



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111088329 A

(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201911323640.5

(22)申请日 2019.12.20

(71)申请人 苏州阅微基因技术有限公司
地址 215011 江苏省苏州市高新区锦峰路8号15号楼312室

(72)发明人 于在亮 杨凡 郑玉 高运通
李逸凡 陈初光 张蕊

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6858(2018.01)

C12Q 1/6888(2018.01)

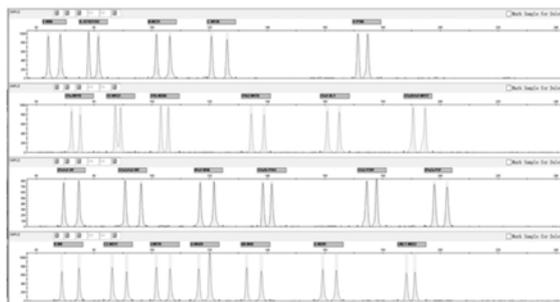
权利要求书1页 说明书15页
序列表12页 附图7页

(54)发明名称

荧光复合扩增体系、试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种荧光复合扩增体系、试剂盒及其应用,所述的荧光复合扩增体系包括多对特异引物,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1-71所示,并将所述的荧光复合扩增体系制作试剂盒,将所述制备的试剂盒应用于法医DNA分析和祖源分析中。本发明所提供的Y-SNP包含了众多单倍群,对于男性群体区分度高,试剂盒独特新颖,信息量大,兼容性好。



1. 一种荧光复合扩增体系,其特征在于:包括多对特异引物,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1-71所示。

2. 根据权利要求1所述的荧光复合扩增体系,其特征在于:包括浓度为0.05-0.3 μ M的所述多对特异引物。

3. 根据权利要求1所述的荧光复合扩增体系,其特征在于:所述的特异引物对应于男性Y染色体上的24个SNP位点,所述的24对特异引物同时扩增24个SNP位点。

4. 根据权利要求1所述的荧光复合扩增体系,其特征在于:还包括
荧光标记素,位于所述特异引物对中其中一条引物的5'端;
PCR预混液,包括硫酸铵,氯化钾,BSA,DMSO,甜菜碱,pH约为8.0的Tris-HCl,镁离子,dNTP和Taq DNA聚合酶组成的混合溶液。

5. 根据权利要求4所述的荧光复合扩增体系,其特征在于:所述的荧光标记素选自FAM、HEX、TAMRA或ROX中的任一种,包括将所述的多对特异引物对划分为四组,每组特异引物对所选用的荧光标记素各不相同。

6. 根据权利要求4所述的一种荧光复合扩增体系,其特征在于:所述PCR预混液包括:
2.5mM硫酸铵,50 mM氯化钾,0.3mg/ml BSA,6.00% DMSO,100mM-120 mM甜菜碱,35 mM pH 8.0的Tris-HCl,1.5mM-2 mM镁离子,0.2mM dNTP以及1U Taq DNA聚合酶。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的一种荧光复合扩增体系,其特征在于,所述扩增体系扩散时反应条件为:第1步:95 $^{\circ}$ C预变性5-10分钟,第2步:94 $^{\circ}$ C变性20-30秒,第3步57-62 $^{\circ}$ C退火90秒,重复2至3步至少28次,最后在60 $^{\circ}$ C延伸30-60分钟。

8. 一种试剂盒,其特征在于:包括如权利要求1-7任一项所述的荧光复合扩增体系。

9. 应用权利要求8所述的试剂盒进行法医DNA分析的方法,包括以下步骤:

将分析样本直接置于试剂盒进行扩增;

采用毛细管电泳法进行荧光检测获取扩增结果。

10. 应用权利要求8所述的试剂盒进行祖源分析的方法,包括以下步骤:

将分析样本直接置于试剂盒进行扩增;

采用毛细管电泳法进行荧光检测获取扩增结果。

荧光复合扩增体系、试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种荧光复合扩增体系、试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 目前DNA检测技术已经广泛应用于法医DNA分析、亲缘关系鉴定、细胞系鉴定、医学遗传学、人类学等领域。而应用最广泛的DNA分析即为遗传标记的分析,多数的DNA分析方法的核心技术在于片段长度多态性和序列多态性的分析。

[0003] SNP研究是人类基因组计划走向应用的重要步骤。这主要是因为SNP将提供一个强有力的工具,用于高危群体的发现、疾病相关基因的鉴定、药物的设计和测试以及生物学的基础研究等。SNP在基因组中分布相当广泛,研究表明在人类基因组中每300碱基对就出现一次。大量存在的SNP位点,使人们有机会发现与各种疾病,包括肿瘤相关的基因组突变;从实验操作来看,通过SNP发现疾病相关基因突变要比通过家系来得容易;有些SNP并不直接导致疾病基因的表达,但由于它与某些疾病基因相邻,而成为重要的标记。SNP在基础研究中也发挥了巨大的作用,通过对Y染色体SNP的分析,使得在人类进化、人类种群的演化和迁徙领域取得了一系列重要成果。

[0004] 与Y-STR相比,Y-SNP具有高度稳定性。SNPs包括了人类基因组已知多态性的80%,是最常见的遗传变异类型。由于Y-SNP高度稳定,祖先突变产生的基因型会长久地保留在后代基因组中,因而可以利用Y-SNP识别人群的亲缘/共祖关系。

[0005] 传统的SNP检测方法有测序法、限制性酶切片段长度多态性、单链构象多态性、等位基因特异的寡聚核苷酸杂交等技术。高通量的分析方法有Taqman法、DNA芯片分析、变性高效液相色谱、引物延伸结合实践飞行质谱等。

[0006] 目前国内检测SNP位点大多使用芯片分析或测序等方法,检测时间长,价格昂贵;用于体外诊断的SNP位点检测多用Taqman探针法,操作简便,但是单管检测价格昂贵,难以用于法医建库中。AB有一款SNP与法医结合的试剂盒SNaPshot,进行单碱基延伸反应,用3730测序仪检测,解决了耗时长长的特点,但是从客户操作上来说较为复杂,进口试剂价格昂贵,推广难度大,同样无法应用于DNA建库。

[0007] 本发明采用的ARMS-PCR(等位基因特异性扩增法)于1989年建立,是PCR技术应用的发展,也称为扩增阻碍突变系统(amplification refractory mutation system,ARMS)、等位基因特异性PCR(allele-specific PCR,ASPCR)等,用于对已知突变基因进行检测。目前,突变扩增阻滞系统已成为国际上肿瘤个性化分子检测最重要、最先进的技术之一,其在临床应用中的优势已被业内专家广泛认可。

[0008] 同一位点通过设计两条5'端长度不同的正向引物,其中一条引物3'端与正常DNA互补,另一条引物3'端与突变DNA互补,反应体系中同时加入这两种正向引物及它们共用的反向引物进行两个平行PCR,与所检测DNA完全互补的引物才可延伸并得到PCR扩增产物,如果错配位于引物的3'端则导致PCR不能延伸。

发明内容

[0009] 针对上述问题,本发明提出一种荧光复合扩增体系、试剂盒及其应用。

[0010] 实现上述技术目的,达到上述技术效果,本发明通过以下技术方案实现:

[0011] 本发明所制作的一种荧光复合扩增体系,是在基于对男性Y染色体上的SNP位点所设计的多对特异引物,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1-71所示。

[0012] 进一步,荧光复合扩增体系中包括浓度为0.05-0.3 μ M的所述多对特异引物。

[0013] 进一步,所述的特异引物对应于男性Y染色体上的24个SNP位点,所述的24对特异引物同时扩增24个SNP位点;

[0014] 进一步,荧光复合扩增体系中还包括荧光标记素,位于所述特异引物对中其中一条引物的5'端;和PCR预混液,包括硫酸铵,氯化钾,BSA,DMSO,甜菜碱,pH约为8.0的Tris-HCl,镁离子,dNTP和Taq DNA聚合酶组成的混合溶液。

[0015] 进一步,所述的荧光标记素选自FAM、HEX、TAMRA或ROX中的任一种,包括将所述的多对特异引物对划分为四组,每组特异引物对所选自的荧光标记素各不相同。

