



(21) 申请号 202310985818.2

(22) 申请日 2023.08.07

(71) 申请人 上海万子健生物科技有限公司

地址 201815 上海市嘉定区新冠路296号1
幢4层、5层

(72) 发明人 李雅雅 沙海天 白艳军

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所(普通
合伙) 31219

专利代理师 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书2页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

一种基于液态芯片的SNP检测方法

(57) 摘要

本申请涉及生物技术领域,特别涉及一种基于液态芯片的SNP检测方法。本申请提供一种基于液态芯片的SNP检测引物,包括上游引物和下游引物;上游引物从5'端到3'端依次包括tag序列、间隔修饰、第一特异序列和第一酶切序列;下游引物从5'端到3'端依次包括检测基团、第二特异序列和第二酶切序列,第一酶切序列或第二酶切序列中含有匹配目标基因SNP位点的RNA碱基。本申请通过在引物上设计酶切序列,由于引物中的RNA碱基只有在上游引物、下游引物与目标基因完全匹配后才能被RNase酶切割,进而正常延伸,因此减少了引物二聚体和其他非特异性扩增产物,实现PCR的单管多重扩增;通过量子点微球可以进行多个目标检测,可以实现多重SNP位点的同时检测。

1. 一种基于液态芯片的SNP检测引物,其特征在于,包括上游引物和下游引物;所述上游引物从5'端到3'端依次包括tag序列、间壁修饰、第一特异序列和第一酶切序列;所述下游引物从5'端到3'端依次包括检测基团、第二特异序列和第二酶切序列,所述第一酶切序列或第二酶切序列中含有匹配目标基因SNP位点的RNA碱基。

2. 如权利要求1所述的基于液态芯片的SNP检测引物,其特征在于,所述第一酶切序列从5'端到3'端均依次包括第一RNA碱基、第三特异性序列、错配碱基和3' block修饰;所述第二酶切序列从5'端到3'端均依次包括第二RNA碱基、第四特异性序列、错配碱基和3' block修饰;所述第一特异序列和/或第三特异性序列适于特异性结合目标基因的第一链;所述第二特异序列和/或第四特异性序列适于特异性结合目标基因的第二链,所述第一RNA碱基或第二RNA碱基匹配SNP位点;

和/或,所述目标基因选自CYP2C9或VKORC1。

3. 如权利要求1所述的基于液态芯片的SNP检测引物,其特征在于,

所述tag序列为10~30bp的随机DNA序列;

和/或,所述间壁修饰包括dSpacer;

和/或,所述检测基团包括生物素;

和/或,所述3' block修饰包括C3 Spacer、C6 Spacer、ddSpacer中的一种或多种的组合。

4. 如权利要求1所述的基于液态芯片的SNP检测引物,其特征在于,所述上游引物包含匹配SNP位点的RNA碱基,所述上游引物包括1条野生型上游引物和2~3条突变型上游引物。

5. 如权利要求4所述的基于液态芯片的SNP检测引物,其特征在于,所述野生型上游引物的RNA碱基匹配SNP位点的野生碱基,突变型上游引物的RNA碱基匹配SNP位点的突变碱基。

6. 如权利要求1~5任一项所述的基于液态芯片的SNP检测引物,其特征在于,所述检测引物的序列如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、或SEQ ID NO:6所示。

7. 一种基于液态芯片的SNP检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 采用权利要求1~6任一项所述的SNP检测引物,与目标基因进行聚合酶链式反应,所述聚合酶链式反应体系中加入有RNA剪切酶,得到带有生物素和tag序列的双链DNA产物;

2) 用带有anti-tag序列的微球与步骤1)的双链DNA产物进行杂交反应,获得杂交产物;

3) 向杂交产物中加入显色剂,孵育,检测信号,分析获得检测结果。

8. 如权利要求7所述的SNP检测方法,其特征在于,包括以下特征中的一种或多种的组合:a1) 步骤1)中,所述RNA剪切酶为RNase HII酶;

a2) 步骤2)中,所述微球选自荧光微球或量子点微球;

a3) 步骤2)中,所述anti-tag序列如SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、或SEQ ID NO:10所示;

a4) 步骤3)中,所述显色剂与生物素反应。

9. 一种基因检测试剂盒,其特征在于,包括如权利要求1~6任一项所述的SNP检测引物,可选的,还包括带有anti-tag序列的微球、RNA剪切酶中的一种或多种的组合。

