



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103320514 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 25

(21) 申请号 201310262554. 4

(22) 申请日 2013. 06. 27

(71) 申请人 无锡中德美联生物技术有限公司
地址 214174 江苏省无锡市惠山区文惠路
18-1

(72) 发明人 郑卫国 卢文翔 孟祥和 卢青
葛海鹏 葛斌文 薛佳 郭育林

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限
公司 32200
代理人 李纪昌 曹翠珍

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006. 01)
C12N 15/11 (2006. 01)

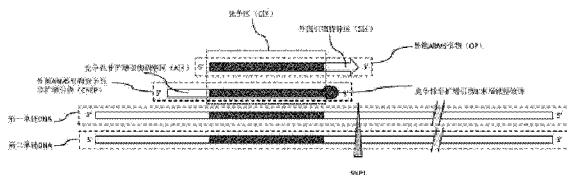
权利要求书2页 说明书12页
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

一种检测邻近 SNPs 的多重 PCR 方法

(57) 摘要

一种检测邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法, 涉及一种多重 DNA 扩增技术。本发明所提供的多重 PCR 方法, 其特征在于: 一条共用上游引物, 两条内侧 SNPs 位点 ARMS 引物, 两条外侧 SNPs 位点 ARMS 引物, 一条外侧竞争性非延伸引物; 所述的外侧竞争性非延伸引物 3' 末端经修饰后阻止聚合酶延伸, 并与外侧 ARMS 引物竞争模板位点, 消除了内扩增抑制现象。本发明的多重 PCR 方法能够有效的检测多个邻近 SNPs 位点, 适用于普通多重 PCR、多重荧光 PCR、DNA 杂交所需进行的多重 PCR 反应。



1. 一种扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,包括如下步骤:在包含目标碱基序列的核酸试样中,加入引物、dNTPs、Taq 酶、缓冲液;对试样进行扩增反应;对扩增产物进行检测和基因分型,所述的目标碱基序列中包括有沿核酸序列 3' -5' 方向的第一 SNP 位点和第二 SNP 位点,其特征在于,所述的引物包括:

(1) 第一外侧引物和第一内侧引物,所述的第一外侧引物和第一内侧引物分别用于检测第一 SNP 位点和第二 SNP 位点,所述的第一外侧引物是由沿引物 3' -5' 方向的特异区和第一竞争区组成,竞争区的长度大于 5 个碱基;

(2) 外侧竞争性非扩增引物,所述的外侧竞争性非扩增引物包括有沿引物 3' -5' 方向的碱基修饰、第二竞争区和调整区,所述的第二竞争区和第一竞争区都与目标碱基序列相同位置互补,所述的碱基修饰使外侧竞争性非扩增引物的 3' 端不发生 PCR 延长反应;

(3) 共用引物;所述的共用引物是与所述第一外侧引物、第一内侧引物和外侧竞争性非扩增引物形成引物对,从而能够使所述核酸扩增的引物。

2. 根据权利要求 1 所述的扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,其特征在于:所述的引物中还包括有第二外侧引物和第二内侧引物,第一外侧引物对第一 SNP 位点的野生型或者突变型中的一种特异,第二外侧引物对另一种特异;第一内侧引物对第二 SNP 位点的野生型或者突变型中的一种特异,第二内侧引物对另一种特异;第二外侧引物是由沿引物 3' -5' 方向的特异区和第三竞争区组成,竞争区的长度大于 5 个碱基且第二外侧引物与第一外侧引物存在至少 1 个碱基的长度差异,第二内侧引物与第一内侧引物存在至少 1 个碱基的长度差异;共用引物与所述第一、第二外侧引物和第一、第二内侧引物和外侧竞争性非扩增引物形成引物对。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,其特征在于:所述的多重 PCR 方法是指对 2 个相邻的 SNP 位点进行检测的方法。

4. 根据权利要求 2 所述的扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,其特征在于:所述的第一、第二外侧引物和第一、第二内侧引物的 3' 端的第 3 ~ 7 位的碱基中有一个或者几个是错配碱基。

5. 根据权利要求 1 所述的扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,其特征在于:所述的第一或第二竞争区从第一或第二外侧引物上沿引物 3' -5' 方向最后一个错配碱基的下一个碱基开始。

6. 根据权利要求 2 所述的扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,其特征在于:所述的外侧竞争性非扩增引物与第一、第二外侧引物的浓度比在 0.1 :1 ~ 10 :1 范围内。

7. 根据权利要求 1 所述的扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,其特征在于:所述外侧竞争性非扩增引物的 3' 端采用磷酸基、氨基、生物素基、巯基、ddNTP 或者肩臂修饰。

8. 根据权利要求 2 所述的扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,其特征在于:所述的外侧竞争性非扩增引物的 Tm 值是第一、第二外侧引物的 Tm 值的 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

9. 根据权利要求 2 所述的扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,其特征在于:当采用琼脂糖电泳对扩增产物进行分析时,在第二外侧和第二内侧引物 5' 端增加 10 个以上碱基;当采用聚丙烯酰胺电泳对扩增产物进行分析时,第二外侧和第二内侧引物 5' 端增加 2 个以上碱基;当采用毛细管电泳对扩增产物进行分析时,在第二外侧和第二内侧引物 5' 端增加 1 个以上碱基。

10. 一种检测人的 SLC26A4 基因上 SNP 位点的试剂盒,其特征在于,包括有如下两个 SNP 位点的引物,以及一条外侧竞争性非扩增引物,引物序列是:

1975G>C

第一内侧引物 :GAAAGATATAGCTCCACAGTCAA_cCAC

第二内侧引物 :tataGAAAGATATAGCTCCACAGTCAAG_gAG

2027T>A

第一外侧引物 :ACCAGAACCTTACCACCC_tCA

第二外侧引物 :tAtaCAGAACCTTACCACC_aGCT

共用引物 :GAAAGATATAGCTCCACAGTCAA_cCAC

外侧竞争性非扩增引物 :GAAAACCAGAACCTTACCACC

所述的外侧竞争性非扩增引物的 3' 端采用 C3 Spacer 修饰。

11. 一种检测人的线粒体 12s-*MTRVR1* 基因上 SNP 位点的试剂盒,其特征在于,包括有如下两个 SNP 位点的引物,以及一条外侧竞争性非扩增引物,引物序列是:

1555A>G

第一外侧引物 :CAGTACACTTACCATGTTAC_tACTTGT

第二外侧引物 :atatCAGTACACTTACCATGTTACG_aATTGC

1494C>T

第一内侧引物 :ATGTCCTTTGAAGTATACTTGAG_tAGG

第二内侧引物 :tataATGTCCTTTGAAGTATACTTGAGG_cGA

共用引物 :ACATTTTCTACCCCAGAAA_cACTACG

外侧竞争性非扩增引物 :CAAGTGCACTTTCCAGTACACTTAC ;

所述的外侧竞争性非扩增引物的 3' 端采用 -NH₂C6 修饰。

12. 一种检测水稻可溶性淀粉酶基因 SSIIIa 的 SNP 位点的试剂盒,其特征在于,包括有如下两个 SNP 位点的引物,以及一条外侧竞争性非扩增引物,引物序列是:

4074G>A

第一外侧引物 :AATAAGTACTATTTACATCCT_tAG

第二外侧引物 :attaAATAAGTACTATTTACATCCT_tAta

4117T>G

第一内侧引物 :AAACTCAGTATTCTTTCAA_cAT

第二内侧引物 :attaAAACTCAGTATTCTTTCAA_tTG

共用引物 :TATACATGACAGTGAACAA_cACTACAT

外侧竞争性非扩增引物 :GGATGTTTTTGACCAA_tTAAG

所述的外侧竞争性非扩增引物的 3' 端采用磷酸化修饰。

一种检测邻近 SNP 的多重 PCR 方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的检测 SNP 的方法,尤其涉及一种基于多重 PCR 方法检测两个邻近 SNP 位点时均衡两位点之间的扩增的设计方法,及其在核酸检测领域的应用。

背景技术

[0002] 多聚酶链式反应 (PCR) 是以两段寡核苷酸为引物,由 DNA 聚合酶催化扩增位于两段引物之间的 DNA 片段的一项分子生物学技术。该技术自 1983 年建立以来,因其高灵敏度、高效率、高特异性的特点,已经成为当前生命科学研究与相关领域中的主体与关键方法。技术本身也不断完善,目前已经发展了一系列相关技术,如巢式 PCR、实时定量 PCR、差异显示 PCR、免疫 PCR、多重 PCR 等。其中多重 PCR 因其高特异性、高效率、低成本的优势,迅速渗透至生命科学的各个领域。

[0003] 多重 PCR (multiplex PCR) 是在普通 PCR 的基础上加以改进,于一个 PCR 反应体系中加入多对特异性引物,针对多个 DNA 模板或同一模板的不同区域扩增多个目的片段的 PCR 技术。这一概念由 Chamberian 等率先于 1988 年提出。由于多重 PCR 同时扩增多个目的基因,具有节省时间、降低成本、提高效率的优点,特别是节省珍贵的实验样品,所以一经提出,即得到众多研究者的青睐,并且发展迅速,在生命科学的各个领域,多重 PCR 已经成为一项成熟而重要的研究手段。

