



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104450911 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201410745451.8

(22)申请日 2014.12.09

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104450911 A

(43)申请公布日 2015.03.25

(73)专利权人 上海五色石医学研究有限公司  
地址 201203 上海市浦东新区李冰路67弄  
15号

(72)发明人 赵书民 赵翊均 陈金中 周巍

(74)专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司  
31200  
代理人 陆飞 盛志范

(51)Int.Cl.  
C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

CN 103282517 A,2013.09.04,  
CN 103981254 A,2014.08.13,  
CN 104059981 A,2014.09.24,  
花茂方等.脆性X 综合征FMR1 基因CGG 重  
复序列与甲基化的检测.《中国优生与遗传杂  
志》.2012,第20卷(第6期),

审查员 田颖

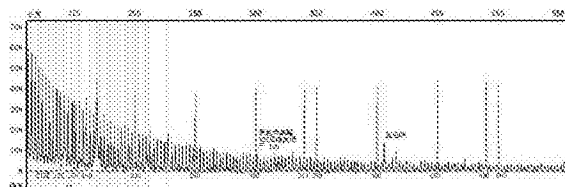
权利要求书1页 说明书6页  
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种FRA X综合症相关基因FMR1检测试剂盒  
及其应用

(57)摘要

本发明属于疾病相关基因突变检测技术领域,具体为一种FRA X综合症相关基因FMR1突变检测试剂盒及其应用。该试剂盒包含有FRAX相关基因FMR1突变检测探针组合物:PCR引物组SEQ ID NO:1和2,SEQ ID NO:1和3,SEQ ID NO:1、4和6,SEQ ID NO:1、5和6。检测步骤包括:提取检测的基因组DNA;采用HpaII酶切和对照预处理显示可能的甲基化差异,采用四色荧光PCR引物对预处理基因组DNA进行PCR扩增;然后进行毛细管电泳;根据毛细管荧光电泳曲线,分析所述基因组DNA中的FRAX相关基因的FMR1 (CGG)n长度和甲基化情况。本发明检测快速、准确、简便,适于推广应用。



1. 一种FRAX综合症相关基因FMR1突变的检测试剂盒,其特征在于,包含有FRAX相关基因FMR1突变检测探针组合物:包括第一对引物容器、第二引物容器、第三对引物容器和第四引物容器;所述第一引物容器内具有第一PCR引物对SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的干燥粉末或溶液;所述第二引物容器内具有第二PCR引物对SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3的干燥粉末或溶液;所述第三引物容器内具有第三PCR引物组SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的干燥粉末或溶液,所述第四引物容器内具有第四组PCR引物SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的干燥粉末或溶液;

其中PCR引物对分别是:SEQ ID NO:1与FAM标记SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:1与HEX标记SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:1与TAMRA标记SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:1与ROX标记SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列;为提高PCR特异性,引入SEQ ID NO:6作为SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的竞争引物;

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6用于扩增未做HpaII处理的样本;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6用于扩增HpaII预处理的样本。

## 一种FRA X综合症相关基因FMR1检测试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于疾病相关基因突变检测技术领域,具体涉及FRA X综合症相关基因FMR1突变检测试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 脆性X染色体(Fragile X, Fra X)综合征导致患者智障(Martin-Bell综合征)。本病在男性中的发病率为1/1000~1/1500,仅次于先天愚型。脆性X综合症是由于在人体内X染色体的形成过程中的突变所导致。主要表现为中度到重度的智力低下,其它常见的特征尚有身长和体重超过正常儿,发育快,前额突出,面中部发育不全,下颌大而前突,大耳,高腭弓,唇厚,下唇突出,另一个重要的表现是大睾丸症。一些患者还有多动症,攻击性行为或孤癖症,中、重度智力低下,语言行为障碍。20%患者有癫痫发作。过去曾认为由于女性有两条X染色体,因此女性携带者不会发病,但由于两条X染色体中有一条失活,女性杂合子中约1/3可有轻度智力低下。目前依然缺乏有效的治疗方法,对社会和家庭造成巨大影响。早期诊断有望获得较为主动地医学机会。

