



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201723189 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：104144049

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 28 日

(51)Int. Cl. :

C12Q1/68 (2006.01)

G01N33/533 (2006.01)

(71)申請人：華聯生物科技股份有限公司(中華民國) PHALANX BIOTECH GROUP, INC. (TW)

新竹市新竹科學園區科技五路 6 號 6 樓

(72)發明人：林上琪 LIN, SHANG CHI (TW)

(74)代理人：侯德銘

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：1 共 27 頁

(54)名稱

用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應的方法

METHOD OF DOUBLE ALLELE SPECIFIC PCR FOR SNP MICROARRAY

(57)摘要

本發明提供一種用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應的方法，該方法使用的正向與反向引皆以等位基因特異性位點為引子的 3' 端終點，不須使用特殊鹼基的引子，並能容易的直接依等位基因特異性位點兩旁的序列進行設計，並且結合整合試劑進行多重聚合酶鏈鎖反應，再以基因型鑑定晶片進行檢測。

發明摘要

※ 申請案號：104144049

※ 申請日：104.12.28

※IPC 分類：C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/33 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應的方法/Method of double allele specific PCR for SNP microarray

【中文】

本發明提供一種用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應的方法，該方法使用的正向與反向引皆以等位基因特異性位點為引子的 3'端終點，不須使用特殊鹼基的引子，並能容易的直接依等位基因特異性位點兩旁的序列進行設計，並且結合螯合試劑進行多重聚合酶鏈鎖反應，再以基因型鑑定晶片進行檢測。

【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 無 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應的方法/

Method of double allele specific PCR for SNP microarray

【技術領域】

【0001】 本發明提供一種雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應的方法，特別係一種用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應的方法。

【先前技術】

【0002】 人體的基因體包含各種遺傳變異，其中單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是常被發現的遺傳變異。單一核苷酸多型性上不同之核苷酸，可能會改變蛋白質的形狀，影響基因的調控反應，進而造成各種遺傳性疾病。

【0003】 近年來，高通量的微陣列晶片技術已被廣泛的應用於個體差異性檢測、比較基因體相關分析、連鎖不平衡或藥物代謝基因相關等研究中。然而，高通量的微陣列晶片技術在進行晶片雜交的前處理步驟相當耗時，且晶片掃描後要得到上萬個 SNP 數據的判讀過程複雜，同時，該技術的儀器及耗材購置成本相當昂貴。而即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction) 因具有較高的專一性、敏感度及準確度，但該技術需要針對個別 SNP 位點訂製之特殊修飾探針的製作成本昂貴，導致整體檢測技術之成本較高，不利用於大規模的 SNP 位點檢測。因此，目前現有技術缺乏一種有效、快速、較大規模之檢測單一核苷酸變異的技術。

【發明內容】

【0004】 有鑑於此，本發明之一目的在於提供一種用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性 (allele specific) 聚合酶鏈鎖反應的方法，包含：(a)

利用一對以上的引子組並藉由多重單一核苷酸多型性聚合酶鏈鎖反應 (Multiplex SNP PCR) 擴增 (amplify) 一待測核酸樣本以產生一擴增產物，其中該聚合酶鏈鎖反應中加入一螢光螯合染劑，且該螢光螯合染劑係為 SYBR green 核苷酸染料；以及 (b) 以一表面固定有辨識該等位基因特異性之探針 (probe) 的基因型鑑定晶片鑑定該擴增產物，其中該引子組包含至少四條等位基因特異性引子，至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的正股 (sense strand) 結合，且該等位基因特異性引子 3' 端終點與等位基因特異性位點互補，以及至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的反股 (antisense strand) 結合，且該等位基因特異性引子 3' 端終點與等位基因特異性位點互補，並於該引子組之 5' 端加上一修飾標記。

【0005】 本發明之又一目的在於提供一種用於以辨識修飾標記的基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性 (allele specific) 聚合酶鏈鎖反應的方法，包含：(a) 利用一對以上的引子組並藉由多重單一核苷酸多型性聚合酶鏈鎖反應 (Multiplex SNP PCR) 擴增 (amplify) 一待測核酸樣本以產生一第一階段擴增產物，其中該聚合酶鏈鎖反應中加入一螢光螯合染劑，且該螢光螯合染劑係為 SYBR green 核苷酸染料；(b) 利用 5' 端具有修飾標記的通用聚合酶鏈鎖反應引子 (universal PCR primer) 擴增該第一階段擴增產物以產生一第二階段擴增產物；以及 (c) 以一表面固定有辨識該等位基因特異性之探針 (probe) 的基因型鑑定晶片鑑定該擴增產物，其中引子組包含至少四條等位基因特異性引子，至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的正股 (sense strand) 結合，且該等位基因特異性引子 3' 端終點與等位基因特異性位點互補，以及至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的反股 (antisense strand) 結合，且該等位基因特異性引子 3' 端終點與等位基因特異性位點互補。