[0004] 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 主要是指由于单个核苷酸的变异而引起基因组水平上的 DNA 序列多态性,形式包括单碱基的缺失、插入、转换及颠换等。SNP 可分成两种形式:一种是基因编码区,称为 cSNP,易造成基因功能的突变;另一种是在非编码区,存在大量单碱基的变异。SNPs 具有数量多、分布广和稳定遗传等特点,它与许多疾病直接相关,在分子诊断、临床检验、法医学、遗传疾病等方面具有重要的应用价值。目前出现了许多 SNPs 检测技术,它们主要基于以下 4 种基本原理:(1) 等位基因特异性杂交;(2) 内切酶酶切技术;(3) 引物延伸法;(4) 寡核苷酸连接反应。每种分型实验的产物又可以有几种不同的检测方法,如:冷光法、荧光法、质谱法等。

[0005] 扩增阻碍突变系统 (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) 技术于 1989 年建立,又称等位基因特异性 PCR (Allele-specific PCR, AS-PCR),也叫序列特异性引物 PCR (PCR with Sequence Specific Primers, PCR-SSP),是验证性检测 DNA 序列变化的经典方法之一。

[0006] ARMS 方法的基本构思是设计 2 条 ARMS 上游(或下游)引物,共用 1 条下游(或上游)引物构成 PCR 反应体系。等位基因特异性碱基置于引物 3' 末端,这是因为耐热 Taq DNA 聚合酶缺乏 3' -5' 外切校正活性。在 PCR 反应进行时,位于引物 3' 末端的特异性碱基分别结合于野生型和突变型等位基因的位点,若此碱基对形成错配, DNA 链延伸反应就会因为 3' -5' - 磷酸二酯键形成障碍而受阻。但是 ARMS 引物 3' 末端碱基对不同错配区分能力不同,因此对有些突变的区分能力有限,后续有学者在 ARMS 引物设计时在引物内部尤其是 3' 端引入错配碱基,以便提高 ARMS 引物的特异性。

[0007] 检测多个 SNPs 位点时,人们通常采用多重 PCR 结合 ARMS 的方法以提高效率和节约成本。利用该方法检测邻近 SNPs 位点时,如图 1 所示,可以在两个邻近 SNPs 位点(SNP1 和 SNP2)分别设计 ARMS 上游(或下游)引物,SNP1 位点对应的外侧 ARMS 上游(或下游)引物命名为 Outside Primers (简称 OP),SNP2 位点对应的内侧 ARMS 上游(或下游)引物命名为 Inside Primers (简称 IP);而下游(或上游)引物则共用一条引物,命名为 Common Primer (简称 CP)。根据 OP 与 CP 的 PCR 扩增产物(命名为 OC)序列差异检测 SNP1 位点的分型,根据 IP 和 CP 的 PCR 扩增产物(命名为 IC)序列差异检测 SNP2 位点的分型。

[0008] 然而,如图 2 所示,在理想状态下,由于 Taq DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性,所有外侧 ARMS 上游(或下游)引物(OP)引导的延伸会对同向内侧 ARMS 上游(或下游)引物(IP)及其延伸产物(IC)产生阻碍作用;阻碍其引导的扩增,破坏其扩增产物的形成。这将导致对 SNP2 位点分型起关键作用的产物——IC 型特异性产物的扩增被抑制,我们称之为内扩增抑制作用。在 PCR 早期的几个循环中,两对 ARMS 引物(OP 和 IP)均结合到模板上进行扩增时,这种作用最为明显,导致内侧 ARMS 上游(或下游)引物(IP)引导的扩增指数增长长期滞后(尤其对于离外引物近的内引物),IC 型特异性产物产量相对较低。内侧 ARMS 上游(或下游)引物引导的 IC 型产物量的降低,使得对 SNP2 位点分型困难。

发明内容

[0009] 本发明的目的为提供一种利用多重 ARMS-PCR 技术有效检测邻近 SNPs 位点的方法,本发明的方法可提高上述 IC 型特异性产物的产量,均衡 OC 型和 IC 型延伸产物的产量,提高邻近 SNPs 位点的分型效率。具体的技术方案是:

[0010] 一种扩增邻近 SNPs 位点的多重 PCR 方法,包括如下步骤:在包含目标碱基序列的核酸试样中,加入引物、dNTPs、Taq 酶、缓冲液;对试样进行扩增反应;对扩增产物进行检测和基因分型,所述的目标碱基序列中包括有沿核酸序列 3' -5' 方向的第一 SNP 位点和第二 SNP 位点,其特征在于,所述的引物包括:

[0011] (1) 第一外侧引物和第一内侧引物,所述的第一外侧引物和第一内侧引物分别用于检测第一 SNP 位点和第二 SNP 位点,所述的第一外侧引物是由沿引物 3' -5' 方向的特异区和第一竞争区组成,竞争区的长度大于 5 个碱基;

[0012] (2) 外侧竞争性非扩增引物,所述的外侧竞争性非扩增引物包括有沿引物 3' -5' 方向的碱基修饰、第二竞争区和调整区,所述的第二竞争区和第一竞争区都与目标碱基序列相同位置互补,所述的碱基修饰使外侧竞争性非扩增引物的 3' 端不发生 PCR 延长反应;

[0013] (3) 共用引物;所述的共用引物是与所述第一外侧引物、第一内侧引物和外侧竞争性非扩增引物形成引物对,从而能够使所述核酸扩增的引物。

[0014] 在核酸序列的 3' -5' 方向分别有需要检测的第一 SNP 位点和第二 SNP 位点,第一外侧引物可以与第一 SNP 位点的野生型或者突变型特异,第二内侧引物可以与第二 SNP 位点的野生型或者突变型特异。采用传统的多重 PCR 扩增方法时,易出现内扩增抑制作用,第二 SNP 位点的引物扩增效率明显受到抑制,导致第二 SNP 位点检测不准确的情况发生。采用本方案时,在引物中加入了外侧竞争性非扩增引物,其具有第二竞争区,第二竞争区的碱基序列是可以与第一竞争区与目标碱基序列上相同位置进行互补的,这样就可以与第一外侧引物竞争在核酸序列上的扩增。本发明中,第一竞争区和第二竞争区与目标碱基序列

的相同位置互补是本质上的互补,具体是指:寡核苷酸具有在延伸反应条件下能够与包括特定序列的目标核酸形成双键状态的碱基序列,但并不要求完全互补,也可以含有几个不匹配碱基对。本发明所述的匹配是指:双链状态的核酸序列碱基对形成沃森-克里克(Watson-Crick)碱基对的状态,不匹配是指:没有形成沃森-克里克碱基对的状态。沃森-克里克碱基对是指:脱氧核糖核酸的两个多核苷酸分子组成腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)、鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)组,并通过氢键连接的碱基对。那么,第一竞争区和第二竞争区的碱基序列可以完全相同,也可以有几个碱基的不同,只要能与相同的目标碱基序列位置互补即可实现本发明的技术方案。同时,外侧竞争性非扩增引物的3'端具有碱基修饰,其无法使得在核酸链上扩增,从而提高了第一内侧引物扩增得到的产物量。为了保证竞争的效果,第一和第二竞争区的长度至少要有5个碱基。碱基数越多,竞争效果越好,竞争区的碱基数增加,与外侧引物竞争模板的能力更强,竞争效果增强。

[0015] 一般来说,上述的多重PCR方法在对多个SNP位点检测时,外侧竞争性非扩增引物可以对外侧的SNP位点的扩增产物起到抑制作用,SNP位点可以是2个也可以是多个,但是对于2个相邻的SNP位点进行同时扩增检测时,效果更好,因为不会存在有其它的多个检测用的引物之间的相互影响和竞争。

[0016] 作为对上述方法的改进,所述的引物中还包括有第二外侧引物和第二内侧引物,第一外侧引物对第一SNP位点的野生型或者突变型中的一种特异,第二外侧引物对另一种特异;第一内侧引物对第二SNP位点的野生型或者突变型中的一种特异,第二内侧引物对另一种特异;第二外侧引物是由沿引物3'-5'方向的特异区和第三竞争区组成,竞争区的长度大于5个碱基且第二外侧引物与第一外侧引物存在至少1个碱基的长度差异,第二内侧引物与第一内侧引物存在至少1个碱基的长度差异;共用引物与上述第一、第二外侧引物和第一、第二内侧引物和外侧竞争性非扩增引物形成引物对。采用这样的引物配置,就可以更好地对目标碱基序列进行检测,对核酸样本进行PCR扩增之后,能够从基因分型的结果中查看到目标碱基序列的第一SNP位点和第二SNP位点是属于野生型还是突变型,另外,由于第一、第二外侧引物之间和第一、第二内侧引物之间存在有碱基长度的差异,从而将碱基差异转化为序列长度差异,通过电泳的方法进行检测。另外,由于第二外侧引物与第一SNP位点特异,那么第二外侧引物上的第三竞争区和第一、第二竞争区能够和目标碱基序列的相同碱基序列位置相互补,这样外侧竞争性非扩增引物就可能对第一或者第二外侧引物起到竞争作用。第一、第二、第三竞争区本质上要与目标碱基序列上互补,也就是说,这三个竞争区之间可以完全相同,也可以存在几个碱基的不同。但是,优选情况下是第一、第二和第三竞争区的碱基序列都相同,这样可以形成更好的竞争作用。第一、第二和第三竞争区最少要包含5个以上的碱基。

[0017] 作为本方法的一种改进,所述的第一、第二外侧引物和第一、第二内侧引物的3'端的第3~7位的碱基中有一个或者几个是错配碱基,错配原则是:如果3'端是“强”错配(A/G或C/T),则需要引入“弱”的错配(C/A或G/T)或“中度”错配(A/A,C/C,G/G或T/T)或不需要引入错配,反之亦然;如果3'端是“中度”错配(A/A,C/C,G/G或T/T),则需要引入“中度”的错配或“强”错配。这样的目的可以是提高引物与核酸链匹配的特异性。