10. 如权利要求1~6任一项所述的SNP检测引物、如权利要求7~8任一项所述的SNP检

测方法、或如权利要求9所述的基因检测试剂盒在SNP检测中的应用。

一种基于液态芯片的SNP检测方法

技术领域

[0001] 本申请涉及生物技术领域,特别涉及一种基于液态芯片的SNP检测方法。

背景技术

[0002] 聚合酶链式反应(PCR)是一种用于扩增特定的DNA片段的分子生物学技术,PCR的最大特点是能将微量的DNA大幅增加。PCR基本原理由变性-退火-延伸三个基本反应步骤构成:(1)模板DNA的变性:模板DNA经加热至93℃左右一定时间后,使模板DNA双链或经PCR扩增形成的双链DNA解离,使之成为单链,以便它与引物结合,为下轮反应作准备;(2)模板DNA与引物的退火(复性):模板DNA经加热变性成单链后,温度降至55℃左右,引物与模板DNA单链的互补序列配对结合;(3)引物的延伸:DNA模板-引物结合物在72℃、DNA聚合酶(如TaqDNA聚合酶)的作用下,以dNTP为反应原料,靶序列为模板,按碱基互补配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板DNA链互补的半保留复制链。重复循环变性-退火-延伸三过程就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。

[0003] 单核苷酸多态性(SNP)主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性。它是人类可遗传的变异中最常见的一种,占有已知多态性的90%以上。SNP检测在医学诊断有多个应用,如用于检测与遗传疾病相关的基因变异,例如乳腺癌基因BRCA1和BRCA2的变异;可以用于预测某些药物对个体的反应,例如华法林对凝血功能的影响;可以用于评估个体患某些疾病的风险,例如心血管疾病、糖尿病等。

[0004] 液态芯片(liquid chip,也称为流式荧光技术),是基于微球和流式技术的一种临床应用型高通量发光检测技术,属于新型生物芯片技术平台,由微球、探针分子、待测分子、报告分子四部分所组成。其核心技术是通过在不同荧光编码的微球上包被不同靶标对应的探针,加入待检样本后,再和带有另一种荧光的报告分子结合,形成微球探针靶标报告分子的复合物,在流式荧光仪中读取信号值,即可对一个样本同时检测多种靶标。

[0005] 目前对基因多态性的检测方法一般有测序法、PCR探针法、PCR-ARMS、基因芯片法、核酸质谱法等,其中测序法、PCR探针法、PCR-ARMS存在检测通量低的问题,无法满足多个基因多态性检测的要求;基因芯片及核酸质谱方法虽然检测通量较前几个高,但是操作时间过长,步骤繁琐还需依赖特定的耗材。

发明内容

[0006] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本申请的目的在于提供一种基于液态芯片的SNP检测方法,用于解决上述问题。

[0007] 为实现上述目的及其他相关目的,本申请一方面提供一种基于液态芯片的SNP检测引物,包括上游引物和下游引物;所述上游引物从5'端到3'端依次包括tag序列、间壁修饰、第一特异序列和第一酶切序列;所述下游引物从5'端到3'端依次包括检测基团、第二特异序列和第二酶切序列,所述第一酶切序列或第二酶切序列中含有匹配目标基因SNP位点的RNA碱基。

[0008] 本申请第二方面提供一种基于液态芯片的SNP检测方法,包括以下步骤:

[0009] 1)采用前述的SNP检测引物,与目标基因进行聚合酶链式反应,所述聚合酶链式反应体系中加入有RNA剪切酶,得到带有生物素和tag序列的双链DNA产物;

[0010] 2)用带有anti-tag序列的微球与步骤1)的双链DNA产物进行杂交反应,获得杂交产物;

[0011] 3)向杂交产物中加入显色剂,孵育,检测信号,分析获得检测结果。

[0012] 本申请第三方面提供一种基因检测试剂盒,包括前述的SNP检测引物,可选的,还包括带有anti-tag序列的微球、RNA剪切酶中的一种或多种的组合。

[0013] 本申请第四方面提供前述的SNP检测引物、前述的SNP检测方法、或前述的基因检测试剂盒在SNP检测中的应用。

[0014] 与现有技术相比,本申请的有益效果为:

[0015] 1、本申请通过在引物上设计酶切序列,由于引物中的RNA碱基只有在上游引物、下游引物与完全匹配的目标序列杂交后才能被RNase酶切割,进而才能正常延伸,因此减少了引物二聚体和其他非特异性扩增产物,实现PCR的单管多重扩增;流式荧光通过量子点微球可以进行多个目标检测,可以实现多重SNP位点的同时检测。