【0006】 本發明之另一目的在於提供一種與 SYBR Green 核苷酸染料搭配使用的雙重等位基因特異性 (allele specific) 聚合酶鏈鎖反應之引子

對，包含：該引子對包含四條等位基因特異性引子，其中兩條等位基因特異性引子與一核酸樣本的正股(sense strand)結合，且該等位基因特異性引子 3'端終點與等位基因特異性位點互補，以及至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的反股(antisense strand)結合，且該等位基因特異性引子 3'端終點與等位基因特異性位點互補。在本發明之一實施例中，該引子對係應用於一基因型鑑定晶片。

【0007】 在本發明之一實施例中，其中該引子對具有接近的溶解溫度(melting temperature, T_m)值。

【0008】 在本發明之一實施例中，其中該修飾標記係為螢光、生物素(biotin)、毛地黃皂甘配基(digoxigenin, DIG)或寡核酸序列。

【0009】 在本發明之一實施例中，其中該基因型鑑定晶片係以晶片螢光掃描儀進行檢測。

【0010】 在本發明之一實施例中，其中該核酸樣本係存在於選自於由血液、血清、血漿、體液及組織所組成群組。

【0011】 在本發明之一實施例中，其中該引子組 5'端進一步加上一密碼(barcode)序列，且該探針包含該密碼序列之互補序列。

【0012】 因此，本發明提供一種用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性(allele specific)聚合酶鏈鎖反應的方法，結合 SYBR green 核苷酸染料進行多重單一核苷酸多型性聚合酶鏈鎖反應(Multiplex SNP PCR)，再以基因型鑑定晶片檢測放大產物。本發明方法所使用的正向(forward)與反向引子(reverse)皆以等位基因特異性位點為引子的 3'端終點，不須使用特殊鹼基的引子，並能容易的直接依等位基因特異性位點兩旁的序列進行設計，故本發明之方法係為不須使用特殊合成引子且引子設計簡單之應用於基因型鑑定晶片檢測的方法，並具有同時檢測多個等位基因特異性位點之優點。

【0013】 以下將配合圖式進一步說明本發明的實施方式，下述所列舉的實施例係用以闡明本發明，並非用以限定本發明之範圍，任何熟習此技

藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可做些許更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

【0014】 第一圖係為本發明之雙重等位基因特異性引子(double allele specific primer)設計之示意圖。

【實施方式】

【0015】 本發明提供一種於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性(allele specific)聚合酶鏈鎖反應的方法，其係使用的正向(forward)與反向引子(reverse)皆以等位基因特異性位點為引子的 3'端終點，不須使用特殊鹼基的引子，並能容易的直接依等位基因特異性位點兩旁的序列進行設計，並且結合螯合試劑(interchelating agent)進行多重(multiplex)聚合酶鏈鎖反應，再以單一核苷酸(single nucleotide polymorphism, SNP)晶片進行檢測。

定義

【0016】 本文中所述之核酸係為 DNA 或 RNA 分子。

【0017】 本文中所述之核苷酸係為核酸的基本組成單位。

實施例 1 本發明之引子設計

【0018】 本發明之用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應方法，分別進行等位基因特異性位點的第一階段擴增反應以及通用引子(universal primer)的第二階段擴增反應；再以一表面固定有辨識探針(probe)的微陣列晶片區別該等位基因特異性位點的放大產物。

【0019】 本發明之方法主要之技術特徵在於雙重等位基因特異性引子之設計，相較於傳統聚合酶鏈鎖反應係利用正向引子與變異性位點一端的一條 DNA 模板鏈互補，反向引子與變異性位點另一端的另一條 DNA 模板鏈互補。本發明之方法所使用正向與反向引子皆以變異性位點為引子的 3'端終點，不須使用特殊鹼基的引子，直接依等位基因特異性位點兩側的序

列進行設計。在本實施例中，本發明以 5 個 SNP 位點作為舉例，包含 rs29232、rs401681、rs667282、rs2072590 以及 rs2131877，但不限於此。需注意的是，一起進行多重(multiplex)SNP 聚合酶鏈鎖反應的引子需接近的熔解溫度 (melting temperature, T_m)值， T_m 公式= $4(G+C) + 2(A+T)$ 。

【0020】 以 rs29232 為例，如第一圖及表一所示，rs29232 為 A/G 基因型變異，直接依該基因型變異之位點兩側的序列進行設計，正向引子(SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2)分別以變異性位點 A 或 G 為引子的 3'端終點設計二條正向引子；反向引子(SEQ ID NO:3 及 SEQ ID NO:4)分別以變異性位點 C 或 T 為引子的 3'端終點設計二條反向引子，分別使用二組引子對進行擴增反應(AT 引子組及 GC 引子組)，不須使用特殊鹼基的引子。其餘 SNP 變異性位點引子對，rs401681 以 SEQ ID NO:5 至 SEQ ID NO:8 表示；rs667282 以 SEQ ID NO:9 至 SEQ ID NO:12 表示；rs2072590 以 SEQ ID NO:13 至 SEQ ID NO:16 表示；rs2131877 以 SEQ ID NO:17 至 SEQ ID NO:20。