[0016] 进一步,所述PCR预混液包括:2.5mM硫酸铵,50mM氯化钾,0.3mg/ml BSA,6.00% DMSO,100mM-120mM甜菜碱,35mM pH 8.0的Tris-HCl,1.5mM-2mM镁离子,0.2mM dNTP以及1U Taq DNA聚合酶。

[0017] 进一步,所述扩增体系扩散时反应条件为:第1步:95 $^{\circ}$ C预变性5-10分钟,第2步:94 $^{\circ}$ C变性20-30秒,第3步57-62 $^{\circ}$ C退火90秒,重复2至3步至少28次,最后在60 $^{\circ}$ C延伸30-60分钟。

[0018] 基于以上所述的扩增体系,本发明还发明的目的是将通过采用以上的扩增体系制作一种试剂盒,并通过使用该试剂盒应用在法医DNA分析以及祖源分析中。

[0019] 本发明中,应用该试剂盒进行法医DNA分析或祖源分析,包括以下步骤:

[0020] 将分析样本直接置于试剂盒进行扩增;

[0021] 采用毛细管电泳法进行荧光检测获取扩增结果。

[0022] 本发明的有益效果:

[0023] (1) 本发明所提供的Y-SNP包含了众多单倍群,对于男性群体区分度高,试剂盒独特新颖,信息量大,兼容性好。

[0024] (2) 本发明采用多重PCR-毛细管电泳的检测平台,单管扩增多个位点,检测周期短,成本低。采用双荧光标记,避免出现假阳性信号,检测准确。

[0025] (3) 更高的样本适用性,适用于多种免提型检材,血液,血卡,唾液卡,头发等均可以直接扩增。

[0026] (4) 物种特异性强,应用该体系扩增了包括猪,牛,羊,鸡,鸭,马,大鼠,小鼠,格子,犬及猴源细胞均没有检测出特异性扩增。

[0027] (5) 系统特异性和稳定性好,经过反复验证多次,无非特异扩增产物产生,信号强度稳定。

[0028] (6) 灵敏度高,低至0.0625ng的DNA模板量可以得到准确分型。

[0029] (7) 女性模板不出峰,男/女样本比例为1/800时,可准确检测出男性样本。

附图说明

- [0030] 图1为采用国际标准品通过PCR-毛细管电泳平台所测得的扩增效果图；
 [0031] 图2为采用等位基因分型标准物通过PCR-毛细管电泳平台所测得的扩增效果图；
 [0032] 图3为采用基因组DNA样本通过PCR-毛细管电泳平台所测得的扩增效果图；
 [0033] 图4为采用全血样本通过PCR-毛细管电泳平台所测得的扩增效果图；
 [0034] 图5为采用血卡样本通过PCR-毛细管电泳平台所测得的扩增效果图；
 [0035] 图6为采用唾液卡样本通过PCR-毛细管电泳平台所测得的扩增效果图；
 [0036] 图7为采用带毛囊毛发样本通过PCR-毛细管电泳平台所测得的扩增效果图；
 [0037] 图8为猴源细胞检测的扩增效果图；
 [0038] 图9为反复冻融测试的结果图；
 [0039] 图10为灵敏度测试的结果图；
 [0040] 图11为男女混合样本测试的结果图。

具体实施方式

[0041] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0042] 下面结合附图对本发明的应用原理作详细的描述。

[0043] 本发明对男性人群的Y-SNP位点的遗传多态性进行了深入的研究，基于Y-DNA Haplogroup Tree 2018家系树划分确定了以下24个位点，这些位点包含了众多单倍群，其中有上游分支D、E、C、F，也有下游O、N、P等。24个YSNP位点所属单倍群及突变信息见下表1：

[0044] 表1

[0045]

序列编号	单倍群	突变信息
------	-----	------

[0046]

rs9306841	C-M130	C->G
rs2267802	D-JST021355	A->G
rs9341278	E-M96	G->A
rs35284970	O-P186	C->T
rs16981290	N-M231	C->A
rs72613040	O1a-M119	T->G
rs78149062	O1b-M268	A->G
rs13447443	O1b2-M176	A->G
rs11575897	O2-M122	G->A
rs17276338	O2a1-KL1	G->T
rs759551978	O2a2b1a1-M117	ins->del -4 bp
rs3212291	D1a1a1-N1	C->G
rs3898	N1a1-M46	C->G
rs34442126	D1a2a-P47	T->C
rs17316007	O2a2-P201	A->G
rs2267801	O2a2a1a2-M7	T->C
rs868302452	O2a2b-P164	C->T
rs3900	G-M201	C->G
rs2032668	IJKLT-M522	A->C
rs2032597	IJ-M429	A->C
rs17306671	K-M9	T->A
rs2032631	QR-M45	G->A
rs2032636	C2-M217	G->T
rs9786714	I-M170	G->A

[0047] 基于分析的基因序列,依次确认以下实验参数条件

[0048] 1) 特征引物设计:

[0049] 所述的特征引物采用Primer Premier 5和NCBI Blast等软件设计而成,设计引物时应尽量确保各引物的T_m值在(59±2)℃的范围内。同一位点通过设计两条5'端长度不同

的正向引物,其中一条引物3'端与正常DNA互补,另一条引物3'端与突变DNA互补,反应体系中同时加入这两种正向引物及它们共用的反向引物进行两个平行PCR,与所检测DNA完全互补的引物才可延伸并得到PCR扩增产物,如果错配位于引物的3'端则导致PCR不能延伸。ARMS和ASPCR借鉴多重PCR原理,可在同一系统中同时检测两种或多种等位基因突变位点。所设计的24对特征引物的核苷酸序列的具体信息如下表2。

[0050] 表2:24对特征引物的核苷酸序列

序列编号	引物	引物序列
rs9306841	F1	TTAATATTATACCTGAGTGTTTATCC
	F2	GTTTGTTAATATTATACCTGAGTGTTTATCG
	R	AGTGAGCTGTGATGTGTAACCTG
rs2267802	F1	CCCATTTTATCTATCTATAGAAACCTCTA
	F2	GAAACCCATTTTATCTATCTATAGAAACCTCTG
	R	ACAAAAGAATCAGGGTAGAAATTA
rs9341278	F1	GTCAACATTTACTGTTTCTACTGCTTACA
	F2	GTTTCTCAACATTTACTGTTTCTACTGCTTACG
	R	CATCCAGTACAGCAAGTTTATTCGT
rs35284970	F1	GGGCAATAAACCTTGGATTTC
	F2	GTTTCTGGCAATAAACCTTGGATTCT
	R	AGAAAAAAGATATGCTGCTACTGC
rs16981290	F1	ACCTGAAATTTTCTGGGGATCA
	F2	GTTTCTGAAATTTTCTGGGGATCC
	R	ATAAAGTCTTACCATGTTGCCACC
rs72613040	F1	TTATTCCAATTCAGCATACTAGACT
	F2	GTTTTATTCCAATTCAGCATACTAGCCG
	R	GTGCTATGTGTTTATTTGGGGAGAC
rs78149062	F1	TTCAGATTTTCCCCTGAGATCG
	F2	GTTTCAGATTTTCCCCTGAGAACA
	R	ACTTGGTAAACTCTACTTAGTTGCCTT

[0051]

[0052]

	F1	CATGTAACAGAATCCACTTTAAATTAT
rs13447443	F2	ACCATGTAACAGAATCCACTTTAAATTAC
	R	TTTTTGATCTTAGAAAGGAAACGAG
	F1	ACCTGTTGTCCAGTTGCACTTGG
rs11575897	F2	TCTTACCTGTTGTCCAGTTGCACTTGA
	R	ATTACAGGCCATGCACAGAGAGAAA
	F1	TAGGTTGCTAGAATTGCACATTC
rs17276338	F2	GTTTTAGGTTGCTAGAATTGCACAGTA
	R	GTGCTGGCAAAAATCTCTTCACTAA
	F	CTTAAGTATGACTTATGAAGTACGAAGA
rs759551978	R	GTTAAAATTGACAGTTATCAGTTTGAAT
	F1	GTTGGCTGGGATTTTC
rs3212291	F2	GTATAGTTGGCTTGGGATTTTG
	R	GCAACTATTCAAGCTACTACCTTAAAG
	F1	TCTGTATGTCAGATCTAACAAC
rs3898	F2	TCCTCTGTATGTCAGATCTAACAAG
	R	TCCCTGCAGCCTTGTGATCC
	F1	TCTGAGTGTAGACTTGTGAATCTT
rs34442126	F2	TTCTTTCTGAGTGTAGACTTGTGAATTAAC
	R	AAGCATAATTGAGAAGGTGCCGTAA
	F1	CTTTGGAACTCTGCCTCTAAT
rs17316007	F2	GATCTTTGGAACTCTGCCTCTCAC
	R	AGGGATCAGAAGGATAGGTATG
	F1	TGAGAGCCAGTTAAAGCCAG
rs2267801	F2	GTTTTGAGAGCCAGTTAAAGCCAA
	R	AGTAGCCATAATGCCTGATTTGTTT
	F1	CAATCTGCTGCACTCCAGTC
rs868302452	F2	TTCTCAATCTGCTGCACTCCGATT