[0016] 2、本申请提供一种基于液态芯片技术的SNP检测方法,该方法结合了多重PCR技术、基于液态芯片技术的恒温杂交、检测技术和特异性序列、编码微球原理,设计了一个用于华法林用药指导的基因检测试剂盒,能够实现CYP2C9和VKORC1基因位点在进行多重PCR靶标序列富集后,得到双链DNA产物,并实现在恒温条件下探针系统的杂交和信号检测。

[0017] 3、本申请解决了基因多态性检测时需要多靶点检测,可以实现同管扩增并同管检测,使用的耗材均为市面通用耗材,节约了时间和成本。

附图说明

[0018] 图1为本申请的检测原理及步骤流程图。

[0019] 图2为本申请的实施例中基因分型二维图。其中,编号1代表CYP2C9*3AA,编号2代表CYP2C9*3CC,编号3代表CYP2C9*3AC,编号4代表VKORC1 GG,编号5代表VKORC1AA,编号6代表VKORC1 GA,编号7代表NTC,编号8代表NTC。通过设置四角线,可以直观得到4个区域,其中左上角代表纯和突变,左下角代表阴性对照,右上角代表杂合突变,右下角代表野生型。

具体实施方式

[0020] 为了使本申请的发明目的、技术方案和有益效果更加清晰,下面结合实施例对本申请作进一步说明。应理解,所述实施例只用于解释本申请,并非用于限定申请的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法,熟悉此技术的人士可由本说明所揭露的内容容易地了解本申请的其他优点及功效。

[0021] 本申请的发明人经过大量探索研究,发现了一种基于液态芯片的SNP检测方法,在此基础上完成了本申请。

[0022] 本申请一方面提供一种基于液态芯片的SNP检测引物,包括上游引物和下游引物;上游引物从5'端到3'端依次包括tag序列、间壁修饰、第一特异序列和第一酶切序列;下游引物从5'端到3'端依次包括检测基团、第二特异序列和第二酶切序列,第一酶切序列或第

二酶切序列中含有匹配目标基因SNP位点的RNA碱基。本文中的匹配是指与目标基因或目标位点相同或互补。

[0023] 本申请提供的SNP检测引物中,第一酶切序列从5'端到3'端依次包括第一RNA碱基、第三特异性序列、错配碱基和3' block修饰。第二酶切序列从5'端到3'端依次包括第二RNA碱基、第四特异性序列、错配碱基和3' block修饰。第一特异序列和/或第三特异性序列适于特异性结合目标基因的第一链;第二特异序列和/或第四特异性序列适于特异性结合目标基因的第二链。目标基因的第一链和第二链互补配对。第一RNA碱基或第二RNA碱基匹配SNP位点。由于引物中的RNA碱基只有在上游引物、下游引物与完全匹配的目标序列杂交后才能被RNaseH酶切割,进而才能正常延伸,因此减少了引物二聚体和其他非特异性扩增产物,实现PCR的单管多重扩增;流式荧光通过量子点微球可以进行多个目标检测,可以实现多重SNP位点的同时检测。第三特异性碱基用于与目标基因的部分序列进行匹配。

[0024] 本申请提供的SNP检测引物中,错配碱基为与目标基因对应位置碱基不同的碱基。例如,当对应位置的碱基为C时,错配碱基可以为A、G、T中的任意一种。3' block修饰包括C3Spacer、C6 Spacer、ddSpacer中的一种或多种的组合。C3 Spacer为亚磷酰胺,Spacer C3经常被放在寡核苷酸的3'端,作为寡核苷酸延伸的封闭基团,同时Spacer C3对于核酸外切酶有一定的抗性。3' block修饰用作封闭基团使用,阻止寡核苷酸的延伸。第三特异性碱基、错配碱基和3' block修饰协同作用,可以减少引物的非特异性扩增,从而提高引物的特异性,使扩增效果更准确。