【0021】 關於第二階段擴增反應的通用引子，如表一所示，以 5'端分別標記不同螢光(Cy3 及 Cy5)的 AT 通用引子(SEQ ID NO:21)及 GC 通用引子(SEQ ID NO:22)。

【0022】 關於晶片上區別該 SNP 變異性位點的放大產物的辨識探針，本發明以 5'端具有胺基(amine)修飾的辨識 rs29232 探針(SEQ ID NO:23)、rs401681 探針(SEQ ID NO:24)、rs667282 探針(SEQ ID NO:25)、rs2072590 探針(SEQ ID NO:26)以及 rs2131877 探針(SEQ ID NO:27)固定於晶片上進行雜交(hybridization)反應，但不限於此。

表一 引子序列

SEQ ID NO	oligo ID	oligo sequence
SEQ ID NO:1	AS-rs29232-fwdA	GATCAGGCGTCTGTCGTGCTCTGGAGAGATTATACTTG CAATGCTATCAAAATA <u>A</u>
SEQ ID NO:2	AS-rs29232-fwdG	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTTGGAGAGATTATACT TGCAATGCTATCAAAAT <u>G</u>

SEQ ID NO:25	AS-rs667282	amine-TTTTTTTTTTTCTAACAAGCTCCCAGGTGAYGTG AATACTGTTGGTCAGTGTATC
SEQ ID NO:26	AS-rs2072590	amine-TTTTTTTTTTGAGGGAAGATGGTACCAGCKCCCT AGAGCTCAGCTCAC
SEQ ID NO:27	AS-rs2131877	amine-TTTTTTTTTTGCAGGCAGTATTTACAGAGCAYGG AGAGGTTAAATGTAGAGTGC

【0023】 關於用於晶片之擴增反應產物之標記方式，包含特殊修飾鹼基、特殊修飾引子以及化學修飾等方法，其中特殊修飾鹼基係為在擴增反應時，加入各種特殊修飾鹼基，例如：biotin-dCTP、Cy5-dCTP、aminoallyl-dCTP 等，或使用末端脫氧核苷酸轉移酶(Terminal deoxynucleotidyl transferase)將特殊鹼基加在擴增反應產物的 3'端，例如直接使用以螢光修飾的 dCTP 進行第一階段的 PCR 擴增反應，便不需再進行第二階段的 PCR 擴增反應。特殊引子修飾係為在擴增反應時，加入各種特殊修飾引子進行擴增反應，例如在引子的 5'端加上螢光、生物素(biotin)、毛地黃皂甘配基(digoxigenin, DIG)或寡核酸序列修飾；化學修飾係為在純化擴增反應產物之後，以化學螢光(如 Kreatech 公司的 ULS™ 技術)將螢光分子直接加在擴增反應產物的鹼基上。

實施例 2 SYBR green 對等位基因特異性之辨識度的影響

【0024】 本發明之以雙重等位基因特異性引子(double allele specific primers)的方法，結合螯合試劑(interchelating agent)進行第一階段擴增反應，可提升等位基因特異性的辨識度。

【0025】 在本實施例中，本發明以 SYBR green I (SYBR green I 核苷酸染料，產品編號 1988131，羅氏)作為螯合試劑，並且分別將 SYBR green I 進行：(1) 25 倍稀釋、(2)50 倍稀釋、(3)100 倍稀釋、(4)200 倍稀釋、(5)400 倍稀釋、(6)800 倍稀釋、(7)1600 倍稀釋、(8)3200 倍稀釋、(9)6400 倍稀釋。

【0026】 在本實施例中，使用購自美國 Coriell 細胞存儲中心的 DNA 樣本，分別為 NA12891 及 NA18526；以 rs29232 進行實驗，並經由資料庫

已知 NA12891 樣本的 rs29232 基因型為 CC 及 NA18526 樣本的 rs29232 基因型為 TT。rs29232 分別包含：含有各 5 μ M SEQ ID NO:1 及 4 的 AT 引子對混合液，以及含有各 5 μ M SEQ ID NO:2 及 3 的 GC 引子對混合液。

【0027】 此外，本發明分別使用不同廠牌的 SYBR green 擴增反應混合試劑包含：美國應用生命系統公司(Applied Biosystems, ABI)快速 SYBR green 擴增反應混合試劑(Fast SYBR Green master mix, 產品編號 4385612)；以及美商伯瑞股份有限公司(Bio-Rad) iQ™ SYBR® Green 擴增反應超級混合試劑 (iQ™ SYBR® Green Supermix, 產品編號 1708880)。

【0028】 進行即時 (Real-Time)聚合酶鏈鎖反應，反應總體積為 10 μ L，包含 5 μ L SYBR green 擴增反應混合試劑、2 μ L SYBR 稀釋液、1 μ L 引子對混合液、1.8 μ L 水及 0.2 μ L 的 gDNA (50 ng/ μ L)樣本。即時 (Real-Time)聚合酶鏈鎖反應器(CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad)進行，其反應條件為：95 °C 反應 1 分鐘，再以 95 °C，10 秒、65°C，30 秒為一循環，並重複此循環 50 次結束反應。

