



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106399552 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610985360.0

(22)申请日 2016.11.09

(71)申请人 上海派森诺医学检验所有限公司
地址 201799 上海市青浦区华浦路500号2
号楼1楼

(72)发明人 丁慧 朱月艳 孙子奎

(74)专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限
公司 31224

代理人 吕伴

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物

(57)摘要

本发明公开的一种检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物,针对CYPC2C9*2(rs1799853,C430T,Arg144Cys)和CYP2C9*3(rs1057910,A1075C,I1e359Leu)每个SNP的序列改变而设计的特异性ARMS引物和共用引物,特异性ARMS引物于3'末端第二位或三位引入错配碱基(下划线标记碱基),以此扩大特异性引物3'末端碱基与DNA模版上SNP位点碱基互补和不互补情况下扩增效率间的差距,从而大幅提高检测的特异性和准确性。

1. 一种检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物,其特征在于,包括:

检测CYPC2C9*2 (rs1799853, C430T, Arg144Cys) 基因的引物,其碱基序列为:

共用引物2C9*2-CR: CCAGTAAGGTCAGTGATATGGAGTAG;

用于检测位点CYPC2C9rs1799853, C的特异性引物为下列核苷酸序列之一:

2C9*2-W1: GGGAAAGAGGAGCATTGAGGGCC;

2C9*2-W2: GGGAAAGAGGAGCATTGAGGTCC;

用于检测位点CYPC2C9rs1799853, T的特异性引物为下列核苷酸序列之一:

2C9*2-M1: GGGAAAGAGGAGCATTGAGGGCT;

2C9*2-M2: GGGAAAGAGGAGCATTGAGGTCT;

检测CYPC2C9*3 (rs1057910, A1075C, Ile359Leu) 基因的引物,其碱基序列为:

共用引物2C9*3-CR: ACCTTGGGAATGAGATAGTTTCTGAAT;

用于检测位点CYPC2C9rs1057910, A的特异性引物为下列核苷酸序列之一:

2C9*3-W1: GTGCACGAGGTCCAGAGATAGA;

2C9*3-W2: GTGCACGAGGTCCAGAGATAAA;

用于检测位点CYPC2C9rs1057910, C的特异性引物为下列核苷酸序列之一:

2C9*3-W1: GTGCACGAGGTCCAGAGATAGC;

2C9*3-W2: GTGCACGAGGTCCAGAGATAAC。

2. 如权利要求1所述的一种检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物,其特征在于,当检测位点为CYPC2C9*2 (rs1799853) 时,使用引物组合为共用下游引物2C9*2-CR以及ARMS引物对2C9*2-W2/2C9*2-M2。

3. 如权利要求1所述的一种检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物,其特征在于,当检测位点为CYPC2C9*3 (rs1057910) 时,使用引物组合为共用下游引物2C9*3-CR以及ARMS引物对2C9*3-W2/2C9*3-M2。

一种检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物

技术领域

[0001] 本发明属生命科学和生物技术领域,特别涉及检测CYP2C9基因第3、7号外显子突变的ARMS引物,采用普通PCR技术和凝胶电泳,可用于快速检测CYP2C9基因多态位点的突变情况。

背景技术

[0002] 人类基因多态性在阐明人体对疾病、毒物的易感性与耐受性,对疾病临床表现的多样性,以及对药物治疗的反应性上都起着重要的作用。

[0003] CYP2C9基因位于人类第10号染色体上,总长83529bp,共10个外显子。CYP2C9是细胞色素P450酶(CYP)第二亚家族中的重要成员,占肝微粒体P450蛋白总量的20%。CYP2C9参与抗凝血药、抗惊厥药、降糖药、非甾体类解热镇痛抗炎药、抗高血压药以及利尿药等多种药物的羟化代谢,其中华法林、甲苯磺丁脲和苯妥因均为治疗指数较窄的药物。CYP2C9活性变化可导致这些药物体内浓度出现较大变化,甚至导致严重药物不良反应的发生。CYP2C9*2(rs1799853,C430T,Arg144Cys)和CYP2C9*3(rs1057910,A1075C,Ile359Leu)均导致CYP2C9酶活性降低,CYP2C9*3纯合子个体酶活性仅为该位点野生型纯合子基因型个体(携带CYP2C9*1或Arg144/Ile359等位基因)的4-6%。中国人群中CYP2C9*2的频率为0%,CYP2C9*3的频率为3%。CYP2C9遗传多态性导致其酶活性变化,从而导致药物代谢种族和个体差异现象。