	R	CAGTCGTCACCCTCTCTGAGATAAC
	F1	GGCCTAAGATGGTTGATTG
rs3900	F2	TTAAACGGCCTAAGATGGTTGATTG
	R	ATGTAAGACATTGAACGTTTGAACA
	F1	TGAAAAAGTTGGGTGACACA
rs2032668	F2	GTTCTTGAAAAAGTTGGGTGACGCC
	R	CGTAAGCATTGATAAAGCTGCTG
	F1	TTTATTACTTAAAAATCATTGTCA
rs2032597	F2	TCTATTTTATTACTTAAAAATCATTGTCC
	R	CAATTACTTTCAACATTTAAGACC
	F1	GTGCAATGCACATTAATTGT
[0053] rs17306671	F2	GTTTGTGCAATGCACATTAATTGA
	R	ATAAATGTTTCATGTCCTATGTGGCA
	F1	GGCAGTGAAAAATTATAGATAA
rs2032631	F2	TTATTGGCAGTGAAAAATTATAGAAAG
	R	TGATGAGCAACAGTTGTGACAG
	F1	GATCTAATAATCCAGTATCAACTGATGG
rs2032636	F2	GTTTCGATCTAATAATCCAGTATCAACTGACGT
	R	CACTAAACATCATGGTGTGACGAAC
	F1	GCTACTACGCCTCTCTTGACGA
rs9786714	F2	GTTTGCTACTACGCCTCTCTTGACCG
	R	AGAGACTGGTCATTGCAGAGGTACT

[0054] 其中,F1指代正向引物1,F2指代正向引物2,R指代反向引物。

[0055] 2) 五色荧光标记的确定

[0056] 本发明采用了五色荧光标记技术,选择了FAM、HEX、TAMRA、ROX、ORG建立五色荧光复合扩增体系。其中,所述ORG为内标所选用的荧光素。

[0057] 所述扩增体系中的被扩增基因座分别由四种颜色的荧光标记,相同荧光标记视为同一组,四组组合分别为:rs9306841、rs2267802、rs9341278、rs35284970、rs16981290为第一组;rs72613040、rs78149062、rs13447443、rs11575897、rs17276338、rs759551978为第二组;rs3212291、rs3898、rs34442126、rs17316007、rs2267801、rs868302452为第三组;rs3900、rs2032668、rs2032597、rs17306671、rs2032631、rs2032636、rs9786714为第四组。

[0058] 所述第一组采用采用FAM标记,第二组采用HEX标记,第三组采用TAMRA标记,第四

组采用ROX标记,所述荧光标记位于特异引物对中其中一条引物的5'端。对所述24对特异荧光引物如下表3:

[0059] 表3

序列编号	突变信息	引物	引物长度	产物碱基数目	荧光标记素
rs9306841	C->G	F1	27	71-76	FAM
		F2	32		
		R	23		
rs2267802	A->G	F1	29	86-90	FAM
		F2	33		
		R	25		
rs9341278	G->A	F1	29	112-117	FAM
		F2	34		
		R	25		
rs35284970	C->T	F1	22	131-137	FAM
		F2	28		
		R	25		
rs16981290	C->A	F1	23	181-185	FAM
		F2	27		
		R	25		
rs72613040	T->G	F1	24	81-85	HEX
		F2	28		
		R	25		
rs78149062	A->G	F1	22	96-98	FAM
		F2	24		

[0060]

[0061]

		R	27		HEX
		F1	27		
rs13447443	A->G	F2	29	112-114	
		R	25		HEX
		F1	23		
rs11575897	G->A	F2	27	143-147	
		R	25		HEX
		F1	23		
rs17276338	G->T	F2	27	171-175	
		R	25		HEX
		F	29		
rs759551978	ins->del -4 bp	R	29	190-194	HEX
		F1	18		
rs3212291	C->G	F2	23	77-82	
		R	27		TAMRA
		F1	22		
rs3898	C->G	F2	27	91-96	
		R	20		TAMRA
		F1	25		
rs34442126	T->C	F2	30	121-126	
		R	25		TAMRA
		F1	22		
rs17316007	A->G	F2	25	141-144	
		R	22		TAMRA
		F1	20		
rs2267801	T->C	F2	24	176-180	
		R	25		TAMRA
		F1	20		
rs868302452	C->T	F1	20	197-202	

		F2	25		
		R	25		TAMRA
		F1	19		
rs3900	C->G	F2	25	70-76	
		R	25		ROX
		F1	20		
rs2032668	A->C	F2	25	91-96	
		R	24		ROX
		F1	26		
rs2032597	A->C	F2	31	107-114	
		R	24		ROX
[0062]		F1	20		
rs17306671	T->A	F2	24	118-122	
		R	25		ROX
		F1	22		
rs2032631	G->A	F2	27	137-142	
		R	22		ROX
		F1	28		
rs2032636	G->T	F2	33	162-167	
		R	25		ROX
		F1	22		
rs9786714	G->A	F2	26	187-192	
		R	25		ROX

[0063] 基于五色荧光标记技术确定荧光复合扩增体系或试剂盒中各特征引物浓度的具体过程为：

[0064] 得到荧光标记引物后，用其相配对的非荧光引物组合，然后分别进行单重扩增，将扩增产物置于3500遗传分析仪上进行毛细管电泳，根据毛细管电泳检测的结果来评估每对引物的扩增效率。

[0065] 其后，将同一位点的野生型及突变型引物混合置于同一管中扩增，将扩增产物置于3500遗传分析仪上进行毛细管电泳，根据毛细管电泳结果确定野生型及突变型引物的特异性及扩增效率。

[0066] 确定同一位点的野生型及突变型引物后，将同一荧光标记的所有引物混合置于同

一管中扩增,将扩增产物置于3500遗传分析仪上进行毛细管电泳,根据毛细管电泳检测的结果来确定每对引物的扩增效率,以及判断该组引物混合扩增是否引起非特异性。

[0067] 最后,根据单重扩增及组合扩增的毛细管电泳结果来初步确定各引物对的加入量,将24对引物混合置于同一管中扩增,再根据复合扩增的电泳结果来调整各自的浓度,使各引物对的扩增效率(反应在电泳结果的峰高上)基本一致为准。所确定的特征引物的浓度如表4所示:

[0068] 表4

序列标号	引物	引物序列	引物浓度 (μM)
	F1	TTAATATTATACCTGAGTGTTTATCC	0.07
rs9306841	F2	GTTTGTTAATATTATACCTGAGTGTTTATCG	0.1
	R	AGTGAGCTGTGATGTGTAACCTG	0.1
	F1	CCCATTTTATCTATCTATAGAAACCTCTA	0.1
rs2267802	F2	GAAACCCATTTTATCTATCTATAGAAACCTCTG	0.12
	R	ACAAAAGAATCAGGGTAGAAATTAA	0.15
	F1	GTCAACATTTACTGTTTCTACTGCTTACA	0.1
[0069] rs9341278	F2	GTTTCTTCAACATTTACTGTTTCTACTGCTTACG	0.09
	R	CATCCAGTACAGCAAGTTTATTCGT	0.12
	F1	GGGCAATAAACCTTGGATTTC	0.07
rs35284970	F2	GTTTCTTGGCAATAAACCTTGGATTTCT	0.09
	R	AGAAAAAAGATATGCTGCTACTGC	0.09
	F1	ACCTGAAATTTTCTGGGGATCA	0.15
rs16981290	F2	GTTTCTGAAATTTTCTGGGGATCC	0.12
	R	ATAAAGTCTTACCATGTTGCCACC	0.15
rs72613040	F1	TTATTCCAATTCAGCATAACAGACT	0.13

