



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103849682 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 11

(21) 申请号 201410027023. 1

(22) 申请日 2014. 01. 21

(71) 申请人 芮宝生物医药科技(厦门)有限公司
地址 361115 福建省厦门市火炬高新区(翔安)产业区建业楼D座301

(72) 发明人 曾骥孟 庄建立 刘斌 赖金娇

(74) 专利代理机构 宁波市鄞州盛飞专利代理事务所(普通合伙) 33243
代理人 张向飞

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

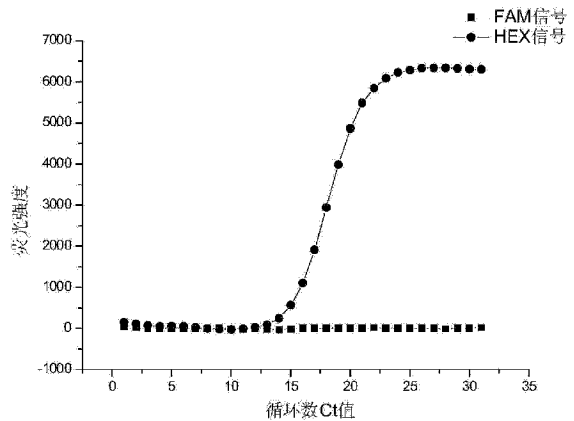
权利要求书10页 说明书22页
序列表17页 附图5页

(54) 发明名称

用于人类耳聋多基因突变筛查的引物、探针及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了用于人类耳聋多基因突变筛查的引物、探针及其使用方法,属于基因检测技术领域。本发明公开了用于人类耳聋GJB2基因突变GJB2-M1、GJB2-M2或GJB2-M3、GJB2-M4和GJB2-M5筛查的引物和探针及其使用方法,用于人类耳聋GJB3基因突变GJB3-M1或GJB3-M2筛查的引物和探针及其使用方法,用于人类耳聋SLC26A4基因突变SLC26A4-M1和SLC26A4-M2筛查的引物和探针及其使用方法。本发明提供的引物和探针及其使用方法,可以在同一次PCR反应中检测多个样本,相比传统的检测方法具有准确率高、步骤少,耗时少的优点。



1. 一种用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M1 筛查的引物和探针,其特征在于,所述的引物和探针如下:

所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 所示的 DNA 序列,Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的 DNA 序列;

所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO.38 或 SEQ ID NO.40 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO.39 或 SEQ ID NO.41 所示的 DNA 序列;

其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M1 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 30-35 位碱基 G 的缺失。

2. 权利要求 1 所述的用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M1 筛查的引物和探针的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 1:样品的 DNA 提取;

步骤 2:荧光 PCR 扩增;

PCR 体系如下:

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

PCR 反应条件如下:

95℃预变性 5 分钟;95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环;93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环;

其中,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO.38 或 SEQ ID NO.40 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO.39 或 SEQ ID NO.41 所示的 DNA 序列;

步骤 3:检测:

采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号,得到 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线;

步骤 4:结果判定:

根据步骤 3 得到的 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线,判断样品提供者的 GJB2 基因突变情况:

如果样品孔只有 FAM 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M1 纯合突变;

如果样品孔只有 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M1 野生型;

如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M1 杂合突变;

其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M1 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 30-35 位碱基 G 的缺失。

3. 一种用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M2 或 GJB2-M3 筛查的引物和探针,其特征在于,所述的引物和探针如下:

所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 6 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 7 或 SEQ ID NO. 8 所示的 DNA 序列;

所述的探针为 Probe-1、Probe-2、Probe-3 和 Probe-4, Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 42 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 43 所示的 DNA 序列;Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO. 44 所示的 DNA 序列;Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO. 45 所示的 DNA 序列;

其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M2 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 167 位碱基 T 的缺失;所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M3 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 176-191 位 16 个碱基的缺失。

4. 权利要求 3 所述的用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M2 或 GJB2-M3 筛查的引物和探针的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 1:样品的 DNA 提取;

步骤 2:荧光 PCR 扩增;

PCR 体系如下:

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol

Primer-F	0.1~1.0 μ mol
Primer-R	0.1~1.0 μ mol
Probe-1	0.5~1.0 μ mol
Probe-2	0.5~1.0 μ mol
Probe-3	0.5~1.0 μ mol
Probe-4	0.5~1.0 μ mol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50 μ L

PCR 反应条件如下：

95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟；95 $^{\circ}$ C 变性 25 秒，64 $^{\circ}$ C 退火 20 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒，15 个循环；93 $^{\circ}$ C 变性 25 秒，60 $^{\circ}$ C 退火 35 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒，31 个循环；

其中，Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 6 所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 7 或 SEQ ID NO. 8 所示的 DNA 序列；Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 42 所示的 DNA 序列；Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 43 所示的 DNA 序列；Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO. 44 所示的 DNA 序列；Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO. 45 所示的 DNA 序列；

步骤 3：检测：

采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号，得到 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线；

步骤 4：结果判定：

根据步骤 3 得到的 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线，判断样品提供者的 GJB2 基因突变情况：

如果样品孔只有 FAM 信号，表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M2 或 GJB2-M3 纯合突变；

如果样品孔只有 HEX 信号，表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M2 或 GJB2-M3 野生型；

如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号，表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M2 或 GJB2-M3 杂合突变；

其中，所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M2 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 167 位碱基 T 的缺失；所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M3 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 176-191 位 16 个碱基的缺失。

5. 一种用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M4 筛查的引物和探针，其特征在于，所述的引物和探针如下：

所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R，Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 9 或 SEQ ID NO. 10 所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 11 或 SEQ ID NO. 12 所示的 DNA 序列；

所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2，其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 46 或 SEQ ID

NO. 48 所示的 DNA 序列 ;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 47 或 SEQ ID NO. 49 所示的 DNA 序列 ;

其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M4 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 233-235 位碱基 C 的缺失。

6. 权利要求 5 所述的用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M4 筛查的引物和探针的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 1 :样品的 DNA 提取 ;

步骤 2 :荧光 PCR 扩增 ;

PCR 体系如下 :

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

PCR 反应条件如下 :

95℃预变性 5 分钟 ;95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环 ;93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环 ;

其中,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 9 或 SEQ ID NO. 10 所示的 DNA 序列 ;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 11 或 SEQ ID NO. 12 所示的 DNA 序列 ;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 46 或 SEQ ID NO. 48 所示的 DNA 序列 ;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 47 或 SEQ ID NO. 49 所示的 DNA 序列 ;

步骤 3 :检测 :

采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号,得到 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线 ;

步骤 4 :结果判定 :

根据步骤 3 得到的 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线,判断样品提供者的 GJB2 基因突变情况 :

如果样品孔只有 FAM 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M4 纯合突变 ;

如果样品孔只有 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M4 野生型 ;

如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M4 杂合突变 ;

其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M4 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的

第 233-235 位碱基 C 的缺失。

7. 一种用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M5 筛查的引物和探针,其特征在于,所述的引物和探针如下:

所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R, Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 13 或 SEQ ID NO. 14 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 15 或 SEQ ID NO. 16 所示的 DNA 序列;

所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 50 或 SEQ ID NO. 52 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 51 或 SEQ ID NO. 53 所示的 DNA 序列;

其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M5 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 299-300 位碱基 AT 的缺失。

8. 权利要求 7 所述的用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M5 筛查的引物和探针的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 1:样品的 DNA 提取;

步骤 2:荧光 PCR 扩增;

PCR 体系如下:

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

PCR 反应条件如下:

95℃预变性 5 分钟;95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环;93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环;

其中,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 13 或 SEQ ID NO. 14 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 15 或 SEQ ID NO. 16 所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 50 或 SEQ ID NO. 52 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 51 或 SEQ ID NO. 53 所示的 DNA 序列;

步骤 3:检测:

采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号,得到 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线;

步骤 4:结果判定:

根据步骤3得到的GJB2基因的FAM信号和HEX信号扩增曲线,判断样品提供者的GJB2基因突变情况:

如果样品孔只有FAM信号,表明样品提供者的GJB2基因为GJB2-M5纯合突变;

如果样品孔只有HEX信号,表明样品提供者的GJB2基因为GJB2-M5野生型;

如果样品孔同时有FAM信号和HEX信号,表明样品提供者的GJB2基因为GJB2-M5杂合突变;

其中,所述的人类耳聋GJB2基因突变GJB2-M5为人类耳聋GJB2基因的第二外显子的第299-300位碱基AT的缺失。

9. 一种用于人类耳聋GJB3基因突变GJB3-M1或GJB3-M2筛查的引物和探针,其特征在于,所述的引物和探针如下:

所述的引物为Primer-F和Primer-R,其中Primer-F为序列表中SEQ ID NO. 17或SEQ ID NO. 18所示的DNA序列;Primer-R为序列表中SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 22和SEQ ID NO. 23中的任一个所示的DNA序列;

所述的探针为Probe-1、Probe-2、Probe-3和Probe-4,其中Probe-1为序列表中SEQ ID NO. 54所示的DNA序列;Probe-2为序列表中SEQ ID NO. 55所示的DNA序列;Probe-3为序列表中SEQ ID NO. 56或SEQ ID NO. 58所示的DNA序列;Probe-4为序列表中SEQ ID NO. 57或SEQ ID NO. 59所示的DNA序列;

其中,所述的人类耳聋GJB3基因突变GJB3-M1为人类耳聋GJB3基因的第二外显子的第538碱基由G变成T;所述的人类耳聋GJB3基因突变GJB3-M2为人类耳聋GJB3基因的第二外显子的第547碱基由G变成A。

10. 权利要求9所述的用于人类耳聋GJB3基因突变GJB3-M1或GJB3-M2筛查的引物和探针的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1:样品的DNA提取;

步骤2:荧光PCR扩增;

PCR体系如下:

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Probe-3	0.5~1.0μmol
Probe-4	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

PCR 反应条件如下：

95℃预变性 5 分钟；95℃变性 25 秒，64℃退火 20 秒，72℃延伸 20 秒，15 个循环；93℃变性 25 秒，60℃退火 35 秒，72℃延伸 20 秒，31 个循环；

其中，Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 17 或 SEQ ID NO. 18 所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 22 和 SEQ ID NO. 23 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 54 所示的 DNA 序列；Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 55 所示的 DNA 序列；Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO. 56 或 SEQ ID NO. 58 所示的 DNA 序列；Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO. 57 或 SEQ ID NO. 59 所示的 DNA 序列；

步骤 3：检测：

采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号，得到 GJB3 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线；

步骤 4：结果判定：

根据步骤 3 得到的 GJB3 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线，判断样品提供者的 GJB3 基因突变情况：