[0025] 本申请提供的SNP检测引物中,目标基因选自CYP2C9或VKORC1。其中,CYP2C9属于细胞色素P450超家族,CYP2C9能羟化代谢许多不同性质的药物,主要是酸性底物。CYP2C9基因位于人染色体10q24.2,全长约50.71kb,有9个外显子和8个内含子。迄今已发现CYP2C9存在CYP2C9*2~CYP2C9*35多种突变等位基因,以野生型CYP2C9*1和突变型CYP2C9*2和CYP2C9*3最为常见,其他突变型除CYP2C9*13外,其他均只在单一民族中发现,相关研究较少,目前研究最多的是CYP2C9*2和CYP2C9*3。CYP2C9*2突变是3号外显子上发生C430>T的突变,造成Arg144>Cys144氨基酸置换,CYP2C9*3是在7号外显子上发生A1075>C突变,造成Ile359>Leu359氨基酸置换。维生素环氧化物还原酶复合体1(VKORC1)基因是维生素K依赖性凝血因子生成的限速酶。华法林通过抑制该酶影响维生素K参与羧化酶的催化过程而发挥药物作用。VKORC1编码区和非编码区存在大量的多态性位点,其中1639位置G>A和1173位置C>T的变异型会影响华法林应用剂量。CYP2C9和VKORC1由于其自身的基因多态性,可用于解释华法林个体用药的差异性,是个体间用药差异的决定性因素。

[0026] 本申请提供的SNP检测引物中,tag序列为ATCG随机组合的10~30bp的序列。tag序列可与微球上的anti-tag序列互补配对,用于微球对聚合酶链式反应扩增后的双链DNA产物的捕获。

[0027] 本申请提供的SNP检测引物中,间壁修饰包括dSpacer。dSpacer为四氢呋喃,将dSpacer添加到寡核苷酸中,可以引入一个稳定的无碱基位点。间壁修饰提供必要的间隔以减少标记基团与寡核苷酸间的相互作用。将间壁修饰引入到寡核苷酸中,通常是为了在寡核苷酸之间或寡核苷酸与其他官能团之间建立一段距离,以避免空间位阻、减少基团之间不利的相互作用、增加柔性等。

[0028] 本申请提供的SNP检测引物中,检测基团包括生物素。亲和素与生物素之间非常稳

定的、非共价作用在化学和生物学领域是最常运用的工具之一。生物素是复合维生素B2的组成部份。它与鸡清蛋白、亲和素、真菌蛋白、链霉亲和素均有较高亲和性和结合力。亲和素和链霉亲和素都是四聚体蛋白,可紧紧地结合四分子D-biotin。

[0029] 本申请提供的SNP检测引物中,上游引物包括1条野生型上游引物和2~3条突变型上游引物。上游引物包含匹配SNP位点的RNA碱基。SNP指单碱基突变,包括野生碱基和突变碱基,野生型上游引物的RNA碱基匹配SNP位点的野生碱基,突变型上游引物的RNA碱基匹配SNP位点的突变碱基。在本申请一具体实施例中,当SNP位点为A>C时,野生型上游引物的RNA碱基为A,突变型上游引物的RNA碱基为C。在一些实施方式中,野生型上游引物的tag序列与突变型上游引物的tag标签不同,这是为了通过不同微球分别检测野生型、突变型和杂合型。除特别说明外,本申请的野生型和突变型是指纯合子,例如AA或CC,杂合型为AC。

[0030] 本申请提供的SNP检测引物中,当目标基因为CYP2C9*3时,野生型上游引物的序列如SEQ ID NO:1所示,突变型上游引物的序列如SEQ ID NO:2所示,下游引物如SEQ ID NO:3所示。当目标基因为VKORC1时,野生型上游引物的序列如SEQ ID NO:4所示,突变型上游引物的序列如SEQ ID NO:5所示,下游引物如SEQ ID NO:6所示。

[0031] 本申请另一方面提供一种基于液态芯片的SNP检测方法,包括以下步骤:

[0032] 1) 采用前述的SNP检测引物,与目标基因进行聚合酶链式反应,聚合酶链式反应体系中加入有RNA剪切酶,得到带有生物素和tag序列的双链DNA产物;

[0033] 2) 用带有anti-tag序列的微球与步骤1)的双链DNA产物进行杂交反应,获得杂交产物;

[0034] 3) 向杂交产物中加入显色剂,孵育,检测信号,分析获得检测结果。

[0035] 本申请的SNP检测方法为非疾病诊断或治疗目的。

[0036] 本申请提供的SNP检测方法中,步骤1)是指采用前述的SNP检测引物,与目标基因进行聚合酶链式反应,聚合酶链式反应体系中加入有RNA剪切酶,得到带有生物素和tag序列的双链DNA产物。其中,RNA剪切酶包括RNase HII酶。本申请的检测引物在PCR反应中,上游引物、下游引物与目标基因的序列特异性互补配对后,其上下游的RNA碱基可被RNase HII酶识别切割,使3'端酶切序列被切除,切除后留下的特异序列引物保留3'端羟基,从而使引物可以正常延伸进行PCR反应,得到的扩增子同时含有标识的tag序列和带有biotin修饰的双链核酸,可被连接有anti-tag的微球捕获,并通过相应显色剂和biotin的反应进行检测。