[0070]

	F2	GTTTTATTCCAATTCAGCATACAGCCG	0.13
	R	GTGCTATGTGTTTATTGGGGAGAC	0.13
	F1	TTCAGATTTTCCCCTGAGATCG	0.1
rs78149062	F2	GTTTCAGATTTTCCCCTGAGAACA	0.1
	R	ACTTGGTAAACTCTACTTAGTTGCCTT	0.12
	F1	CATGTAACAGAATCCACTTTAAATTAT	0.23
rs13447443	F2	ACCATGTAACAGAATCCACTTTAAATTAC	0.25
	R	TTTTTGATCTTAGAAAGGAAACGAG	0.25
	F1	ACCTGTTGTCCAGTTGCACTTGG	0.08
rs11575897	F2	TCTTACCTGTTGTCCAGTTGCACTTGA	0.12
	R	ATTACAGGCCATGCACAGAGAGAAA	0.15
	F1	TAGGTTGCTAGAATTGCACATTC	0.13
rs17276338	F2	GTTT TAGGTTGCTAGAATTGCACAGTA	0.13
	R	GTGCTGGCAAAAATCTCTCACTAA	0.15
	F	CTTTAAGTATGACTTATGAAGTACGAAGA	0.11
rs759551978	R	GTAAAAATTGACAGTTATCAGTTTGAAAT	0.11
	F1	GTTGGCTTGGGATTTTTC	0.21
rs3212291	F2	GTATAGTTGGCTTGGGATTTTTC	0.25
	R	GCAACTATTCAAGCTACTACCTTAAAG	0.25
	F1	TCTGTATGTCAGATCTAACAAC	0.15
rs3898	F2	TCCTCTCTGTATGTCAGATCTAACAAG	0.16
	R	TCCCTGCAGCCTTGTGATCC	0.15
	F1	TCTGAGTGTAGACTTGTGAATTCTT	0.08
rs34442126	F2	TTCTTTCTGAGTGTAGACTTGTGAATTAAC	0.06
	R	AAGCATAATTGAGAAGGTGCCGTAA	0.08
	F1	CTTTGAAACTCTGCCTCTAAT	0.1
rs17316007	F2	GATCTTTGGAAACTCTGCCTCTCAC	0.09
	R	AGGGATCAGAAGGATAGGTATG	0.12

	F1	TGAGAGCCAGTTAAAGCCAG	0.14
rs2267801	F2	GTTTTGAGAGCCAGTTAAAGCCAA	0.14
	R	AGTAGCCATAATGCCTGATTTGTTT	0.14
	F1	CAATCTGCTGCACTCCAGTC	0.22
rs868302452	F2	TTCTTCAATCTGCTGCACTCCGATT	0.2
	R	CAGTCGTCACCCTCTCTGAGATAAC	0.25
	F1	GGCCTAAGATGGTTGATTG	0.1
rs3900	F2	TTAAACGGCCTAAGATGGTTGATT	0.1
	R	ATGTAAGACATTGAACGTTTGAACA	0.1
	F1	TGAAAAAGTTGGGTGACACA	0.11
rs2032668	F2	GTTCTTGAAAAAGTTGGGTGACGCC	0.15
	R	CGTAAGCATTGATAAAGCTGCTG	0.15
	F1	TTTATTTACTTAAAAATCATTGTCA	0.13
[0071] rs2032597	F2	TCTATTTTATTACTTAAAAATCATTGTCC	0.13
	R	CAATTAATTTCAACATTTAAGACC	0.13
	F1	GTGCAATGCACATTAATTGT	0.08
rs17306671	F2	GTTTGTCGAATGCACATTAATTGA	0.15
	R	ATAAATGTTTCATGTCCTATGTGGCA	0.15
	F1	GGCAGTGAAAAATTATAGATAA	0.09
rs2032631	F2	TTATTGGCAGTGAAAAATTATAGAAAG	0.08
	R	TGATGAGCAACAGTTGTGACAG	0.12
	F1	GATCTAATAATCCAGTATCAACTGATGG	0.21
rs2032636	F2	GTTTCGATCTAATAATCCAGTATCAACTGACGT	0.21
	R	CACTAAACATCATGGTGTGACGAAC	0.21
	F1	GCTACTACGCCTCTCTTGACGA	0.3
rs9786714	F2	GTTTGCTACTACGCCTCTCTTGACCG	0.1
	R	AGAGACTGGTCATTGCAGAGGTACT	0.3

[0072] 3) PCR预混液成分的确定:

[0073] 通过多次反复实验最终用于本扩增体系中的PCR预混液成分包括:50mM氯化钾, 0.3mg/ml BSA, 6.00%DMSO, 100mM甜菜碱, 35mM pH 8.0的Tris-HCl, 2mM镁离子, 0.2mM

dNTP以及1U Taq DNA聚合酶。

[0074] 4) 反应条件设定:

[0075] 经过大量实验摸索了实验采用以下条件下(见表5)进行的扩增可以得到较好的结果:

[0076] 表5

步骤	温度	时间	循环数
第1步	95℃	5min	28次
第2步	94℃	20sec	
第3步	59℃	90sec	
第4步	60℃	30min	

[0078] 具体所述案例:

[0079] 实施例1

[0080] (1) 获取样本:(a) 采用Chelex-100法或磁珠法从以下样本中提取基因组DNA、(b) 全血、(c) 血卡、(d) 唾液卡、(e) 带毛囊毛发;

[0081] (2) 将各反应试剂振荡混合后按确定的浓度配成PCR预混液,扩增体系总体积为24 μ l,包括携带荧光标记的24对特定引物混合物5 μ l并制成试剂盒,之后向试剂盒中注入所采集的基因组DNA 1 μ l。

[0082] (3) 按所确定的反应条件进行PCR扩增。

[0083] (4) 毛细管电泳检测:将QD550内标和甲酰胺按比例3:100混合,取10 μ l混合物加入到96孔板,再加入扩增产物样品或者是等位基因标准物1 μ l,混合静置数分钟,95℃变性3min,立即冰浴3min,离心后放入ABI3500测序仪上,准备检测。

[0084] (5) 将原始数据导入GeneMapperRID-X软件中,采用GeneMapperRID-X软件分析得到的数据并生成图谱。

[0085] 由图3-图7所示的结果可以看出,采用本发明的体系扩增不同类型检材均可得到清晰准确的分型图。

[0086] 实施例2:利用24个Y-SNP位点的荧光复合扩增试剂盒进行物种特异性检测,本发明检测的物种是猴源细胞,检测结果如图8所示,未出现非特异条带。

[0087] 实施例3:利用24个Y-SNP位点的荧光复合扩增试剂盒进行反复冻融测试,检测图谱如图9所示,反复冻融十次扩增效果未发生变化。

[0088] 实施例4:利用24个Y-SNP位点的荧光复合扩增试剂盒进行灵敏度检测,检测图谱如图10所示,样本浓度为0.0625ng时可完整检出。

[0089] 实施例5:利用24个Y-SNP位点的荧光复合扩增试剂盒进行男女混合样本测试,检测图谱如图11所示,在男女样本浓度为1/800时,可完整检出男性样本,而不受女性样本干扰。

[0090] 以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本

发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和进步都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

序列表

- <110> 苏州阅微基因技术有限公司
- <120> 荧光复合扩增体系、试剂盒及其应用
- <160> 71
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 1
- ttaatattat acctgagtgt tttatcc 27
- <210> 2
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 2
- gtttgttaat attataacctg agtgttttat cg 32
- <210> 3
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 3
- agtgagctgt gatgtgtaac ttg 23
- <210> 4
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 4
- cccattttat ctatctatag aaacctcta 29
- <210> 5
- <211> 33
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <400> 5
- gaaaccatt ttatctatct atagaaacct ctg 33
- <210> 6
- <211> 25
- <212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
acaaaagaat caggtagaa attaa 25
<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
gtcaacattt actgtttcta ctgcttaca 29
<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
gtttcttcaa catttactgt ttctactgct tacg 34
<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
catccagtac agcaagttta ttcgt 25
<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
gggcaataaa ccttggattt cc 22
<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
gtttcttggc aataaacctt ggatttct 28
<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12
agaaaaaaag atatgctgct actgc 25

