



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104372093 B

(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201410643497.9

(22)申请日 2014.11.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104372093 A

(43)申请公布日 2015.02.25

(73)专利权人 博奥生物集团有限公司

地址 102206 北京市昌平区生命科学园路
18号

专利权人 清华大学

(72)发明人 王栋 王辉 张岩 项光新

孙义民 邢婉丽 程京

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

CN 1177938 C, 2004.12.01, 说明书第4页,
权利要求书及说明书附图.

CN 101275904 A, 2008.10.01, 权利要求书
及图1.

CN 103194534 A, 2013.07.10, 权利要求1-2
及图1.

Anonymous.TruSeq Custom Amplicon.《互
联网文章》, 2011, 第1-4页.

审查员 李谦

权利要求书2页 说明书14页
序列表10页 附图3页

(54)发明名称

一种基于高通量测序的SNP检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于高通量测序的SNP检测方法。本发明的方法包括如下步骤:探针设计、预扩增及biotin标记、杂交、连接、Barcode特异性引物扩增、测序、根据测序结果来分析样品的SNP位点信息。本发明的实验证明,本发明的方法具有如下优点:(1)提高了体系的灵敏度、(2)样品标记简单、(3)排除了预扩增中的非特异扩增产物的影响利于数据分析、(4)建库方法简单、(5)降低了模板随机突变的概率、(6)极大的降低测序成本、(7)数据分析容易、(8)位点选择灵活,非常适合中等数量的突变位点进行大规模样本筛查。

1. 一种基于高通量测序检测待测样本中突变位点的方法,包括如下步骤:

1) 针对已知突变位点所在的靶序列设计检测探针和预扩增引物对,

所述突变位点为插入突变位点和/或缺失突变位点;

所述检测探针为1个或多个用于检测插入或缺失突变位点的检测探针B;每个检测探针B对应一个所述突变位点;

所述用于检测插入/缺失突变位点的检测探针B由1条用于检测插入/缺失突变位点的上游位点分型探针AS0-B、1条用于检测野生型位点的上游位点分型探针AS0-B和1条下游位点特异探针LS0-B组成,且3条探针的延伸方向相同;

所述用于检测插入/缺失突变位点的上游位点分型探针AS0-B为用于检测插入突变位点的上游位点分型探针AS0-B或用于检测缺失突变位点的上游位点分型探针AS0-B;

所述用于检测插入突变位点的上游位点分型探针AS0-B的3'端与插入突变位点所在的靶序列相同或互补,且其3'末端碱基与所述插入突变位点序列的最后一位碱基相同或互补;

所述用于检测缺失突变位点的上游位点分型探针AS0-B的3'端与缺失突变位点所在的靶序列相同或互补,且其3'末端碱基与所述野生型位点所在靶序列上缺失突变位点序列中第一位碱基的上游紧邻碱基相同或互补;

所述插入/缺失突变位点所在的靶序列为所述野生型位点所在的靶序列的第n个碱基前插入或者缺失突变位点得到的序列;

所述用于下游位点特异探针LS0-B的5'端与所述野生型位点所在的靶序列相同或互补,且其5'末端碱基与所述野生型位点所在的靶序列沿探针延伸方向第n位碱基相同或互补;

所述LS0-B探针的3'端游离于所述野生型位点所在的靶序列之外且为通用探针P2;

每个突变位点的每条所述上游位点分型探针AS0与其对应的下游位点特异探针LS0均可无间隙、非重叠拼接为该突变位点对应的目的靶序列反向互补序列;

所述预扩增引物对为1个或多个预扩增引物对,所述预扩增引物对为能够扩增出1个或多个突变位点所在靶序列的引物对;且每个所述预扩增引物对中的一条引物的5'端标记biotin;

2) 用1个所述预扩增引物对或多个所述预扩增引物对待测样本进行预扩增,得到biotin标记核酸;

3) 用一个所述检测探针B和/或多个所述检测探针B的混合物与所述biotin标记核酸杂交,得到杂交产物;