[0037] 本申请提供的SNP检测方法中,步骤2)是指用带有anti-tag序列的微球与步骤1)的双链DNA产物进行杂交反应,获得杂交产物。其中,微球选自荧光微球、量子点微球或其他常规的带有可编码功能的微球。当靶基因为CYP2C9*3时,野生型纯合子(AA)anti-tag序列如SEQ ID NO:7所示,突变型纯合子(CC)anti-tag序列如SEQ ID NO:8所示。当靶基因为VKORC1时,野生型纯合子(GG)anti-tag序列如SEQ ID NO:9所示,突变型纯合子(AA)anti-tag序列如SEQ ID NO:10所示。

[0038] 本申请提供的SNP检测方法中,步骤3)是指向杂交产物中加入显色剂,孵育,检测信号,分析获得检测结果。其中,显色剂与生物素反应。在本申请一具体实施例中,显色剂为SA-PE(链霉素亲和素-R-藻红蛋白偶联物),其中链霉素亲和素是一种细菌来源的生物素结合蛋白,红藻门藻红蛋白(RPE)的分子量为240,000道尔顿,量子效率为78%,是一种极其明

亮的试剂,当需要生物素的灵敏检测时,其宽吸收和明亮橙色信号使其成为流式、微孔板和微阵列应用的理想选择。

[0039] 本申请另一方面提供一种基因检测试剂盒,包括前述的SNP检测引物,可选地,还把阔带有anti-tag序列的微球、RNA剪切酶中的一种或多种的组合。本申请的检测引物在PCR反应中,特异序列与目标序列特异性互补配对后,其上下游的RNA碱基可被RNA剪切酶例如RNase HII酶识别切割,使3'端酶切序列被切除,切除后留下的特异序列引物保留3'端羟基,从而使引物可以正常延伸进行PCR反应,得到的扩增子同时含有标识的tag序列和带有biotin修饰的双链核酸,可被连接有anti-tag的微球捕获,并通过相应显色剂和biotin的反应进行检测。

[0040] 本申请另一方面提供前述的SNP检测引物、前述的SNP检测方法、或前述的基因检测试剂盒在SNP检测中的应用。本申请的SNP检测为非疾病诊断或治疗目的。本申请解决了基因多态性检测时需要多靶点检测,可以实现同管扩增并同管检测,使用的耗材均为市面通用耗材,节约了时间和成本。

[0041] 下面通过实施例对本申请予以进一步说明,但并不因此而限制本申请的范围。

[0042] 实施例1

[0043] 本实施例提供一种基于液态芯片技术的SNP检测方法,该方法结合了多重PCR技术、基于液态芯片技术的恒温杂交、检测技术和特异性序列、编码微球原理,设计了一个用于华法林用药指导的基因检测试剂盒,能够实现CYP2C9和VKORC1基因位点在进行多重PCR靶标序列富集后,得到双链DNA产物,并实现在恒温条件下探针系统的杂交和信号检测。

[0044] 1、分别用1条带有标记的引物和2条连接了不同tag序列的特异性引物(具体引物序列见表1)扩增CYP2C9和VKORC1模板(模板为根据NCBI查找合成的DNA序列),PCR程序如表2所示,PCR体系配制如表3所示,得到带有生物素标记和游离tag序列的CYP2C9和VKORC1的检测靶标双链DNA产物(图1-PCR部分)。

[0045] 表1 PCR引物

靶基因	引物名称	引物序列	序列号
[0046] CYP2C9*3 (1075A>C)	野生型上游引物	AGAGATTGAACGTG/dspacer/CACGAG GTCCAGAGATAC/rA/TTGg-C3 spacer	SEQ ID NO:1
	突变型上游引物	CAGAAACCGGAGCC/dspacer/CACGAG GTCCAGAGATAC/rC/TTGg-C3 spacer	SEQ ID NO:2
	下游引物	Biotin-TTTAATGTCACAGGTCCTGCA /rU/GGGGa-C3 spacer	SEQ ID NO:3
[0047] VKORC1 (1639G>A)	野生型上游引物	TTCAGAAACTATCT/dspacer/TAGGCG TGAGCCACCGCACC/rG/TTGAg-C3 spacer	SEQ ID NO:4
	突变型上游引物	ACCCTTCTGGGAACTC/dspacer/TAGG CGTGAGCCACCGCACC/rA/TTGAg-C3 spacer	SEQ ID NO:5
	下游引物	Biotin-TAAGGGATCCCTCTGGGAAGT/ rC/AAGa-C3 spacer	SEQ ID NO:6

