正向引物(SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2)分别以变异性位点A或G为引物的3' 端终点设计二条正向引物;反向引物(SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4)分别以变异性位点C或T为引物的3' 端终点设计二条反向引物,分别使用二组引物对进行扩增反应(AT引物组及GC引物组),不须使用特殊碱基的引物。其余SNP变异性位点引物对,rs401681以SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:8表示;rs667282以SEQ ID NO:9至SEQ ID NO:12表示;rs2072590以SEQ ID NO:13至SEQ ID NO:16表示;rs2131877以SEQ ID NO:17至SEQ ID NO:20。

[0025] 关于第二阶段扩增反应的通用引物,如表一所示,以5' 端分别标记不同荧光(Cy3及Cy5)的AT通用引物(SEQ ID NO:21)及GC通用引物(SEQ ID NO:22)。

[0026] 关于芯片上区别该SNP变异性位点的放大产物的辨识探针,本发明以5'端具有氨基(amine)修饰的辨识rs29232探针(SEQ ID NO:23)、rs401681探针(SEQ ID NO:24)、rs667282探针(SEQ ID NO:25)、rs2072590探针(SEQ ID NO:26)以及rs2131877探针(SEQ ID NO:27)固定于芯片上进行杂交(hybridization)反应,但不限于此。

[0027] 表一引物序列

SEQ ID NO	oligo ID	oligo sequence
SEQ ID NO:1	AS-rs29232-fwdA	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCTGGAGAGATTATACTTG CAATGCTATCAAAAATA <u>A</u>
SEQ ID NO:2	AS-rs29232-fwdG	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTTGGAGAGATTATACT TGCAATGCTATCAAAAAT <u>G</u>
SEQ ID NO:3	AS-rs29232-revC	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTAGGCCACCACCCAT GAG <u>C</u>
SEQ ID NO:4	AS-rs29232-revT	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCTAGCCCCACCACCCATG AG <u>T</u>
SEQ ID NO:5	AS-rs401681-fwdC	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTGACCTATCCAGACAA CTTCAGAGT <u>C</u>
SEQ ID NO:6	AS-rs401681-fwdT	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCGACCTATCCAGACAAC TCAGAGT <u>T</u>
SEQ ID NO:7	AS-rs401681-revA	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCGGTGAAAGCTGCTTCAC ACCATGAT <u>A</u>
SEQ ID NO:8	AS-rs401681-revG	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTTCTAAGCTGCTTCACA CCATGAT <u>G</u>
SEQ ID NO:9	AS-rs667282-fwdC	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTAACTAACAAGCTCC CAGGTG <u>A</u>
SEQ ID NO:10	AS-rs667282-fwdT	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCTAATCTAACAAGCTCCC AGGTGAT <u>T</u>
SEQ ID NO:11	AS-rs667282-revA	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCACAGATACTGACCAA CAGTATTCA <u>A</u>
SEQ ID NO:12	AS-rs667282-revG	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTACAGATACTGACC AACAGTATTCA <u>G</u>
SEQ ID NO:13	AS-rs2072590-fwdG	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTAAACAGGGAAGATGGT ACCAG <u>G</u>
[0028] SEQ ID NO:14	AS-rs2072590-fwdT	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCTAAGAGGGAAGATGGT ACCAG <u>T</u>
SEQ ID NO:15	AS-rs2072590-revA	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCGACGTGAGCTGAGCTCT AGGG <u>A</u>
SEQ ID NO:16	AS-rs2072590-revC	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTACCTGAGCTGAGCTC TAGGG <u>C</u>
SEQ ID NO:17	AS-rs2131877-fwdC	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTTTTGCAGGCAGTATTT ACAGAGCA <u>C</u>
SEQ ID NO:18	AS-rs2131877-fwdT	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCTTGCAGGCAGTATTTA CAGAGCA <u>T</u>
SEQ ID NO:19	AS-rs2131877-revA	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCACGGCACTCTACATTTA ACCTCTCC <u>A</u>
SEQ ID NO:20	AS-rs2131877-revG	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTACGGCACTCTACATTT AACCTCTCC <u>G</u>
SEQ ID NO:21	Universal-GC	Cy5-CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTT
SEQ ID NO:22	Universal-AT	Cy3-GATCAGGCGTCTGTCGTGCTC
SEQ ID NO:23	AS-rs29232	amine-TTTTTTTTTTAGAGATTATACTTGCAATGCTATCA AAATRCTCATGGGTGGTGGG
SEQ ID NO:24	AS-rs401681	amine-TTTTTTTTTTCTATCCAGACAACCTCAGAGTCYAT CATGGTGTGAAGCAGCTTC
SEQ ID NO:25	AS-rs667282	amine-TTTTTTTTTTCTAACAAGCTCCCAGGTGAYGTG AATACTGTTGGTCAGTGTATC
SEQ ID NO:26	AS-rs2072590	amine-TTTTTTTTTTGAGGGAAGATGGTACCAGCKCCCT AGAGCTCAGCTCAC
SEQ ID NO:27	AS-rs2131877	amine-TTTTTTTTTTGCAGGCAGTATTTACAGAGCAYGG AGAGGTTAAATGTAGAGTGC