4) 用DNA连接酶连接所述杂交产物,得到测序靶序列;

5) 用Barcode特异性引物和Common primer引物对测序靶序列进行扩增、高通量测序,得到测序靶序列扩增产物的测序结果;

所述Barcode特异性引物和Common primer引物的3'端20个碱基与所述通用探针P2互补;

所述Barcode特异性引物中含有用于区分样本的Barcode序列XXXXXX,该序列为A、T、C和G随机组合的6碱基,根据不同的组合方式确定不同的样本;

6) 分析所述测序结果,确定待测样本是否含有该突变位点或确定该突变位点的基因

型。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

步骤1)中,

所述检测探针为多个用于检测缺失或插入突变位点的检测探针B;

所述检测探针中的每条探针均为等摩尔混合;

步骤2)中,所述多个所述预扩增引物对混合物为多个所述预扩增引物对等摩尔比混合;

所述待测样本为一个或多个,每一种Barcode特异性引物对应一种待测样本;

步骤3)中,所述多个所述检测探针B的混合物为多个所述检测探针B等摩尔比混合。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

步骤2)中,在所述预扩增的步骤后,还包括如下步骤:向所述预扩增的扩增产物中加入核酸外切酶I和碱性磷酸酶去除预扩增体系中的引物和dNTP,得到biotin标记核酸。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

在步骤3)中,在所述杂交中,用磁珠吸附捕获所述杂交产物。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的方法,其特征在于:

在步骤5)中,所述测序采用二代测序仪器进行。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

所述检测探针为3个用于检测缺失或插入突变位点的检测探针B组成;

所述缺失或插入突变位点为235delC、176DEL16和299delAT;

所述235delC对应的检测探针B由序列表中序列15所示的ASO-B探针、序列表中序列16所示的ASO-A探针和序列表中序列17所示的LSO-B探针组成;

所述176DEL16对应的检测探针B由序列表中序列12所示的ASO-B探针、序列表中序列13所示的ASO-A探针和序列表中序列14所示的LSO-B探针组成;

所述299delAT对应的检测探针B由序列表中序列18所示的ASO-B探针、序列表中序列19所示的ASO-A探针和序列表中序列20所示的LSO-B探针组成;

所述预扩增引物由用于扩增176del16、299delAT、235delC三个突变位点的引物对1;

所述引物对1由序列表中序列28所示的单链DNA分子和序列表中序列29所示的单链DNA分子组成。

7. 一种用于检测突变位点的试剂盒,包括权利要求6中所述235delC对应的检测探针B、所述176DEL16对应的检测探针B、所述299delAT对应的检测探针B、所述用于扩增176del16、299delAT、235delC三个突变位点的引物对1;

所述突变位点为235delC、176DEL16和299delAT。

一种基于高通量测序的SNP检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种基于高通量测序的SNP检测方法。

背景技术

[0002] SNP在分子诊断、临床检验、病原检测、法医学、遗传疾病研究、指导个体化用药和新药研发等多方面具有极其重要应用价值(GayetAgeron et al.2009)。SNP检测是目前基因诊断的主要研究内容。同时,SNP检测所代表的基因诊断也逐渐成为新生儿或特定人群遗传病筛查的重要手段之一。因此,一种操作方便、成本低廉并且高通量的SNP检测技术是当前基因检测的关键所在。

[0003] 相比较其他高通量的基因检测技术,二代高通量测序技术更准确、灵敏、具有更高的通量。随着价格的不断降低,其应用范围不断扩大,已涉及生命科学研究以及医学研究的各个不同方面。利用高通量测序技术来进行高通量的SNP检测是目前的研究热点之一。