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 13
acctgaaatt tttctgggga tca 23
<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 14
gttttcctga aatttttctg gggatcc 27
<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 15
ataaagtctt accatgttgc ccacc 25
<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 16
ttattccaat tcagcataca gact 24
<210> 17
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 17
gtttttattc caattcagca tacagccg 28
<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 18
gtgctatgtg tttatttggg gagac 25
<210> 19
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 19
ttcagatttt cccctgagat cg 22
<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 20
gtttcagatt ttcccctgag aaca 24
<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 21
acttggtaaa ctctacttag ttgcctt 27
<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 22
catgtaacag aatccacttt aaattat 27
<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 23
accatgtaac agaatccact ttaaattac 29
<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 24
tttttgatct tagaaaggaa acgag 25
<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 25
acctgttgtc cagttgcact tgg 23

<210> 26
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 26
tcttacctgt tgtccagttg cacttga 27
<210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 27
attacaggcc atgcacagag agaaa 25
<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 28
taggttgcta gaattgcaca ttc 23
<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 29
gttttaggtt gctagaattg cacagta 27
<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 30
gtgctggcaa aaatctcttc actaa 25
<210> 31
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 31
ctttaagtat gacttatgaa gtacgaaga 29
<210> 32
<211> 29
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 32
gttaaaattg acagttatca gtttgaaat 29
<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 33
gttggcttgg gatttttc 18
<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 34
gtatagttgg ctggtgattt ttg 23
<210> 35
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 35
gcaactattc aagctactac cttaaag 27
<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 36
tctgtatgtc agatctaaca ac 22
<210> 37
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 37
tcctctctgt atgtcagatc taacaag 27
<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 38
tccctgcagc cttgtgatcc 20

<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 39
tctgagtgta gacttgtgaa ttctt 25
<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 40
ttctttctga gtgtagactt gtgaattaac 30
<210> 41
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 41
aagcataatt gagaagggtgc cgtaa 25
<210> 42
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 42
ctttggaac tctgcctcta at 22
<210> 43
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 43
gatctttgga aactctgcct ctcac 25
<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 44
agggatcaga aggataggta tg 22
<210> 45
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 45
tgagagccag ttaaagccag 20
<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 46
gttttgagag ccagttaaag ccaa 24
<210> 47
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 47
agtagccata atgcctgatt tgttt 25
<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 48
caatctgctg cactccagtc 20
<210> 49
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 49
ttcttcaatc tgctgcactc cgatt 25
<210> 50
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 50
cagtcgtcac cctctctgag ataac 25
<210> 51
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 51
ggcctaagat ggttgattg 19

<210> 52
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 52
ttaaacggcc taagatggtt gattc 25
<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 53
atgtaagaca ttgaacgttt gaaca 25
<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 54
tgaaaaagtt gggtagacaca 20
<210> 55
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 55
gttcttgaaa aagttgggtg acgcc 25
<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 56
cgtaagcatt tgataaagct gctg 24
<210> 57
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 57
tttatttact taataatcat tgttca 26
<210> 58
<211> 31
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 58
tctattttat ttacttaaaa atcattgttc c 31
<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 59
caattacttt caacatttaa gacc 24
<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 60
gtgcaatgca cattaattgt 20
<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 61
gtttgtgcaa tgcacattaa ttga 24
<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 62
ataaatgttc atgtcctatg tggca 25
<210> 63
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 63
ggcagtgaaa aattatagat aa 22
<210> 64
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 64
ttattggcag tgaaaaatta tagaaag 27

<210> 65
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 65
tgatgagcaa cagttgtgac ag 22
<210> 66
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 66
gatctaataa tccagtatca actgatgg 28
<210> 67
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 67
gtttcgatct aataatccag tatcaactga cgt 33
<210> 68
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 68
cactaaacat catggtgtga cgaac 25
<210> 69
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 69
gctactacgc ctctcttgac ga 22
<210> 70
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 70
gtttgctact acgcctctct tgaccg 26
<210> 71
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 71