如果样品孔只有 FAM 信号，表明样品提供者的 GJB3 基因为 GJB3-M1 或 GJB3-M2 纯合突变；

如果样品孔只有 HEX 信号，表明样品提供者的 GJB3 基因为 GJB3-M1 或 GJB3-M2 野生型；

如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号，表明样品提供者的 GJB3 基因为 GJB3-M1 或 GJB3-M2 杂合突变；

其中，所述的人类耳聋 GJB3 基因突变 GJB3-M1 为人类耳聋 GJB3 基因的第二外显子的第 538 碱基由 G 变成 T；所述的人类耳聋 GJB3 基因突变 GJB3-M2 为人类耳聋 GJB3 基因的第二外显子的第 547 碱基由 G 变成 >A。

11. 一种用于人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M1 筛查的引物和探针,其特征在于,所述的引物和探针如下:

所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 24 或 SEQ ID NO. 25 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 29 中的任一个所示的 DNA 序列;

所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 60、SEQ ID NO. 61 和 SEQ ID NO. 62 中的任一个所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 63 所示的 DNA 序列;

其中,所述的人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M1 为人类耳聋 SLC26A4 基因的 IVS7-2A>G。

12. 权利要求 11 所述的用于人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M1 筛查的引物和探针的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 1:样品的 DNA 提取;

步骤 2:荧光 PCR 扩增;

PCR 体系如下:

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

PCR 反应条件如下:

95℃预变性 5 分钟;95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环;93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环;

其中,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 24 或 SEQ ID NO. 25 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 29 中的任一个所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 60、SEQ ID NO. 61 和 SEQ ID NO. 62 中的任一个所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 63 所示的 DNA 序列;

步骤 3:检测:

采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号,得到 SLC26A4 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线;

步骤 4:结果判定:

根据步骤 3 得到的 SLC26A4 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线,判断样品提供者的

GJB3 基因突变情况：

如果样品孔只有 FAM 信号,表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M1 纯合突变；

如果样品孔只有 HEX 信号,表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M1 野生型；

如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号,表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M1 杂合突变；

其中,所述的人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M1 为人类耳聋 SLC26A4 基因的 IVS7-2A>G。

13. 一种用于人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M2 筛查的引物和探针,其特征在于,所述的引物和探针如下：

所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31 和 SEQ ID NO. 32 中的任一个所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 36 和 SEQ ID NO. 37 中的任一个所示的 DNA 序列；

所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 64、SEQ ID NO. 65、SEQ ID NO. 66 和 SEQ ID NO. 67 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 68 所示的 DNA 序列；

其中,所述的人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M2 为人类耳聋 SLC26A4 基因的第 19 外显子的第 2168 碱基由 A 变成 G。

14. 权利要求 13 所述的用于人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M2 筛查的引物和探针的使用方法,其特征在于,包括如下步骤：

步骤 1:样品的 DNA 提取；

步骤 2:荧光 PCR 扩增；

PCR 体系如下：

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

PCR 反应条件如下：

95℃预变性 5 分钟；95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环；93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环；

其中,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31 和 SEQ ID NO. 32 中的任一

个所示的DNA序列;Primer-R为序列表中SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 36和SEQ ID NO. 37中的任一个所示的DNA序列;Probe-1为序列表中SEQ ID NO. 64、SEQ ID NO. 65、SEQ ID NO. 66和SEQ ID NO. 67中的任一个所示的DNA序列;Probe-2为序列表中SEQ ID NO. 68所示的DNA序列;

步骤3:检测:

采用实时PCR扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测FAM和HEX荧光信号,得到SLC26A4基因的FAM信号和HEX信号扩增曲线;

步骤4:结果判定:

根据步骤3得到的SLC26A4基因的FAM信号和HEX信号扩增曲线,判断样品提供者的GJB3基因突变情况:

如果样品孔只有FAM信号,表明样品提供者的SLC26A4基因为SLC26A4-M2纯合突变;

如果样品孔只有HEX信号,表明样品提供者的SLC26A4基因为SLC26A4-M2野生型;

如果样品孔同时有FAM信号和HEX信号,表明样品提供者的SLC26A4基因为SLC26A4-M2杂合突变;

其中,所述的人类耳聋SLC26A4基因突变SLC26A4-M2为人类耳聋SLC26A4基因的第19外显子的第2168碱基由A变成G。

用于人类耳聋多基因突变筛查的引物、探针及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因检测技术领域,特别涉及用于人类耳聋多基因突变筛查的引物、探针及其使用方法。

背景技术

[0002] 耳聋是严重影响人类健康的一种常见疾病,也是临床上最常见的遗传性疾病之一,因其病因复杂、发生率高且治疗困难,从而极大的影响着患者的人际交往与生活质量。据统计,耳聋在新生儿中的发病率约为1%~3%,全世界约有7000万人罹患不同程度的听力缺损,而我国是世界上听力障碍人口最多的国家,在全国各类残疾人中,听力残疾约占总数的24%,累及全国数千万个家庭。

[0003] 耳聋的致病因素有很多,包括遗传因素和环境因素等,其中约50%-60%由遗传因素导致,即遗传性耳聋。在大量迟发性听力下降的患者中,许多也是由于自身基因缺陷或由于基因缺陷和多态性造成对环境因素的易感性增加而致病。根据是否伴有耳外组织的异常或病变,遗传性耳聋分为综合征性耳聋(SHL)和非综合征性耳聋(NSHL),其中NSHL占70%甚至更多。而根据遗传方式的不同又可将遗传性耳聋分为常染色体显性遗传(DFNA)、常染色体隐性遗传(DFNB)、X连锁遗传、Y连锁遗传及线粒体遗传五类,其中以DFNB最为常见,约占60%~75%;其次为DFNA,约占20%~30%。一般情况下,DFNB多表现为语前聋或先天性耳聋,DFNA多表现为语后聋或渐进性听力下降。

[0004] 随着基因组学以及分子生物学技术的迅猛发展,对于遗传性耳聋相关基因及发病机制的研究已经取得了很大的进展。研究发现,在70%~80%的遗传性耳聋患者中可发现致聋基因突变,已知有数百个基因与遗传性耳聋有关,且绝大多数的遗传性耳聋为单基因病,而耳聋相关的遗传基因突变在正常群体中也并不少见,在我国现有人口中,携带遗传性致聋基因的比例约为6%。研究结果还表明,遗传性耳聋的致病基因及同一基因的突变位点在不同种族,甚至在同一种族的不同地区的人群中都不完全相同。目前,欧美发达国家列入耳聋致病基因临床检测的项目包括EYA1、TIMM8A、GJB2、GJB6、SLC26A4、USH2A、USH3A、POU3F4、WFS1、COCH、OTOF、TECTA以及线粒体DNA(mtDNA)等,但最普遍也是最基本的检测项目是GJB2、GJB6、SLC26A4、COCH和mtDNA基因的突变检测。而国内进行的耳聋分子流行病学调查结果显示,我国大部分的遗传性耳聋主要由GJB2、GJB3、SLC26A4以及mtDNA等为数不多的几个基因突变引起,对这几个基因进行遗传学检测可以明确耳聋人群中40%的遗传学病因,结合家族史分析和查体可以诊断95%以上的遗传性耳聋,这为我国耳聋致病基因筛查以及临床基因诊断工作的大规模开展提供了理论依据。

[0005] GJB2基因定位于13q112q12上,含2个外显子,是NSHL最常见的致病基因,已被证实与常染色体隐性遗传性耳聋(DFNB1)和显性遗传性耳聋(DFNA3)有关,其编码的连接蛋白26(connexin26)表达于耳蜗,参与细胞间信号介导和离子传递。突变的GJB2基因可导致连接蛋白异常,进而影响细胞间隙的连接功能,引起内耳钾离子回收障碍而致耳聋。GJB2基因突变是中国人散发性先天性耳聋的主要病因,且有26%-33%的语前聋患儿为GJB2基因

突变所致。目前在 NSHL 病人中已经发现了 100 多种 GJB2 基因突变类型,其主要突变类型包括 35delG、167delT、235delC、V37I、299-300delAT、R143W、W24X 等,这些突变类型在不同种族人群中的发生频率和分布情况差异很大,其中 35delG 为高加索人的致病热点突变,而我国的致病热点突变则为 235delC。

[0006] GJB3 基因于 1998 年由夏家辉等研究中国两个常染色体显性遗传非综合征性耳聋的家系时定位并克隆,该基因定位于人类染色体 1p33-p35,编码由 270 个氨基酸组成的连接蛋白 31 (connexin31)。GJB3 突变既可导致 DFNA,又可导致 DFNB,其错义突变 E183K 和无义突变 R180X 被认为与高频听力下降有关,复合杂合突变 423-425delATT 和 423A-G 能导致隐性非综合征性耳聋。多项研究结果表明,GJB3 基因突变在中国耳聋人群中的携带率约为 3%。

[0007] SLC26A4 基因定位于 7q31,亦称 PDS 基因,含 21 个外显子,是 Pendred 综合征和大前庭水管综合征的致病基因。SLC26A4 基因编码的 Pendred 蛋白主要由疏水性氨基酸组成,其功能主要是参与碘 / 氯离子的转运。SLC26A4 的突变导致 Pendred 蛋白发生异常,既可影响细胞内外阴离子的转运,从而影响声音传递而导致听力损失。在中国大陆,大前庭水管综合征患者 SLC26A4 基因突变检出率为 97.9%,高于韩国(78%)、日本(92%)和欧洲(40%)。全国分子流行病学研究结果表明,中国人群的 SLC26A4 基因具有独特的突变谱,其 IVS7-2A>G 突变是大前庭水管综合征中的高发突变,在聋人群体中的检出率达到 14.3%,占所有 SLC26A4 突变的 45-60%,其次为第 19 外显子上的 2168A>G 突变。而在欧美国家耳聋患者中最常见的 T416P、IVS8+1G>A、L236P 等 SLC26A4 基因突变,在中国大前庭水管综合征患者中却鲜有发现。