[0029] 关于用于芯片的扩增反应产物的标记方式,包含特殊修饰碱基、特殊修饰引物以及化学修饰等方法,其中特殊修饰碱基是在扩增反应时,加入各种特殊修饰碱基,例如:biotin-dCTP、Cy5-dCTP、aminoallyl-dCTP等,或使用末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal deoxynucleotidyl transferase)将特殊碱基加在扩增反应产物的3'端,例如直接使用以荧光修饰的dCTP进行第一阶段的PCR扩增反应,便不需再进行第二阶段的PCR扩增反应。特殊引物修饰是在扩增反应时,加入各种特殊修饰引物进行扩增反应,例如在引物的5'端加上荧光、生物素(biotin)、毛地黄皂苷配基(digoxigenin, DIG)或寡核苷酸序列修饰;化学修饰是在纯化扩增反应产物之后,以化学荧光(如Kreatech公司的ULS™技术)将荧光分子直接加在扩增反应产物的碱基上。

[0030] 实施例2 SYBR green对等位基因特异性的辨识度的影响

[0031] 本发明的以双重等位基因特异性引物(double allele specific primers)的方法,结合螯合试剂(interchelating agent)进行第一阶段扩增反应,可提升等位基因特异性的辨识度。

[0032] 在本实施例中,本发明以SYBR green I(SYBR green I核酸染料,产品编号1988131,罗氏)作为螯合试剂,并且分别将SYBR green I进行:(1)25倍稀释、(2)50倍稀释、(3)100倍稀释、(4)200倍稀释、(5)400倍稀释、(6)800倍稀释、(7)1600倍稀释、(8)3200倍稀释、(9)6400倍稀释。

[0033] 在本实施例中,使用购自美国Coriell细胞存储中心的DNA样本,分别为NA12891及NA18526;以rs29232进行实验,并经由数据库已知NA12891样本的rs29232基因型为CC及NA18526样本的rs29232基因型为TT.rs29232分别包含:含有各5 μ M SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:4的AT引物对混合液,以及含有各5 μ M SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:3的GC引物对混合液。

[0034] 此外,本发明分别使用不同厂牌的SYBR green扩增反应混合试剂包含:美国应用生命系统公司(Applied Biosystems,ABI)快速SYBR green扩增反应混合试剂(Fast SYBR Green master mix,产品编号4385612);以及美商伯瑞股份有限公司(Bio-Rad) iQ™ SYBR® Green扩增反应超级混合试剂(iQ™ SYBR® Green Supermix,产品编号1708880)。