靶基因名称	模板序列	序列号
CYP2C9* 3(1075A) 野生型	AGAGATTGAACGTGTGATTGGCAGAAACCGG AGCCCCTGCATGCAAGACAGGAGCCACATGC CCTACACAGATGCTGTGGTGCACGAGGTCCA GAGATACATTGACCTTCTCCCCACCAGCCTG CCCCATGCAGTGACCTGTGACATTAATTCA GAAACTATCTCATTCCCAAGGTAAGTTTGTT CTCCTACACTGCAA	SEQ ID NO:11
CYP2C9* 3(1075C) 突变型	AGAGATTGAACGTGTGATTGGCAGAAACCGG AGCCCCTGCATGCAAGACAGGAGCCACATGC CCTACACAGATGCTGTGGTGCACGAGGTCCA GAGATACCTTGACCTTCTCCCCACCAGCCTG CCCCATGCAGTGACCTGTGACATTAATTCA GAAACTATCTCATTCCCAAGGTAAGTTTGTT CTCCTACACTGCAA	SEQ ID NO:12
VKORC1 (1639G) 野生型	TCACCATGTTGGCCAGGCTTGTCTTAAACTCC TGACCTCAAGTGATCCACCCACCTCGGCCTCC CAAATGCTAGGATTATAGGCGTGAGCCACCG CACCGGGCAATGGTTGTTTTTCAGGTCTTCT CTTGCTTGACTTCCCAGAGGGATCCCTTACTG TTGCACCTACCCTTCTGGGA ACTCTCTTCTC TGGCGTCTG	SEQ ID NO:13
VKORC1 (1639A) 突变型	TCACCATGTTGGCCAGGCTTGTCTTAAACTCC TGACCTCAAGTGATCCACCCACCTCGGCCTCC CAAATGCTAGGATTATAGGCGTGAGCCACCG CACCAGGCAATGGTTGTTTTTCAGGTCTTCT CTTGCTTGACTTCCCAGAGGGATCCCTTACTG TTGCACCTACCCTTCTGGGA ACTCTCTTCTC TGGCGTCTG	SEQ ID NO:14

[0049] 表2 PCR体系配制

[0050]	体系组成	25 μ L
	2 \times Taq Mix	12.5
[0051]	RNase HII(2U/ul)	0.33
	模板	5
	F+R	2.5
	ddH ₂ O	4.67

[0052] 其中RNase HII购自IDT-11-02-12-01。F+R表示上游引物和下游引物,浓度均为10 μ M,二者的总体积为2.5 μ L。

[0053] 表3 PCR程序

	温度	时间	cycles
[0054]	95 °C	3 min	1
	95 °C	15 s	40
	55°C	45 s	

[0055] 2、将用于区分CYP2C9和VKORC1不同分型的单链DNA探针通过化学反应生成共价键的方式连接到微球上,该步骤同已发表专利202110992820.3中微球处理一致。表4所述探针包含与步骤1中带标记的双链产物序列上连接的游离tag序列的互补(anti-tag)的核酸序列

[0056] 表4探针序列

	靶基因	分型	探针扩增序列	序列号
[0057]	CYP2C9*3 (1075A>C)	AA(野生)	5'-CACGTTCAATCTCTTTTTTTTTTTT-NH ₂ -3'	SEQ ID NO:7
		CC(突变)	5'-GGCTCCGGTTTCTGTTTTTTTTTTT-NH ₂ -3'	SEQ ID NO:8
	VKORC1 (1639G>A)	GG(野生)	5'-AGATAGTTTCTGAATTTTTTTTTTTT-NH ₂ -3'	SEQ ID NO:9
		AA(突变)	5'-GAGTTCCCAGAAGGGTTTTTTTTTTT-NH ₂ -3'	SEQ ID NO:10