agagactggg cattgcagag gtact 25

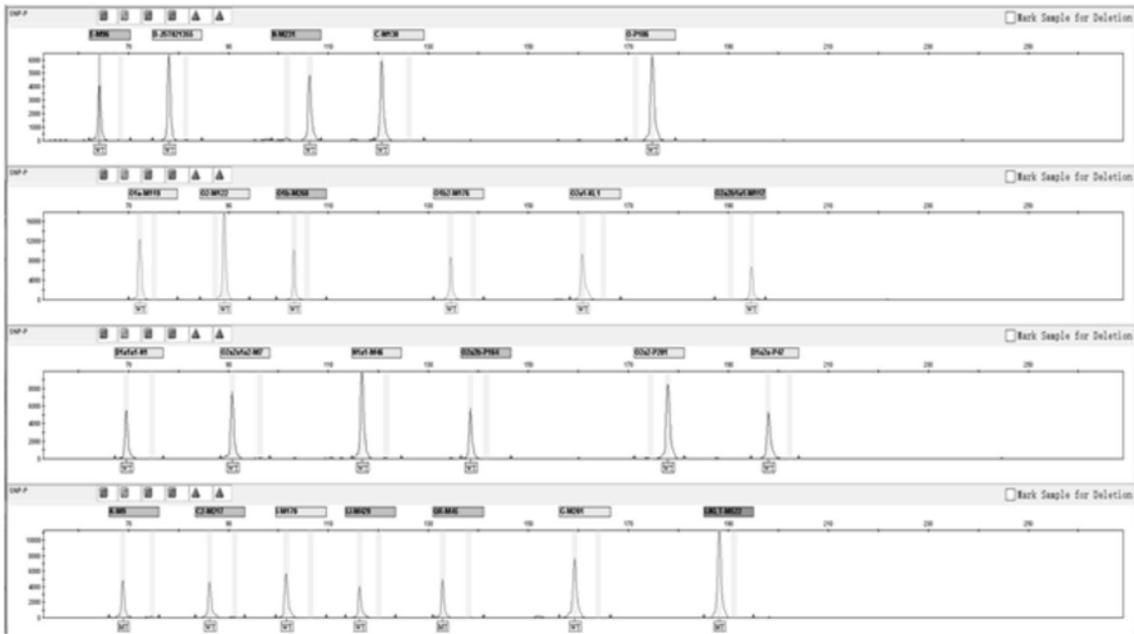


图1

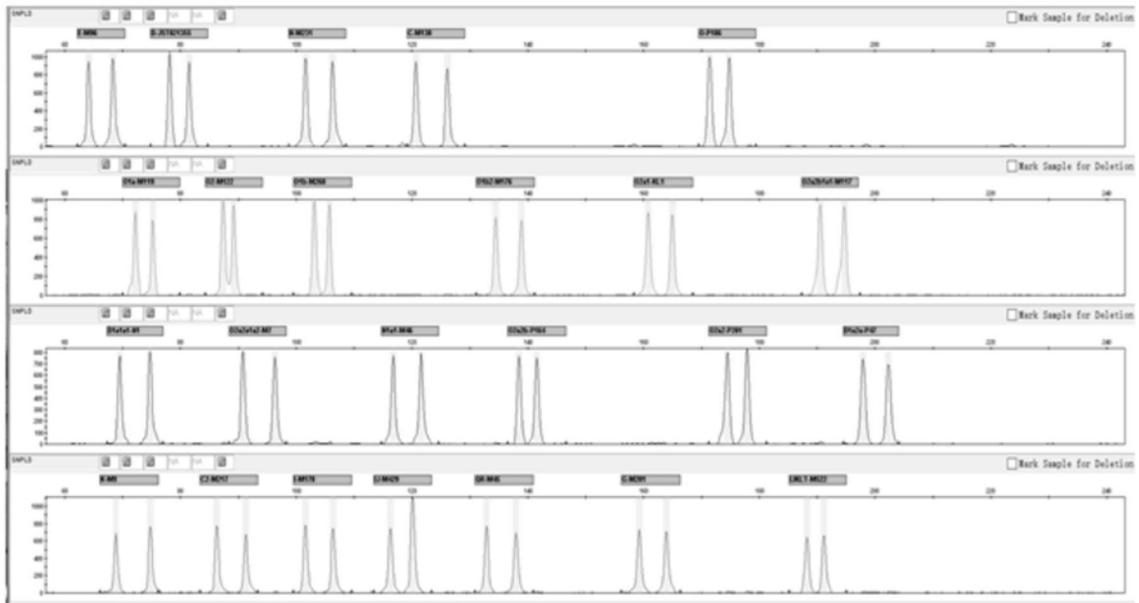


图2

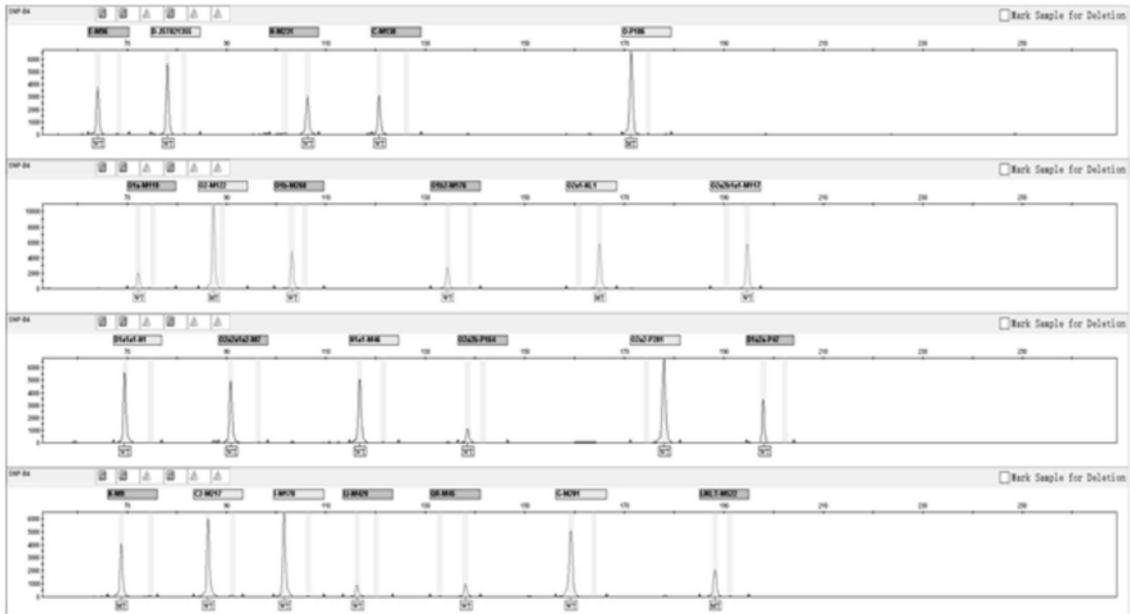


图3