[0035] 进行实时(Real-Time)聚合酶链锁反应,反应总体积为10 μ L,包含5 μ L SYBR green扩增反应混合试剂、2 μ L SYBR稀释液、1 μ L引物对混合液、1.8 μ L水及0.2 μ L的gDNA(50ng/ μ L)样本。实时(Real-Time)聚合酶链锁反应器(CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad)进行,其反应条件为:95 $^{\circ}$ C反应1分钟,再以95 $^{\circ}$ C,10秒、65 $^{\circ}$ C,30秒为一循环,并重复此循环50次结束反应。

[0036] 实验结果所得的Ct值,经由公式 $\Delta Ct = (\text{AT引物对的Ct}) - (\text{GC引物对的Ct})$ 计算,使用ABI快速SYBR green扩增反应混合试剂的结果如表二所示。因所使用的两个样本基因型为CC(NA12891)与TT(NA18526),CC基因型样本的qPCR结果的GC引物对的Ct会比AT引物对的Ct小,因此在公式计算结果会是正值,反之在TT基因型样本的qPCR计算结果会是负值。数值绝对值越大,表示分辨效果越佳,在ABI SYBR green的100倍稀释的两个数值的绝对值都很大,表示在两种基因型的分辨效果都很好,但在50倍稀释只有CC基因型样本(NA12891)绝对值数值很大,但TT基因型样本(NA18526)的绝对值很小,表示在此配方中只有CC基因型的分辨效果较佳,但TT基因型的分辨效果不佳,故100倍稀释浓度的SYBR green在ABI快速SYBR

green扩增反应混合试剂的搭配效果最佳。使用Bio-Rad iQ™SYBR®Green扩增反应超级混合试剂的结果如表三所示,800-1600倍稀释浓度的SYBR green在Bio-Rad iQ™SYBR®Green扩增反应超级混合试剂的搭配效果最佳。其结果显示虽不同扩增反应试剂所使用的最佳SYBR green浓度不同,但使用SYBR green确实可有效提升等位基因特异性的辨识度。

[0037] 表二、使用ABI快速SYBR green扩增反应混合试剂的 ΔCt 值

SYBR 稀释 溶液	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
	25 倍 稀释	50 倍 稀释	100 倍 稀释	200 倍 稀释	400 倍 稀释	800 倍 稀释	1600 倍 稀释	3200 倍 稀释	6400 倍 稀释
NA12891	NA	9.28	5.73	3.05	0.91	0.87	1.59	2.83	3.57
NA18526	NA	-1.28	-5.21	-3.37	-2.42	-2.83	-4.37	-5.28	-5.51

[0039] 表三、使用Bio-Rad iQ™SYBR®Green扩增反应超级混合试剂的 ΔCt 值

SYBR 稀释 溶液	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
	25 倍 稀释	50 倍 稀释	100 倍 稀释	200 倍 稀释	400 倍 稀释	800 倍 稀释	1600 倍 稀释	3200 倍 稀释	6400 倍 稀释
NA12891	NA	NA	NA	NA	NA	6.63	6.88	4.41	4.65
NA18526	NA	NA	NA	NA	NA	-8.94	-5.39	-3.85	-2.93

[0041] 实施例3其他整合试剂对等位基因特异性的辨识度的影响

[0042] 申请人以其他整合试剂GelRed (GelRed™核酸染料,产品编号89139-138,Biotium)作为整合试剂,并且分别将GelRed进行:(1) 100倍稀释、(2) 200倍稀释、(3) 400倍稀释、(4) 800倍稀释、(5) 1600倍稀释、(6) 3200倍稀释、(7) 6400倍稀释、(8) 水。

[0043] 在本实施例中,使用购自美国Coriell细胞存储中心的DNA样本,分别为NA12891及NA18526;以rs29232进行实验,并经由数据库已知NA12891样本的rs29232基因型为CC及NA18526样本的rs29232基因型为TT.rs29232分别包含:含有各5 μ M SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:4的AT引物对混合液,以及含有各5 μ M SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:3的GC引物对混合液。