[0004] 可用于CYP2C9基因分型的方法很多,包括如DNA直接测序法、杂交芯片法、焦磷酸测序法、变性高效液相色谱法、实时荧光定量法、限制性片段长度多态性(RFLP)以及扩增阻碍突变系统(ARMS)等等。其中,DNA测序法为基因分型的金标准,但该方法在临床应用上存在一些限制:检测的灵敏度不高,费时,操作复杂,易污染,通量小等。限制性片段长度多态性仅适用于突变位点附近存在适当的特定限制性内切酶识别序列的情况,应用局限性较大。杂交芯片检测方法存在假阳性率高、退火温度要求精确,特异性不高的问题;Taqman法探针制备以及配套使用的仪器设备昂贵,准确性不高。

[0005] 扩增阻滞突变系统利用Taq酶没有3'→5'的外切酶活性,当3'末端碱基发生错配,不能有效扩增的原理。

[0006] 基因分型检测通常包括两个互补的PCR反应,使用相同的DNA模板和一条相同的共有引物和反应条件,区别仅在于与共有引物配对的ARMS引物不同,野生型ARMS引物3'末端与野生型模板匹配,突变型ARMS引物设计时将突变位点设计在3'端,与突变型模板匹配,使两个反应选择性扩增特定的DNA模板,即3'末端不匹配引物的延伸受到阻碍,通常还在3'末端2-4个碱基人为设置错配碱基,以提高错配引物的选择扩增性。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有检测CYP2C9基因多态性所存在的问题而提供一种基于ARMS-PCR的方法检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物,可用于快速、有效检测待测者CYP2C9

基因多态位点的突变情况。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明所采用的技术方案如下:

[0009] 针对CYP2C9*2 (rs1799853, C430T, Arg144Cys) 和CYP2C9*3 (rs1057910, A1075C, Ile359Leu) 每个SNP的序列改变而设计的特异性ARMS引物和共用引物,特异性ARMS引物于3'末端第二位或三位引入错配碱基(下划线标记碱基),以此扩大特异性引物3'末端碱基与DNA模版上SNP位点碱基互补和不互补情况下扩增效率间的差距,从而大幅提高检测的特异性和准确性。其中:

[0010] 一种检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物,包括:

[0011] 检测CYP2C9*2 (rs1799853, C430T, Arg144Cys) 基因的引物,其碱基序列为:

[0012] 共用引物2C9*2-CR: CCAGTAAGGTCAGTGATATGGAGTAG;

[0013] 用于检测位点CYP2C9rs1799853, C的特异性引物为下列核苷酸序列之一:

[0014] 2C9*2-W1: GGAAGAGGAGCATTGAGGGCC;

[0015] 2C9*2-W2: GGAAGAGGAGCATTGAGGTCC;

[0016] 用于检测位点CYP2C9rs1799853, T的特异性引物为下列核苷酸序列之一:

[0017] 2C9*2-M1: GGAAGAGGAGCATTGAGGGCT;

[0018] 2C9*2-M2: GGAAGAGGAGCATTGAGGTCT;

[0019] 检测CYP2C9*3 (rs1057910, A1075C, Ile359Leu) 基因的引物,其碱基序列为:

[0020] 共用引物2C9*3-CR: ACCTTGGAATGAGATAGTTTCTGAAT;

[0021] 用于检测位点CYP2C9rs1057910, A的特异性引物为下列核苷酸序列之一:

[0022] 2C9*3-W1: GTGCACGAGGTCCAGAGATAGA;

[0023] 2C9*3-W2: GTGCACGAGGTCCAGAGATAAA;