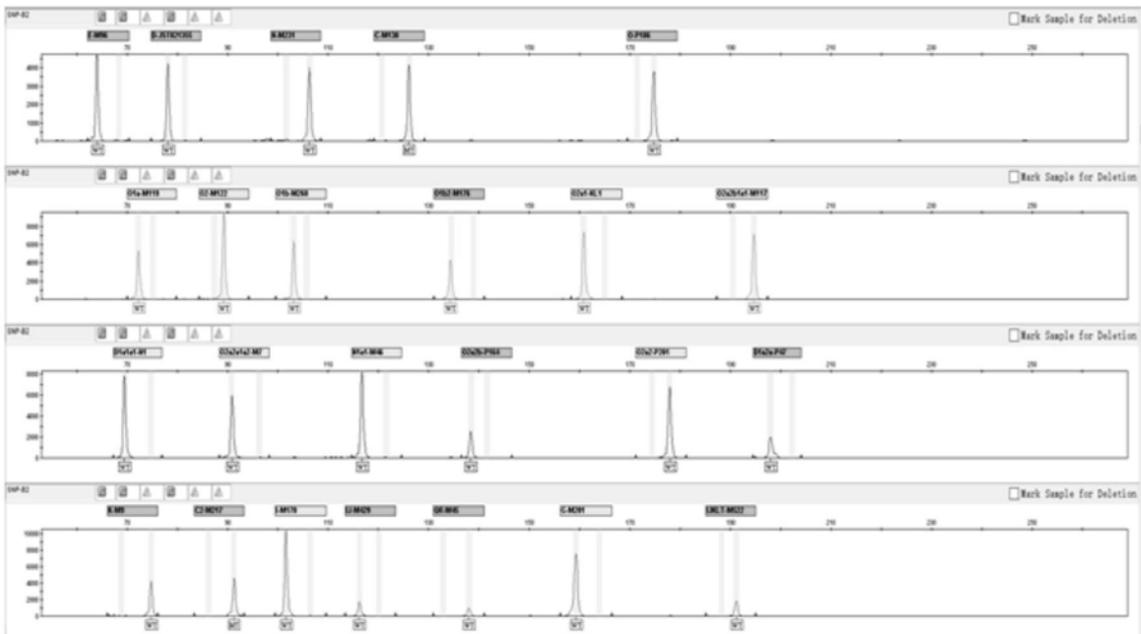


图4

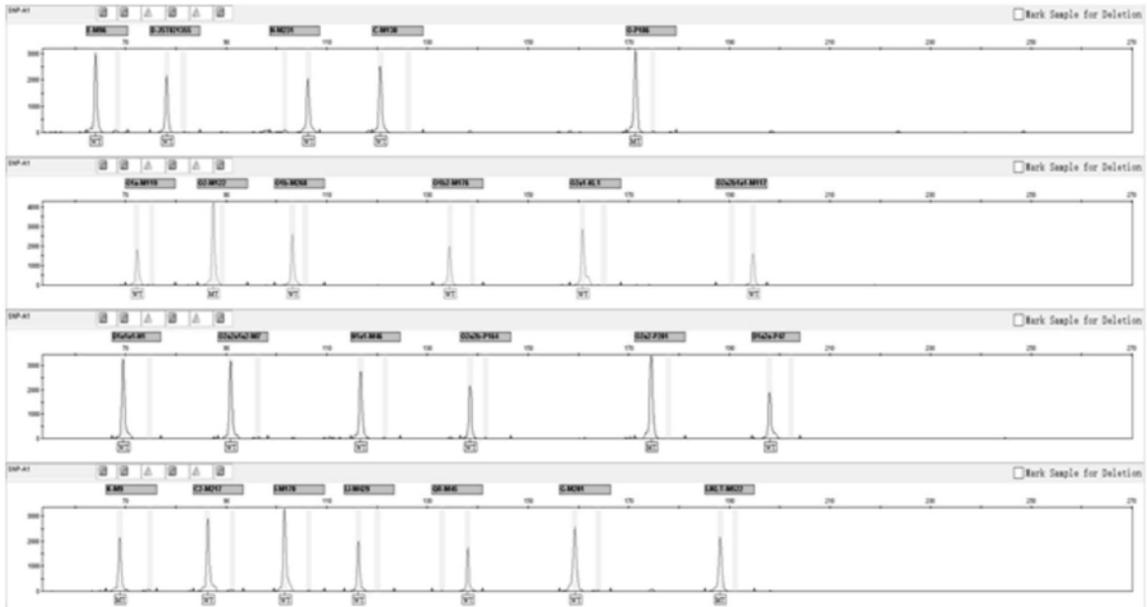


图5

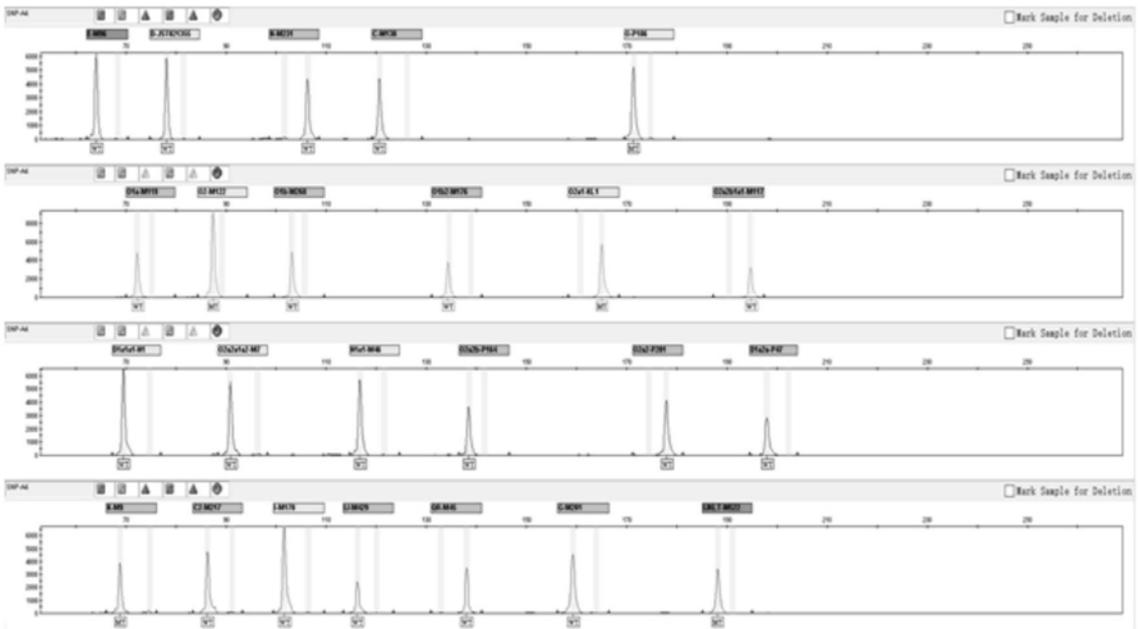


图6

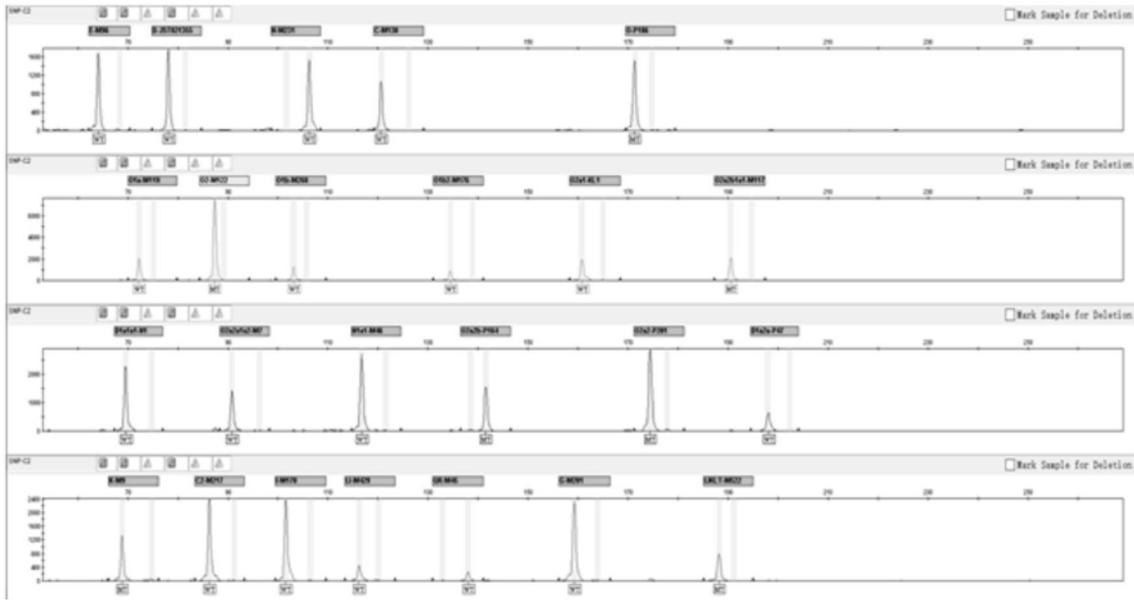


图7

