

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510049666.7

[51] Int. Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年2月4日

[11] 授权公告号 CN 100458419C

[22] 申请日 2005.4.26

[21] 申请号 200510049666.7

[73] 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38号

共同专利权人 杭州博康生物科技有限公司

[72] 发明人 王剑勇 李毓敏 王竞 薛忆
邵俊斌

[56] 参考文献

CN1143117 A 1997.2.19

US5670302 A 1997.9.23

CN1238456 A 1999.12.15

WO0134839 A1 2001.5.17

US5185244 A 1993.2.9

审查员 刘婷婷

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 唐银益

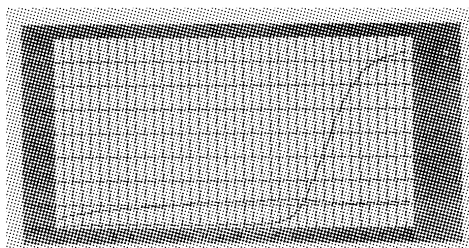
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

[54] 发明名称

以分子探针技术检测线粒体 DNA11778 点突变的试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种基因检测用的试剂盒，旨在提供一种基于分子荧光探针技术 PCR 检测线粒体 DNA11778 点突变的试剂盒。本发明首先判定标本中是否存在线粒体 DNA11778 点突变，然后在线粒体基因组保守区设计引物，在线粒体 11778 位点设计与靶序列互补的分子探针，再进行 PCR 扩增过程。本发明具有、定量功能，未知样品可以根据 Ct 值换算成样品含量，准确性好、有效防污染、操作简单、耗时短、结果判断直观明确。



1、一种以分子探针技术检测线粒体DNA11778点突变的试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括：

反应总体积的一半的 $2\times$ Taqman PCR buffer；
各 $200\ \mu\text{mol/L}$ 的dATP、dTTP、dGTP、dCTP；
各 $0.1\ \mu\text{mol/L}\sim 2\ \mu\text{mol/L}$ 的两条引物MT-1、MT-2；
各 $0.1\ \mu\text{mol/L}\sim 5\ \mu\text{mol/L}$ 的两条探针MT-3、MT-4；
 $1.5\ \text{mmol/L}\sim 2.5\ \text{mmol/L}$ 的氯化镁或硫酸镁；
余量为蒸馏水；

所述两条引物MT-1、MT-2为PCR扩增过程中使用的PCR引物，在线粒体基因组保守区设计引物序列分别为：

MT-1：5'-CATCCTCATTACTATTCTGCCTAGCA-3'；

MT-2：5'-GGAGTAGAGTTTGAAGTCCTTGAGAGA-3'；

所述两条探针MT-3、MT-4为在线粒体11778位点设计与靶序列互补的分子探针，5'端分别用FAM和VIC标记，另一端用MGBNFQ标记，其序列为：

MT-3：5'-FAM-CACTCACAGTCACATCA-MGBNFQ；

MT-4：5'-VIC-AGGATTATGATGCGACTGT-MGBNFQ。

以分子探针技术检测线粒体 DNA11778 点突变的试剂盒

技术领域

本发明涉及一种基因检测用的试剂盒，更具体地说，本发明涉及一种基于分子荧光探针技术 PCR 检测线粒体 DNA11778 点突变的试剂盒。

背景技术

Leber's 病，即 Leber's 遗传性视神经病变 (LHON)，是一种主要累及视网膜、巩膜筛板前部视乳头黄斑束纤维，导致视神经退行性变的遗传性疾病。该病的传递方式不符合孟德尔遗传，至今遗传方式及发病机理还一直有争论。临床上多为青壮年发病，双眼同时或先后表现为急性或亚急性的视功能严重损害，目前尚无特效治疗，由此所引起的不及时进行明确诊断或开展不恰当治疗将给社会、家庭和患者带来诸多的不良后果。临床上开展 LHON 明确的分子遗传学诊断处理不仅能避免昂贵的、重复的、损伤性检查，节省了资源，给社会和个人减少了不必要的浪费，也能避免给患者不必要的可能有害的治疗；而且有助于易感人群及个体的确定，对有目的地进行预防和早诊早治起重要作用，在分子水平进行产前基因诊断，也给女性携带者的高危妊娠进行选择流产提供客观依据，从而为优生优育，开展遗传咨询，对该病的产前诊断提供新的方法和指导。