[0024] 用于检测位点CYP2C9rs1057910, C的特异性引物为下列核苷酸序列之一:

[0025] 2C9*3-W1: GTGCACGAGGTCCAGAGATAGC;

[0026] 2C9*3-W2: GTGCACGAGGTCCAGAGATAAC。

[0027] 在本发明的一个优选实施例中,当检测位点为CYP2C9*2 (rs1799853) 时,使用引物组合为共用下游引物2C9*2-CR以及ARMS引物对2C9*2-W2/2C9*2-M2。

[0028] 在本发明的一个优选实施例中,当检测位点为CYP2C9*3 (rs1057910) 时,使用引物组合为共用下游引物2C9*3-CR以及ARMS引物对2C9*3-W2/2C9*3-M2。

[0029] 本发明操作简单、检测结果准确可靠,具体有益效果如下:

[0030] 1、回避了家族基因间序列相近区域,避免家族基因间序列的相近区域引起的非特异性扩增,此引物组的设计具有特异性强的优点。

[0031] 2、引入的碱基错配,提高了引物对SNP的识别能力,使引物能有效识别一个碱基的差异,扩大了最适退火温度范围,避免了因退火温度要求精确所导致检测结果的假阳性发生,提高了检测准确性和可靠性。

[0032] 3、检测方法简单,无需昂贵设备,仅需要PCR和电泳设备就能完成试验。

[0033] 4、操作快速便捷,检测用时短,可在2小时内完成分型工作。

附图说明

[0034] 图1为CYP2C9*2 (rs1799853) 和CYP2C9*3 (rs1057910) 的分型电泳图。图中所用

的marker为Takara公司的50bp的marker。最下面的条带为50bp,倒数第二条为100bp。左侧是检测样本CYP2C9*2,从左至右扩增使用的引物分别为2C9*2-W1、2C9*2-M1、2C9*2-W2和2C9*2-M2;右侧是检测样本CYP2C9*3,从左至右扩增使用的引物分别为2C9*3-W1、2C9*3-M1、2C9*3-W2和2C9*3-M2。

[0035] 图2为CYPC2C9*2的Sanger测序验证图谱。图中对样本使用Sanger测序检测CYPC2C9*2(rs1799853,C430T,Arg144Cys),图中框显示的是多态性位点。

[0036] 图3为CYPC2C9*3的Sanger测序验证图谱。对样本使用Sanger测序检测CYPC2C9*3(rs1057910,A1075C,Ile359Leu),图中框显示的是多态性位点。

具体实施方式

[0037] 本发明依据ARMS-PCR原理,优选了CYPC2C9的8条特异性引物,包括针对rs1799853的四条特异性引物(2C9*2-W1/2C9*2-M1,2C9*2-W2/2C9*2-M2);针对rs1057910的四条特异性引物(2C9*3-W1/2C9*3-M1,2C9*3-W2/2C9*3-M2)。这8条特异性引物的3'端碱基与对应SNP位点的两种不同的碱基相互补,并在3'末端的第二位或第三位引入错配碱基,错配碱基的引入可以扩大特异性引物与互补的模版和非互补模版结合后的扩增效率差异,使特异性引物的最佳退火范围扩大,避免非特异性扩增的产生,提高了检测的准确性和特异性。经实验测试,这些引物可在55度~60度范围内进行退火,进行特异性扩增,最大可能的避免了假阳性的发生。

[0038] 本发明还优选了2条共用下游引物,包括针对rs1799853的2C9*2-CR;针对rs1057910的2C9*3-CR。这2条引物通过在人类基因组数据库中检测,回避了家族基因间基因序列的一致区域,避免与目的片段外模版序列的结合,提高了扩增的特异性。

[0039] 本发明可选取针对同一检测位点的特异性引物中的任意一条和其对应的下游共用引物结合,组成此为点的检测引物组合,实现对检测位点的特异性扩增检测。检测位点为CYPC2C9*2(rs1799853)时,使用引物组合为共用下游引物2C9*2-CR,以及ARMS引物对2C9*2-W2/2C9*2-M2、2C9*2-W2/2C9*2-M2两对特异性引物中任意一对;检测位点为CYPC2C9*3(rs1057910)时,使用引物组合为共用下游引物2C9*3-CR,以及ARMS引物对2C9*3-W2/2C9*3-M2、2C9*3-W2/2C9*3-M2两对特异性引物中任意一对。