[0044] 进行实时 (Real-Time) 聚合酶链锁反应,反应总体积为10 μ L,包含5 μ LABI快速SYBR green扩增反应混合试剂、2 μ L GelRed稀释液、1 μ L引物对混合液、1.8 μ L水及0.2 μ L的gDNA (50ng/ μ L) 样本。实时 (Real-Time) 聚合酶链锁反应器 (CFX Connect Real-Time PCR Detection System,Bio-Rad) 进行,其反应条件为:95 $^{\circ}$ C反应1分钟,再以95 $^{\circ}$ C,10秒、65 $^{\circ}$ C,30秒为一循环,并重复此循环50次结束反应。

[0045] 实验结果所得的Ct值,经由公式 $\Delta Ct = (\text{AT引物对的Ct}) - (\text{GC引物对pair的Ct})$ 计算,结果如表四所示,如同实施例2的判断方式,且GelRed所有的测试结果都跟水差异不大,故GelRed对等位基因特异性的辨识度效果不佳,显示非所有的整合试剂都能提高SNP的辨识效果。

[0046] 表四、使用GelRed及ABI快速SYBR green扩增反应混合试剂的 ΔCt 值

GelRed 稀 释溶液	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
	100 倍 稀释	200 倍 稀释	400 倍 稀释	800 倍 稀释	1600 倍 稀释	3200 倍 稀释	6400 倍 稀释	水
NA12891	NA	2.2	2.13	1.33	1.06	1.58	1.62	1.66
NA18526	NA	-6.1	-3.96	-2.79	-2.86	-2.89	-3.64	-4.64

[0048] 实施例4多重 (multiplex) SNP的辨识度

[0049] 本发明确认使用SYBR green能有效提升等位基因特异性的辨识度后,进行多重

(multiplex) SNP聚合酶链锁反应以进一步确认本发明的方法对多重SNP的辨识效果。

[0050] 在本实施例中,使用rs29232、rs401681、rs667582三种SNP进行检测。其中AT引物对混合物包含:各2.5 μ M的SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:4(rs29232)、SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:7(rs401681)、SEQ ID NO:10及SEQ ID NO:11(rs667582)。GC引物对混合液包含:各2.5 μ M的SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:3(rs29232)、SEQ ID NO:5及8(rs401681)、SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:12(rs667582)。

[0051] 在本实施例中,使用购自美国Coriell细胞存储中心的DNA样本,分别为NA12891、NA18526、NA18526以及NA18558,并经由数据库已知各样本的基因型如表五所示。

[0052] 表五、各样本的基因型

	NA12891	NA18524	NA18526	NA18558
[0053] rs29232	CC	TC	TT	TC
rs401681	CT	TT	CC	CT
rs667282	CT	TT	TT	CC

[0054] 进行实时(Real-Time)聚合酶链锁反应,反应总体积为10 μ L,包含5 μ LBio-Rad iQTM SYBR[®]Green、0.67 μ L SYBR green 320倍稀释液、2 μ L引物对混合液、2.83 μ L水及0.5 μ L的gDNA(50ng/ μ L)样本。实时(Real-Time)聚合酶链锁反应器(CFX Connect Real-Time PCR Detection System,Bio-Rad)进行,其反应条件为:95 $^{\circ}$ C反应1分钟,再以95 $^{\circ}$ C,10秒、65 $^{\circ}$ C,30秒为一循环,并重复此循环50次结束反应。

[0055] 各样本的实验结果皆与已知基因型结果一致,证实本发明用于基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应方法应用于多重SNP亦具有极高的准确率。此外,实验结果所得的Ct值,经由公式 $\Delta Ct = (AT引物对的Ct) - (GC引物对的Ct)$ 计算,结果如表六所示,SYBR green确实可有效提升等位基因特异性的辨识度,且使用多重SNP的辨识度效果佳。