[0004] 当前,二代测序技术都需要进行测序文库的构建,然后使用构建好的文库进行上机测序。其一般步骤主要包括DNA提取、DNA片段化、片段选择、文库构建(包括加接头、扩增等步骤)、上机测序,最后完成数据分析。这些环节中,文库构建最为费事费力。而且在建库过程中样本需要扩增上千上万倍,样本中的基因量容易出现偏差。使用这种建库方法,所有基因组中的片段被测序的几率相同,适合对基因组进行测序。如果只对其中的某些基因感兴趣,或只需要对特定部分测序,这种建库方法就会浪费测序空间,并增加数据分析难度。同时,这种建库方法样品处理步骤繁琐,测序数据复杂庞大,需要的起始核酸量高,很难进行大规模样本的同时测序。

[0005] 对特定的某些感兴趣基因(如外显子、某些单基因致病基因等)测序则需要目标序列富集等额外的建库步骤。通过杂交进行目标序列捕获富集是目前应用最为广泛的方法。应用较为广泛的目标序列捕获技术主要基于固相杂交捕获(Choietal.2009)或液相杂交捕获技术(Bainbridge et al.2010)。现在有商业化的定制捕获试剂盒(如Niblegen sequence capture array或Aglient sureselect target enrichment system等)可以使用。这些商业化的定制序列捕获试剂盒一般价格昂贵,一旦芯片定制后检测目标序列就被固定,位点的选择不灵活。除利用目标序列捕获技术进行目标基因测序研究之外,同时基于PCR技术的非杂交序列捕获技也得到应用。但基于多重PCR的技术有其先天不足,一些区域会得不到有效的扩增。同时,聚合酶本身的扩增错误,以及所有片段都被混合扩增,测序结果难以验证。

[0006] illumina公司还提供一种不同的PCR扩增建库技术(Truseq coustom amplicon)。其主要原理为:在目标序列的两侧设计一对带有通用探针的同向探针。通过探针与目标特异序列杂交,将2条探针锚定在目标序列的5'端和3'端。利用DNA聚合酶进行延伸填补两条探针之间的空隙(即感兴趣序列),然后测序。这种方法根据所测基因序列需要设计不同的探针,其探针设计较为复杂,建库质量会受杂交效率的影响较大。利用这种方法来检测低频突变时,因为绝大多数的测序结果是野生型序列,需要增加测序深度来达到符合要求的灵

敏度,无形之中浪费了测序空间。同时,利用这种方法进行大规模的群体突变基因筛查时,野生型序列会占去大部分测序空间,造成测序成本升高。此外,这种建库方法每份样品需要高达数百ng的核酸量,不利于一些浓度较低、稀有或者难获取的核酸样品进行测序。

[0007] 基于这些建库方法的不足,需要建立一种针对SNP检测的多样品、多位点、简单高效的高通量建库测序方法。DNA连接酶对单个核苷酸变异具有很强的鉴别能力,它可以将与模板完全配对的两相邻寡核苷酸片段连接起来,如果连接处出现一个碱基错配,连接反应就不能进行。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供一种基于高通量测序检测待测样本中突变位点的方法。

[0009] 本发明提供的方法,包括如下步骤:

[0010] 1)针对已知突变位点所在的靶序列设计检测探针和预扩增引物对,

[0011] 所述突变位点为SNP位点、插入突变位点和/或缺失突变位点;

[0012] 所述检测探针为1个或多个用于检测SNP位点的检测探针A和/或1个或多个用于检测插入或缺失突变位点的检测探针B;所述每个检测探针A或每个检测探针B对应一个所述突变位点;

[0013] 所述用于检测SNP位点的检测探针A由上游位点分型探针ASO-A和下游位点特异探针LSO-A组成,且所述ASO-A探针和所述LSO-A探针的延伸方向相同;

[0014] 所述ASO-A的3'端与SNP野生型碱基所在靶序列或SNP突变位点碱基所在靶序列相同或互补;所述ASO-A的3'末端碱基与所述SNP野生型碱基或所述SNP突变位点碱基相同或互补;

[0015] 所述ASO-A探针的5'端游离于所述SNP野生型碱基所在靶序列或所述SNP突变位点碱基所在靶序列之外,且为通用探针P1;