[0008] 综上所述,对遗传性耳聋致病基因 GJB2、GJB3 和 SLC26A4 的热点突变进行筛查,明确患者耳聋病因,依据基因检测结果指导临床医生及患者的疾病治疗情况以规避耳聋风险,对夫妻双方均为遗传性耳聋致病基因携带者的胎儿进行产前诊断,对于我国防治遗传性耳聋、推进优生优育、提高人口素质具有重要意义。目前,对遗传性耳聋致病基因进行检测的方法包括限制性片段长度多态性分析(RFLP),变性高效液相色谱分析(DHPLC),直接测序法等,这些方法或者不能定性,或者耗时费力、所需设备和耗材昂贵,更重要的是这些方法难以同时对不同基因或同一基因的多个突变位点进行检测。由于遗传性耳聋具有遗传异质性强、突变位点多以及人群患病率及携带致病基因比例高等特点,因此有必要建立一种高通量、高效率的基因突变检测方法,以实现临床快速检测或大规模的人群筛查。基因芯片技术用于遗传性耳聋致病基因检测,具有通量高、自动化程度高等优点,但存在重复性差、易产生交叉污染而造成假阳性结果等缺点。Real-Time PCR 法在实时荧光定量 PCR 平台上进行闭管检测,能够有效克服 PCR 产物遗留污染的问题,且操作简便、快捷,根据引物和探针的优化设计,可同时检测多个样品不同基因或同一基因的多个突变位点,能够有效的应用于遗传性耳聋致病基因检测,是一种极具潜力的耳聋基因检测工具。

发明内容

[0009] 为解决上述问题,本发明提出了一种用于人类耳聋多基因突变筛查的引物、探针及其使用方法。

[0010] 一种用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M1 筛查的引物和探针,所述的引物和探针

如下：

[0011] 所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 所示的 DNA 序列,Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的 DNA 序列；

[0012] 所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO.38 或 SEQ ID NO.40 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO.39 或 SEQ ID NO.41 所示的 DNA 序列；

[0013] 其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M1 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 30-35 位碱基 G 的缺失。

[0014] 上述用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M1 筛查的引物和探针的使用方法,包括如下步骤：

[0015] 步骤 1 :样品的 DNA 提取；

[0016] 步骤 2 :荧光 PCR 扩增；

[0017] PCR 体系如下：

[0018]

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol

[0019]

Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

[0020] PCR 反应条件如下：

[0021] 95℃预变性 5 分钟;95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环;93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环；

[0022] 其中,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.2 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO.38 或 SEQ ID NO.40 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO.39 或 SEQ ID NO.41 所示的 DNA 序列；

[0023] 步骤 3 :检测：

[0024] 采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号,得到 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线；

[0025] 步骤 4 :结果判定：

[0026] 根据步骤 3 得到的 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线,判断样品提供者的 GJB2 基因突变情况:

[0027] 如果样品孔只有 FAM 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M1 纯合突变;

[0028] 如果样品孔只有 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M1 野生型;

[0029] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M1 杂合突变。

[0030] 其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M1 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 30-35 位碱基 G 的缺失。

[0031] 一种用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M2 或 GJB2-M3 筛查的引物和探针,所述的引物和探针如下:

[0032] 所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 6 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 7 或 SEQ ID NO. 8 所示的 DNA 序列;

[0033] 所述的探针为 Probe-1、Probe-2、Probe-3 和 Probe-4, Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 42 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 43 所示的 DNA 序列;Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO. 44 所示的 DNA 序列;Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO. 45 所示的 DNA 序列;

[0034] 其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M2 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 167 位碱基 T 的缺失;所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M3 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 176-191 位 16 个碱基的缺失。

[0035] 上述用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M2 或 GJB2-M3 筛查的引物和探针的使用方法,包括如下步骤:

[0036] 步骤 1:样品的 DNA 提取;

[0037] 步骤 2:荧光 PCR 扩增;

[0038] PCR 体系如下:

[0039]

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Probe-3	0.5~1.0μmol
Probe-4	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

[0040] PCR 反应条件如下：

[0041] 95℃预变性 5 分钟；95℃变性 25 秒，64℃退火 20 秒，72℃延伸 20 秒，15 个循环；93℃变性 25 秒，60℃退火 35 秒，72℃延伸 20 秒，31 个循环；

[0042] 其中，Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 6 所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 7 或 SEQ ID NO. 8 所示的 DNA 序列；Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 42 所示的 DNA 序列；Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 43 所示的 DNA 序列；Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO. 44 所示的 DNA 序列；Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO. 45 所示的 DNA 序列；

[0043] 步骤 3：检测：

[0044] 采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号，得到 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线；

[0045] 步骤 4：结果判定：

[0046] 根据步骤 3 得到的 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线，判断样品提供者的 GJB2 基因突变情况：

[0047] 如果样品孔只有 FAM 信号，表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M2 或 GJB2-M3 纯合突变；

[0048] 如果样品孔只有 HEX 信号，表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M2 或 GJB2-M3 野生型；

[0049] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号，表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M2 或 GJB2-M3 杂合突变。

[0050] 其中，所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M2 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 167 位碱基 T 的缺失；所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M3 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 176-191 位 16 个碱基的缺失。

[0051] 一种用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M4 筛查的引物和探针，所述的引物和探针

如下：

[0052] 所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R, Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 9 或 SEQ ID NO. 10 所示的 DNA 序列 ;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 11 或 SEQ ID NO. 12 所示的 DNA 序列 ;

[0053] 所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2, 其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 46 或 SEQ ID NO. 48 所示的 DNA 序列 ;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 47 或 SEQ ID NO. 49 所示的 DNA 序列 ;

[0054] 其中, 所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M4 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 233-235 位碱基 C 的缺失。

[0055] 上述用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M4 筛查的引物和探针的使用方法, 包括如下步骤：

[0056] 步骤 1 :样品的 DNA 提取；

[0057] 步骤 2 :荧光 PCR 扩增；

[0058] PCR 体系如下：

[0059]

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

[0060] PCR 反应条件如下：

[0061] 95℃预变性 5 分钟 ;95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环 ;93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环；

[0062] 其中, Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 9 或 SEQ ID NO. 10 所示的 DNA 序列 ;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 11 或 SEQ ID NO. 12 所示的 DNA 序列 ;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 46 或 SEQ ID NO. 48 所示的 DNA 序列 ;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 47 或 SEQ ID NO. 49 所示的 DNA 序列；

[0063] 步骤 3 :检测：

[0064] 采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号, 得到 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线；

[0065] 步骤 4 :结果判定：

[0066] 根据步骤 3 得到的 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线, 判断样品提供者的

GJB2 基因突变情况：

[0067] 如果样品孔只有 FAM 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M4 纯合突变；

[0068] 如果样品孔只有 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M4 野生型；

[0069] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M4 杂合突变。

[0070] 其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M4 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 233-235 位碱基 C 的缺失。

[0071] 一种用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M5 筛查的引物和探针,所述的引物和探针如下：

[0072] 所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 13 或 SEQ ID NO. 14 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 15 或 SEQ ID NO. 16 所示的 DNA 序列；

[0073] 所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 50 或 SEQ ID NO. 52 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 51 或 SEQ ID NO. 53 所示的 DNA 序列；

[0074] 其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M5 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 299-300 位碱基 AT 的缺失。

[0075] 上述用于人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M5 筛查的引物和探针的使用方法,包括如下步骤：

[0076] 步骤 1 :样品的 DNA 提取；

[0077] 步骤 2 :荧光 PCR 扩增；

[0078] PCR 体系如下：

[0079]

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
[0080]	
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

[0081] PCR 反应条件如下：

[0082] 95℃预变性 5 分钟;95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环；93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环；

[0083] 其中,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO.13 或 SEQ ID NO.14 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO.15 或 SEQ ID NO.16 所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO.50 或 SEQ ID NO.52 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO.51 或 SEQ ID NO.53 所示的 DNA 序列;

[0084] 步骤 3:检测:

[0085] 采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号,得到 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线;

[0086] 步骤 4:结果判定:

[0087] 根据步骤 3 得到的 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线,判断样品提供者的 GJB2 基因突变情况:

[0088] 如果样品孔只有 FAM 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M5 纯合突变;

[0089] 如果样品孔只有 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M5 野生型;

[0090] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为 GJB2-M5 杂合突变。

[0091] 其中,所述的人类耳聋 GJB2 基因突变 GJB2-M5 为人类耳聋 GJB2 基因的第二外显子的第 299-300 位碱基 AT 的缺失。

[0092] 一种用于人类耳聋 GJB3 基因突变 GJB3-M1 或 GJB3-M2 筛查的引物和探针,所述的引物和探针如下:

[0093] 所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO.17 或 SEQ ID NO.18 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.22 和 SEQ ID NO.23 中的任一个所示的 DNA 序列;

[0094] 所述的探针为 Probe-1、Probe-2、Probe-3 和 Probe-4,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO.54 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO.55 所示的 DNA 序列;Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO.56 或 SEQ ID NO.58 所示的 DNA 序列;Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO.57 或 SEQ ID NO.59 所示的 DNA 序列;

[0095] 其中,所述的人类耳聋 GJB3 基因突变 GJB3-M1 为人类耳聋 GJB3 基因的第二外显子的第 538 碱基由 G 变成 T;所述的人类耳聋 GJB3 基因突变 GJB3-M2 为人类耳聋 GJB3 基因的第二外显子的第 547 碱基由 G 变成 A。

[0096] 上述用于人类耳聋 GJB3 基因突变 GJB3-M1 或 GJB3-M2 筛查的引物和探针的使用方法,包括如下步骤:

[0097] 步骤 1:样品的 DNA 提取;

[0098] 步骤 2:荧光 PCR 扩增;

[0099] PCR 体系如下:

[0100]

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Probe-3	0.5~1.0μmol
Probe-4	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

[0101] PCR 反应条件如下：

[0102] 95℃预变性 5 分钟；95℃变性 25 秒，64℃退火 20 秒，72℃延伸 20 秒，15 个循环；93℃变性 25 秒，60℃退火 35 秒，72℃延伸 20 秒，31 个循环；

[0103] 其中，Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 17 或 SEQ ID NO. 18 所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 22 和 SEQ ID NO. 23 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 54 所示的 DNA 序列；Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 55 所示的 DNA 序列；Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO. 56 或 SEQ ID NO. 58 所示的 DNA 序列；Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO. 57 或 SEQ ID NO. 59 所示的 DNA 序列；

[0104] 步骤 3：检测：

[0105] 采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号，得到 GJB3 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线；

[0106] 步骤 4：结果判定：

[0107] 根据步骤 3 得到的 GJB3 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线，判断样品提供者的 GJB3 基因突变情况：

[0108] 如果样品孔只有 FAM 信号，表明样品提供者的 GJB3 基因为 GJB3-M1 或 GJB3-M2 纯合突变；

[0109] 如果样品孔只有 HEX 信号，表明样品提供者的 GJB3 基因为 GJB3-M1 或 GJB3-M2 野生型；

[0110] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号，表明样品提供者的 GJB3 基因为 GJB3-M1 或 GJB3-M2 杂合突变。