【0029】 實驗結果所得之 Ct 值，經由公式 $\Delta Ct = (AT \text{ 引子對的 } Ct) - (GC \text{ 引子對的 } Ct)$ 計算，使用 ABI 快速 SYBR green 擴增反應混合試劑之結果如表二所示。因所使用的兩個樣本基因型為 CC (NA12891)與 TT (NA18526)，CC 基因型樣本的 qPCR 結果之 GC 引子對的 Ct 會比 AT 引子對的 Ct 小，因此在公式計算結果會是正值，反之在 TT 基因型樣本的 qPCR 計算結果會是負值。數值絕對值越大，表示分辨效果越佳，在 ABI SYBR green 的 100 倍稀釋的兩個數值的絕對值都很大，表示在兩種基因型的分辨效果都很好，但在 50 倍稀釋只有 CC 基因型樣本(NA12891) 絕對值數值很大，但 TT 基因型樣本 (NA18526) 的絕對值很小，表示在此配方中只有 CC 基因型的分辨效果較佳，但 TT 基因型的分辨效果不佳，故 100 倍稀釋濃度的 SYBR green 在 ABI 快速 SYBR green 擴增反應混合試劑的搭配效果最佳。使用 Bio-Rad iQ™ SYBR® Green 擴增反應超級混合試劑之結果如表三

所示，800-1600 倍稀釋濃度的 SYBR green 在 Bio-Rad iQ™ SYBR® Green 擴增反應超級混合試劑的搭配效果最佳。其結果顯示雖不同擴增反應試劑所使用之最佳 SYBR green 濃度不同，但使用 SYBR green 確實可有效提升等位基因特異性之辨識度。

表二、使用 ABI 快速 SYBR green 擴增反應混合試劑的 ΔC_t 值

SYBR 稀釋溶液	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
	25 倍稀釋	50 倍稀釋	100 倍稀釋	200 倍稀釋	400 倍稀釋	800 倍稀釋	1600 倍稀釋	3200 倍稀釋	6400 倍稀釋
NA12891	NA	9.28	5.73	3.05	0.91	0.87	1.59	2.83	3.57
NA18526	NA	-1.28	-5.21	-3.37	-2.42	-2.83	-4.37	-5.28	-5.51

表三、使用 Bio-Rad iQ™ SYBR® Green 擴增反應超級混合試劑的 ΔC_t 值

SYBR 稀釋溶液	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
	25 倍稀釋	50 倍稀釋	100 倍稀釋	200 倍稀釋	400 倍稀釋	800 倍稀釋	1600 倍稀釋	3200 倍稀釋	6400 倍稀釋
NA12891	NA	NA	NA	NA	NA	6.63	6.88	4.41	4.65
NA18526	NA	NA	NA	NA	NA	-8.94	-5.39	-3.85	-2.93

實施例 3 其他螯合試劑對等位基因特異性之辨識度的影響

【0030】 申請人以其他螯合試劑 GelRed(GelRed™ 核苷酸染料，產品編號 89139-138，Biotium)作為螯合試劑，並且分別將 GelRed 進行：(1) 100 倍稀釋、(2)200 倍稀釋、(3)400 倍稀釋、(4)800 倍稀釋、(5)1600 倍稀釋、(6)3200 倍稀釋、(7)6400 倍稀釋、(8)水。

【0031】 在本實施例中，使用購自美國 Coriell 細胞存儲中心的 DNA 樣本，分別為 NA12891 及 NA18526；以 rs29232 進行實驗，並經由資料庫已知 NA12891 樣本的 rs29232 基因型為 CC 及 NA18526 樣本的 rs29232 基因型為 TT。rs29232 分別包含：含有各 5 μ M SEQ ID NO:1 及 4 的 AT 引子對混合液，以及含有各 5 μ M SEQ ID NO:2 及 3 的 GC 引子對混合液。

【0032】 進行即時 (Real-Time)聚合酶鏈鎖反應，反應總體積為 10

μL，包含 5 μL ABI 快速 SYBR green 擴增反應混合試劑、2 μL GelRed 稀釋液、1 μL 引子對混合液、1.8 μL 水及 0.2 μL 的 gDNA (50 ng/μL) 樣本。即時 (Real-Time) 聚合酶鏈鎖反應器 (CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad) 進行，其反應條件為：95 °C 反應 1 分鐘，再以 95 °C，10 秒、65°C，30 秒為一循環，並重複此循環 50 次結束反應。

【0033】 實驗結果所得之 Ct 值，經由公式 $\Delta Ct = (AT \text{ 引子對的 } Ct) - (GC \text{ 引子對 pair 的 } Ct)$ 計算，結果如表四所示，如同實施例 2 的判斷方式，且 GelRed 所有的測試結果都跟水差異不大，故 GelRed 對等位基因特異性的辨識度效果不佳，顯示非所有的整合試劑都能提高 SNP 的辨識效果。