[0056] 表六、各样本的 ΔCt 值

	rs29232	rs401681	rs667282
[0057] NA12891	8.80	0.13	-2.83
NA18524	-1.58	-12.49	-11.74
NA18526	-7.15	7.92	-9.43
NA18558	-1.97	-1.61	6.44

[0058] 实施例5基因型鉴定芯片测试

[0059] 本发明的用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应方法,在本实施例中使用rs29232、rs401681、rs667582、rs2072590、rs2131877五种SNP进行检测,分别进行SNP变异性位点的第一阶段扩增反应(使用SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20)以及通用引物的第二阶段扩增反应(使用SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22);再以表面固定有辨识探针(SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:27)的微数组芯片区别该SNP变异性位点的放大产物。

[0060] 其中,AT引物对混合物包含:各1.5 μ M的SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:4(rs29232)、SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:7(rs401681)、SEQ ID NO:10及SEQ ID NO:11(rs667582)、SEQ ID NO:14及SEQ ID NO:15(rs2072590)、SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:19(rs2131877)。GC引物对混合液包含:各1.5 μ M的SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:3(rs29232)、SEQ ID NO:5及SEQ ID

NO:8(rs401681)、SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:12(rs667582)、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:16(rs2072590)、SEQ ID NO:17及SEQ ID NO:20(rs2131877)。

[0061] 在本实施例中,使用购自美国Coriell细胞存储中心的DNA样本,分别为NA12891、NA18526、NA18526以及NA18559,并经由数据库已知各样本的基因型如表七所示。

[0062] 表七、各样本的基因型

	NA12891	NA18524	NA18526	NA18529
[0063] rs2072590	CC	CA	CA	CC
rs2131877	GG	AA	AA	GA
rs29232	CC	TC	TT	TC
rs401681	CT	TT	CC	CC
rs667282	CT	TT	TT	CT

[0064] 首先,进行第一阶段扩增反应,反应总体积为10 μ L,包含5 μ L ABI快速SYBR green扩增反应混合试剂、1.5 μ L SYBR green 100倍稀释液、1.5 μ L引物对混合液及2 μ L的gDNA(50ng/ μ L)样本。聚合酶连锁反应使用热循环反应器(GeneAmp[®] PCR System 9700,ABI)进行,其反应条件为:95 $^{\circ}$ C反应1分钟,再以95 $^{\circ}$ C,10秒、65 $^{\circ}$ C,30秒为一循环,并重复此循环16次,最后降至4 $^{\circ}$ C结束反应。

[0065] 接着,进行第二阶段扩增反应,反应总体积为30 μ L,包含10 μ L第一阶段扩增反应产物、10 μ L ABI快速SYBR green扩增反应混合试剂、1 μ L通用引物(10 μ M)、9 μ L水;其中AT通用引物(SEQ ID NO:21)及GC通用引物(SEQ ID NO:22)分别于两个反应中进行,代号分别为A及B。聚合酶连锁反应使用热循环反应器(GeneAmp[®] PCR System 9700,ABI)进行,其反应条件为:95 $^{\circ}$ C反应1分钟,再以95 $^{\circ}$ C,10秒、70 $^{\circ}$ C,30秒为一循环,并重复此循环30次,最后降至4 $^{\circ}$ C结束反应。将相同样本的A及B反应产物混合后进行以下芯片杂交步骤。