[0003] 现今在X脆性部位已发现了致病基因FMR-1,它含有(CGG)<sub>n</sub>三核苷酸重复序列,后者在正常人约为30拷贝,而在正常男性传递者和女性携带者增多到150~500bp,称为小插入,与之相邻的CpG岛未被甲基化,称为前突变(pre-mutation),携带者无或只有轻微症状。女性携带者的CGG区不稳定,在向受累后代传递过程中扩增,以致在男性患者和脆性部位高表达的女性达到1000~3000bp,相邻的CpG岛也被甲基化。这种全突变(full mutation)可关闭相邻基因的表达,从而出现临床症状。由前突变转化为完全突变只发生母亲向后代传递过程中。根据对脆性部位DNA序列的了解,现已可用细胞遗传学检测、RFLP连锁分析、DNA杂交分析、PCR扩增等方法来检出致病基因。但是现行的细胞遗传学检测、RFLP连锁分析、DNA杂交分析方法时间长,对样本需求量大,技术操作复杂,难于广泛开展。而基于PCR扩增和毛细管电泳和测序分析则因为(CGG)<sub>n</sub>的扩增难度成功率不高因而开展有限。因此,需要提供一种可靠的、方便的FRA X综合症相关基因FMR1突变检测方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的就是针对以上存在的问题与不足,提供一种FRA X综合症相关基因FMR1突变检测试剂盒及其应用。

[0005] 本发明首先提供FRAX相关基因FMR1突变检测探针组合物,其包括第一PCR引物对、第二PCR引物对、第三PCR引物对和第四PCR引物对;其中,所述第一PCR引物对是SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列,所述第二PCR引物对是SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列,所述第三PCR引物对的核苷酸序列是SEQ ID NO:1和SEQ ID:4以及竞争性引物SEQ ID NO:6;所述第四PCR引物对的核苷酸序列是SEQ ID NO:1和SEQ ID:5以及竞争性引物SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

[0006] 本发明提供的FRAX相关基因FMR1突变检测试剂盒,包含有上述FRAX相关基因FMR1

突变检测探针组合物。具体地,包括第一对引物容器、第二引物容器、第三对引物容器和第四引物容器;所述第一引物容器内具有第一PCR引物对(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2)干燥粉末或溶液;所述第二引物容器内具有第二PCR引物对(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3)干燥粉末或溶液;所述第三引物容器内具有第三PCR引物组(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6)干燥粉末或溶液,所述第四引物容器内具有第四组PCR引物(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6)干燥粉末或溶液。

[0007] 本发明提供的FRAX相关基因FMR1突变检测试剂盒在检测FRAX相关基因FMR1突变中的应用,即用于FRAX相关基因FMR1突变检测,具体步骤为:

[0008] (1)提取检测对象的基因组DNA;

[0009] (2)采用平行对照方法,取等量基因组DNA建立HpaII酶切和对照体系(即两管反应体系),HpaII酶可以切开非甲基化DNA;

[0010] (3)以经上述预处理的DNA为模板,分别建立4个PCR反应体系;把4个PCR体系扩增产物等量混合,然后进行毛细管电泳,收集数据后用GENEMAPPER软件包分析;其中,蓝色和黑色产物代表未处理DNA,反映FMR1对应区域长度(或(CGG)<sub>n</sub>拷贝数);绿色和红色产物代表甲基化可抵抗HpaII的DNA;通过比较蓝色和绿色产物峰得出甲基化情况(例如有或无甲基化);对于绿色和红色产物,因为一侧引物处于(CGG)<sub>n</sub>区,可在FMR1相应区域长度大于仪器设定量程时提供最小长度判断。