表四、使用 GelRed 及 ABI 快速 SYBR green 擴增反應混合試劑的 ΔCt 值

GelRed 稀釋溶液	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
	100 倍稀釋	200 倍稀釋	400 倍稀釋	800 倍稀釋	1600 倍稀釋	3200 倍稀釋	6400 倍稀釋	水
NA12891	NA	2.2	2.13	1.33	1.06	1.58	1.62	1.66
NA18526	NA	-6.1	-3.96	-2.79	-2.86	-2.89	-3.64	-4.64

實施例 4 多重(multiplex)SNP 的辨識度

【0034】 本發明確認使用 SYBR green 能有效提升等位基因特異性之辨識度後，進行多重(multiplex)SNP 聚合酶鏈鎖反應以進一步確認本發明之方法對多重 SNP 的辨識效果。

【0035】 在本實施例中，使用 rs29232、rs401681、rs667582 三種 SNP 進行檢測。其中 AT 引子對混合物包含：各 2.5 μM 的 SEQ ID NO:1 及 4 (rs29232)、SEQ ID NO:6 及 7(rs401681)、SEQ ID NO:10 及 11(rs667582)。GC 引子對混合液包含：各 2.5 μM 的 SEQ ID NO:2 及 3(rs29232)、SEQ ID NO:5 及 8(rs401681)、SEQ ID NO:9 及 12(rs667582)。

【0036】 在本實施例中，使用購自美國 Coriell 細胞存儲中心的 DNA 樣本，分別為 NA12891、NA18526、NA18526 以及 NA18558，並經由資料

庫已知各樣本的基因型如表五所示。

表五、各樣本的基因型

	NA12891	NA18524	NA18526	NA18558
rs29232	CC	TC	TT	TC
rs401681	CT	TT	CC	CT
rs667282	CT	TT	TT	CC

【0037】 進行即時 (Real-Time)聚合酶鏈鎖反應，反應總體積為 10 μL ，包含 5 μL Bio-Rad iQ™ SYBR® Green、0.67 μL SYBR green 320 倍稀釋液、2 μL 引子對混合液、2.83 μL 水及 0.5 μL 的 gDNA (50 ng/ μL)樣本。即時 (Real-Time)聚合酶鏈鎖反應器(CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad)進行，其反應條件為：95 °C 反應 1 分鐘，再以 95 °C，10 秒、65°C，30 秒為一循環，並重複此循環 50 次結束反應。

【0038】 各樣本的實驗結果皆與已知基因型結果一致，證實本發明用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應方法應用於多重 SNP 亦具有極高的準確率。此外，實驗結果所得之 Ct 值，經由公式 $\Delta\text{Ct} = (\text{AT 引子對的 Ct}) - (\text{GC 引子對的 Ct})$ 計算，結果如表六所示，SYBR green 確實可有效提升等位基因特異性之辨識度，且使用多重 SNP 的辨識度效果佳。

表六、各樣本的 ΔCt 值

	rs29232	rs401681	rs667282
NA12891	8.80	0.13	-2.83
NA18524	-1.58	-12.49	-11.74
NA18526	-7.15	7.92	-9.43
NA18558	-1.97	-1.61	6.44

實施例 5 基因型鑑定晶片測試

【0039】 本發明之用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶鏈鎖反應方法，在本實施例中使用 rs29232、rs401681、rs667582、rs2072590、rs2131877 五種 SNP 進行進行檢測，分別進行 SNP 變異性位點的第一階段擴增反應(使用 SEQ ID NO: 1 至 20)以及通用引子的第二階段擴

增反應(使用 SEQ ID NO:21 及 22);再以表面固定有辨識探針(SEQ ID NO:23 至 27)的微陣列晶片區別該 SNP 變異性位點的放大產物。

【0040】 其中，AT 引子對混合物包含：各 1.5 μM 的 SEQ ID NO:1 及 4 (rs29232)、SEQ ID NO:6 及 7(rs401681)、SEQ ID NO:10 及 11(rs667582)、SEQ ID NO:14 及 15(rs2072590)、SEQ ID NO:18 及 19(rs2131877)。GC 引子對混合液包含：各 1.5 μM 的 SEQ ID NO:2 及 3(rs29232)、SEQ ID NO:5 及 8(rs401681)、SEQ ID NO:9 及 12(rs667582)、SEQ ID NO:13 及 16(rs2072590)、SEQ ID NO:17 及 20(rs2131877)。

【0041】 在本實施例中，使用購自美國 Coriell 細胞存儲中心的 DNA 樣本，分別為 NA12891、NA18526、NA18526 以及 NA18559，並經由資料庫已知各樣本的基因型如表七所示。