[0016] 所述SNP突变位点每个突变形式对应一条ASO-A探针;具体:所述SNP突变位点需设计4条ASO-A探针,4条所述ASO-A的3'末端碱基分别为A、T、C、G;所述ASO-A探针的5'端游离于所述靶序列之外且为通用探针P1;也可只使用其中3条ASO-A探针,2条所述ASO-A的3'末端碱基分别对应SNP的野生型碱基或突变型形式碱基,另外一条ASO-A的3'末端碱基可选择除SNP的野生型碱基或突变型形式碱基以外的一种碱基。所述ASO-A探针的5'端游离于所述靶序列之外且为通用探针P1;也可只使用其中2条ASO-A探针,2条所述ASO-A的3'末端碱基分别对应SNP的野生型碱基或突变型形式碱基。所述ASO-A探针的5'端游离于所述靶序列之外且为通用探针P1;当只检测SNP位点某一种碱基形式时,可使用1条所述ASO-A探针,ASO-A探针的3'末端碱基对应需检测SNP的碱基形式相同或互补;

[0017] 所述LSO-A探针的5'端与所述靶序列相同或互补,且其5'末端碱基与所述靶序列按照探针延伸方向SNP位点下游第一个紧邻碱基相同或互补,且5'末端碱基磷酸化,所述LSO-A探针3'端游离于所述靶序列之外且为通用探针P2;

[0018] 所述用于检测插入/缺失突变位点的检测探针B由1条用于检测插入/缺失突变位点的上游位点分型探针ASO-B、1条用于检测野生型位点的上游位点分型探针ASO-B和1条下游位点特异探针LSO-B组成,且3条探针的延伸方向相同;

[0019] 所述用于检测插入/缺失突变位点的上游位点分型探针ASO-B为用于检测插入突

- 变位点的上游位点分型探针ASO-B或用于检测插缺失突变位点的上游位点分型探针ASO-B;
- [0020] 所述用于检测插入突变位点的上游位点分型探针ASO-B的3'端与插入突变位点所在的靶序列相同或互补,且其3'末端碱基与所述插入突变位点序列的最后一位碱基相同或互补;
- [0021] 所述用于检测缺失突变位点的上游位点分型探针ASO-B的3'端与缺失突变位点所在的靶序列相同或互补,且其3'末端碱基与所述野生型位点所在靶序列上缺失突变位点序列中第一位碱基的上游紧邻碱基相同或互补;
- [0022] 所述插入/缺失突变位点所在的靶序列为所述野生型位点所在的靶序列的第n个碱基前插入或者缺失突变位点得到的序列;
- [0023] 所述用于下游位点特异探针LSO-B的5'端与所述野生型位点所在的靶序列相同或互补,且其5'末端碱基与所述野生型位点所在的靶序列沿探针延伸方向第n位碱基相同或互补;
- [0024] 所述LSO-B探针的3'端游离于所述野生型位点所在的靶序列之外且为通用探针P2;
- [0025] 每个突变位点的每条所述上游位点分型探针ASO与其对应的下游位点特异探针LSO均可无间隙、非重叠拼接为该突变位点对应的目的靶序列反向互补序列;
- [0026] 所述预扩增引物对为1个或多个预扩增引物对,所述预扩增引物对为能够扩增出1个或多个突变位点所在靶序列的引物对;且每个所述预扩增引物对中的一条引物的5'端标记biotin;
- [0027] 2)用1个所述预扩增引物对或多个所述预扩增引物对待测样本进行预扩增,得到biotin标记核酸;
- [0028] 3)用一个所述检测探针A、多个所述检测探针A的混合物、一个所述检测探针B和/或多个所述检测探针B的混合物与所述biotin标记核酸杂交,得到杂交产物;
- [0029] 4)用DNA连接酶连接所述杂交产物,得到测序靶序列;
- [0030] 5)用Barcode特异性引物和Common primer引物对测序靶序列进行扩增、高通量测序,得到测序靶序列扩增产物的测序结果;
- [0031] 所述Barcode特异性引物和Common primer引物的3'端20个碱基分别与所述通用探针P1和所述通用探针P2互补;
- [0032] 所述Barcode特异性引物中含有用于区分样本的Barcode序列XXXXXX,该序列为A、T、C和G随机组合的6碱基,根据不同的组合方式确定不同的样本;
- [0033] 6)分析所述测序结果,确定待测样本是否含有该突变位点或确定该突变位点的基因型。
- [0034] 所述分析所述测序结果确定待测样本是否含有该突变位点或确定该突变位点的基因型包括如下步骤:
- [0035] 将某个突变位点对应的目的靶序列反向互补序列与所述测序结果进行比对,相同序列的个数为该突变位点数目;计算该突变位点占总位点的比例,得到该突变位点比例;根据该突变位点占总位点的比例来判该位点的基因型信息。所述位点基因型信息的判断,需要根据对已知信息的各位点所占比例进行统计学分析,设定合适的阈值,并通过阈值来判断所检测位点的信息。