[0066] 将第二阶段反应物加入100 μ L杂交缓冲液(4.27M四甲基氯化铵溶液(Tetramethylammonium chloride solution)、0.9%EMPIGEN BB洗涤液、100mM Tris缓冲液(pH 8.0))及50 μ L甲酰胺(formamide)混合均匀,以80 $^{\circ}$ C加热5分钟,在于4 $^{\circ}$ C冷却5分钟。将冷却后的产物注入至表面固定有辨识探针(SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:27)的芯片,将该芯片以2rpm转速于45 $^{\circ}$ C烘箱反应至隔夜。之后进行芯片清洗步骤,再以42 $^{\circ}$ C洗涤液I(2X SSPE缓冲液,含0.1%SDS)于80rpm转速的震荡器上震荡清洗3分钟;以42 $^{\circ}$ C洗涤液II(0.1X SSPE缓冲液,含0.1%SDS)于80rpm转速的震荡器上震荡清洗3分钟;以室温洗涤液III(0.1X SSPE缓冲液)于80rpm转速的震荡器上震荡清洗5分钟;将芯片以离心机旋干。最后以一芯片荧光扫描仪进行芯片扫描步骤,本发明使用具有两支固态激光雷射波长635nm(PMT 750V)及532nm(PMT 600V)的LuxScan[™]10k/A芯片扫描仪(CapitalBio)进行扫描。再以Genepix 4.0(Axon Laboratory)进行芯片影像分析。

[0067] 经由AT(讯号强度-背景强度)/GC(讯号强度-背景强度)计算出log₂比率(ratio)值,如果为G或C同型合子(homozygote)基因型,数值会是负值;如果为A或T同型合子(homozygote)基因型数值会是正值;如果是异形合子(heterozygote)数值会介于两种同型合子中间。如表八所示,各样本的实验结果皆与已知基因型结果一致,证实本发明用于基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应方法应用于多重SNP亦具有极高的准确

率。显示本发明的用于基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应方法能有效分辨单管扩增反应中的多种SNP产物。

[0068] 表八、各样本的计算出 \log_2 比率 (ratio) 值

	<i>NA12891</i>	<i>NA18524</i>	<i>NA18526</i>	<i>NA18529</i>
rs2072590	-6.30	1.06	1.25	-6.83
rs2131877	-0.85	5.22	4.57	2.67
rs29232	-7.13	-1.11	1.91	-1.24
rs401681	1.98	4.83	-6.30	-2.96
rs667282	2.43	4.37	4.74	1.89

[0070] 此外,本发明亦可在SNP变异性位点引物组的5'端加上一修饰标记直接进行第一阶段扩增反应,不需再进行第二阶段扩增反应,或者在产物无任何修饰的情况下,也可以类似表面电浆共振 (surface plasmon resonance, SPR) 方法侦测是否有产物杂交在芯片表面。

[0071] 更进一步地,当单一SNP的基因型超过两种基因型时,如表九所示,可将等位基因特异性引物的5'端再加上密码 (barcode) 序列,以及表面固定包含密码 (barcode) 互补序列的辨识探针,扩增反应依实施例五的方法进行,最后芯片的杂交结果可看见该SNP会有两种讯号结果 (如表九A类及B类),A类辨识探针可辨识第一密码序列,B类辨识探针可辨识第二密码序列。计算A类讯号的红绿荧光强度 \log_2 比率 (ratio),判断样本是否含有A或G,或是计算B类讯号的红绿荧光强度 \log_2 比率,判断检体是否含有T或C。

[0072] 表九、基因特异性引物的5'端密码 (barcode) 序列辨识方式

基因型	A	T	G	C
反应管	1号	1号	2号	2号
加入 dCTP 种类	Cy3-dCTP	Cy3-dCTP	Cy5-dCTP	Cy5-dCTP
密码种类	第一密码序列	第二密码序列	第一密码序列	第二密码序列
芯片辨识探针种类	A类	B类	A类	B类

[0074] 综上所述,本发明提供一种用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性引物 (double allele specific primers) 的方法,该方法使用的正向 (forward) 与反向引物 (reverse) 皆以等位基因特异性位点为引物的3'端终点,不须使用特殊碱基的引物,并能容易的直接依等位基因特异性位点两旁的序列进行设计,并且结合螯合试剂 (interchelating agent) 进行多重 (multiplex) 聚合酶链锁反应。该方法能有效将目前市面上SNP芯片将扩增产物注入芯片进行杂交的前处理步骤的时间减少至5小时,并能减少合成特殊碱基引物所需的昂贵成本,且具有同时检测多个等位基因特异性位点的优点,故本发明的方法是一种有效、快速、低成本、较大规模的检测SNP变异的技术。