[0058] 3、在步骤1中带有生物素标记和tag序列的双链扩增产物中加入步骤2中带有anti-tag的微球,进行恒温杂交,杂交程序如表5。

[0059] 表5杂交程序

步骤	温度(°C)	时间(min)	循环数
杂交	50	20	1

[0061] 4、向步骤3中的杂交产物中加入显色剂(本次实施例中采用SA-PE,购自Invitrogen C27206),恒温孵育,孵育程序如表6。

[0062] 表6孵育程序

步骤	温度(°C)	时间(min)	循环数
孵育	50	10	1

[0064] 5、将步骤4中的孵育产物采用流式细胞分析仪分析结果。检测结果如表7所示。其中,NTC是指模板为水的阴性对照。

[0065] 表7杂交信号

编号	样本名称	野生探针	突变探针
1	CYP2C9*3AA	196101	78136.2
2	CYP2C9*3CC	77409.2	163818.4
3	CYP2C9*3AC	127748	125231.1
4	VKORC1 GG	190822.1	71320.6
5	VKORC1 AA	83797.3	171794.3

6	VKORC1 GA	125712.5	131144.6
7	NTC	7005.2	5064.2
8	NTC	11388.5	5058.1

[0067] 根据上述表7或图2结果可知,各模板对应的扩增产物杂交的信号值,可明显区分出加入的对应样本的野生型、纯和突变及杂合突变结果。通过多重PCR扩增方式获得的PCR产物,能够实现产物上的tag序列有效地与探针杂交,得到杂交信号,并能有效地判断所测样本的分型。通过block引物的设计,在RNaseHII酶的作用下成功水解特异性结合的SNP位点,将有模板的反应孔和无模板的反应孔(NTC)较好的区分开来,成功完成多重PCR过程。

[0068] 对比例1

[0069] 设计过实验对比普通引物测试CYP2C9*3 (1075A>C) 位点,其引物设置除无酶切位点外,其余条件一致,详见表8对比引物表。

[0070] 表8对比引物表

靶基因	位置	引物序列	序列号
CYP2C9*3 (1075A>C)	野生型上游	AGAGATTGAACGTG/dspacer/CACGAGG TCCAGAGATACA	SEQ ID NO:15
	突变型上游	CAGAAACCGGAGCC/dspacer/CACGAGG TCCAGAGATACC	SEQ ID NO:16
	下游	Biotin-TTTAATGTCACAGGTCCTCAT	SEQ ID NO:17

[0072] 1. PCR部分,采用上述引物参照表9配制PCR体系,同时设置表1中引物参照表2配制平行进行实验。

[0073] 表9 PCR体系配制

体系组成	25 μ L
2 \times Taq Mix	12.5
模板	5
F+R	2.5
ddH ₂ O	5

[0075] 2. 后续杂交及检测部分操作和实施例1中步骤2-4相同。

[0076] 3. 结果

[0077] 表10杂交信号

引物组	编号	样本名称	野生探针	突变探针
表1中引物	1	CYP2C9*3 AA	196101	78136.2
	2	CYP2C9*3 CC	77409.2	163818.4
	3	CYP2C9*3 AC	127748	125231.1
	4	NTC	7005.2	5064.2
表8中引物	5	CYP2C9*3 AA	34398.5	41372.1
	6	CYP2C9*3 CC	14170	46503.8
	7	CYP2C9*3 AC	34616.9	58619.4
	8	NTC	8501.7	12230.2

[0079] 从上表中可知,如采用普通设计的引物(表8中引物),其本底(编号8)信号会显出

偏高,可能原因是上下游引物形成引物二聚体,其带有标识作用的探针和检测用的生物素,会被微球捕获并检测到信号;其次对样本检测,无法从信号高低区分出野生型和杂合型(编号5和7),可能原因为在野生型样本中突变引物也产生非特异扩增。故综上所述,表1中引物设计得到的结果远优于表8中引物。

[0080] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本申请。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本申请的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本申请的权利要求所涵盖。