[0018] 作为本方法的一种改进,所述的第一或第二竞争区从第一或第二外侧引物上沿引物3'-5'方向最后一个错配碱基的下一个碱基开始。由于外侧引物的3'末端为SNP位点、

倒数第 3 位或第 4 位或第 5 位或第 6 位或第 7 位中的一个或者几个增加了错配,如果外侧竞争性非扩增引物竞争外侧 ARMS 引物的位点包含第一外侧引物 3' 端的倒数第 3 位或第 4 位或第 5 位或第 6 位或第 7 位错配位点,则存在更为明显竞争性作用,故而优先将竞争区设置于 3' 末端碱基人为引入错配的下一个碱基处开始。例如:如果 3' 末端起的第 3、第 5 位设置为错配,那么竞争区至少要从第 6 位开始向 5' 方向排列。

[0019] 在使用本方法时,外侧竞争性非扩增引物与第一、第二外侧引物的浓度需要进行调整,外侧竞争性非扩增引物浓度过大时,会产生抑制外侧引物扩增的情况;外侧竞争性非扩增引物浓度过小时,其无法产生足够的与外侧引物竞争的作用。由于不同模板序列及引物的扩增效果差异,进行 PCR 扩增时,外侧竞争性非延伸引物与第一、第二外侧引物的浓度比例需要优化调整。一般情况下,外侧竞争性非扩增引物与第一、第二外侧引物的浓度比可以控制在 0.1 倍~10 倍范围内。

[0020] 对于外侧竞争性非扩增引物,其 3' 端需要通过基团进行修饰,以使其不会在 PCR 反应中产生扩增,一般可以采用磷酸基、氨基、生物素基、巯基、ddNTP、肩臂或它们的类似物修饰以阻止其扩增。

[0021] 作为本方法的一种改进,为保证外侧竞争性非扩增引物的竞争效果,外侧竞争性非扩增引物的 T_m 值是第一、第二外侧引物的 T_m 值的 $\pm 5^\circ\text{C}$ 。

[0022] 在对扩增产物进行检测时,可以采用琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺电泳、毛细管电泳、DNA 杂交或 DNA 芯片等方法。对扩增产物进行检测时采用琼脂糖电泳时,最好在第二外侧和第二内侧引物 5' 端增加 10 个以上碱基。对扩增产物进行检测时采用聚丙烯酰胺电泳时,最好在第二外侧和第二内侧引物 5' 端增加 2 个以上碱基。对扩增产物进行检测时采用毛细管电泳时,最好在第二外侧和第二内侧引物 5' 端增加 1 个以上碱基,在共用引物 5' 端进行荧光标记。从而将碱基差异转化为序列长度差异,通过电泳的方法进行检测。

[0023] 技术效果

[0024] 通过以上技术方案,本发明提供利用外侧引物和内侧引物同时准确检测两个邻近 SNP 位点的多重 PCR 方法。解决了外侧引物对内侧引物的扩增内抑制作用,均衡外侧引物和内侧引物的扩增效率,从而确保多重 PCR 扩增的均衡性。应用本发明可以结合多重 PCR 与 ARMS 方法相结合,单管 PCR 扩增同时检测多个 SNP 位点,尤其解决邻近 SNP 位点扩增不均衡的问题,提高检测效率,可广泛应用于基于核酸检测的各个领域。

附图说明

[0025] 图 1 是表示现有多重 PCR-ARMS 方法检测邻近 SNP 位点的图。

[0026] 图 2 是表示在 PCR 过程中,外侧 ARMS 引物对内侧 ARMS 引物及其扩增产物的内抑制作用的图。

[0027] 图 3 是表示本发明所涉及的均衡内侧和外侧 ARMS 引物扩增方法的图。

[0028] 图 4 是表示本发明中外侧 ARMS 上游(或下游)引物竞争性非扩增引物(CNEP)的设计方法的图。

[0029] 图 5 是表示比较例扩增产物检测结果的图。

[0030] 图 6 是表示实施例扩增产物检测结果的图。

[0031] 图 7 是表示比较例与实施例扩增效果比较的图。

具体实施方式

[0032] 以下,参照图 3 说明本发明的实施方式。

[0033] 如图 3 所示,以 PCR 扩增过程中采用第一或第二外侧引物以及外侧竞争性非扩增引物作为其特征。

[0034] 如图 4 所示,外侧竞争性非扩增引物与第一外侧引物存在部分相同的序列(竞争区),两者 T_m 值相差 5°C 以内,并且外侧竞争性非扩增引物不能为 DNA 聚合酶引发的延伸反应提供起点。对于外侧竞争性非扩增引物,优选 3' 末端与第一外侧引物 3' 末端倒数第 5 位一致,且 T_m 值与第一外侧引物接近。

[0035] 在多重 PCR 扩增反应之前,在混合 PCR 体系中添加第一、第二外侧引物、第一、第二内侧引物和共用引物。并且,在混合液中添加外侧竞争性非扩增引物。

[0036] 添加外侧竞争性非扩增引物时,第一、第二外侧引物与外侧竞争性非扩增引物同时与模板中相同的位置(SNP1)结合,同时第一、第二内侧引物结合在 SNP2 位置。进而,如图 3 所示,部分模板与第一、第二外侧引物结合并延伸,同时抑制第一、第二内侧引物的延伸;另一部分模板与外侧竞争性非扩增引物结合但不延伸,从而保护内侧第一、第二内侧引物的延伸。进而在 PCR 结束时可以同时获得第一、第二外侧引物与共用引物的延伸产物(OC)和第一、第二内侧引物与共用引物的延伸产物(IC)。

[0037] 第一实施例部分

[0038] 本实施例及对照例中所用的模板 DNA 是利用磁珠法 DNA 提取试剂盒(长春市博坤生物科技有限公司)提取。

[0039] 所有第一 SNP 位点和第二 SNP 位点的引物、共用引物、外侧竞争性非扩增引物均购自上海生工生物工程有限公司。

[0040] 共用引物在 5' 端进行 FAM 荧光修饰。

[0041] 外侧竞争性非扩增引物在 3' 端进行 C3Spacer 修饰。

[0042] 反应混合物 Reaction Mix 包含 dNTP、 Mg^{2+} 、缓冲溶液等,采用常规配置即可,由无锡中德美联生物技术有限公司配制。PCR 后的电泳解析采用 ABI3130 遗传分析仪(ABI 公司制)。

[0043] 以下的实施例和比较例中,检测的 SNP 位点为人的 SLC26A4 基因所存在的 1975G>C 和 2027T>A 两个邻近的 SNP 位点。SLC26A4,即溶质转运家族 26-成员 4(solution carrier family26, member4),是临床比较常见的非综合征型耳聋相关基因,可导致呈常染色体隐性遗传的非综合征型耳聋 DFNB4 和 Pendred 综合征,此类患者绝大部分伴有 EVA(大前庭水管)或 Mondini 畸形(耳蜗阶间隔发育不良 2 型)。对于不同人群 EVA 患者的 SLC26A4 基因筛查发现,在中国人群中 1975G>C 和 2027T>A 两个 SNP 位点突变为较常见的突变类型,婚前及产前对以上两个位点的筛查预测孩子患耳聋可能性,对于优生优育有着重要意义。

[0044] SLC26A4 基因的部分序列如下,其中第 132 位为 1975G>C 位点,命名为 SNP2a;第 184 位为 2027T>A 位点,命名为 SNP1a。

[0045] 1 TTAGCCTGA TGAGGATATT GAAGATCTGG AGGAACTTGA TATCCCAACC

[0046] 51 AAGGAAATAG AGATTCAAGT GGATTGGAAC TCTGAGCTTC CAGTCAAAGT

[0047] 101 GAACGTTCCC AAAGTGCCAA TCCATAGCCT TGTGCTTGAC TGTGGAGCTA

[0048] 151 TATCTTTCCT GGACGTTGTT GGAGTGAGAT CACTGCGGGT GGTAAGGTTC

[0049] 201 TGGTTTTCTG AATTATACAT TTGGAGCTTT GGCA

[0050] 对照例 1

[0051] 采用多重 PCR-ARMS 方法检测这两个相邻 SNP 位点, 选用共用引物 (命名为 CP1), 序列为 (5' -3') TTAGCCTGATGAGGATATTGAAG (SEQ NO. 5), 5' 端 FAM 荧光染色。

[0052] SNP1a 位点的两条 ARMS 引物 (第一外侧引物、第二外侧引物): 扩增 T 碱基的引物 (命名为 OP-T1), 序列为 (5' -3') ACCAGAACCTTACCACCtCA (SEQ NO. 1), 倒数第三位引入强错配, T_m 为 58.4°C, 其中划横线部分 17bp 为竞争区, 剩余 4bp 为特异区, OP-T1 与 CP1 扩增片段大小为 204bp; 扩增 A 碱基的引物命名为 (OP-A1), 序列为 (5' -3') tAtaCAGAACCTTACCACCgCT (SEQ NO. 2), 倒数第四位引入强错配, 同时在引物 5' 端外挂四个碱基以将碱基差异转化为序列长度差异, T_m 为 55.7°C, 其中划横线部分 15bp 为竞争区, 剩余 3' 端 4bp 为特异区, OP-A1 与 CP1 扩增片段大小为 206bp。