[0111] 其中，所述的人类耳聋 GJB3 基因突变 GJB3-M1 为人类耳聋 GJB3 基因的第二外显子的第 538 碱基由 G 变成 T；所述的人类耳聋 GJB3 基因突变 GJB3-M2 为人类耳聋 GJB3 基因的第二外显子的第 547 碱基由 G 变成 A。

[0112] 一种用于人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M1 筛查的引物和探针,所述的引物和探针如下:

[0113] 所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 24 或 SEQ ID NO. 25 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 29 中的任一个所示的 DNA 序列;

[0114] 所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 60、SEQ ID NO. 61 和 SEQ ID NO. 62 中的任一个所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 63 所示的 DNA 序列;

[0115] 其中,所述的人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M1 为人类耳聋 SLC26A4 基因的 IVS7-2A>G。

[0116] 上述用于人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M1 筛查的引物和探针的使用方法,包括如下步骤:

[0117] 步骤 1:样品的 DNA 提取;

[0118] 步骤 2:荧光 PCR 扩增;

[0119] PCR 体系如下:

[0120]

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol

[0121]

Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

[0122] PCR 反应条件如下:

[0123] 95℃预变性 5 分钟;95℃变性 25 秒,64℃退火 20 秒,72℃延伸 20 秒,15 个循环;93℃变性 25 秒,60℃退火 35 秒,72℃延伸 20 秒,31 个循环;

[0124] 其中,Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 24 或 SEQ ID NO. 25 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 29 中的任一个所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 60、SEQ ID NO. 61 和 SEQ ID NO. 62 中的任一个所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 63 所示的 DNA 序列;

[0125] 步骤 3:检测:

[0126] 采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号,得到 SLC26A4 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线;

[0127] 步骤4:结果判定:

[0128] 根据步骤3得到的 SLC26A4 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线,判断样品提供者的 GJB3 基因突变情况:

[0129] 如果样品孔只有 FAM 信号,表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M1 纯合突变;

[0130] 如果样品孔只有 HEX 信号,表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M1 野生型;

[0131] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号,表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M1 杂合突变。

[0132] 其中,所述的人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M1 为人类耳聋 SLC26A4 基因的 IVS7-2A>G。

[0133] 一种用于人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M2 筛查的引物和探针,所述的引物和探针如下:

[0134] 所述的引物为 Primer-F 和 Primer-R,其中 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31 和 SEQ ID NO. 32 中的任一个所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 36 和 SEQ ID NO. 37 中的任一个所示的 DNA 序列;

[0135] 所述的探针为 Probe-1 和 Probe-2,其中 Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 64、SEQ ID NO. 65、SEQ ID NO. 66 和 SEQ ID NO. 67 中的任一个所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 68 所示的 DNA 序列;

[0136] 其中,所述的人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M2 为人类耳聋 SLC26A4 基因的第 19 外显子的第 2168 碱基由 A 变成 G。

[0137] 上述用于人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M2 筛查的引物和探针的使用方法,包括如下步骤:

[0138] 步骤1:样品的 DNA 提取;

[0139] 步骤2:荧光 PCR 扩增;

[0140] PCR 体系如下:

[0141]

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

[0142] PCR 反应条件如下：

[0143] 95℃预变性 5 分钟；95℃变性 25 秒，64℃退火 20 秒，72℃延伸 20 秒，15 个循环；93℃变性 25 秒，60℃退火 35 秒，72℃延伸 20 秒，31 个循环；

[0144] 其中，Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31 和 SEQ ID NO. 32 中的任一个所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 36 和 SEQ ID NO. 37 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 64、SEQ ID NO. 65、SEQ ID NO. 66 和 SEQ ID NO. 67 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 68 所示的 DNA 序列；

[0145] 步骤 3：检测：

[0146] 采用实时 PCR 扩增仪于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号，得到 SLC26A4 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线；

[0147] 步骤 4：结果判定：

[0148] 根据步骤 3 得到的 SLC26A4 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线，判断样品提供者的 GJB3 基因突变情况：

[0149] 如果样品孔只有 FAM 信号，表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M2 纯合突变；

[0150] 如果样品孔只有 HEX 信号，表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M2 野生型；

[0151] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号，表明样品提供者的 SLC26A4 基因为 SLC26A4-M2 杂合突变。

[0152] 其中，所述的人类耳聋 SLC26A4 基因突变 SLC26A4-M2 为人类耳聋 SLC26A4 基因的第二十九外显子的第 2168 碱基由 A 变成 G。

[0153] 表 1：用于人类耳聋多基因突变筛查的引物和探针序列

[0154]

引物名称	序列	序列编号

GJB2-M1-F1	5' -TAGTGATTCCTGTGTTGTGTG-3'	SEQ ID NO. 1
GJB2-M1-F2	5' -TCTGTCCTAGCTAGTGATTCCT-3'	SEQ ID NO. 2
GJB2-M1-R1	5' -AGAGGACGGTGAGCCAGA-3'	SEQ ID NO. 3
GJB2-M1-R2	5' -AAGAGGACGGTGAGCCA-3'	SEQ ID NO. 4
GJB2-M1-P1	FAM-5' -ACGATCCTGGGGGTGT-3' -MGB	SEQ ID NO. 38
GJB2-M1-P1'	HEX-5' -CGATCCTGGGGGTGTGA-3' -MGB	SEQ ID NO. 39
GJB2-M1-P2	FAM-5' -CGATCCTGGGGGTGT-3' -MGB	SEQ ID NO. 40
GJB2-M1-P2'	HEX-5' -ATCCTGGGGGTGTGA-3' -MGB	SEQ ID NO. 41
GJB2-M2\3-F1	5' -TATGATCCTCGTTGTGGCT-3'	SEQ ID NO. 5
GJB2-M2\3-F2	5' -TTCGCATTATGATCCTCGTTGT-3'	SEQ ID NO. 6
GJB2-M2\3-R1	5' -ACACGAAGATCAGCTGC-3'	SEQ ID NO. 7
GJB2-M2\3-R2	5' -CATAGCCGGATGTGGGAG-3'	SEQ ID NO. 8
GJB2-M2-P1	FAM-5' -TCTGCAACACCCGCA-3' -MGB	SEQ ID NO. 42
GJB2-M2-P1'	HEX-5' -TCTGCAACACCCTGCA-3' -MGB	SEQ ID NO. 43
GJB2-M3-P1	FAM-5' -CAGCCAGCTACGATCA-3' -MGB	SEQ ID NO. 44
GJB2-M3-P1'	HEX-5' -CCAGGCTGCAAGAACGTGTGCT-3' -TAMRA	SEQ ID NO. 45
GJB2-M4-F1	5' -TGTGCTACGATCACTACTTCC-3'	SEQ ID NO. 9
GJB2-M4-F2	5' -AAGAACGTGTGCTACGATCA-3'	SEQ ID NO. 10
GJB2-M4-R1	5' -CCCCCTTGATGAACTCCTC-3'	SEQ ID NO. 11
GJB2-M4-R2	5' -CTTCTTCTCATGTCTCCGGT-3'	SEQ ID NO. 12
GJB2-M4-P1	FAM-5' -CGGCTATGGGCCTGCA-3' -MGB	SEQ ID NO. 46
GJB2-M4-P1'	HEX-5' -CGGCTATGGGCCTGCA-3' -MGB	SEQ ID NO. 47
GJB2-M4-P2	FAM-5' -ATCCGGCTATGGGCCTG-3' -MGB	SEQ ID NO. 48
GJB2-M4-P2'	HEX-5' -ATCCGGCTATGGGCCTG-3' -MGB	SEQ ID NO. 49

GJB2-M5-F1	5' -TGATCTTCGTGTCCACG-3'	SEQ ID NO. 13
[0155]		
GJB2-M5-F2	5' -CTGATCTTCGTGTCCACG-3'	SEQ ID NO. 14
GJB2-M5-R1	5' -GGAGCCTTCGATGCCG-3'	SEQ ID NO. 15
GJB2-M5-R2	5' -CTTCGATGCCGACCTTCTG-3'	SEQ ID NO. 16
GJB2-M5-P1	FAM-5' -TGGCCTACCGGAGACGAG-3' -MGB	SEQ ID NO. 50
GJB2-M5-P1'	HEX-5' -CCTACCGGAGACATGAG-3' -MGB	SEQ ID NO. 51
GJB2-M5-P2	FAM-5' -TGGCCTACCGGAGACGAG-3' -MGB	SEQ ID NO. 52
GJB2-M5-P2'	HEX-5' -CCTACCGGAGACATGAGA-3' -MGB	SEQ ID NO. 53
GJB3-M-F1	5' -TCTCTGGCATGGCTTCAATATG-3'	SEQ ID NO. 17
GJB3-M-F2	5' -CTCTCTGGCATGGCTTCAATATG-3'	SEQ ID NO. 18
GJB3-M-R1	5' -CACCATGAAGTAGGTGAAGATTTTCTT-3'	SEQ ID NO. 19
GJB3-M-R2	5' -CCACCATGAAGTAGGTGAAGATTTT-3'	SEQ ID NO. 20
GJB3-M-R3	5' -CCCACCATGAAGTAGGTGAAGAT-3'	SEQ ID NO. 21
GJB3-M-R4	5' -GGCGCCACCATGAAGTA-3'	SEQ ID NO. 22
GJB3-M-R5	5' -GAGGCGCCACCATGA-3'	SEQ ID NO. 23
GJB3-M1-P1	FAM-5' -GCCCCCTGCCCAACA-3' -MGB	SEQ ID NO. 54
GJB3-M1-P1'	HEX-5' -GTGGCCCCCTGCCCAACA-3' -MGB	SEQ ID NO. 55
GJB3-M2-P1	FAM-5' -CCCAACATCGTAGAC-3' -MGB	SEQ ID NO. 56
GJB3-M2-P1'	HEX-5' -CCCAACATCGTGGAC-3' -MGB	SEQ ID NO. 57
GJB3-M2-P2	FAM-5' -CCCAACATCGTAGACT-3' -MGB	SEQ ID NO. 58
GJB3-M2-P2'	HEX-5' -AACATCGTGGACTGCT-3' -MGB	SEQ ID NO. 59
SLC26A4-M1-F1	5' -AAAGTTCAGCATTATTTGGTTGACAA-3'	SEQ ID NO. 24
SLC26A4-M1-F2	5' -GAAAGTTCAGCATTATTTGGTTGACA-3'	SEQ ID NO. 25