[0011] 本发明步骤(2)中,所述采用平行对照方法,取等量基因组DNA建立HpaII酶切和对照体系(即两管反应体系),其中A管仅使用HpaII酶缓冲液对照,B管使用HpaII酶切;A管DNA可以被4个引物组扩增,B管非甲基化DNA对应位点被切开,不能被扩增,而甲基化DNA保持完整可以被引物扩增。具体为:A管加入DNA模板100 ng,HpaII(NEB)缓冲液 1μL,Hpa II 0.2 μL,加水到10μL, 37°C 2Hr;80°C,20 min;B管加入DNA模板100 ng,HpaII(NEB)缓冲液 1μL,加水到10μL, 37°C 2Hr;80°C,20 min。

[0012] 本发明中,步骤(3)中所述分别建立4个PCR反应体系,具体为:

[0013] 第1管反应体系:

[0014] A管处理模板 1 μL

[0015] KOD-FX酶 1单位

[0016] 2× KOD-FX 缓冲液 5 μL

[0017] 2.5 mM dNTPs 1 μL

[0018] 第一对引物混合物 1 μL

[0019] 加水到10 μL;

[0020] 第2管反应体系:

[0021] B管处理模板 1 μL

[0022] KOD-FX酶 1单位

[0023] 2× KOD-FX 缓冲液 5 μL

[0024] 2.5 mM dNTPs 1 μL

[0025] 第二对引物混合物 1 μL

[0026] 加水到10 μL;

[0027] 第3管反应体系:

- [0028] A管处理模板 1  $\mu$ L
- [0029] KOD-FX酶 1单位
- [0030] 2 $\times$  KOD-FX 缓冲液 5  $\mu$ L
- [0031] 2.5 mM dNTPs 1  $\mu$ L
- [0032] 第三组引物混合物 1  $\mu$ L
- [0033] 加水到10  $\mu$ L;
- [0034] 第4管反应体系:
- [0035] B管处理模板 1  $\mu$ L
- [0036] KOD-FX酶 1单位
- [0037] 2 $\times$  KOD-FX 缓冲液 5  $\mu$ L
- [0038] 2.5 mM dNTPs 1  $\mu$ L
- [0039] 第四组引物混合物 1  $\mu$ L
- [0040] 加水到10  $\mu$ L;
- [0041] 反应条件:KOD-FX,98 $^{\circ}$ C 2分钟;98 $^{\circ}$ C 20秒、68 $^{\circ}$ C 4分钟共40个循环;68 $^{\circ}$ C保温60分钟。
- [0042] 本发明设计巧妙,检测快速、准确、简便,从而可作为医师诊断、治疗和用药的参考依据,适于大规模推广应用。

### 附图说明

- [0043] 图1:FRAX相关基因FMR1突变检测引物设计图。附图采用(CGG)<sub>20</sub>的FMR1基因序列,引物(P1-P6)序列、修饰与方向标注于对应区段。HpaII位点用下划线标注。
- [0044] 图2:FMR1突变检测代表性结果图。上方横坐标代表长度(碱基数),纵坐标荧光强度(峰高),样本检测结果:蓝色出现扩增峰,长度411,(CGG)<sub>n</sub>拷贝数等于62[(411-225)/3]。黑色衰减锯齿峰在325后峰高低于100,对应(CGG)<sub>n</sub>拷贝数等于66[(325-123)/3]。代表甲基化的绿色和红色峰未出现。结果解读为(CGG)<sub>n</sub>拷贝数低于200,未见甲基化,FMR1基因检测区域正常。

### 具体实施方式

- [0045] 为更好的理解本发明的内容,下面结合具体实施例作进一步说明。应理解,下列具体实施例仅仅用于说明本发明,而不是对本发明的限制。
- [0046] 实施例1:DNA制备
- [0047] (1)测试用HEK293基因组DNA制备
- [0048] 常规培养收集10<sup>6</sup>个HEK293细胞(ATCC),用Qiagen基因组小量抽提试剂盒抽提基因组DNA,浓度调节到20 ng/ $\mu$ L作为正常参照品。
- [0049] 实施例2:FRA(X)突变基因扩增引物和竞争性引物设计合成
- [0050] 根据FMR1 (CGG)<sub>n</sub>以及周边设计合成引物,FMR1 (CGG)<sub>n</sub> 5'侧翼远侧(涵盖HpaII甲基化敏感序列)基因特异性引物为SEQ ID NO:1;FMR1 (CGG)<sub>n</sub> 3'侧翼远侧(涵盖Hpa II甲基化敏感序列)基因特异性引物为SEQ ID NO:2,并标记FAM荧光染料;FMR1 (CGG)<sub>n</sub> 3'侧翼远侧(涵盖HpaII甲基化敏感序列)基因特异性引物为SEQ ID NO:3,并标记HEX荧光染料。位