表七、各樣本的基因型

	NA12891	NA18524	NA18526	NA18529
rs2072590	CC	CA	CA	CC
rs2131877	GG	AA	AA	GA
rs29232	CC	TC	TT	TC
rs401681	CT	TT	CC	CC
rs667282	CT	TT	TT	CT

【0042】 首先，進行第一階段擴增反應，反應總體積為 10 μL ，包含 5 μL ABI 快速 SYBR green 擴增反應混合試劑、1.5 μL SYBR green 100 倍稀釋液、1.5 μL 引子對混合液及 2 μL 的 gDNA (50 ng/ μL)樣本。聚合酶連鎖反應使用熱循環反應器(GeneAmp® PCR System 9700, ABI)進行，其反應條件為：95 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1 分鐘，再以 95 $^{\circ}\text{C}$ ，10 秒、65 $^{\circ}\text{C}$ ，30 秒為一循環，並重複此循環 16 次，最後降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 結束反應。

【0043】 接著，進行第二階段擴增反應，反應總體積為 30 μL ，包含 10 μL 第一階段擴增反應產物、10 μL ABI 快速 SYBR green 擴增反應混合試劑、1 μL 通用引子(10 μM)、9 μL 水；其中 AT 通用引子(SEQ ID NO:21)及 GC 通用引子(SEQ ID NO:22)分別於兩個反應中進行，代號分別為 A 及 B。

聚合酶連鎖反應使用熱循環反應器(GeneAmp® PCR System 9700, ABI)進行，其反應條件為：95 °C 反應 1 分鐘，再以 95 °C，10 秒、70°C，30 秒為一循環，並重複此循環 30 次，最後降至 4°C 結束反應。將相同樣本之 A 及 B 反應產物混合後進行以下晶片雜交步驟。

【0044】 將第二階段反應物加入 100 μ L 雜交緩衝液(4.27M 四甲基氯化銨溶液(Tetramethylammonium chloride solution)、0.9% EMPIGEN BB 洗滌液、100 mM Tris 緩衝液(pH 8.0))及 50 μ L 甲醯胺(formamide)混合均勻，以 80°C 加熱 5 分鐘，在於 4°C 冷卻 5 分鐘。將冷卻後的產物注入至表面固定有辨識探針(SEQ ID NO:23 至 27)的晶片，將該晶片以 2 rpm 轉速於 45°C 烘箱反應至隔夜。之後進行晶片清洗步驟，再以 42°C 洗滌液 I(2X SSPE 緩衝液，含 0.1%SDS)於 80 rpm 轉速之震盪器上震盪清洗 3 分鐘；以 42°C 洗滌液 II(0.1X SSPE 緩衝液，含 0.1%SDS)於 80 rpm 轉速之震盪器上震盪清洗 3 分鐘；以室溫洗滌液 III(0.1X SSPE 緩衝液)於 80 rpm 轉速之震盪器上震盪清洗 5 分鐘；將晶片以離心機旋乾。最後以一晶片螢光掃描儀進行晶片掃描步驟，本發明使用具有兩支固態激光雷射波長 635 nm(PMT 750V)及 532 nm(PMT 600V)的 LuxScan™ 10k/A 晶片掃描儀(CapitalBio)進行掃描。再以 Genepix 4.0(Axon Laboratory)進行晶片影像分析。

【0045】 經由 $AT(\text{訊號強度}-\text{背景強度})/GC(\text{訊號強度}-\text{背景強度})$ 計算出 \log_2 比率(ratio)值，如果為 G 或 C 同型合子(homozygote)基因型，數值會是負值；如果為 A 或 T 同型合子(homozygote)基因型數值會是正值；如果是異形合子(heterozygote)數值會界於兩種同型合子中間。如表八所示，各樣本的實驗結果皆與已知基因型結果一致，證實本發明用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶連鎖反應方法應用於多重 SNP 亦具有極高的準確率。顯示本發明之用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶連鎖反應方法能有效分辨單管擴增反應中的多種 SNP 產物。

表八、各樣本的計算出 \log_2 比率(ratio)值

	<i>NA12891</i>	<i>NA18524</i>	<i>NA18526</i>	<i>NA18529</i>
rs2072590	-6.30	1.06	1.25	-6.83
rs2131877	-0.85	5.22	4.57	2.67
rs29232	-7.13	-1.11	1.91	-1.24
rs401681	1.98	4.83	-6.30	-2.96
rs667282	2.43	4.37	4.74	1.89

【0046】 此外，本發明亦可在 SNP 變異性位點引子組之 5'端加上一修飾標記直接進行第一階段擴增反應，不需再進行第二階段擴增反應，或者在產物無任何修飾的情況下，也可以類似表面電漿共振(surface plasmon resonance, SPR)方法偵測是否有產物雜交在晶片表面。