SLC26A4-M1-R1	5' -AGGTTGGCTCCATATGAAATGG-3'	SEQ ID NO. 26
SLC26A4-M1-R2	5' -CCAGGTTGGCTCCATATGAAA-3'	SEQ ID NO. 27
SLC26A4-M1-R3	5' -TTTTTCCAGGTTGGCTCCATA-3'	SEQ ID NO. 28
SLC26A4-M1-R4	5' -TTTTTCCAGGTTGGCTCCAT-3'	SEQ ID NO. 29
SLC26A4-M1-P1	FAM-5' -ATCTTTTGTGTTTATTTTCGGACGA-3' -MGB	SEQ ID NO. 60
SLC26A4-M1-P2	FAM-5' -TCTTTTGTGTTTATTTTCGGACGA-3' -MGB	SEQ ID NO. 61
SLC26A4-M1-P3	FAM-5' -CTTTTGTGTTTATTTTCGGACGAT-3' -MGB	SEQ ID NO. 62
SLC26A4-M1-P'	HEX-5' -CATCTTTTGTGTTTATTTTCAGACG-3' -MGB	SEQ ID NO. 63
SLC26A4-M2-F1	5' -TGACGACAACATTAGAAAAGGACACA-3'	SEQ ID NO. 30
SLC26A4-M2-F2	5' -GGAGCAATGCGGGTCTTT-3'	SEQ ID NO. 31
SLC26A4-M2-F3	5' -TGGAGCAATGCGGGTCT-3'	SEQ ID NO. 32
SLC26A4-M2-R1	5' -TGAGATTTCACTTGGTTCTGTAGATAGAG-3'	SEQ ID NO. 33
SLC26A4-M2-R2	5' -TTGACCCTCTTGAGATTTCACTG-3'	SEQ ID NO. 34
SLC26A4-M2-R3	5' -CTTGACCCTCTTGAGATTTCACTG-3'	SEQ ID NO. 35
SLC26A4-M2-R4	5' -CCTTGACCCTCTTGAGATTTCACTT-3'	SEQ ID NO. 36
SLC26A4-M2-R5	5' -ATGGAACCTTGACCCTCTTGAGA-3'	SEQ ID NO. 37
SLC26A4-M2-P1	FAM-5' -CGGTCCGTGATGC-3' -MGB	SEQ ID NO. 64
SLC26A4-M2-P2	FAM-5' -TTGACGGTCCGTGATG-3' -MGB	SEQ ID NO. 65
SLC26A4-M2-P3	FAM-5' -TGACGGTCCGTGATG-3' -MGB	SEQ ID NO. 66
SLC26A4-M2-P4	FAM-5' -ACGGTCCGTGATGC-3' -MGB	SEQ ID NO. 67
SLC26A4-M2-P'	HEX-5' -TGACGGTCCATGATG-3' -MGB	SEQ ID NO. 68

[0156]

[0157] 表 2 :GJB2、GJB3 和 SLC26A4 的 9 种突变

[0158]

突变名称	突变	外显子 / 内含子	碱基变化

GJB2-M1	35delG	Exon-2	第 30-35 位碱基 G 的缺失
GJB2-M2	167delT	Exon-2	第 167 位碱基 T 的缺失
GJB2-M3	176_191del16	Exon-2	第 176-191 位 16 个碱基的缺失
GJB2-M4	235delC	Exon-2	第 233-235 位碱基 C 的缺失
GJB2-M5	299_300delAT	Exon-2	第 299-300 位碱基 AT 的缺失
GJB3-M1	R180X	Exon-2	第 538 碱基由 G 变成 T
GJB3-M2	E183K	Exon-2	第 547 碱基由 G 变成 A
SLC26A4-M1	—	Intron-7	IVS7-2A>G
SLC26A4-M2	H723R	Exon-19	第 2168 碱基由 A 变成 G

[0159] 本发明的有益效果是：

[0160] 使用本发明提供的用于人类耳聋多基因突变筛查的引物和探针序列检测人类耳聋多基因突变的多重实时荧光 PCR,可以在同一次 PCR 反应中检测多个样本,准确率高、步骤少,耗时少。

附图说明

[0161] 图 1 是本发明实施例 1 中 GJB2-M1 基因野生型扩增曲线图；

[0162] 图 2 是本发明实施例 1 中 GJB2-M1 基因纯合突变扩增曲线图；

[0163] 图 3 是本发明实施例 1 中 GJB2-M1 基因杂合突变扩增曲线图。

[0164] 图 4 是本发明实施例 2 中 GJB3-M1 基因野生型扩增曲线图；

[0165] 图 5 是本发明实施例 2 中 GJB3-M1 基因纯合突变扩增曲线图；

[0166] 图 6 是本发明实施例 2 中 GJB3-M1 基因杂合突变扩增曲线图。

[0167] 图 7 是本发明实施例 3 中 SLC26A4-M1 基因野生型扩增曲线图；

[0168] 图 8 是本发明实施例 3 中 SLC26A4-M1 基因纯合突变扩增曲线图；

[0169] 图 9 是本发明实施例 3 中 SLC26A4-M1 基因杂合突变扩增曲线图。

具体实施方式

[0170] 下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步说明：

[0171] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0172] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0173] 下述实施例中使用的全血样品均为非肝素抗凝全血;使用的 10×PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTPs、Taq 酶均购自中国大连宝生物公司。

[0174] 实施例 1：

[0175] 本实施例以 GJB2 基因检测为例来说明单管荧光 PCR 检测待检样品的方法。

[0176] 实验用样品为某聋哑人学校学员及家属共计 1200 例样本,其中聋哑人 400 例,家属 800 例。

[0177] 利用上述荧光 PCR 的方法来鉴定 1200 人中 GJB2 基因突变的方法如下:

[0178] (1) 样品的 DNA 提取:

[0179] 每人抽取 400 μ L 全血样品,采用 RBC 公司 MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit 试剂盒 (Cat. No. :MGB400-04),按试剂盒的操作说明提取 DNA。经紫外分光光度计检测提取的 DNA 质量后,将提取的 DNA 用 Tris-HCl 溶液 (10mmol/L, pH8.0) 调整到 10ng/ μ L 作为 PCR 扩增的模板;

[0180] (2) 荧光 PCR 扩增:

[0181] PCR 体系如下:

[0182]

10 \times PCR 缓冲液	5 μ L
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0 μ mol
Primer-R	0.1~1.0 μ mol
Probe-1	0.5~1.0 μ mol
Probe-2	0.5~1.0 μ mol
Probe-3	0.5~1.0 μ mol
Probe-4	0.5~1.0 μ mol
Taq 酶	2.0~3.0 U

[0183]

DNA	40~60ng
加水至	50 μ L

[0184] PCR 反应条件如下:

[0185] 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟;95 $^{\circ}$ C 变性 25 秒,64 $^{\circ}$ C 退火 20 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒,15 个循环;93 $^{\circ}$ C 变性 25 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 35 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒,31 个循环。

[0186] 当用上述 PCR 体系检测 GJB2-M1 突变时,上述 PCR 体系中的 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 3 或 SEQ ID NO. 4 所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 38 或 SEQ ID NO. 40 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 39 或 SEQ ID NO. 41 所示的 DNA 序列;无 Probe-3 和 Probe-4;

[0187] 当用上述 PCR 体系检测 GJB2-M2 或 GJB2-M3 突变时,上述 PCR 体系中的 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 6 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 7 或 SEQ ID NO. 8 所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 42 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 43 所示的 DNA 序列;Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO. 44 所

示的 DNA 序列 ;Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO. 45 所示的 DNA 序列 ;

[0188] 当用上述 PCR 体系检测 GJB2-M4 突变时,上述 PCR 体系中的 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 9 或 SEQ ID NO. 10 所示的 DNA 序列 ;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 11 或 SEQ ID NO. 12 所示的 DNA 序列 ;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 46 或 SEQ ID NO. 48 所示的 DNA 序列 ;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 47 或 SEQ ID NO. 49 所示的 DNA 序列 ;无 Probe-3 和 Probe-4 ;

[0189] 当用上述 PCR 体系检测 GJB2-M5 突变时,上述 PCR 体系中的 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 13 或 SEQ ID NO. 14 所示的 DNA 序列 ;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 15 或 SEQ ID NO. 16 所示的 DNA 序列 ;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 50 或 SEQ ID NO. 52 所示的 DNA 序列 ;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 51 或 SEQ ID NO. 53 所示的 DNA 序列 ;无 Probe-3 和 Probe-4 ;

[0190] (3) 检测 :

[0191] 采用 Mx3000P 实时 PCR 扩增仪 (StrataGene 公司) 于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号,得到 GJB2 基因扩增曲线。一次可检测 96 份样品。

[0192] (4) 结果判定 :

[0193] 根据步骤 3 得到的 GJB2 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线,判断样品提供者的 GJB2 基因突变情况 :

[0194] 如果样品孔只有 FAM 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为纯合突变 ;

[0195] 如果样品孔只有 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为野生型 ;

[0196] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号,表明样品提供者的 GJB2 基因为杂合突变。

[0197] 结果显示,前述样本中,400 例聋哑人中共计检出 GJB2 基因突变 85 例,其中 78 例为 GJB2-M4 (即 235de1C)突变 ;7 例为 GJB2-M5 (即 299_300de1AT 突变);800 例家属中共检出 GJB2 基因突变 118 例,其中 2 例为 GJB2-M1(即 35de1G)突变,1 例为 GJB2-M2 或 GJB2-M3 (即 167de1T 或 176_191de116)突变,109 例为 GJB2-M4 (即 235de1C)突变,10 例为 GJB2-M5 (即 299_300de1AT)突变。

[0198] 同时采用测序法将上述所有 DNA 样品送上海生工进行测序验证。经测序得到的结果和使用本发明提供的方法得到的结果对比如表 4 所示 :

[0199] 表 4

[0200]

基因型	本发明提供的方法			测序验证法		
	男	女	检出率	男	女	检出率
野生型	522	473	82.92%	522	473	82.9%
杂合突变	59	45	8.67	59	45	8.67
纯合突变	60	41	8.42%	60	41	8.42%
复合突变	0	0	0%	0	0	0%

[0201] 由表 4 可知,使用本实施例提供的方法与使用测序方法得到的结果完全一致,说明本实施例提供的方法准确率很高 ;但是,与测序相比,本方法单个 PCR 反应即可判断检体

为野生型、纯合突变和杂合突变,检测时间仅需 100 分钟,步骤少,耗时少,可满足产前诊断的快速筛查。

[0202] 实施例 2:

[0203] 本实施例以 GJB3 基因检测为例来说明单管荧光 PCR 检测待检样品的方法。

[0204] 实验用样品为某聋哑人学校学员及家属共计 1200 例样本,其中聋哑人 400 例,家属 800 例。

[0205] 利用上述荧光 PCR 的方法来鉴定 1200 人中 GJB3 基因突变的方法如下:

[0206] (1) 样品的 DNA 提取:

[0207] 每人抽取 400 μ L 全血样品,采用 RBC 公司 MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit 试剂盒(Cat. No. :MGB400-04),按试剂盒的操作说明提取 DNA。经紫外分光光度计检测提取的 DNA 质量后,将提取的 DNA 用 Tris-HCl 溶液(10mmol/L, pH8.0)调整到 10ng/ μ L 作为 PCR 扩增的模板;

[0208] (2) 荧光 PCR 扩增:

[0209] PCR 体系如下:

[0210]

10 \times PCR 缓冲液	5 μ L
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol

[0211]

Primer-F	0.1~1.0 μ mol
Primer-R	0.1~1.0 μ mol
Probe-1	0.5~1.0 μ mol
Probe-2	0.5~1.0 μ mol
Probe-3	0.5~1.0 μ mol
Probe-4	0.5~1.0 μ mol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50 μ L

[0212] PCR 反应条件如下:

[0213] 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟;95 $^{\circ}$ C 变性 25 秒,64 $^{\circ}$ C 退火 20 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒,15 个循环;93 $^{\circ}$ C 变性 25 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 35 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 秒,31 个循环。

[0214] 当用上述 PCR 体系检测 GJB3-M1 或 GJB3-M2 突变时,上述 PCR 体系中的 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 17 或 SEQ ID NO. 18 所示的 DNA 序列;Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 21、SEQ ID NO. 22 和 SEQ ID NO. 23 中的任一个所示的 DNA 序列;Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 54 所示的 DNA 序列;Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 55 所示的 DNA 序列;Probe-3 为序列表中 SEQ ID NO. 56 或 SEQ ID NO. 58 所示的 DNA 序列;Probe-4 为序列表中 SEQ ID NO. 57 或 SEQ ID NO. 59 所示的 DNA 序列;

[0215] (3) 检测：

[0216] 采用 Mx3000P 实时 PCR 扩增仪 (StrataGene 公司) 于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号, 得到 GJB3 基因扩增曲线。一次可检测 96 份样品。

[0217] (4) 结果判定：

[0218] 根据步骤 3 得到的 GJB3 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线, 判断样品提供者的 GJB3 基因突变情况：

[0219] 如果样品孔只有 FAM 信号, 表明样品提供者的 GJB3 基因为纯合突变；

[0220] 如果样品孔只有 HEX 信号, 表明样品提供者的 GJB3 基因为野生型；

[0221] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号, 表明样品提供者的 GJB3 基因为杂合突变。

[0222] 结果显示, 前述样本中, 400 例聋哑人中共检出 GJB3 基因突变 10 例, 其中 6 例为 GJB3-M2 (即 547G>A) 突变; 4 例为 GJB3-M1 (即 538C>T) 突变; 800 例家属中共检出 GJB3 基因突变 17 例, 其中 10 例为 GJB3-M2 (即 547G>A) 突变, 7 例为 GJB3-M1 (即 538C>T) 突变。

[0223] 同时采用测序法将上述所有 DNA 样品送上海生工进行测序验证。经测序得到的结果和使用本发明提供的方法得到的结果对比如表 5 所示：

[0224] 表 5

[0225]

基因型	本发明提供的方法			测序验证法		
	男	女	检出率	男	女	检出率
野生型	586	587	97.75%	586	587	97.75%
杂合突变	7	9	1.33%	7	9	1.33%
纯合突变	5	6	0.92%	5	6	0.92%
复合突变	0	0	0%	0	0	0%

[0226] 由表 5 可知, 使用本实施例提供的方法与使用测序方法得到的结果完全一致, 说明本实施例提供的方法准确率很高; 但是, 与测序验证法相比, 本方法单个 PCR 反应即可判断检体为野生型、纯合突变和杂合突变, 检测时间仅需 100 分钟, 步骤少, 耗时少, 可满足产前诊断的快速筛查。

[0227] 实施例 3：

[0228] 本实施例以 SLC26A4 基因检测为例来说明单管荧光 PCR 检测待检样品的方法。

[0229] 实验用样品为某聋哑人学校学员及家属共计 1200 例样本, 其中聋哑人 400 例, 家属 800 例。

[0230] 利用上述荧光 PCR 的方法来鉴定 1200 人中 SLC26A4 基因突变的方法如下：

[0231] (1) 样品的 DNA 提取：

[0232] 每人抽取 400 μ L 全血样品, 采用 RBC 公司 MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit 试剂盒 (Cat. No. :MGB400-04), 按试剂盒的操作说明提取 DNA。经紫外分光光度计检测提取的 DNA 量后, 将提取的 DNA 用 Tris-HCl 溶液 (10mmol/L, pH8.0) 调整到 10ng/ μ L 作为 PCR 扩增模板；

[0233] (2) 荧光 PCR 扩增：

[0234] PCR 体系如下：

[0235]

10×PCR 缓冲液	5μL
MgCl ₂	5.0~10.0mmol
dNTPs	0.8~1.5mmol
Primer-F	0.1~1.0μmol
Primer-R	0.1~1.0μmol
Probe-1	0.5~1.0μmol
Probe-2	0.5~1.0μmol
Taq 酶	2.0~3.0 U
DNA	40~60ng
加水至	50μL

[0236] PCR 反应条件如下：

[0237] 95℃预变性 5 分钟；95℃变性 25 秒，64℃退火 20 秒，72℃延伸 20 秒，15 个循环；93℃变性 25 秒，60℃退火 35 秒，72℃延伸 20 秒，31 个循环。

[0238] 当用上述 PCR 体系检测 SLC26A4-M1 突变时，上述 PCR 体系中的 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 24 或 SEQ ID NO. 25 所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 27、SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 29 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 60、SEQ ID NO. 61 和 SEQ ID NO. 62 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 63 所示的 DNA 序列；

[0239] 当用上述 PCR 体系检测 SLC26A4-M2 突变时，上述 PCR 体系中的 Primer-F 为序列表中 SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 31 和 SEQ ID NO. 32 中的任一个所示的 DNA 序列；Primer-R 为序列表中 SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 36 和 SEQ ID NO. 37 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-1 为序列表中 SEQ ID NO. 64、SEQ ID NO. 65、SEQ ID NO. 66 和 SEQ ID NO. 67 中的任一个所示的 DNA 序列；Probe-2 为序列表中 SEQ ID NO. 68 所示的 DNA 序列；

[0240] (3) 检测：

[0241] 采用 Mx3000P 实时 PCR 扩增仪 (StrataGene 公司) 于每个循环步骤的退火阶段检测 FAM 和 HEX 荧光信号，得到 SLC26A4 基因扩增曲线。一次可检测 96 份样品。

[0242] (4) 结果判定：

[0243] 根据步骤 3 得到的 SLC26A4 基因的 FAM 信号和 HEX 信号扩增曲线，判断样品提供者的 SLC26A4 基因突变情况：

[0244] 如果样品孔只有 FAM 信号，表明样品提供者的 SLC26A4 基因为纯合突变；

[0245] 如果样品孔只有 HEX 信号，表明样品提供者的 SLC26A4 基因为野生型；

[0246] 如果样品孔同时有 FAM 信号和 HEX 信号，表明样品提供者的 SLC26A4 基因为杂合突变。

[0247] 结果显示,前述样本中,400 例聋哑人中共计检出 SLC26A4 基因突变 56 例,其中 41 例为 SLC26A4-M2 (即 IVS7-2A>G) 突变;15 例为 SLC26A4-M1 (即 2168A>G) 突变;800 例家属中共检出 SLC26A4 基因突变 103 例,其中 72 例为 SLC26A4-M2(即 IVS7-2A>G)突变,31 例为 SLC26A4-M1 (即 2168A>G) 突变。

[0248] 同时采用测序法将上述所有 DNA 样品送上海生工进行测序验证。经测序得到的结果和使用本发明提供的方法得到的结果对比如表 6 所示:

[0249] 表 6

[0250]

基因型	本发明提供的方法			测序验证法		
	男	女	检出率	男	女	检出率

[0251]

野生型	541	500	86.75%	541	500	86.75%
杂合突变	39	44	6.92%	39	44	6.92%
纯合突变	41	35	6.33%	41	35	6.33%
复合突变	0	0	0%	0	0	0%

[0252] 由表 6 可知,使用本实施例提供的方法与使用测序方法得到的结果完全一致,说明本实施例提供的方法准确率很高;但是,与测序验证法相比,本方法单个 PCR 反应即可判断检体为野生型、纯合突变和杂合突变,检测时间仅需 100 分钟,步骤少,耗时少,可满足产前诊断的快速筛查。

[0001]

<110>芮宝生物医药科技（厦门）有限公司

<120>用于人类耳聋多基因突变筛查的引物、探针及其使用方法

<160> 68

<210> 1

<211>21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

tagtgattcc tgtgttgtgt g

21

<210> 2

<211>22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

tctgtcctag ctagtgattc ct

22

<210> 3

<211>18

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

agaggacggt gagccaga

18

<210> 4

<211>17

<212> DNA

<213>人工序列

[0002]

<220>

<400> 1

aagaggacgg tgagcca

17

<210> 5

<211>19

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

tatgatcctc gttgtgget

19

<210> 6

<211>22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

ttcgcattat gatcctcggt gt

22

<210>7

<211>17

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

acacgaagat cagctgc

17

<210> 8

<211>18

<212> DNA

<213>人工序列

[0003]

<220>

<400> 1

catagccgga tgtgggag

18

<210>9

<211>21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

tgtgctacga tcaactacttc c

21

<210> 10

<211>20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

aagaacgtgt gctacgatca

20

<210> 11

<211>20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

cccccttgat gaacttcctc

20

<210> 12

<211>20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

[0004]

<400> 1	
cttctttctca tgtctccggt	20
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
tgatcttcgt gtcacgc	18
<210> 14	
<211> 18	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
ctgatcttcg tgtccacg	18
<210> 15	
<211> 16	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
ggagccttcg atgcgg	16
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cttcgatgcg gaccttcg	19

[0005]

- <210> 17
<211>22
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<400> 1
tctctggcat ggcttcaata tg 22
- <210> 18
<211>23
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<400> 1
ctctctggca tggcttcaat atg 23
- <210> 19
<211>27
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<400> 1
caccatgaag taggtgaaga ttttett 27
- <210> 20
<211>25
<212> DNA
<213>人工序列
<220>
<400> 1
ccaccatgaa gtaggtgaag atttt 25
- <210> 21

[0006]