自从 Wallace 等在 1988 年首先发现该病是由线粒体 DNA (mtDNA) 突变造成以来，其主要发现有 mtNd4*LHON11778A、mtND1*LHON3460A、mtND6*LHON14484C 这三个原发突变位点。我国及同属蒙古人种的日本等人群中 mtND4*LHON11778A 尤其高发，有报道约占 90% 左右。临床上在散发的不明原因的视神经病变病人中，经分子遗传学诊断为 LHON 患者比例在美国、欧洲、日本分别为 50~80%、50%、40%，我国也有相当一部分（有报道近 40%）实际是 LHON 病人。mtDNA，作为唯一的胞质遗传物质，当今许多学者对其在一些疾病发病机理中的作用已进行了长期的探索，现在对不明原因视神经病变患者行 mtDNA 主要原发点突变的检测以确诊为 Leber's 病这一点上已达成共识。但目前通用 MSP（等位

基因特异性 PCR) 检测 11778 突变位点稳定性及准确性欠佳, 酶切、SSCP 及直接测序等方法耗时花费高, 不适宜于临床推广, 如何在临床中准确简便检测视神经病变的 mtDNA 突变仍然是国内外需重点解决的问题之一。同时, 对线粒体 DNA 突变比例和发病之间的相互关系, 是否存在突变阈值和同(异)质性与疾病的发生问题在方法学上也一直是个不能很好解决的问题。一方面人体各组织间可能存在有线粒体 DNA 突变比例的差异, 个体眼视神经组织的取材也不可能, 所以对外周血样的准确检测也就显得非常重要。目前由于用来定量的方法均是通过 PCR 产物电泳灰度扫描来实现半定量, 所以相对精确性差。

近年来迅速发展起来的荧光 PCR 技术是在对 PCR 产物的检测原理做了很大的改进, 荧光 PCR 技术不同于其它 PCR 之处在于利用荧光染料在激发光的作用下所释放的荧光光能的变化来动态直接反映出 PCR 扩增产物量的变化。因荧光信号变量与扩增产物量成正比, 通过足够灵敏的自动化仪器对荧光的采集与分析来实现对初始模板的定量, 同时可动态实时监测核酸产物的形成, 无须后处理过程, 这样在一定程度上避免了扩增产物的污染, 既缩短了检测时间, 又节省了特殊仪器及专业人员的配备。Applied Biosystems 公司推出最新 TaqMan MGB 荧光探针合成技术, 使 SNP (single nucleotide polymorphism) 筛选检测有了更好的方法。TaqMan MGB 荧光探针与常规 TaqMan 荧光探针相比, 有两个主要的不同: 一是探针 3' 端标记了自身不发光的淬灭荧光分子, 以取代常规可发光的 Tamra 荧光标记。这一新技术使荧光本底降低, 荧光光谱分辨得以大大改善, 尤其是 SNP 分析时不同报告荧光光谱之间的分辨得以大大改善。二是探针 3' 端另结合了 Minor groove binder 结合物, 使得探针的 T_m 值提高, 大大增加了探针的杂交稳定性。因此用 TaqMan MGB 荧光探针检测 SNP, 其探针长度一般在 13 至 18 个碱基范围, 而常规 TaqMan 探针在 AT 碱基含量较多时其探针长度将达 30-40 个碱基, 探针长度越长, 则其 SNP 识别率越低。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中的不足, 提供一种基于分子荧光探针 PCR 线粒体 DNA11778 点突变的检测方法。