[0040] 下面结合具体实施例和附图,进一步阐述本发明。

[0041] 实施例1一种基于ARMS-PCR法的CYPC2C9基因分型检测

[0042] PCR扩增反应液扩增反应液为20ul,使用NEB公司的Q5hifi DNA polymerase试剂装,包含5xQ5buffer、5xGC buffer、dNTP、Q5hifi DNA polymerase和5xGC enhancer。PCR反应管每人份2个,1~2号管为特异性反应管。具体见表1

[0043] 表1

| | | | | | |
|--------|--------|-----------|----------|-----------|----------|
| | 管号 | 1 | | 2 | |
| | 检测位点 | rs1799853 | | rs1057910 | |
| [0044] | | C | T | A | C |
| | 共用引物 | 2C9*2-CR | | 2C9*3-CR | |
| | ARMS引物 | 2C9*2-W2 | 2C9*2-M2 | 2C9*3-W2 | 2C9*3-M2 |
| | 片段大小 | 109 bp | | 98 bp | |

[0045] 实施例2

[0046] 一种基于ARMS-PCR法的CYPC2C9基因分型检测的操作步骤

[0047] (1) 提取受检者全血DNA或唾液DNA, 稀释成20ng/ul的DNA溶液;

[0048] (2) PCR扩增: 检测在常规PCR仪上进行, 反应条件见表2:

[0049] 表2

| | | | |
|--------|---|-----------|-----------|
| | 1 | 95°C 5min | 1 cycle |
| [0050] | 2 | 95°C 10s | 35 cycles |
| | | 60°C 10s | |
| | | 72°C 15s | |
| | 3 | 72°C 5min | 1 cycle |
| | 4 | 10°C | ∞ |

[0051] PCR扩增体系试剂配制方法见表3:

[0052] 表3

[0053]

| | |
|-----------------------|------------|
| 5x Q5buffer | 4ul |
| 5x GC buffer | 4ul |
| 10mM dNTP | 0.4ul |
| Q5hifi DNA pilymerase | 0.2ul |
| 5xGC enhancer | 4ul |
| template DNA | 20ng |
| 10uM Forward Primer | 1ul |
| 10uM Reverse Primer | 1ul |
| Nuclease-free water | up to 20ul |

[0054] (3) 电泳: 2%琼脂糖凝胶电泳, 110V, 25min。在凝胶成像系统中拍照, 获得电泳结果图。根据目的条带的有无, 进行基因型分析。

[0055] 若PCR反应管中, 如无任何产物带, 仅有引物二聚体带(小于100bp), 判断为扩增失败。若PCR反应管中, 野生型引物扩增有目的产物, 而特异型ARMS引物扩增后没有条带, 则判

读为野生型；若PCR反应管中，特异型ARMS引物扩增没有目的产物，而野生型引物扩增后有带，则判读为突变纯合型；若PCR反应管中，野生型引物和特异型ARMS引物扩增都有目的产物，则判读为杂合型。

[0056] 图中所用的marker为Takara公司的50bp的marker。样本为同一个人的基因组DNA。

[0057] 左侧是检测样本CYP2C9*2，从左至右扩增使用的引物分别为2C9*2-W1、2C9*2-M1、2C9*2-W2和2C9*2-M2。可以从图中看出两对引物都是野生型引物扩增有目的产物，而特异型ARMS引物扩增后没有条带，判读为野生型；

[0058] 右侧是检测样本CYP2C9*3，从左至右扩增使用的引物分别为2C9*3-W1、2C9*3-M1、2C9*3-W2和2C9*3-M2。可以从图中看出两对引物都是野生型引物扩增有目的产物，而特异型ARMS引物扩增后没有条带，判读为野生型。