<211>23	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cccaccatga agtaggtgaa gat	23
<210> 22	
<211>18	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
ggcgcccacc atgaagta	18
<210> 23	
<211>16	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
gagcgcccac ceatga	16
<210> 24	
<211>26	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
aaagttcagc attatttggg tgacaa	26
<210> 25	
<211>26	
<212> DNA	

[0007]

<213>人工序列

<220>

<400> 1

gaaagttcag cattatattgg ttgaca

26

<210> 26

<211>22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

aggttggctc catatgaaat gg

22

<210> 27

<211>21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

ccaggttggc tccatattgaa a

21

<210> 28

<211>22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

ttttttccag gttggtccca ta

22

<210> 29

<211>20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

[0008]

<400> 1	
tttttccagg ttggtccat	20
<210> 30	
<211>25	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
tgacgacaac attagaaagg acaca	25
<210> 31	
<211>19	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
ggagcaatgc gggttcttt	19
<210> 32	
<211>18	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
tgagcaatg cgggttct	18
<210> 33	
<211>29	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
tgagatttca cttggttctg tagatagag	29

[0009]

<210> 34	
<211>24	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
ttgaccctct tgagatttca cttg	24
<210> 35	
<211>25	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cttgaccctc ttgagatttc acttg	25
<210> 36	
<211>25	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
ccttgaccct cttgagattt cactt	25
<210> 37	
<211>23	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
atggaacctt gacctcttg aga	23
<210> 38	

[0010]

<211>16
 <212> DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <400> 1
 acgatacctgg ggggtgt 16

<210> 39
 <211>17
 <212> DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <400> 1
 cgatacctggg ggtgtga 17

<210> 40
 <211>16
 <212> DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <400> 1
 cgatacctggg ggggtgt 16

<210> 41
 <211>16
 <212> DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <400> 1
 atcctggggg gtgtga 16

<210> 42
 <211>15
 <212> DNA

[0011]

<213>人工序列

<220>

<400> 1

tetgcaaacac cgcga

15

<210> 43

<211>16

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

tetgcaaacac cctgca

16

<210> 44

<211>16

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

cagccagcta cgatca

16

<210> 45

<211>22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

ccaggetgca agaacgtgtg ct

22

<210> 46

<211>16

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

[0012]

<400> 1	
cggetatggg cctgca	16
<210> 47	
<211>17	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cggetatggg cctgca	17
<210> 48	
<211>17	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
atccggetat ggcctg	17
<210> 49	
<211>18	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
atccggetat ggcctg	18
<210> 50	
<211>18	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
tggectaccg gagaagag	18

[0013]

<210> 51	
<211>17	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cctaccggag acatgag	17
<210> 52	
<211>18	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
tggcctaccg gagaagag	18
<210> 53	
<211>18	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cctaccggag acatgaga	18
<210> 54	
<211>16	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
gccccctgcc ccaaca	16
<210> 55	

[0014]

<211>19	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
gtggccccct gccctaaca	19
<210> 56	
<211>15	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cccaacatcg tagac	15
<210> 57	
<211>16	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
ccccacatc gtggac	16
<210> 58	
<211>16	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cccaacatcg tagact	16
<210> 59	
<211>16	
<212> DNA	

[0015]

<213>人工序列

<220>

<400> 1

aacatcgtgg actgct

16

<210> 60

<211>23

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

atcttttggt ttatttcgga cga

23

<210> 61

<211>22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

tcttttggtt tatttcggac ga

22

<210> 62

<211>22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400> 1

cttttggttt atttcggacg at

22

<210> 63

<211>23

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

[0016]

<400> 1	
catcttttgt tttatttcag acg	23
<210> 64	
<211>13	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
cggtccgtga tgc	13
<210> 65	
<211>16	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
ttgacgggcc gtgatg	16
<210> 66	
<211>15	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
tgaacggccg tgatg	15
<210> 67	
<211>14	
<212> DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<400> 1	
acggtccgtg atgc	14

[0017]