[0053] SNP2a 位点的两条 ARMS 引物 (第一内侧引物、第二内侧引物): 扩增 G 碱基的引物 (命名为 IP-G1), 序列为 (5' -3') GAAAGATATAGCTCCACAGTCAAcCAC (SEQ NO. 3), 倒数第四位引入中错配, T_m 为 62.2°C, IP-G1 与 CP1 扩增片段大小为 158bp; 扩增 C 碱基的引物 (命名为 IP-C1), 序列为 (5' -3') tataGAAAGATATAGCTCCACAGTCAAGgAG (SEQ NO. 4), 倒数第三位引入中错配, 同时在引物 5' 端外挂四个碱基以将碱基差异转化为序列长度差异, T_m 为 61.8°C, IP-C1 与 CP1 扩增片段大小为 162bp。用以上引物进行 ARMS-PCR 扩增。

[0054] ARMS-PCR 体系的组成如下:

反应组分	体积 (μL)
Reaction Mix (无锡中德美联生物技术有限公司配制)(Tris-HCl:100mM, KCl:150mM, MgCl ₂ :7.5mM, BSA:1 mM, dNTPs:1 mM)	4.0
引物(摩尔比为 CP1: OP-T1: OP-A1: IP-G1: IP-C1 =1.5:0.2:0.2:0.6:0.6)	2.0
热启动 C-Taq 酶	0.4
模板 (源于受验者)	1
sdH ₂ O	2.6
总体积	10

[0056] PCR 温度(热循环)的谱 1 如下表所示

阶段	预变性	PCR 扩增 (循环数: 30)			终延伸
温度	95°C	94°C	58°C	72°C	72°C
时间	2min	30sec	1min	1min	20min

[0058] 图 5 (1) 示出谱 1 的毛细管荧光电泳结果。由 OP-T1 和 CP1 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP1a 位点)的荧光值为 975RFU, 由 IP-G1 和 CP1 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP2a 位点)的荧光值为 57RFU。内侧 ARMS 引物的扩增产物量非常低, 明显受到外侧 ARMS 引物的内抑制作用。

[0059] 实施例 1

[0060] 本实施例中采用了与比较例中相同的共用上游引物(CP1); SNP1a 位点的两条 ARMS 引物: 扩增 T 碱基的引物(OP-T1)和扩增 A 碱基的引物(OP-A1); SNP2a 位点的两条

ARMS 引物：扩增 G 碱基的引物 (IP-G1)，扩增 C 碱基的引物 (IP-C1)。

[0061] 增加针对 SNP1a 位点的 ARMS 引物所设计的竞争性非扩增引物命名为 CNEP1，序列为 (5' -3') GAAAACCAGAACCTTACCACC-C3Spacer (SEQ NO. 6)， T_m 为 55.6℃，其中划线部分 17bp 为竞争区，剩余 5' 端 4bp 为调整区，在该序列 3' 末端采用 C3Spacer 修饰。用以上引物进行如下所示的 ARMS-PCR 扩增。

[0062] 实施例 1 中，竞争性引物的 T_m 值为 55.6℃，外侧引物的 T_m 值分别为 58.4℃ 和 55.7℃，竞争区的长度为 15-17bp。

[0063] ARMS-PCR 体系的组成如下：

反应组分	体积 (μL)
[0064] Reaction Mix (无锡中德美联生物技术有限公司配制) (Tris-HCl:100mM, KCl:150mM, MgCl ₂ :7.5mM, BSA:1 mM, dNTPs:1 mM)	4.0
Primers (摩尔比为 CPI: OP-T1: OP-A1: IP-G1: IP-C1: CNEP1 = 1.5:0.2:0.2:0.6:0.6: 0.6)	2.0
热启动 C-Taq 酶	0.4
模板 (源于受验者)	1
[0065] sdH ₂ O	2.6
总体积	10

[0066] PCR 温度 (热循环) 的谱与比较例相同。

[0067] 图 6 (1) 示出谱 1 的毛细管荧光电泳结果。由 OP-T1 和 CP1 的组合得到的 DNA 片段 (检测 SNP1a 位点) 的荧光值为 582RFU，由 IP-G1 和 CP1 的组合得到的 DNA 片段 (检测 SNP2a 位点) 的荧光值为 588RFU。内外侧 ARMS 引物均能扩增而且产物量比较均衡。

[0068] 由图 6 可知 CNEP1 在 PCR 过程中与 OP-T1 竞争，保证了 IP-G1 的扩增，从而均衡了内侧 ARMS 引物与外侧 ARMS 引物的扩增效率。

[0069] 图 7 (1) 是根据内侧扩增片段的荧光值与外侧扩增片段的荧光值的比值计算得出。与图 5 (1) 所示的 ARMS-PCR 结果相比较，图 6 (1) 所示的加入 CNEP1 后的 ARMS-PCR 产生的内扩增产物与外扩增产物的比值提升了 16.3 倍。

[0070] 综合以上结果可以看出，在只加入 ARMS 引物检测邻近 SNP 时由于扩增内抑制作用，导致内侧引物扩增效率受到严重影响。而加入 CNEP 时缓解了外侧 ARMS 引物对内侧 ARMS 引物的内抑制作用，均衡了内侧和外侧 ARMS 引物的扩增效率，提高了 SNP 位点的检测准确性。

[0071] 第二实施例部分

[0072] 本实施例及对照例中所用的模板 DNA 是利用磁珠法 DNA 提取试剂盒 (长春市博坤生物科技有限公司) 提取。

[0073] 所有第一 SNP 位点和第二 SNP 位点的引物、共用引物、外侧竞争性非扩增引物均购自上海生工生物工程有限公司。

[0074] 共用引物在 5' 端进行 ROX 荧光修饰。

[0075] 外侧 ARMS 竞争性非扩增引物在 3' 端进行 -NH₂C6 修饰。

[0076] 反应混合物 Reaction Mix 包含 dNTP、Mg²⁺、缓冲溶液等，采用常规配置即可，由无锡中德美联生物技术有限公司配制。PCR 后的电泳解析采用 ABI3130 遗传分析仪 (ABI 公司

制)。

[0077] 以下的实施例和比较例中,检测的 SNP 位点为人的线粒体 12s-MTRNR1 基因所存在的 1494C>T 和 1555A>G 两个邻近的 SNP 位点。线粒体 DNA 突变是导致呈母系遗传的药物性耳聋的最常见原因。在已报道的与遗传性非综合征型耳聋相关的线粒体 DNA (mtDNA)突变中,以 12s-MTRNR1 基因的 1555A>G 突变最为常见。近几年关于 12s-MTRNR1 基因 1494C>T 的研究也成为我国学者研究线粒体基因突变致聋的热点。避免该基因突变携带者使用氨基糖甙类抗生素是预防及减少此类耳聋发生的关键。

[0078] 12s-MTRNR1 基因的部分序列如下,其中第 122 位为 1494C>T 位点,命名为 SNP2b;第 183 位为 1555A>G 位点,命名为 SNP1b。

[0079] 1 TACCCCAGAA AACTACGATA GCCCTTATGA AACTTAAGGG TCGAAGGTGG

[0080] 51 ATTTAGCAGT AAATAAGAG TAGAGTGCTT AGTTGAACAG GGCCCTGAAG

[0081] 101 CGCGTACACA CCGCCCGTCA CCCTCCTCAA GTATACTTCA AAGGACATTT

[0082] 151 AACTAAAACC CCTACGCATT TATATAGAGG AGACAAGTCG TAACATGGTA

[0083] 201 AGTGTACTGG AAAGTGAAGT TGGACGAACC AGAGTGTAGC TTAACACAAA

[0084] 251 GCACCCAACT TACTACTTAGG AGATTTCAAC TTAACCTGAC CGCTCTGA

[0085] 对照例 2

[0086] 采用多重 PCR-ARMS 方法检测这两个相邻 SNP 位点,选用共用引物(命名为 CP2),序列为(5' -3')ACATTTTCTACCCCAGAAAACACTACG(SEQ NO. 11),5'端 ROX 荧光染色。

[0087] SNP1b 位点的两条 ARMS 引物(第一外侧引物、第二外侧引物):扩增 A 碱基的引物(命名为 OP-A2),序列为(5' -3')CAGTACACTTACCATGTTACTACTTGT(SEQ NO. 7),倒数第七位引入强错配, T_m 为 57.4°C,其中划横线部分 12bp 为竞争区,剩余 15bp 为特异区,OP-A2 与 CP2 扩增片段大小为 217bp;扩增 G 碱基的引物命名为(OP-G2),序列为(5' -3')atatCAGTACACTTACCATGTTACGAATTGC(SEQ NO. 8),倒数第五位引入强错配,同时在引物 5'端外挂四个碱基以将碱基差异转化为序列长度差异, T_m 为 61.8°C,其中划横线部分 12bp 为竞争区,剩余 3'端 15bp 为特异区,OP-A1 与 CP1 扩增片段大小为 221bp。

[0088] SNP2 位点的两条 ARMS 引物(第一内侧引物、第二内侧引物):扩增 C 碱基的引物(命名为 IP-C2),序列为(5' -3')ATGTCCTTTGAAGTATACTTGAGtAGG(SEQ NO. 9),倒数第四位引入强错配, T_m 为 57.6°C,IP-C2 与 CP2 扩增片段大小为 156bp;扩增 T 碱基的引物(命名为 IP-T2),序列为(5' -3')tataATGTCCTTTGAAGTATACTTGAGGcGA(SEQ NO. 10),倒数第三位引入强错配,同时在引物 5'端外挂四个碱基以将碱基差异转化为序列长度差异, T_m 为 64.3°C,IP-C2 与 CP2 扩增片段大小为 160bp。用以上引物进行 ARMS-PCR 扩增。

[0089] ARMS-PCR 体系的组成如下:

反应组分	体积 (μL)
Reaction Mix (无锡中德美联生物技术有限公司配制)(Tris-HCl:100mM, KCl:150mM, MgCl ₂ :7.5mM, BSA:1 mM, dNTPs:1 mM)	4.0
[0090] 引物(摩尔比为 CP2: OP-A2: OP-G2: IP-C2: IP-T2 =1.5:0.2:0.2:0.6:0.6)	2.0
热启动 C-Taq 酶	0.4
模板(源于受验者)	1
sdH ₂ O	2.6
总体积	10

[0091]

[0092] PCR 温度(热循环)的谱 2 如表 2 所示

[0093] 2

阶段	预变性	PCR 扩增(循环数: 30)			终延伸
[0094] 温度	95℃	94℃	58℃	72℃	72℃
时间	2min	30sec	1min	1min	20min

[0095] 图 5 (2)示出谱 2 的毛细管荧光电泳结果。由 OP-A2 和 CP2 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP1b 位点)的荧光值为 2595RFU,由 IP-C2 和 CP2 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP2b 位点)的荧光值为 716RFU。内侧 ARMS 引物的扩增产物量非常较低,受到外侧 ARMS 引物的内抑制作用。

[0096] 实施例 2

[0097] 本实施例中采用了与比较例中相同的共用上游引物(CP2);SNP1b 位点的两条 ARMS 引物:扩增 A 碱基的引物(OP-A2)和扩增 G 碱基的引物(OP-G2);SNP2b 位点的两条 ARMS 引物:扩增 C 碱基的引物(IP-C2),扩增 T 碱基的引物(IP-T2)。

[0098] 增加针对 SNP1b 位点的 ARMS 引物所设计的竞争性非扩增引物命名为 CNEP2,序列为 (5' -3') CAAGTGCACCTTCCAGTACACTTAC-NH₂C6 (SEQ NO. 12), T_m 为 58.2℃,其中划线部分 12bp 为竞争区,剩余 5'端 13bp 为调整区,在该序列 3'末端采用 -NH₂C6 修饰。用以上引物进行如下所示的 ARMS-PCR 扩增。

[0099] 实施例中,竞争性引物的 T_m 值为 58.2℃,外侧引物的 T_m 值分别为 57.4℃和 61.8℃,竞争区的长度为 12bp。

[0100] ARMS-PCR 体系的组成如下:

反应组分	体积 (μL)
Reaction Mix (无锡中德美联生物技术有限公司配制)(Tris-HCl:100mM, KCl:150mM, MgCl ₂ :7.5mM, BSA:1 mM, dNTPs:1 mM)	4.0
[0101] Primers (摩尔比为 CP2: OP-A2: OP-G2: IP-C2: IP-T2: CNEP2 =1.5:0.2:0.2:0.6:0.6:1.2)	2.0
热启动 C-Taq 酶	0.4
模板(源于受验者)	1
sdH ₂ O	2.6
总体积	10

[0102] PCR 温度(热循环)的谱与比较例相同。

[0103] 图 6 (2) 示出谱 2 的毛细管荧光电泳结果。由 OP-A2 和 CP2 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP1b 位点) 的荧光值为 1303RFU, 由 IP-C2 和 CP2 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP2b 位点) 的荧光值为 1040RFU。内外侧 ARMS 引物均能扩增而且产物量比较均衡。

[0104] 由图 6 可知 CNEP2 在 PCR 过程中与 OP-A2 竞争, 保证了 IP-C2 的扩增, 从而均衡了内侧 ARMS 引物与外侧 ARMS 引物的扩增效率。

[0105] 图 7 是根据内侧扩增片段的荧光值与外侧扩增片段的荧光值的比值计算得出。与图 5 (2) 所示的 ARMS-PCR 结果相比较, 图 6 (2) 所示的加入 CNEP2 后的 ARMS-PCR 产生的内扩增产物与外扩增产物的比值提升了 1.9 倍, 这一结果由图 7 (3) 及图 7 (3) 示出。

[0106] 综合以上结果可以看出, 在只加入 ARMS 引物检测邻近 SNP 时由于扩增内抑制作用, 导致内侧引物扩增效率受到严重影响, 改变 PCR 退火温度对缓解内抑制现象效果不明显。而加入 CNEP 时缓解了外侧 ARMS 引物对内侧 ARMS 引物的内抑制作用, 均衡了内侧和外侧 ARMS 引物的扩增效率, 提高了 SNP 位点的检测准确性。

[0107] 第三实施例部分

[0108] 本实施例及对对照例中所用的模板 DNA 是利用磁珠法 DNA 提取试剂盒(长春市博坤生物科技有限公司) 提取。

[0109] 所有第一 SNP 位点和第二 SNP 位点的引物、共用引物、外侧竞争性非扩增引物均购自上海生工生物工程有限公司。

[0110] 共用引物在 5' 端进行 FAM 荧光修饰。

[0111] 外侧 ARMS 竞争性非扩增引物在 3' 端进行磷酸化修饰。

[0112] 反应混合物 Reaction Mix 包含 dNTP、Mg²⁺、缓冲溶液等, 采用常规配置即可, 由无锡中德美联生物技术有限公司配制。PCR 后的电泳解析采用 ABI3130 遗传分析仪(ABI 公司制)。

[0113] 以下的实施例和比较例中, 检测的 SNP 位点为水稻可溶性淀粉酶基因 SSIIIa 所存在的 4074G>A 和 4117T>G 两个邻近的 SNP 位点。水稻可溶性淀粉酶是控制水稻支链淀粉生物合成的关键酶之一, 对支链淀粉结构的形成和稻米品质起着重要作用。近几年关于 SSIIIa 基因的 SNP 位点研究成为我国学者研究水稻品质基因及分子育种的热点。有研究表明 SSIIIa 基因的支链淀粉结构与糊化起始温度与 4074G>A 和 4117T>G 两个邻近的 SNP 位点显著相关。

[0114] 水稻可溶性淀粉酶基因 SSIIIa 部分序列如下, 其中第 4074 位为 4074G>A 位点, 命名为 SNP1c ; 第 4117 位为 4117T>G 位点, 命名为 SNP2c。

[0115] 1 GATGTTTTTG ACCAAATAAG TACTATTTC ACATCCTAAG ACATGTTATA

[0116] 51 AAATTCATCC AAACCTCAGTA TTCTTTCAAA TATACAATAA TTAATTTGAC

[0117] 101 CAGTTAGATC ATTCTTCACT TTGAACTTGT GCCTTAAGCT GACTGTTTTG

[0118] 151 ACCAAACGAA TTGATGGCCC ACCCAGTTAG CAGTTAGCAC TATTTATTGG

[0119] 201 AACTTCTGTT ATACCATATT ATATTATTCA AGGAAAAATG TAGTTGTTCA

[0120] 251 CTGTCATGTA TATATCTTGA TGTTTTGAAC ATCAGATATA TGTTGTGAAG

[0121] 对照例

[0122] 采用多重 PCR-ARMS 方法检测这两个相邻 SNP 位点, 选用共用引物(命名为 CP3), 序列为(5' -3') TATACATGACAGTGAACAACACTACAT(SEQ NO. 17), 5' 端 FAM 荧光染色。

[0123] SNP1c 位点的两条 ARMS 引物 (第一外侧引物、第二外侧引物): 扩增 G 碱基的引物 (命名为 OP-G3), 序列为 (5' -3') AATAAGTTACTATTTACATCCTtAG (SEQ NO. 13), 倒数第三位引入中错配, T_m 为 52°C, 其中划横线部分 6bp 为竞争区, 剩余 17bp 为特异区, OP-G3 与 CP3 扩增片段大小为 248bp; 扩增 A 碱基的引物命名为 (OP-A3), 序列为 (5' -3') attAATAAGTTACTATTTACATCCTAtA (SEQ NO. 14), 倒数第二位引入中错配, 同时在引物 5' 端外挂四个碱基以将碱基差异转化为序列长度差异, T_m 为 54.9°C, 其中划横线部分 6bp 为竞争区, 剩余 3' 端 18bp 为特异区, OP-A3 与 CP3 扩增片段大小为 252bp。

[0124] SNP2 位点的两条 ARMS 引物 (第一内侧引物、第二内侧引物): 扩增 T 碱基的引物 (命名为 IP-T3), 序列为 (5' -3') AAACTCAGTATTCTTTCAAAcAT (SEQ NO. 15), 倒数第三位引入强错配, T_m 为 50.5°C, IP-T3 与 CP3 扩增片段大小为 201bp; 扩增 G 碱基的引物 (命名为 IP-G3), 序列为 (5' -3') attAAACTCAGTATTCTTTCAAATtG (SEQ NO. 16), 倒数第二位引入中错配, 同时在引物 5' 端外挂四个碱基以将碱基差异转化为序列长度差异, T_m 为 56.2°C, IP-G3 与 CP3 扩增片段大小为 205bp。用以上引物进行 ARMS-PCR 扩增。

[0125] ARMS-PCR 体系的组成如下:

反应组分	体积 (μL)
Reaction Mix (无锡中德美联生物技术有限公司配制)(Tris-HCl:100mM, KCl:150mM, MgCl ₂ :7.5mM, BSA:1 mM, dNTPs:1 mM)	4.0
[0126] 引物(摩尔比为 CP3: OP-G3: OP-A3: IP-T3: IP-G3 =1.5:0.2:0.2:0.3:0.3)	2.0
热启动 C-Taq 酶	0.4
模板(源于受验者)	1
sdH ₂ O	2.6
总体积	10