[0059] 经DNA直接测序验证，如图2、图3所示，完全与上述结果一致，样本的CYP2C9*2和CYP2C9*3均为野生型。

[0060] 上述结果表明，本发明的ARMS引物来检测CYP2C9基因多态性的方法可靠，灵敏度高，操作简单，判读结果客观。

序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 上海派森诺生物科技股份有限公司

<120> 用于检测CYP2C9基因多态性的ARMS引物

<130>

<160> 10

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ccagtaaggt cagtgatatg gagtag 26

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gggaagagga gcattgaggg cc 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gggaagagga gcattgaggt cc 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gggaagagga gcattgaggg ct 22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gggaagagga gcattgaggt ct 22

<210> 6

<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 6
accttgggaa tgagatagtt tctgaat 27
<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 7
gtgcacgagg tccagagata ga 22
<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 8
gtgcacgagg tccagagata aa 22
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 9
gtgcacgagg tccagagata gc 22
<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 8
gtgcacgagg tccagagata ac 22

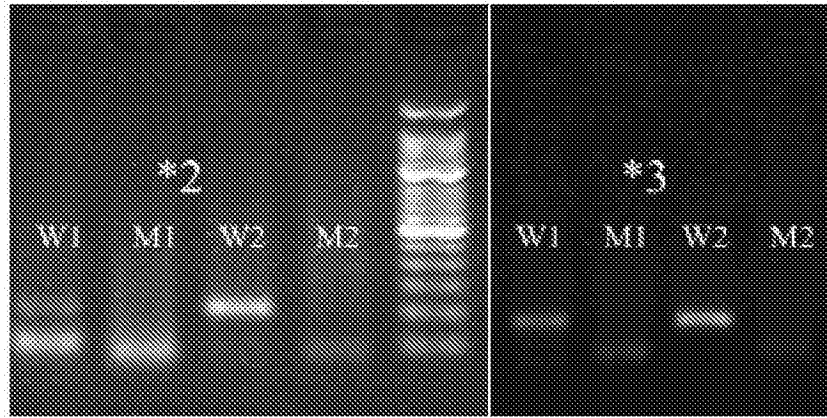


图1

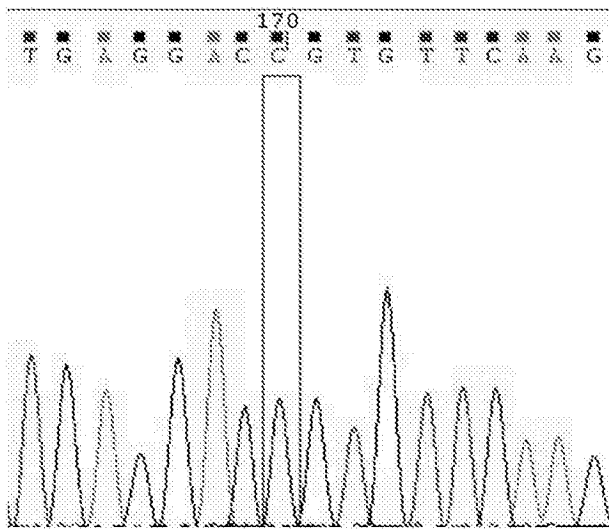


图2

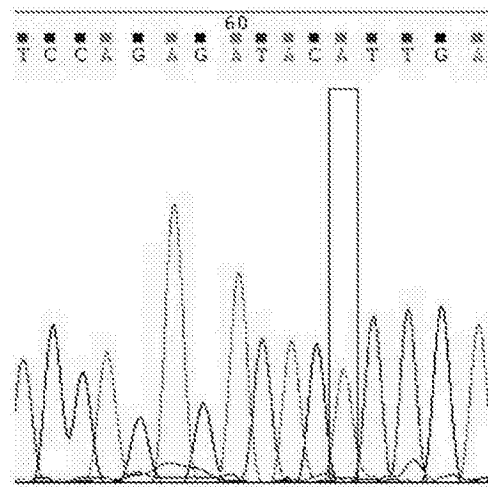


图3