[0056] (1)DNA HpaII酶切反应;

[0057] A管加入DNA模板100 ng,HpaII(NEB)缓冲液 1μL,Hpa II 0.2 μL,加水到10μL, 37°C 2Hr;80°C,20 min。

[0058] B管加入DNA模板100 ng,HpaII(NEB)缓冲液 1μL,加水到10μL, 37°C 2Hr;80°C, 20 min。

[0059] (2)FMR1基因突变扩增

[0060] 第1管反应体系:A管处理模板1 μL,KOD-FX酶 1单位,2× KOD-FX缓冲液 5 μL, 2.5 mM dNTPs 1 μL,第一管引物混合物1 μL,加水到10 μL。

[0061] 第2管反应体系:B管处理模板1 μL,KOD-FX酶 1单位,2× KOD-FX缓冲液 5 μL, 2.5 mM dNTPs 1 μL,第二管引物混合物1 μL,加水到10 μL。

[0062] 第3管反应体系:A管处理模板1 μL,KOD-FX酶 1单位,2× KOD-FX缓冲液 5 μL, 2.5 mM dNTPs 1μL,第三管引物混合物1 μL,加水到10 μL。

[0063] 第4管反应体系:B管处理模板1 μL,KOD-FX酶 1单位,2× KOD-FX缓冲液 1 μL, 2.5 mM dNTPs 1μL,第四管引物混合物1 μL,加水到10 μL。

[0064] 反应条件:KOD-FX,98°C 2分钟;98°C 20秒、68°C 4分钟共40个循环,68度保温60分钟。

[0065] (3)FMR1基因突变扩增产物电泳与结果读取

[0066] 毛细管电泳:第1、2、3、4管扩增产物各取1 μL,加水到10 μL;取1 μL混合物加入10 μL含Liz600(AB)分子量标准的HID中,采用E5光谱标准,常规毛细管电泳。

[0067] 电泳结果读取:电泳文件导入GENEMAPPER 4.0 (AB),读取电泳数据。结果包括以下几种情况(表2):

[0068] 表2:FMR1突变检测结果判断

	反应情况	长度判断 (CGG) <sub>n</sub>
[0069] 甲基化	蓝色有信号; 绿色有信号; 黑色有信号, 衰减锯齿波; 红色有信号, 衰减锯齿波	蓝色、绿色判断: (CGG) <sub>n</sub> = (长度-225) /3; 黑色、红色判断: (CGG) <sub>n</sub> = (长度-123) /3
	蓝色有信号; 绿色无信号; 黑色有信号, 衰减锯齿波; 红色无信号	蓝色判断: (CGG) <sub>n</sub> = (长度-225) /3; 黑色判断: (CGG) <sub>n</sub> = (长度-123) /3

[0070] 本发明采用HpaII对照处理检材基因组DNA,并使用不同荧光标记PCR引物分别扩增,从而可以得出FMR1与FRA(X)相关的两个突变基因型—(CGG) <sub>n</sub>扩增数量和甲基化程度。为避免扩增长度大于仪器量程,设计针对(CGG) <sub>n</sub>的扩增引物,并同时使用竞争性引物提高(CGG) <sub>n</sub>扩增引物特异性,确保可以得出(CGG) <sub>n</sub>的最小界值。依据以上数据可以对95%以上的FRA(X)做出基因型判断。