[0127] PCR 温度(热循环)的谱 3 如表 3 所示

[0128] 3

阶段	预变性	PCR 扩增(循环数: 30)			终延伸
[0129] 温度	95°C	94°C	53°C	72°C	72°C
时间	2min	30sec	1min	1min	20min

[0130] 图 5 (3) 示出谱 3 的毛细管荧光电泳结果。由 OP-G3 和 CP3 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP1c 位点)的荧光值为 4550RFU, 由 IP-T3 和 CP3 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP2c 位点)的荧光值为 1350RFU。内侧 ARMS 引物的扩增产物量非常较低, 受到外侧 ARMS 引物的内抑制作用。

[0131] 实施例 3

[0132] 本实施例中采用了与比较例中相同的共用上游引物(CP3); SNP1c 位点的两条 ARMS 引物: 扩增 G 碱基的引物(OP-G3)和扩增 A 碱基的引物(OP-A3); SNP2c 位点的两条 ARMS 引物: 扩增 C 碱基的引物(IP-T3), 扩增 T 碱基的引物(IP-G3)。

[0133] 增加针对 SNP1c 位点的 ARMS 引物所设计的竞争性非扩增引物命名为 CNEP3, 序列为 (5' -3') GGATGTTTTGACCAAAATAAG, 3' 端磷酸化 (SEQ NO. 18), T_m 为 52.1°C, 其中划线部分 6bp 为竞争区, 剩余 5' 端 15bp 为调整区, 在该序列 3' 末端采用磷酸化修饰。用以上引

物进行如下所示的 ARMS-PCR 扩增。

[0134] 实施例中,竞争性引物的 T_m 值为 52.1°C ,外侧引物的 T_m 值分别为 52°C 和 54.9°C ,竞争区的长度为 6bp。

[0135] ARMS-PCR 体系的组成如下:

反应组分	体积 (μL)
Reaction Mix (无锡中德美联生物技术有限公司配制)(Tris-HCl:100mM, KCl:150mM, MgCl_2 :7.5mM, BSA:1 mM, dNTPs:1 mM)	4.0
[0136] Primers (摩尔比为 CP2: OP-A2: OP-G2: IP-C2: IP-T2: CNEP2 =1.5:0.2:0.2:0.3:0.3:0.2)	2.0
热启动 C-Taq 酶	0.4
模板 (源于受验者)	1
sdH ₂ O	2.6
总体积	10

[0137] PCR 温度(热循环)的谱与比较例相同。

[0138] 图 6 (3)示出谱 3 的毛细管荧光电泳结果。由 OP-G3 和 CP3 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP1c 位点)的荧光值为 2980RFU,由 IP-T3 和 CP3 的组合得到的 DNA 片段(检测 SNP2c 位点)的荧光值为 2520RFU。内外侧 ARMS 引物均能扩增而且产物量比较均衡。

[0139] 由图 6 可知 CNEP2 在 PCR 过程中与 OP-G3 竞争,保证了 IP-T3 的扩增,从而均衡了内侧 ARMS 引物与外侧 ARMS 引物的扩增效率。

[0140] 图 7 是根据内侧扩增片段的荧光值与外侧扩增片段的荧光值的比值计算得出。与图 5 (3)所示的 ARMS-PCR 结果相比较,图 6 (3)所示的加入 CNEP3 后的 ARMS-PCR 产生的内扩增产物与外扩增产物的比值提升约了 1.9 倍,这一结果由图 7 (5)及图 7 (6)示出。

[0141] 综合以上结果可以看出,在只加入 ARMS 引物检测邻近 SNP 时由于扩增内抑制作用,导致内侧引物扩增效率受到严重影响,改变 PCR 退火温度对缓解内抑制现象效果不明显。而加入 CNEP 时缓解了外侧 ARMS 引物对内侧 ARMS 引物的内抑制作用,均衡了内侧和外侧 ARMS 引物的扩增效率,提高了 SNP 位点的检测准确性。

SEQUENCE LISTING

<110>	无锡中德美联生物技术有限公司	
<120>	一种检测邻近 SNP 的多重 PCR 方法	
<130>	none	
<160>	18	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	accagaacct taccaccctc a	21
<210>	2	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	tatacagaac cttaccacca gct	23
<210>	3	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	gaaagatata gctccacagt caaccac	27
<210>	4	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
	tatagaaaga tatagctcca cagtcaagga g	31
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
	ttgagcctga tgaggatatt gaag	24
<210>	6	

<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
gaaaaccaga acctaccac c	21
<210> 7	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
cagtacactt accatgttac tacttgt	27
<210> 8	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
atatcagtac acttaccatg ttacgaattg c	31
<210> 9	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
atgtcctttg aagtatactt gagtagg	27
<210> 10	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
tataatgtcc tttgaagtat acttgaggcg a	31
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 11	
acattttcta cccagaaaa ctacg	25
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<400> 12	
caagtgcact ttccagtaca ettac	25
<210> 13	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
aataagttac tatttcacat ccttag	26
<210> 14	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
attaaataag ttactatttc acatcctata	30
<210> 15	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 15	
aaactcagta ttctttcaaa cat	23
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
attaaaaactc agtatttcttt caaattg	27
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
tatacatgac agtgaacaac tacat	25
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 18	
ggatgtttttt gaccaaataa g	21