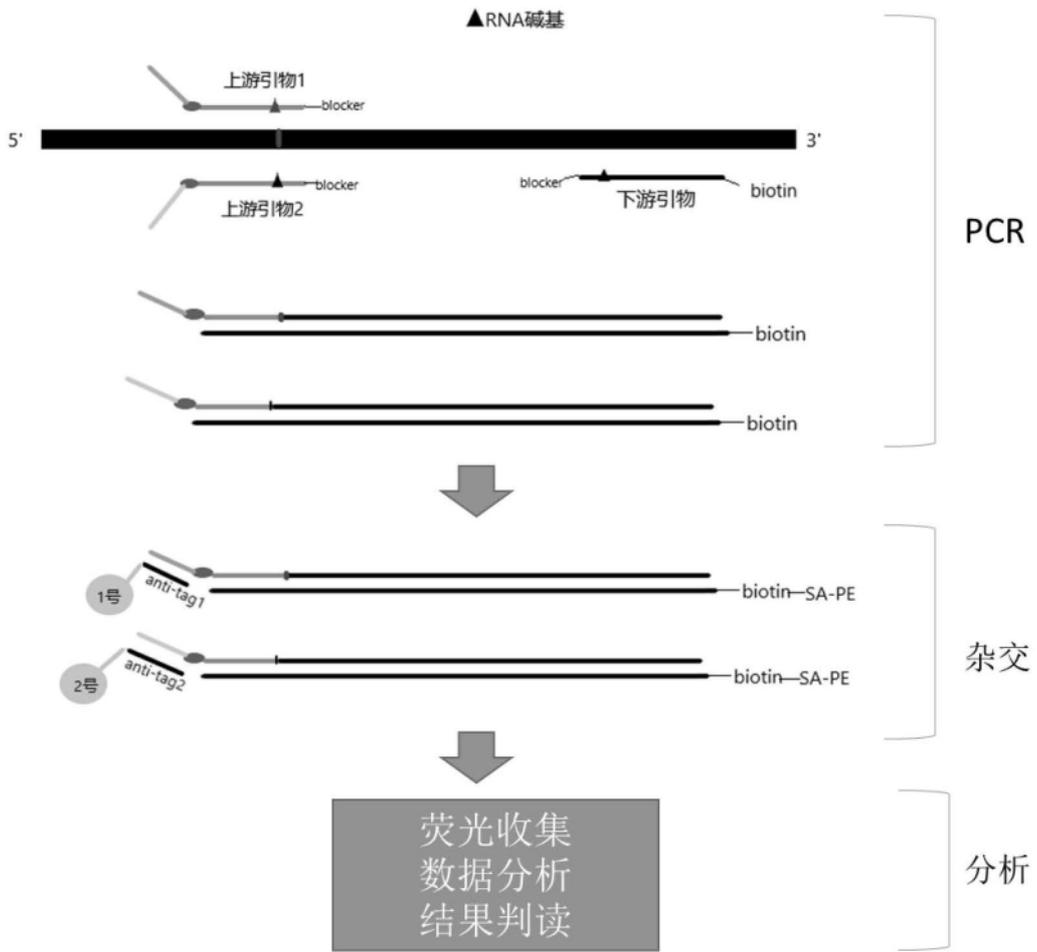


图1

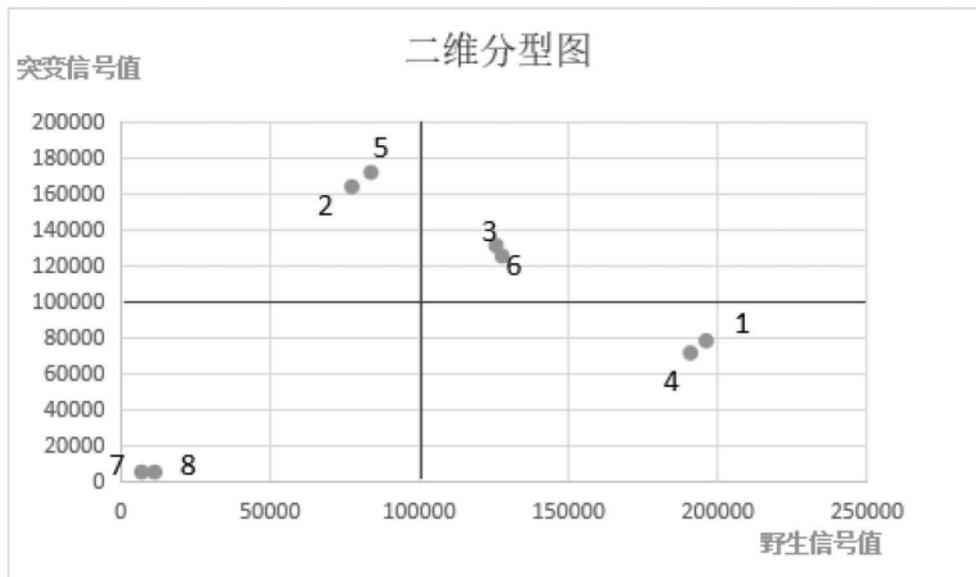


图2