[0071] 本发明提出的FMR1的2个基因位点检测引物,分位点包装为4管,单引物探针浓度

为0.1到0.5 $\mu$ M,设计为10倍浓度,使用时终浓度为1倍浓度。

[0072] 本发明提供的试剂可以在具有PCR和遗传分析仪的实验室完成,检测时间仅仅需要3到5个小时;检测仪器(如AB 9700 PCR仪,AB 3500DX毛细管电泳)获得SFDA认证;结果判读直观可靠;该发明可以稳定实施,具备在大规模推广的技术条件。

[0073] 因此,本发明的FMR1基因突变检测方法可以使用PCR仪、毛细管电泳仪以及配套试剂,通过扩增检测2个FMR1常见突变,可在3到5个小时内得出检测结果(CGG) $n$ 长度特性以及基因甲基化程度。该发明提供的试剂可以方便地在生物技术公司生产以及在生物医学检测机构用于检测,具备产业化推广的条件。

[0074] 综上所述,本发明的FMR1基因突变检测,设计巧妙,且检测快速、准确、简便,适于大规模推广应用。

[0075] 在此说明书中,本发明已参照其特定的实施例作了描述。但是,很显然仍可以作出各种修改和变换而不背离本发明的精神和范围。因此,说明书和附图应被认为是说明性的而非限制性的。



- [0001] <110>申请人 :上海五色石医学研究有限公司
- [0002] <120> 一种FRA X综合症相关基因FMR1检测试剂盒及其应用
- [0003] <160>6
- [0004] <210>1
- [0005] <211>30
- [0006] <212> DNA
- [0007] <213>人工序列
- [0008] <220>
- [0009] <221>misc\_feature
- [0010] <222> (1) ... (30)
- [0011] <223>人FRA(X)相关基因FMR1基因的突变检测的上游引物
- [0012] <400>1
- [0013] gctcagctcc gtttcggttt cacttccggt 30
- [0014] <210>2
- [0015] <211>26
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213>人工序列
- [0018] <220>
- [0019] <221>misc\_feature
- [0020] <222> (1) ... (26)
- [0021] <223>人FRA(X)相关基因FMR1基因的突变检测的下游引物,5`端FAM标记
- [0022] <400>2
- [0023] aagcgccatt ggagccccgc acttcc 26
- [0024] <210>3
- [0025] <211>26
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213>人工序列
- [0028] <220>
- [0029] <221>misc\_feature
- [0030] <222> (1) ... (26)
- [0031] <223>人FRA(X)相关基因FMR1基因的突变检测的下游引物,5`端HEX标记
- [0032] <400> 3
- [0033] aagcgccatt ggagccccgc acttcc 26
- [0034] <210>4
- [0035] <211>31
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213>人工序列
- [0038] <220>

- [0039] <221>misc\_feature  
[0040] <222> (1) ... (31)  
[0041] <223>人FRA(X)相关基因FMR1基因的(CGG)n突变检测的下游引物,5`端TAMRA标记  
[0042] <400>4  
[0043] cgctcgaggc ccagccgccg ccgcccgcgc c 31  
[0044] <210>5  
[0045] <211>31  
[0046] <212> DNA  
[0047] <213>人工序列  
[0048] <220>  
[0049] <221>misc\_feature  
[0050] <222> (1) ... (31)  
[0051] <223>人FRA(X)相关基因FMR1基因的(CGG)n突变检测的下游引物,5`端ROX标记  
[0052] <400>5  
[0053] cgctcgaggc ccagccgccg ccgcccgcgc c 31  
[0054] <210>6  
[0055] <211>31  
[0056] <212> DNA  
[0057] <213>人工序列  
[0058] <220>  
[0059] <221>misc\_feature  
[0060] <222> (1) ... (31)  
[0061] <223>人FRA(X)相关基因FMR1基因的(CGG)n突变检测的竞争性引物,3`端双脱氧  
标记  
[0062] <400> 6  
[0063] gacggcggcg gcggcggtg ggcctcgagc g 31