本发明的另一目的在于提供一种用于分子荧光探针 PCR 线粒体 DNA11778 点突变检测方法的试剂盒。

为了解决上述技术问题，本发明是通过以下技术方案实现的：

本发明提供了一种线粒体 DNA11778 点突变检测方法，包括下述步骤：

(1) 细胞基因组 DNA 的提取，包括外周血单个核细胞分离和 DNA 提取；

(2) 在分子探针的存在下，对提取的细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增；

(3) 测定 PCR 反应体系的荧光强度，判定标本中是否存在线粒体 DNA11778 点突变；

所述 PCR 扩增使用了 PCR 引物，在线粒体基因组保守区设计引物序列为：

MT-1: 5' - CATCCTCATTACTATTCTGCCTAGCA - 3' ；

MT-2: 5' - GGAGTAGAGTTTGAAGTCCTTGAGAGA - 3' ；

所述分子探针：在线粒体 11778 位点设计与靶序列互补的分子探针，5' 端用 FAM 标记，另一端用 MGBNFQ 标记，其序列为：

MT-3: 5' -FAM-CACTCACAGTCACATCA- MGBNFQ；

MT-4: 5' -VIC-AGGATTATGATGCGACTGT- MGBNFQ。

本发明所述 PCR 扩增的条件为：

95℃ 120 秒 → 93℃ 10 秒 → 60℃ 40 秒，

其中：93℃ 10 秒 → 60℃ 40 秒之间进行 40 次循环。

本发明所述测定 PCR 反应体系的荧光强度时，荧光采集通道选择 FAM 和 VIC 双通道。

本发明还提供了一种用于分子灯标 (MGB) 荧光探针 PCR 线粒体 DNA11778 点突变检测方法的试剂盒，该试剂盒包括：

反应总体积的一半的 2×Taqman PCR buffer；

各 200 μ Mol/L 的 dATP 、 dTTP、 dGTP、 dCTP；

各 0.1 μ Mol/L~2 μ Mol/L 的两条引物 MT-1、 MT-2；

各 0.1 μ Mol/L~5 μ Mol/L 的两条探针 MT-3、 MT-4；

1.5 mMol/L~2.5 mMol/L 的氯化镁或硫酸镁；

余量为蒸馏水。

与现有技术相比，本发明的有益效果是：

1、定量功能：在 PCR 扩增过程中，探针被 Taq 酶（具有 5' 外切酶活性）降解，荧光基团远离淬灭基团，反应体系中荧光报告基团所产生的荧光强度随着 PCR 反应进行，逐渐增强，通过荧光定量 PCR 仪检测到荧光信号。检测所得的循环数阈值（Cycle threshold, Ct 值）与反应初始模板量对数值呈线形负相关。反应过程中引入标准参控品，可以建立 Ct 值与样品浓度的标准曲线。未知样品可以根据 Ct 值换算成样品含量。

2、准确性好：与核酸序列测定分型比较，两者结果吻合率 100%。

3、有效防污染：PCR 反应和分析在完全闭管条件下进行，有效防范 PCR 产物污染，提高检测结果的可靠性。

4、操作简单、耗时短、结果判断直观明确。在荧光 PCR 检测仪上进行扩增和分析，不需进行电泳、核酸纯化、紫外灯观测、测序反应等步骤。只需 0.5~1.2 小时即可完成 PCR 过程，有利于提高报告速度。只需根据双通道荧光增长曲线或 Ct 值即可直接判断变异类型。

附图说明

图 1 为 LHONmtDNA 野生型试验图谱；

图 2 为 LHONmtDNA 变异型试验图谱；

图 3 为 LHONmtDNA 变异株和野生株混合型试验图谱；

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步详细地阐述本发明。

具体实施例 1：

配制本发明所述试剂盒的原料选用如下：。

PCR 引物，由 Biosearch. INC 公司合成，引物序列为：

MT-1: 5' - CATCCTCATTACTATTCTGCCTAGCA - 3' ；

MT-2: 5' - GGAGTAGAGTTTGAAGTCCTTGAGAGA - 3' ；

分子探针：在细胞基因组保守区设计与靶序列互补的分子灯标（MGB）探针，5' 端用 FAM 标记，另一端用 MGBNFQ（Minor groove binder/Non-fluorescent quencher）标记，其序列为：

MT-3: 5' -FAM-CACTCACAGTCACATCA- MGBNFQ；

MT-4: 5' -VIC-AGGATTATGATGCCACTGT- MGBNFQ。

dNTPs(dATP, dTTP, dnP, dGTP): 购自 Applied Biosystems 公司, 浓度:
200 μ Mol/L。

具体实施例 1 中试剂盒成分如下:

反应总体积的一半的 2 \times Taqman PCR buffer;
各 200 μ Mol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP;
各 0.1 μ Mol/L 的两条引物 MT-1、MT-2;
各 0.1 μ Mol/L 的两条探针 MT-3、MT-4;
1.5 mMol/L 的氯化镁;
余量为蒸馏水。

具体实施例 2:

试剂盒成分如下:

反应总体积的一半的 2 \times Taqman PCR buffer;
各 200 μ Mol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP;
各 2 μ Mol/L 的两条引物 MT-1、MT-2;
各 5 μ Mol/L 的两条探针 MT-3、MT-4;
2.5 mMol/L 的氯化镁;
余量为蒸馏水。

具体实施例 3:

试剂盒成分如下:

反应总体积的一半的 2 \times Taqman PCR buffer;
各 200 μ Mol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP;
各 1 μ Mol/L 的两条引物 MT-1、MT-2;
各 2.5 μ Mol/L 的两条探针 MT-3、MT-4;
2 mMol/L 的氯化镁;
余量为蒸馏水。

具体实施例 4:

试剂盒成分如下：

反应总体积的一半的 2×Taqman PCR buffer；

各 200 μ Mol/L 的 dATP 、 dTTP、 dGTP、 dCTP；

各 0.5 μ Mol/L 的两条引物 MT-1、 MT-2；

各 1 μ Mol/L 的两条探针 MT-3、 MT-4；

1.5 mMol/L 硫酸镁；

余量为蒸馏水。

具体实施例 5：

试剂盒成分如下：

反应总体积的一半的 2×Taqman PCR buffer；

各 200 μ Mol/L 的 dATP 、 dTTP、 dGTP、 dCTP；

各 1.5 μ Mol/L 的两条引物 MT-1、 MT-2；

各 3 μ Mol/L 的两条探针 MT-3、 MT-4；

2.5 mMol/L 的硫酸镁；

余量为蒸馏水。

具体实施例 6：

试剂盒成分如下：

反应总体积的一半的 2×Taqman PCR buffer；

各 200 μ Mol/L 的 dATP 、 dTTP、 dGTP、 dCTP；

0.1 μ Mol/L 的引物 MT-1、 2 μ Mol/L 的引物 MT-2；

0.1 μ Mol/L 的探针 MT-3、 5 μ Mol/L 的探针 MT-4；

2 mMol/L 的硫酸镁；

余量为蒸馏水。

具体实施例 7：

本发明所述基于分子荧光探针 PCR 线粒体 DNA11778 点突变检测方法的步骤如下：

(一) 细胞基因组DNA的提取：

1、外周血单个核细胞 (PBMCs) 分离:

5ml 抗凝血经 0.9% NaCl 溶液对倍稀释后, 缓缓加入到装有等体积 Ficoll 100 溶液的离心管中, 2500rpm 转速离心 10 分钟, 吸取中间单个核细胞层置于 1.5ml eppendorf 管中, 5000rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 沉淀为外周血单个核细胞。

2、DNA 提取:

向上述细胞沉淀中加入 100 μ l DNA 提取液 (杭州博康生物技术有限公司), 99 $^{\circ}$ C 10 分钟, 13,000 rpm 离心 10 分钟, 上清液即可为 PCR 扩增的模板。

(二) 对提取的细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增:

1、PCR 反应混合液

2 \times Taqman PCR 反应缓冲液 20 μ l, 两条引物 MT-1、MT-2 浓度为 0.75 μ mol/L, 两条探针 MT-3、MT-4 浓度为 0.25 μ mol/L, 1.5 U Taq DNA 聚合酶 (ROCHE 公司产品), DNA 模板 5 μ l 用三蒸水补足至 40 μ l。

2、PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟, 然后进入扩增循环 93 $^{\circ}$ C \times 10 秒, 60 $^{\circ}$ C \times 40 秒, 共 40 个循环。实时定量 PCR 仪选用 ABI 7000, 荧光采集通道选择 FAM 和 VIC 双通道。

(三) 测定 PCR 反应体系的荧光强度, 判定标本中是否存在线粒体 DNA11778 点突变。

(四) 试验结果:

1、正常人血样检测结果, 荧光 PCR 法检测 VIC 通道检测均为阳性, FAM 通道检测均为阴性, 判断为 LHONmtDNA 野生型, 正常人样品测序结果均为野生型, 结果完全吻合。

2、临床可疑 LHON 病人及家系成员 20 人, 测序结果表现为 LHONmtDNA 变异型患者 12 例, 荧光 PCR 法检测 FAM 通道均为 LHONmtDNA 变异阳性, 其中存在 LHONmtDNA 变异株和野生株混合的为 5 例, 混合型中, 变异株/野生株比例均大于 4: 1;

3、测序结果表现为 LHON mtDNA 野生型 8 例, 荧光 PCR 法检测, 5 例为 LHONmtDNA 野生型, 3 例为 LHONmtDNA 变异株和野生株混合型, 混合型中, 变异株/野生株比例均小于 1: 4。

4、荧光定量 PCR 检测 LHONmtDNA G11778A 点突变耗时仅为 80 分钟，远小于测序法时间。

具体实施例 8:

检测不明原因的视神经病变病人 10 人，结果同直接测序比较。

1、DNA 样本来源于中国医学军事科学院基因研究所。

2、PCR 反应混合液:

2×Taqman PCR 反应缓冲液 20 μl，两条引物 MT-1、MT-2 浓度为 0.75 μmol/L，两条探针 MT-3、MT-4 浓度为 0.25 μmol/L，1.5 U Taq DNA 聚合酶（ROCHE 公司产品），DNA 模板 5 μl 用三蒸水补足至 40 μl。