[0036] 所述总位点由突变位点和野生型位点总和；

[0037] 在本发明的实施例中，若该突变位点比例大于90%，则所述待测样本含有或候选含有该突变位点或所述待测样本的基因型为或候选为突变位点纯合型；若该突变位点比例为20-90%，则所述待测样本含有或候选含有该突变位点或所述待测样本的基因型为或候选为突变位点杂合型；若该突变位点比例为小于20%，则所述待测样本不含有或候选不含有该突变位点或所述待测样本的基因型为或候选为野生型。

[0038] 上述野生型位点为将某个突变位点对应野生型位点的目的靶序列反向互补序列与所述测序结果进行比对，相同序列的个数为野生型位点；

[0039] 上述方法中，步骤1)中，所述突变位点为SNP位点和插入/缺失突变位点；

[0040] 所述检测探针为多个用于检测SNP位点的检测探针A和多个用于检测缺失或插入突变位点的检测探针B；

[0041] 所述检测探针中的每条探针均为等摩尔混合；

[0042] 步骤2)中，所述多个所述预扩增引物对混合物为多个所述预扩增引物对等摩尔比混合；

[0043] 所述待测样本为一个或多个，每一种Barcode特异性引物对应一种待测样本；

[0044] 步骤3)中，所述多个所述检测探针A的混合物为多个所述检测探针A等摩尔比混合；

[0045] 所述多个所述检测探针B的混合物为多个所述检测探针B等摩尔比混合。

[0046] 上述方法中，步骤2)中，在所述预扩增的步骤后，还包括如下步骤：向所述预扩增的扩增产物中加入核酸外切酶I和碱性磷酸酶去除预扩增体系中的引物和dNTP，得到biotin标记核酸。

[0047] 上述方法中，在步骤3)所述杂交中，用磁珠吸附捕获所述杂交产物。

[0048] 上述方法中，在步骤5)中，所述测序采用二代测序仪器进行。

[0049] 上述方法中，所述检测探针为2个用于检测SNP位点的检测探针A和3个用于检测缺失或插入突变位点的检测探针B组成；

[0050] 所述SNP位点为1494C>T和IVS7-2A>G；

[0051] 所述缺失或插入突变位点为235delC、176DEL16和299delAT；

[0052] 所述1494C>T对应的检测探针A由序列表中序列21所示的ASO-A探针、序列表中序列22所示的ASO-A探针、序列表中序列23所示的ASO-A探针、序列表中序列24所示的ASO-A探针和序列表中序列25所示的LSO-A探针组成；

[0053] 所述IVS7-2A>G对应的检测探针A由序列表中序列7所示的ASO-A探针、序列表中序列8所示的ASO-A探针、序列表中序列9所示的ASO-A探针、序列表中序列10所示的ASO-A探针和序列表中序列11所示的LSO-A探针组成；