【0047】 更進一步地，當單一 SNP 的基因型超過兩種基因型時，如表九所示，可將等位基因特異性引子的 5'端再加上密碼(barcode)序列，以及表面固定包含密碼(barcode)互補序列的辨識探針，擴增反應依實施例五之方法進行，最後晶片的雜交結果可看見該 SNP 會有兩種訊號結果(如表九 A 類及 B 類)，A 類辨識探針可辨識第一密碼序列，B 類辨識探針可辨識第二密碼序列。計算 A 類訊號的紅綠螢光強度 \log_2 比率(ratio)，判斷樣本是否含有 A 或 G，或是計算 B 類訊號的紅綠螢光強度 \log_2 比率，判斷檢體是否含有 T 或 C。

表九、基因特異性引子的 5'端密碼(barcode)序列辨識方式

基因型	A	T	G	C
反應管	1 號	1 號	2 號	2 號
加入 dCTP 種類	Cy3-dCTP	Cy3-dCTP	Cy5-dCTP	Cy5-dCTP
密碼種類	第一密碼序列	第二密碼序列	第一密碼序列	第二密碼序列
晶片辨識探針種類	A 類	B 類	A 類	B 類

【0048】 綜上所述，本發明提供一種用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性引子(double allele specific primers)的方法，該方法使用的正向(forward)與反向引子(reverse)皆以等位基因特異性位點為引子的 3'端終點，不須使用特殊鹼基的引子，並能容易的直接依等位基因特異性位點兩旁的

序列進行設計，並且結合螯合試劑(interchelating agent)進行多重(multiplex)聚合酶鏈鎖反應。該方法能有效將目前市面上 SNP 晶片將擴增產物注入晶片進行雜交的前處理步驟之時間減少至 5 小時，並能減少合成特殊鹼基引子所需之昂貴成本，且具有同時檢測多個等位基因特異性位點之優點，故本發明之方法係為一有效、快速、低成本、較大規模之檢測 SNP 變異的技術。

【符號說明】

【0049】 無。

【序列表】

<110> 華聯生物科技股份有限公司

<120> 用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性聚合酶反應的方法

<130> 104B0436-I1

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 1
 gatcaggcgt ctgtcgtgct ctggagagat tatacttgca atgctatcaa aata 54

<210> 2
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 2
 ccttccttcc ttccttcctt cctttggaga gattatactt gcaatgctat caaaatg 57

<210> 3
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 3
 ccttccttcc ttccttcctt ccttaggcc accacccatg agc 43

<210> 4
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 4
 gatcaggcgt ctgtcgtgct ctagcccccac cacccatgag t 41

<210> 5
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 5
 ccttccttcc ttccttcctt ccttgaccta tccagacaac ttcagagtcc 50

<210> 6
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 6
 gatcaggcgt ctgtcgtgct cgacctatcc agacaacttc agagtct 47

<210> 7
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 7
 gatcaggcgt ctgtcgtgct cggtgaaagc tgcttcacac catgata 47

<210> 8
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 8
 ccttccttcc ttccttcctt cctttctaag ctgcttcaca ccatgatg 48

<210> 9
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 9
 ccttccttcc ttccttcctt ccttaaacta acaagctccc aggtgac 47

<210> 10
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 10
 gatcaggcgt ctgtcgtgct ctaatctaac aagctcccag gtgat 45

<210> 11
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 11
 gatcaggcgt ctgtcgtgct cacagatata ctgaccaaca gtattcaca 49

<210> 12
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 12
 ccttccttcc ttccttcctt ccttacagat aactgacca acagtattca cg 52

<210> 13
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 13
 ccttccttcc ttccttcctt ccttaacagg gaagatggta ccagcg 46

<210> 14
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 14
 gatcaggcgt ctgtcgtgct ctaagagggga agatgggtacc agct 44

<210> 15
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 15
gatcaggcgt ctgtcgtgct cgacgtgagc tgagctctag gga 43

<210> 16
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 16
ccttccttcc ttccttcctt ccttacctga gctgagctct agggc 45

<210> 17
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 17
ccttccttcc ttccttcctt cctttttgca ggcagtattt acagagcac 49

<210> 18
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 18
gatcaggcgt ctgtcgtgct ctttgcaggc agtatttaca gagcat 46

<210> 19
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic primer

<400> 19
gatcaggcgt ctgtcgtgct cacggcactc tacatttaac ctctcca 47

<210> 20
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 20
 ccttccttcc ttccttcctt ccttacggca ctctacattt aacctctccg 50

<210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 21
 ccttccttcc ttccttcctt cctt 24

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic primer

 <400> 22
 gatcaggcgt ctgtcgtgct c 21

<210> 23
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

 <400> 23
 tttttttttt agagattata cttgcaatgc tatcaaaaatr ctcatgggtg gtgggg 56

<210> 24
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

 <400> 24
 tttttttttt ctatccagac aacttcagag tcyatcatgg tgtgaagcag ctttc 55

<210> 25
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 25
tttttttttt ttctaacaag ctcccagggtg aygtgaatac tgttggtcag tgtatc 56

<210> 26
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 26
tttttttttt gagggaagat ggtaccagck ccctagagct cagctcac 48

<210> 27
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 27
tttttttttt gcaggcagta ttacagagc ayggagaggt taaatgtaga gtgc 54