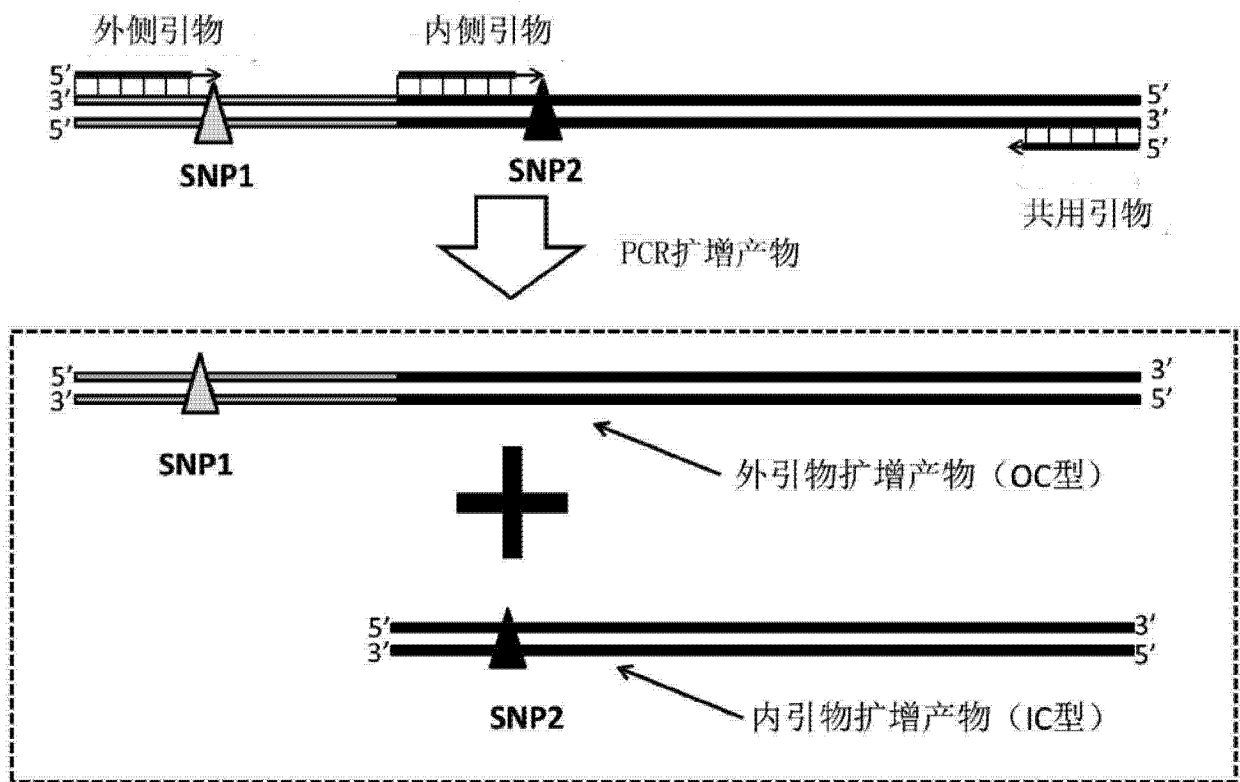


图 1

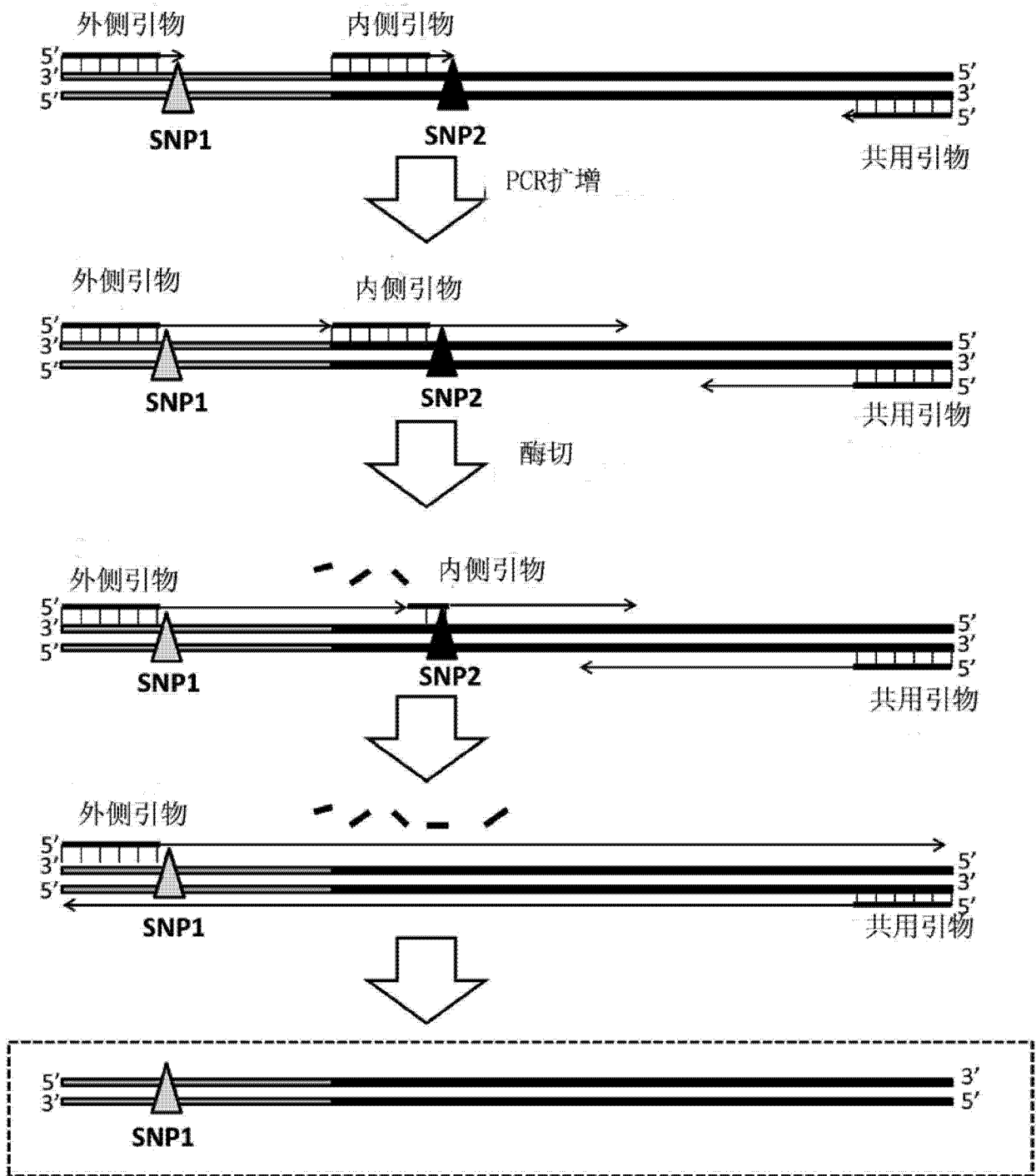


图 2

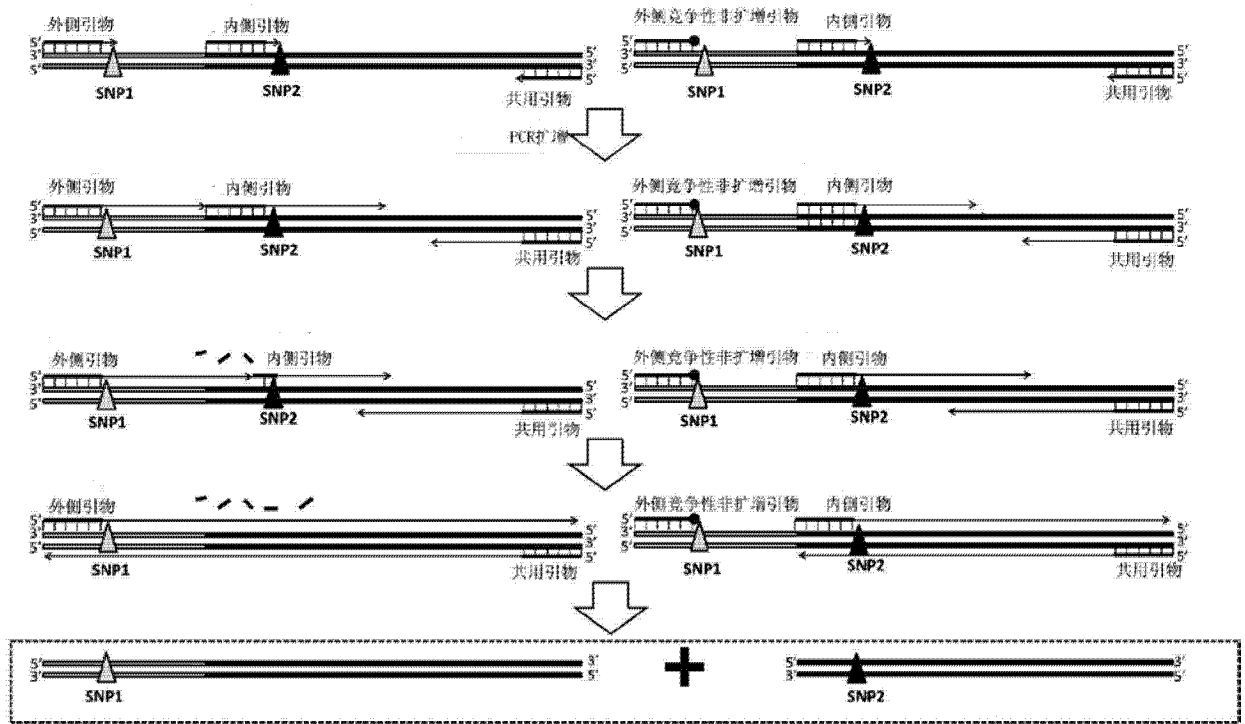


图 3

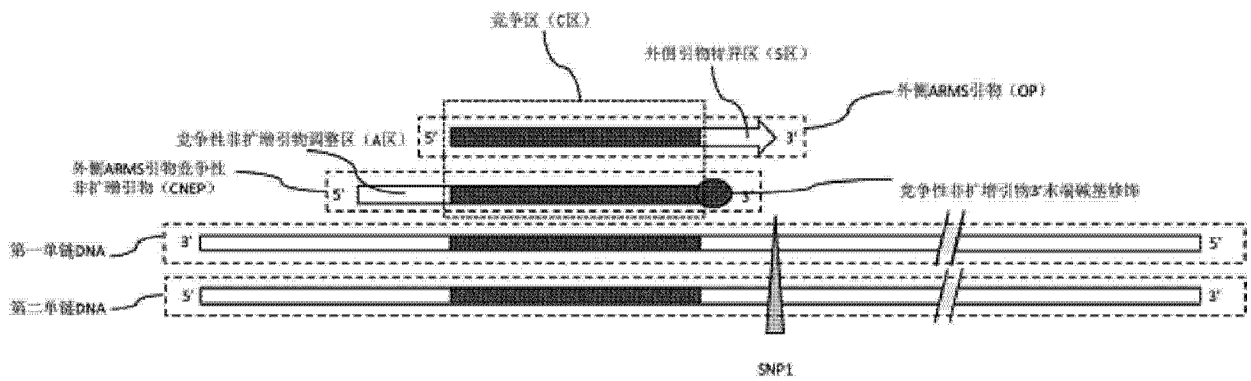
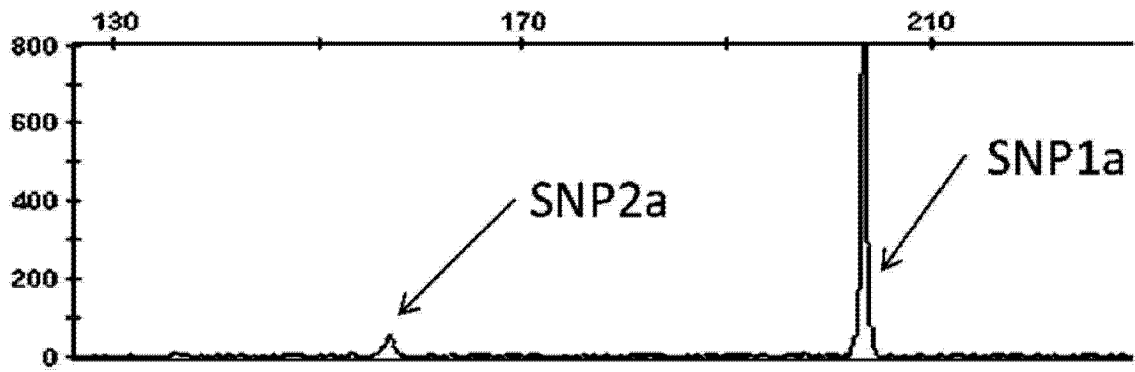
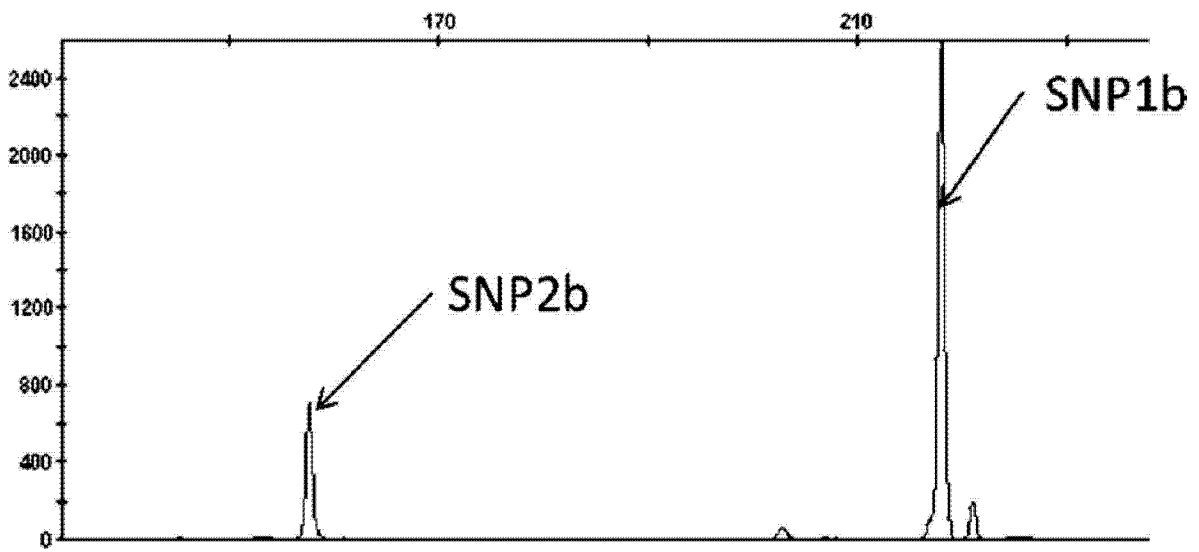