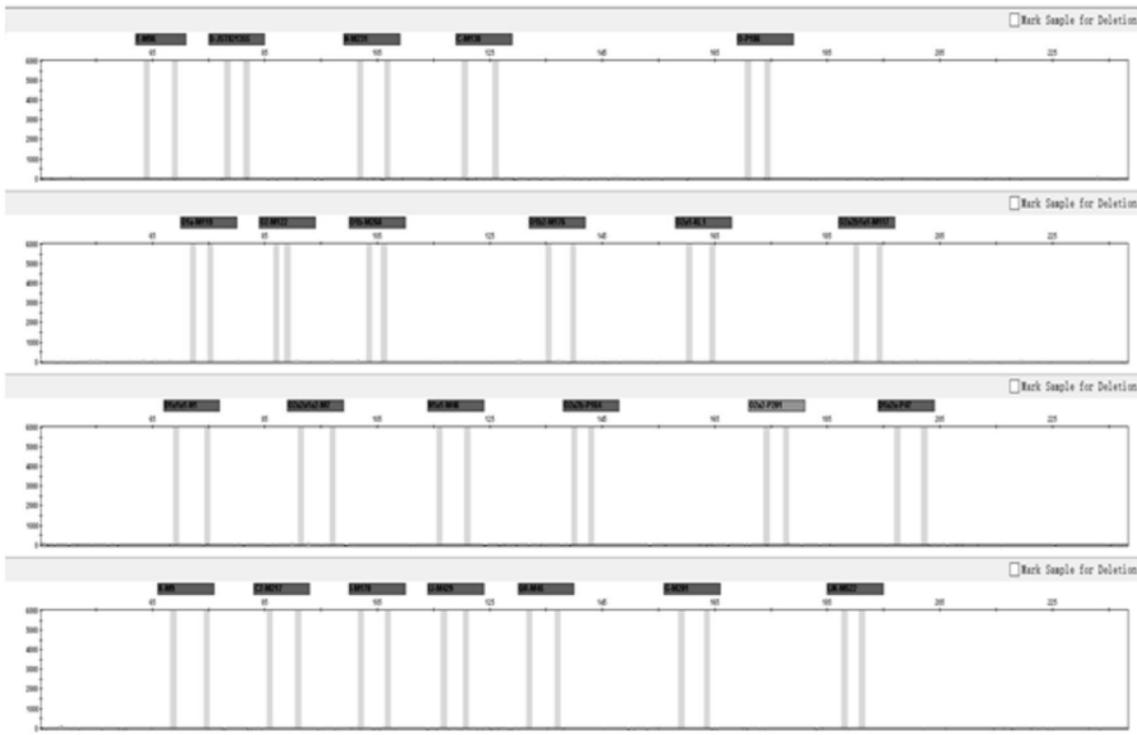


图8

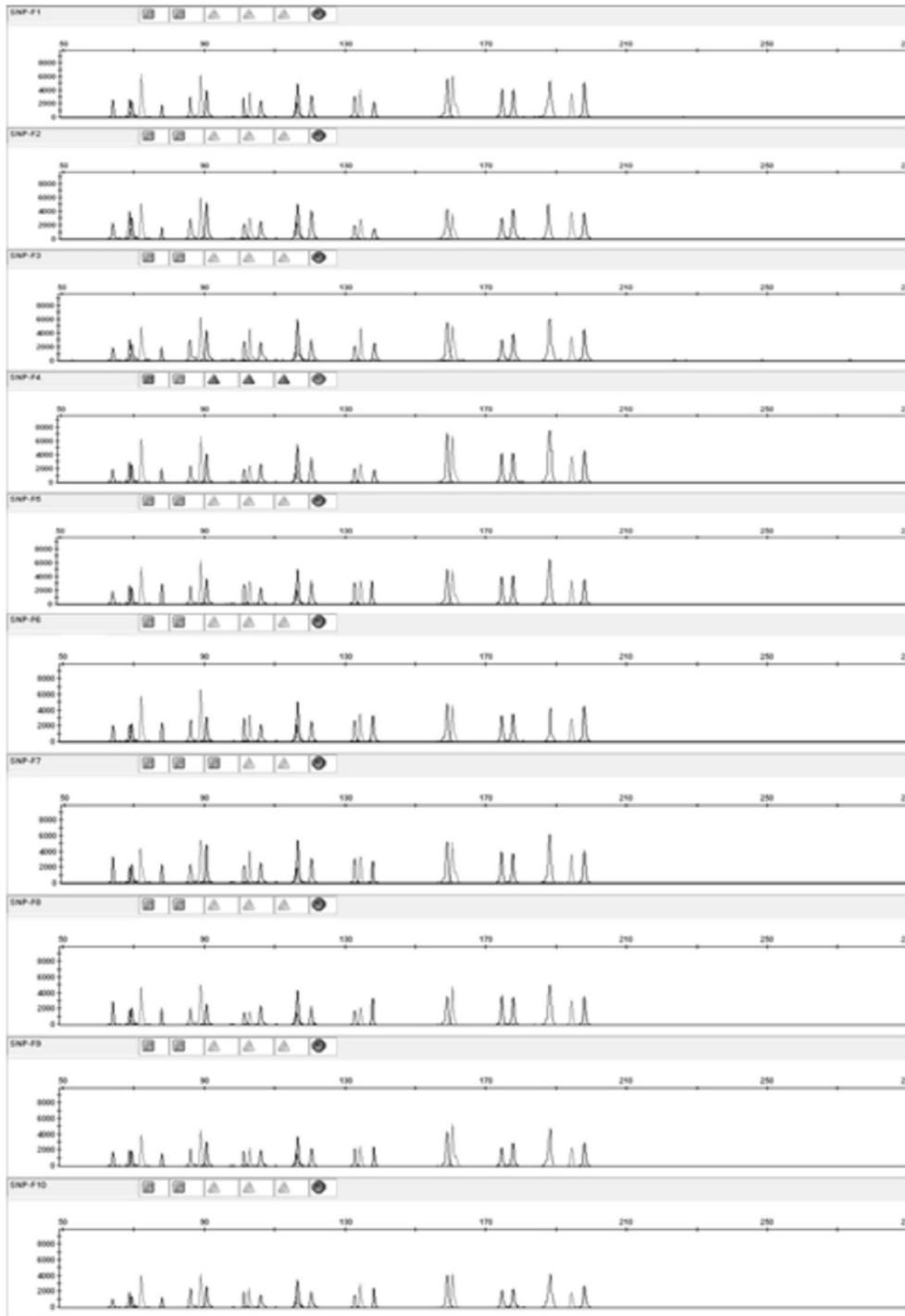


图9

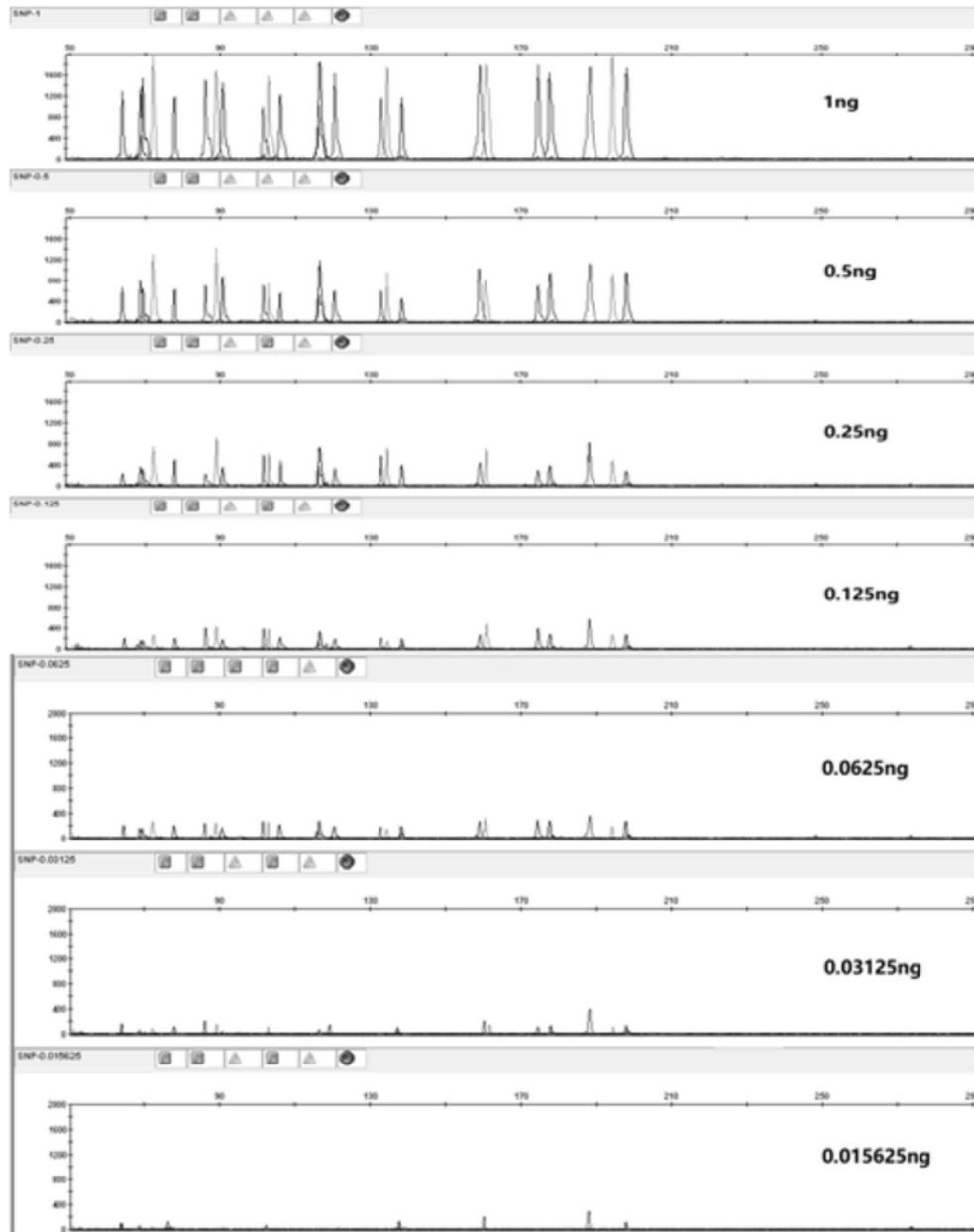


图10

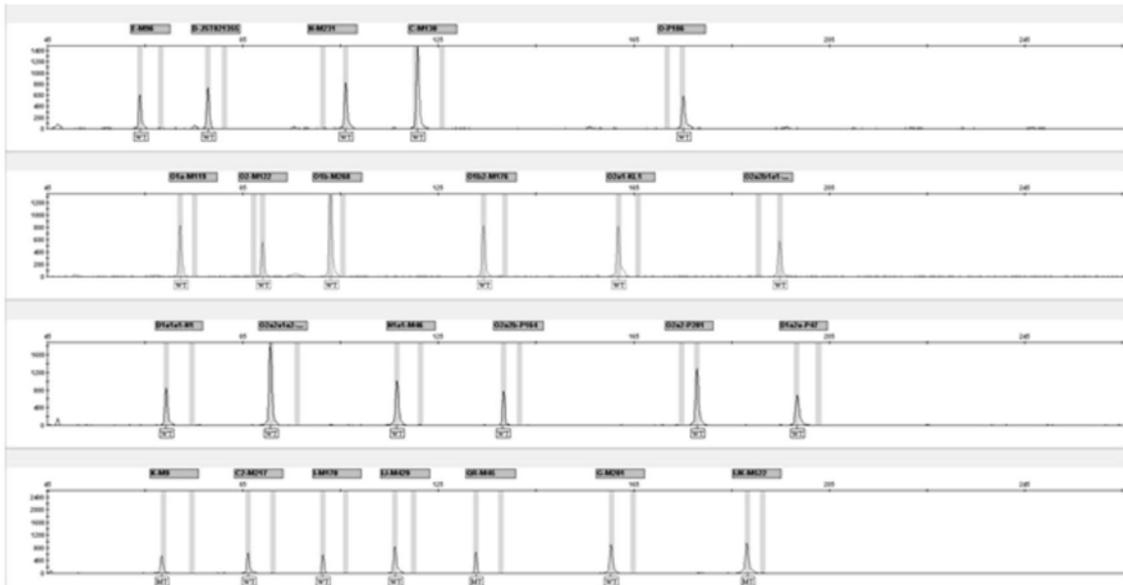


图11