申請專利範圍

1. 一種用於基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性(allele specific)聚合酶鏈鎖反應的方法，包含：
 - (a) 利用一對以上的引子組並藉由多重單一核苷酸多型性聚合酶鏈鎖反應(Multiplex SNP PCR)擴增(amplify)一待測核酸樣本以產生一擴增產物，其中該聚合酶鏈鎖反應中加入一螢光螯合染劑，且該螢光螯合染劑係為 SYBR green 核苷酸染料；以及
 - (b) 以一表面固定有辨識該等位基因特異性之探針(probe)的基因型鑑定晶片鑑定該擴增產物，
其中該引子組包含至少四條等位基因特異性引子，至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的正股(sense strand)結合，且該等位基因特異性引子 3'端終點與等位基因特異性位點互補，以及至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的反股(antisense strand)結合，且該等位基因特異性引子 3'端終點與等位基因特異性位點互補，並於該引子組之 5'端加上一修飾標記。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該步驟(a)的引子組具有接近的熔解溫度(melting temperature, Tm)值。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該待測核酸樣本係存在於選自於由血液、血清、血漿、體液及組織所組成群組。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該基因型鑑定晶片係以晶片螢光掃描儀進行檢測。
5. 一種用於以辨識修飾標記的基因型鑑定晶片之雙重等位基因特異性(allele specific)聚合酶鏈鎖反應的方法，包含：
 - (a) 利用一對以上的引子組並藉由多重單一核苷酸多型性聚合酶鏈鎖反應(Multiplex SNP PCR)擴增(amplify)一待測核酸樣本以產生一第一階段擴增產物，其中該聚合酶鏈鎖反應中加入一螢光螯合染劑，且該螢

光整合染劑係為 SYBR green 核苷酸染料；

(b) 利用 5'端具有修飾標記的通用聚合酶鏈鎖反應引子(universal PCR primer)擴增該第一階段擴增產物以產生一第二階段擴增產物；以及

(c) 以一表面固定有辨識該等位基因特異性之探針(probe)的基因型鑑定晶片該擴增產物，

其中引子組包含至少四條等位基因特異性引子，至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的正股(sense strand)結合，且該等位基因特異性引子 3'端終點與等位基因特異性位點互補，以及至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的反股(antisense strand)結合，且該等位基因特異性引子 3'端終點與等位基因特異性位點互補。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中該步驟(a)的引子組具有接近的熔解溫度(melting temperature, T_m)值。
7. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中該修飾標記係為螢光、生物素(biotin)、毛地黃皂甘配基(digoxigenin, DIG)或寡核酸序列。
8. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中該待測核酸樣本係存在於選自於由血液、血清、血漿、體液及組織所組成群組。
9. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中該引子組 5'端進一步加上一密碼(barcode)序列，且該探針包含該密碼序列之互補序列。
10. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中該基因型鑑定晶片係以晶片螢光掃描儀進行檢測。
11. 一種與 SYBR green 核苷酸染料搭配的雙重等位基因特異性(allele specific)聚合酶鏈鎖反應之引子對，包含：

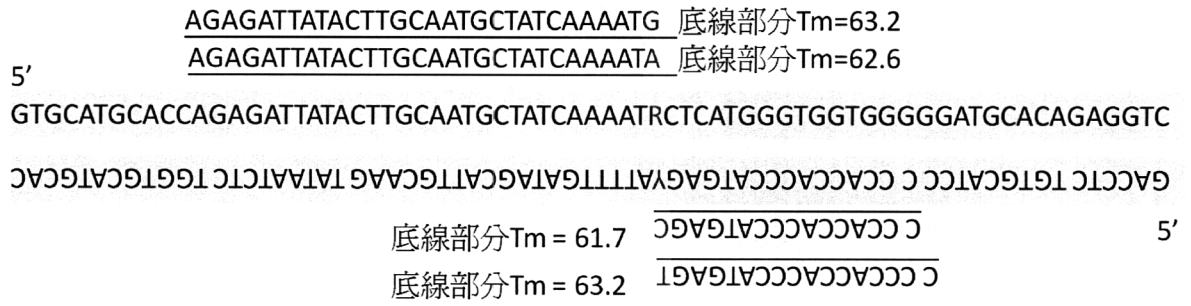
該引子對包含四條等位基因特異性引子，其中兩條等位基因特異性引子與一核酸樣本的正股(sense strand)結合，且該等位基因特異性引子 3'端終點與等位基因特異性位點互補，以及至少兩條等位基因特異性引子與該核酸樣本的反股(antisense strand)結合，且該等位基因特異性引子 3'端終點與等位基因特異性位點互補。

- 12.如申請專利範圍第 11 項所述之引子對，其中該引子對具有接近的熔解溫度(melting temperature，Tm)值。
- 13.如申請專利範圍第 11 項所述之引子對，其中該引子對係應用於一基因型鑑定晶片。

圖式

rs29232

Tm : 62.5±1.4°C



第一圖