图 4

1



2



3

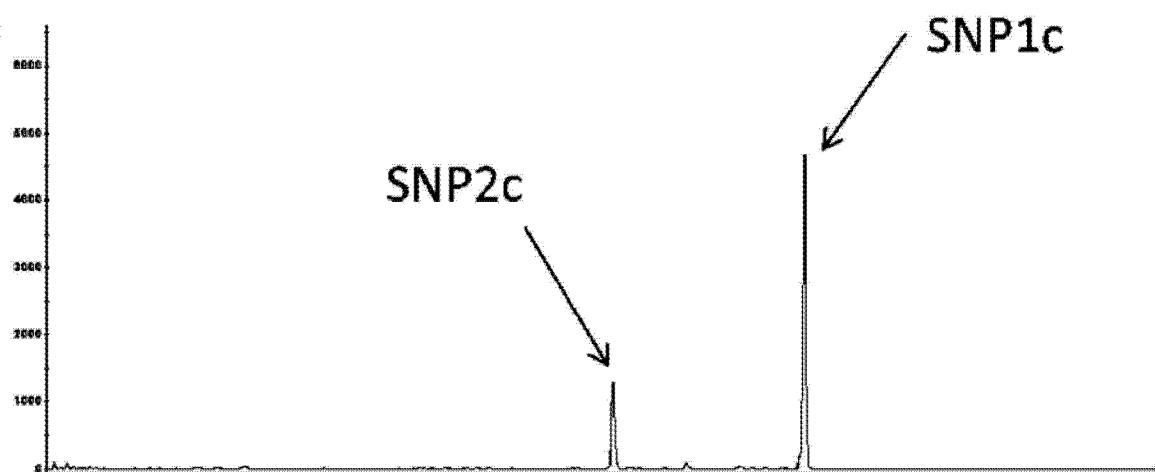


图 5

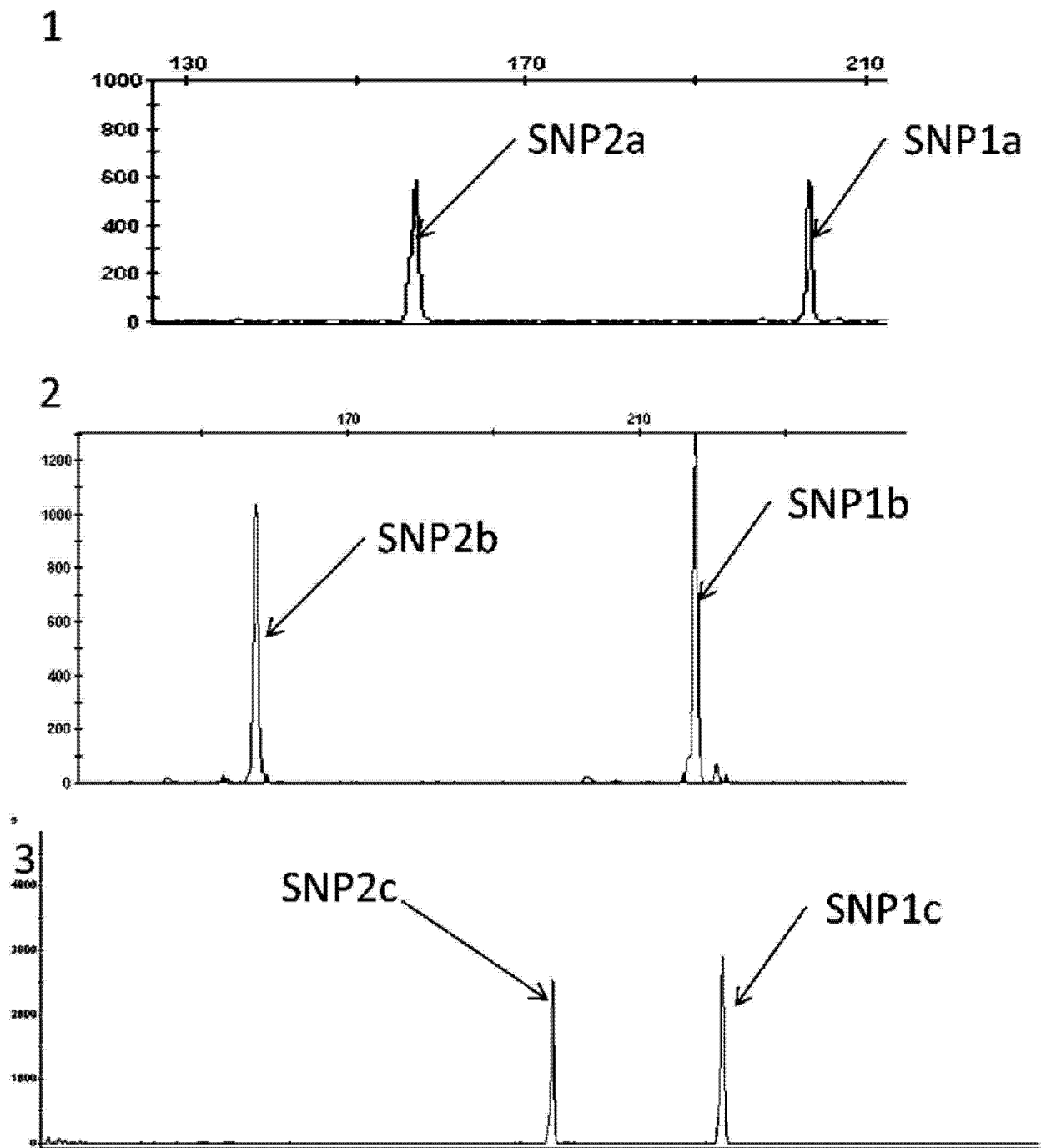


图 6

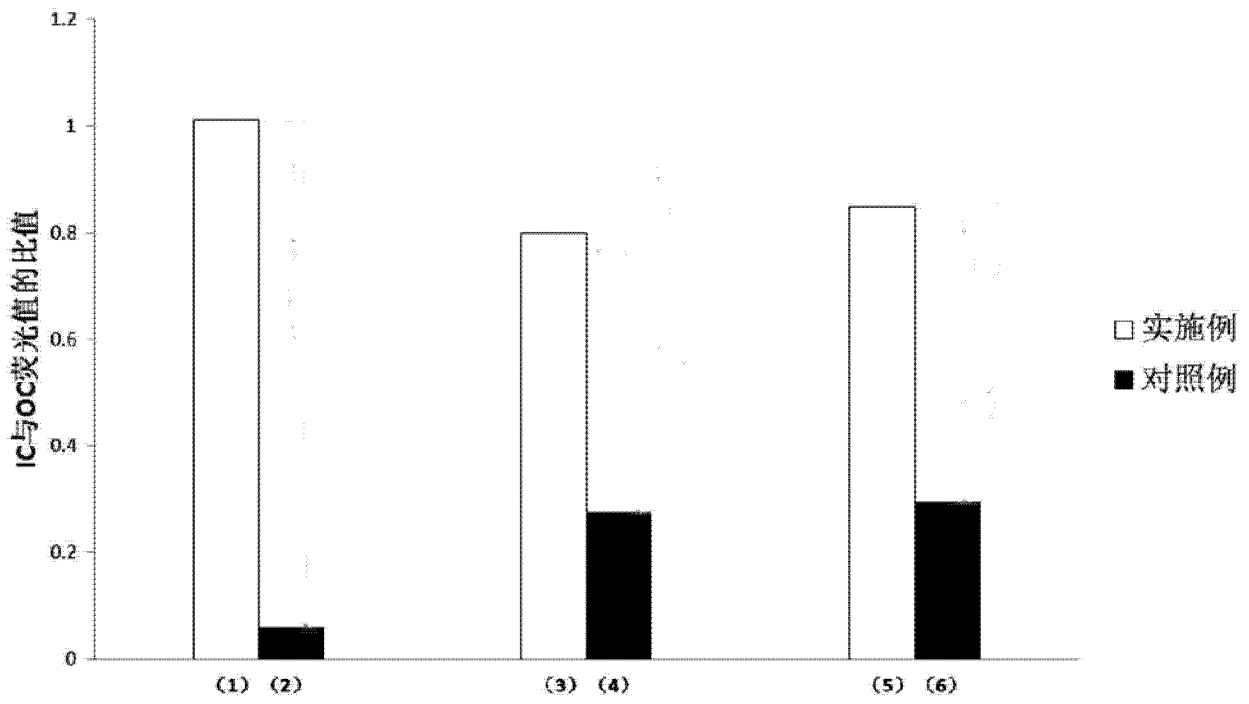


图 7