【序列表】

<110> 华联生物科技股份有限公司

<120> 用于辨识核苷酸基因多型性的基因型鉴定芯片的双重等位基因特异性聚合酶链锁反应的方法

<130> 104B0436-I1

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 54

[0001]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 1

gatcagcgct ctgctgtgct ctggagagat tatacttgca atgctatcaa aata

54

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 2

ccttcttcc ttcttctt cctttggaga gattatactt gcaatgctat caaatg 57

<210> 3

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

[0002]

<400> 3

ccttcttcc ttcttctt ccttaggcc accacccatg agc 43

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 4

gatcaggcgt ctgtcgtcct ctageccac cacccatgag t 41

	<210> 5	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 5	
	ccttctctcc ttccttctct ccttgacctt tccagacaac ttcagagtcc	50
	<210> 6	
[0003]	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 6	
	gatcaggcgt ctgtcgtgct cgacctatcc agacaacttc agagtct	47
	<210> 7	
	<211> 47	
	<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 7

gacagcgct ctgtcgtgct cggtgaaagc tgcttcacac catgata

47

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

[0004]

<220>

<223> 合成引物

<400> 8

cttctcttc ttcctctctt cctttctaag ctgcttcaca ccatgatg

48

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 9

ccttctctcc ttctctcctt ccttaaacta acaagctccc aggtgac

47

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 10

gatcaggcgt ctgtcgtgct ctaatctaac aagctcccag gtgat

45

[0005]

<210> 11

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 11

gatcaggcgt ctgtcgtgct cacagataca ctgaccaaca gtattcaca

49

<210> 12

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 12

ccttctctcc ttccttcctt ccttacagat acactgacca acagtattca cg 52

<210> 13

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 合成引物

<400> 13

ccttctctcc ttccttcctt ccttaacagg gaagatggta ccageg 46

<210> 14

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 14

gacagcgt ctgtcgtgct ctaagagga agatgtacc agct

44

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 15

gacagcgt ctgtcgtgct cgacgtgagc tgagctctag gga

43

[0007]

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 16

ccttcttcc ttcttctt ccttacctga gctgagctct aggge

45

<210> 17

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 17

ccttctctcc ttcttctctt cctttttgca ggcagtattt acagagcac

49

<210> 18

<211> 46

<212> DNA

[0008] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 18

gatcagcgct ctgtcgtgct ctttcagcgc agtatttaca gagcat

46

<210> 19

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

	<223> 合成引物	
	<400> 19	
	gatcaggcgt ctgtcgtgct cacggcactc tacatttaac ctctcca	47
	<210> 20	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
[0009]	<400> 20	
	ccttccttcc ttcttctt ccttaaggca ctctacattt aacctctcgg	50
	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 21	
	ccttccttcc ttcttctt cett	24

	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 22	
	gatcaggcgt ctgtcgtgct c	21
	<210> 23	
	<211> 56	
[0010]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 23	
	tttttttt agagattata ctgcaatgc tatcaaaatr ctcatgggtg gtgggg	56
	<210> 24	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 24	
	tttttttt ctatccagac aacttcagag tcyatcatgg tgtgaagcag ctttc	55
	<210> 25	
	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
[0011]	<400> 25	
	tttttttt ttctaacaag ctcccagtg aygtgaatac ttttggtcag tgtatc	56
	<210> 26	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 26	
	tttttttt gaggaagat ggtaccagck ccctagagct cagctcac	48

<210> 27

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 27

tttttttt gcaggcagta ttacagagc ayggagaggt taaatgtaga gtgc

54