<210> 68

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<400> 1

tgacgggtcca tgatg

15

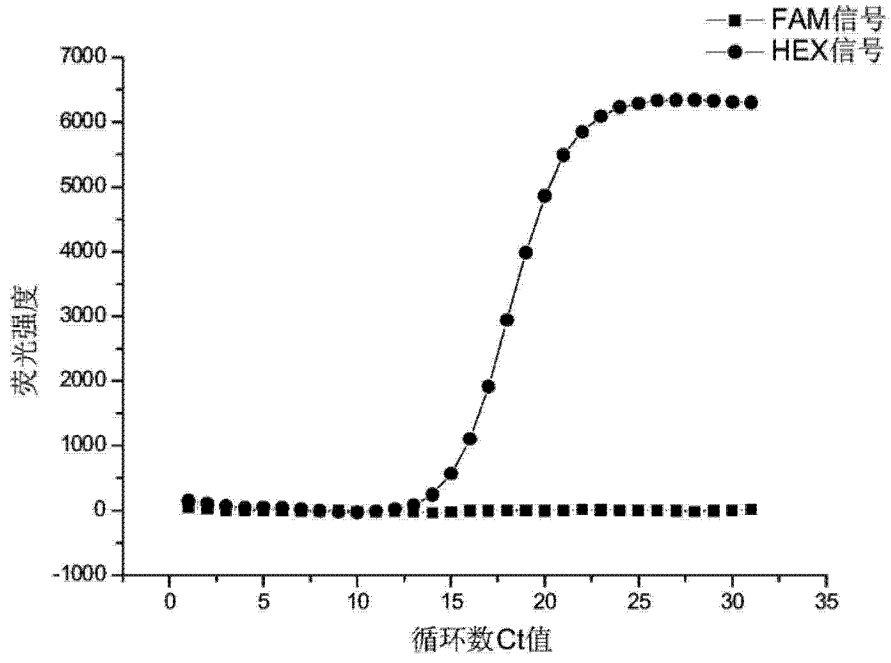


图 1

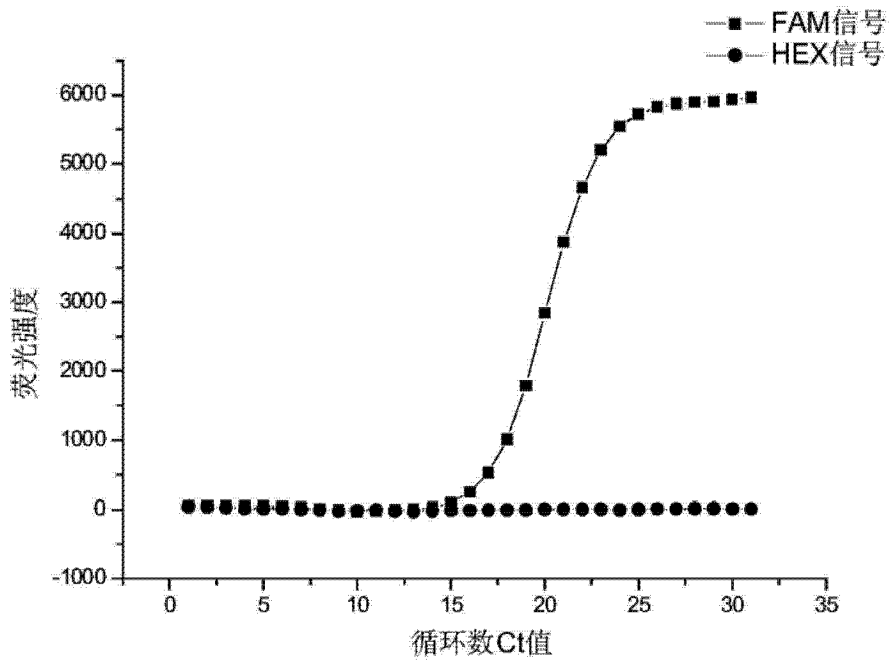


图 2

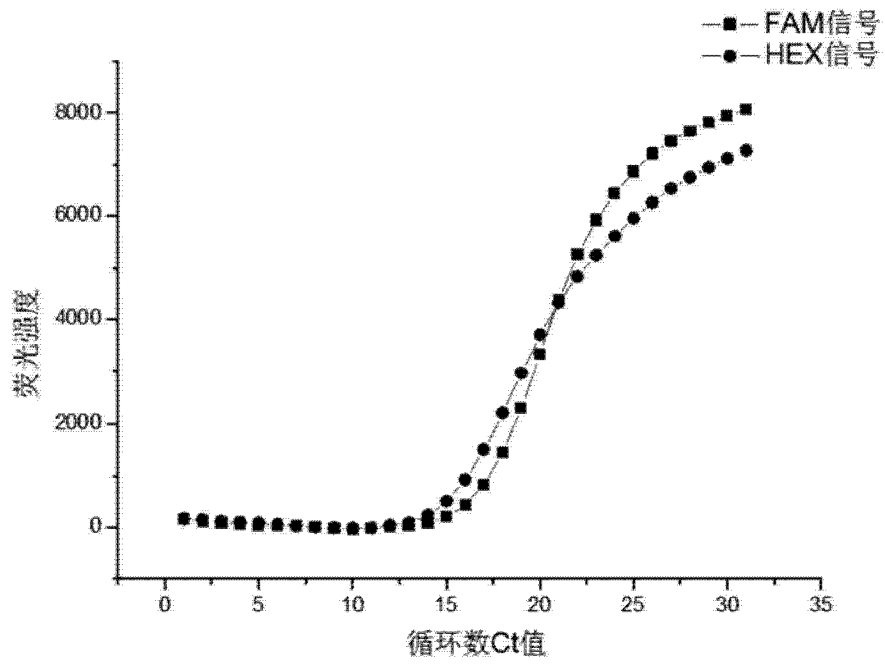


图 3

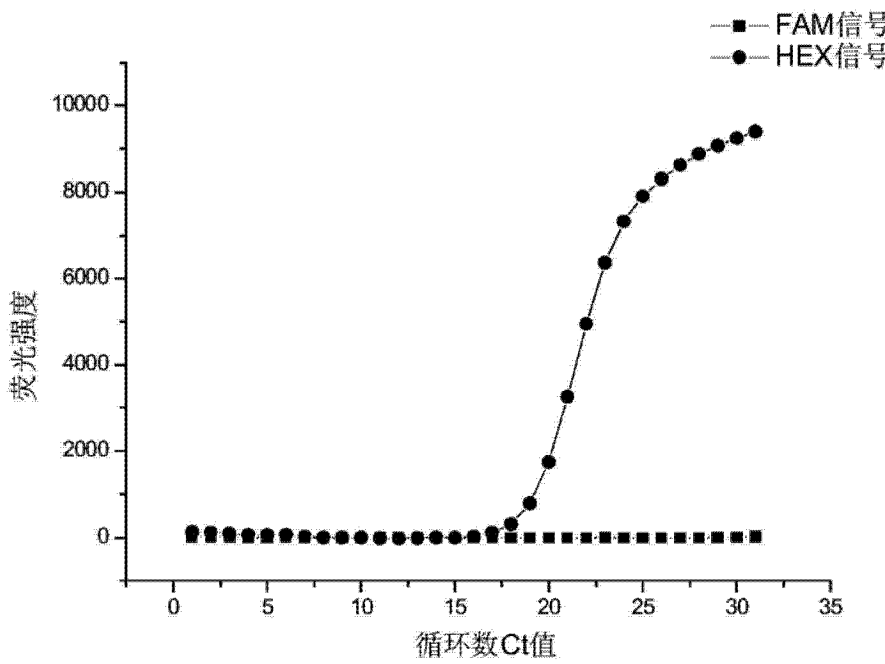


图 4

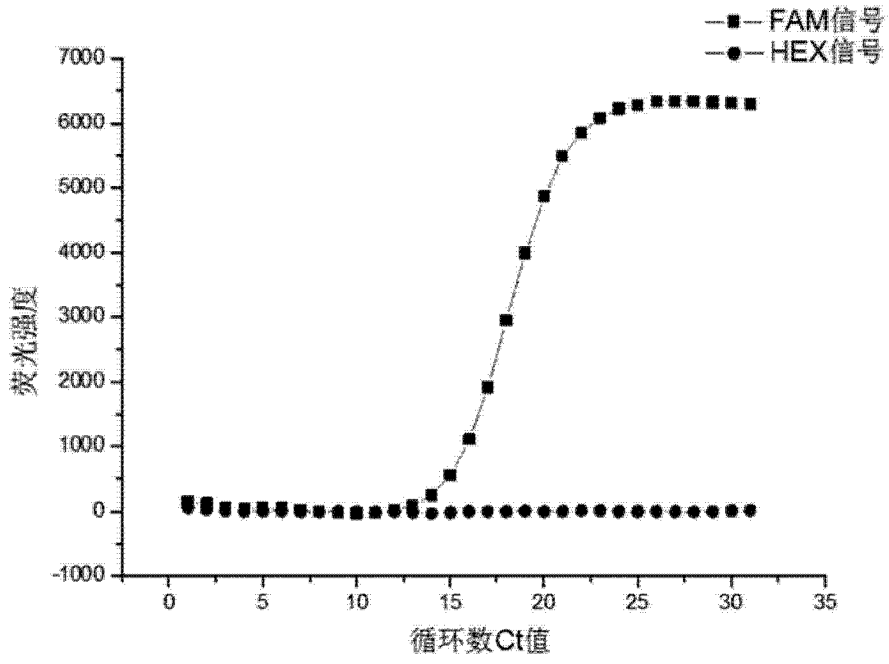


图 5

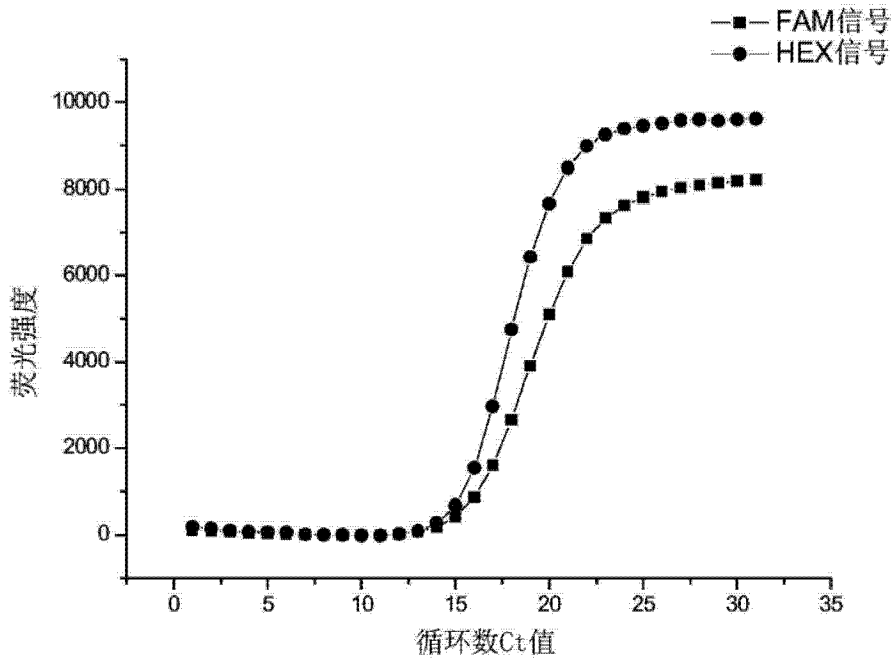


图 6

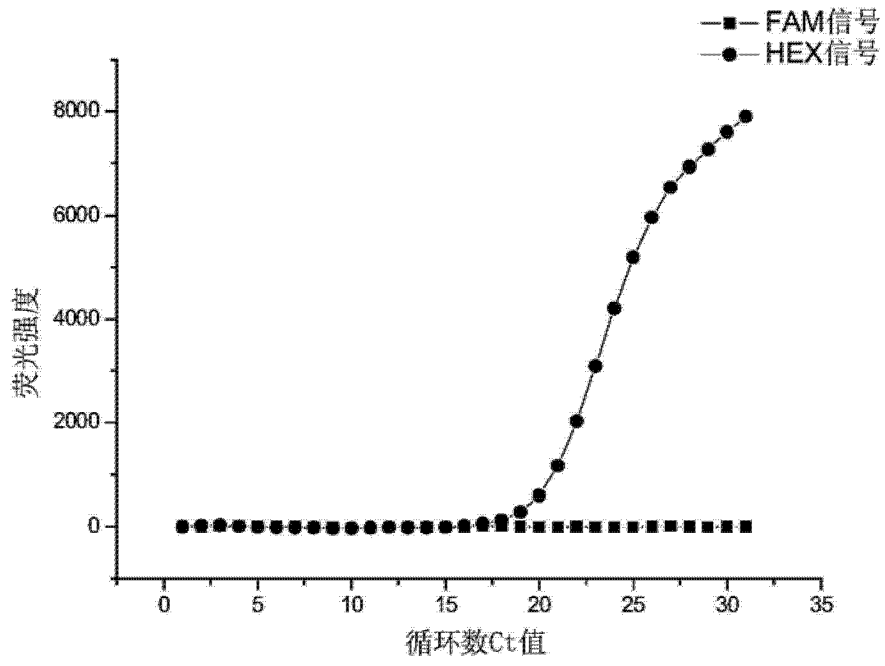


图 7

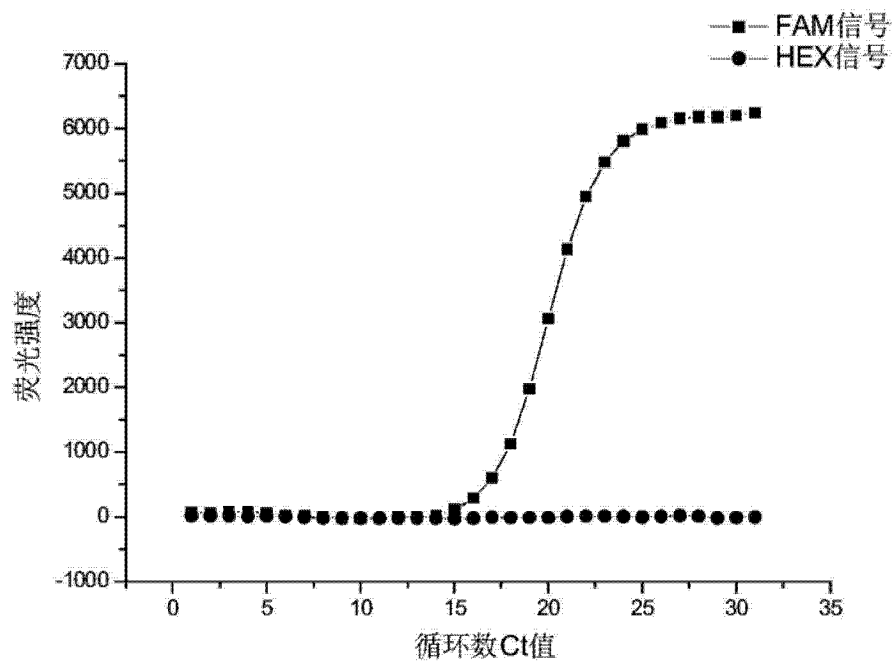


图 8

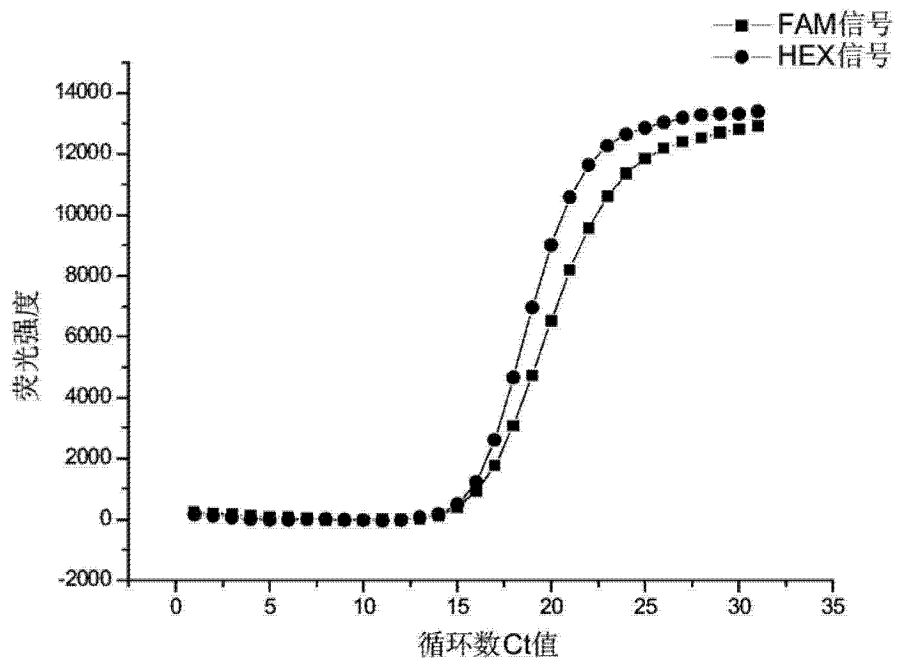


图 9