3、PCR 扩增程序：95℃预变性 2 分钟，然后进入扩增循环 93℃×10 秒，60℃×40 秒，共 40 个循环。实时定量 PCR 仪选用 ABI 7000，荧光采集通道选择 FAM 和 VIC 双通道。

4、测定 PCR 反应体系的荧光强度，判定标本中是否存在线粒体 DNA11778 点突变。

5、结果：直接测序结果表现为 LHON mtDNA 野生型 7 例，变异型 3 例；荧光 PCR 法检测，6 例为 LHONmtDNA 野生型，4 例为 LHONmtDNA 变异型其中 1 例是混合型，混合型中，变异株/野生株比例小于 1:4，故在直接测序中不能判断出其变异情况。

最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的具体实施例子。显然，本发明不限于以上实施例子，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

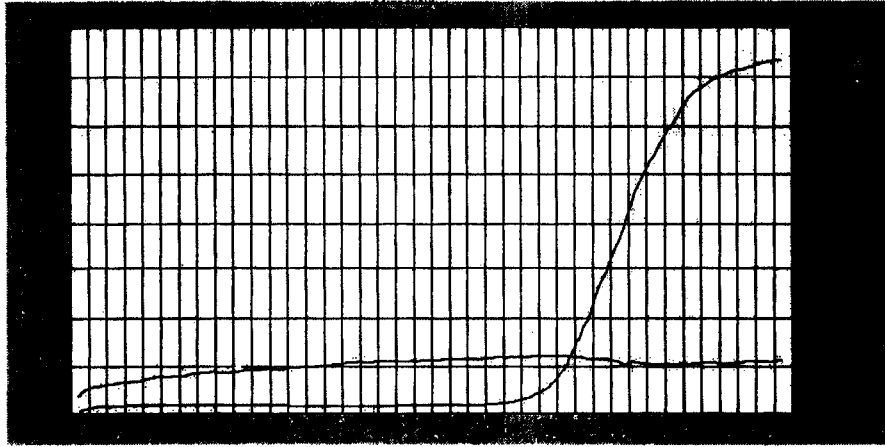


图 1

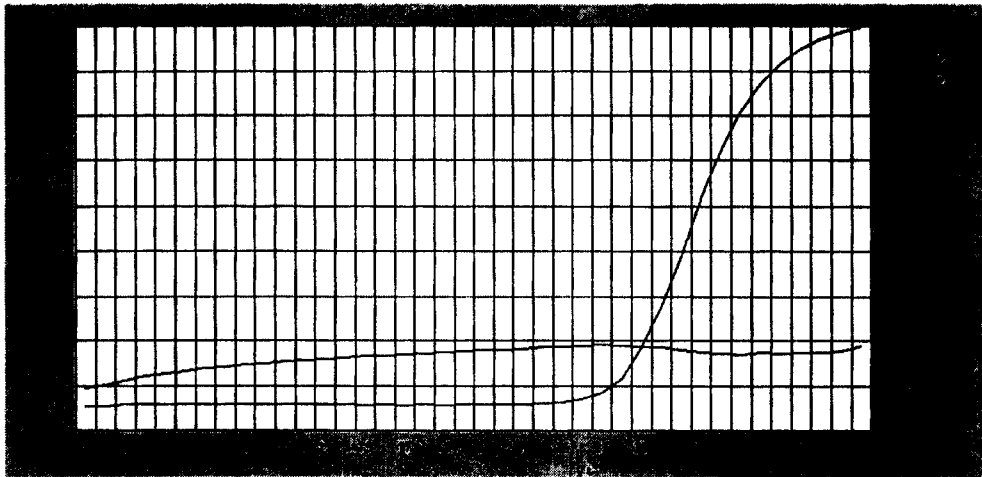


图 2

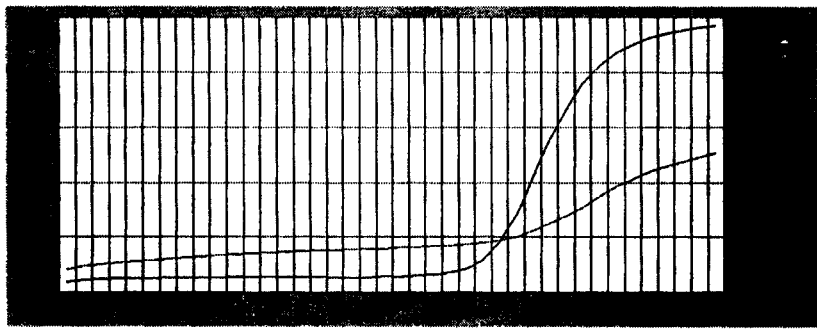


图 3