[0054] 所述235delC对应的检测探针B由序列表中序列15所示的ASO-B探针、序列表中序列16所示的ASO-A探针和序列表中序列17所示的LSO-B探针组成；

[0055] 所述176DEL16对应的检测探针B由序列表中序列12所示的ASO-B探针、序列表中序列13所示的ASO-A探针和序列表中序列14所示的LSO-B探针组成；

[0056] 所述299delAT对应的检测探针B由序列表中序列18所示的ASO-B探针、序列表中序列19所示的ASO-A探针和序列表中序列20所示的LSO-B探针组成；

[0057] 所述预扩增引物用于扩增176del16、299delAT、235delC三个突变位点的引物对1、用于扩增1494C>T位点的引物对2和用于扩增IVS7-2A>G位点的引物对3组成；

[0058] 所述引物对1由序列表中序列28所示的单链DNA分子和序列表中序列29所示的单链DNA分子组成；

[0059] 所述引物对2由序列表中序列26所示的单链DNA分子和序列表中序列27所示的单链DNA分子组成；

[0060] 所述引物对3由序列表中序列30所示的单链DNA分子和序列表中序列31所示的单链DNA分子组成。

[0061] 本发明的另一个目的是提供一种用于检测突变位点的试剂盒。

[0062] 本发明提供的试剂盒,包括上述的1494C>T对应的检测探针A、所述IVS7-2A>G对应的检测探针A、所述235delC对应的检测探针B、所述176DEL16对应的检测探针B、所述299delAT对应的检测探针B、所述用于扩增176del16、299delAT、235delC三个突变位点的引物对1、所述用于扩增1494C>T位点的引物对2和所述用于扩增IVS7-2A>G位点的引物对3；

[0063] 所述突变位点为1494C>T、IVS7-2A>G、235delC、176DEL16和299delAT。

[0064] 所述Barcode primer的核苷酸序列为序列表中序列32；

[0065] 所述Common primer的核苷酸序列为序列表中序列33。

[0066] 检测多个突变位点是可以多个预扩增引物对混合扩增,用多个检测探针混合检测；

[0067] 所述突变位点为235delC(缺失C)、176del16(缺失16bp)、299delAT(缺失AT)、IVS7-2A>G(A突变为G)和/或1494C>T(C突变为T)；

[0068] 所述步骤3)的杂交和杂交产物磁珠捕获的方法如下:将适当浓度的检测探针ASO、LSO及上述处理检测样品加入反应体系中,加入适当盐离子浓度的杂交液binding buffer。高温变性,然后进行低温退火,使得探针ASO和LSO与检测位点周围序列充分杂交。退火完成以后,加入磁珠,以合适温度温育。温育完成以后,使用washing buffer和Taq ligation buffer洗涤磁珠,除去未杂交的探针。

[0069] 所述步骤4)洗涤完成后,使用DNA连接酶,在合适温度下进行连接。连接反应完成,去连接反应液,用适量ddH₂O重悬磁珠,加热解离下连接好的探针。

[0070] 所述步骤5)使用Barcode Primer/Common primer引物对解离产物进行PCR扩增。

[0071] 对技术方案的进一步改进:步骤3)进行样品杂交反应时,把样品分为2份,一份样品只加入野生型探针。而另一份样品中加入其余3种探针或突变型探针。按所述方法步骤4),步骤5)继续制备测序样品。获得目的片段后,2管分别进行步骤6)所述Barcode Primer/Common primer引物扩增。扩增后定量,按照比例将2管样品混合然后进行高通量测序。这样进行大规模SNP突变基因筛查或检测低频率的突变时,可只使用特异性突变探针检测突变型SNP位点,有效利用测序空间,节约测序成本。

[0072] 本发明的方法具有如下优点:

[0073] (1)引入预扩增步骤,极大提高了体系的灵敏度,可以检测低至50copy的核酸；

[0074] (2)样品标记简单,在预扩增的同时完成样品标记不需要额外的标记步骤；

[0075] (3)预扩增完成后利用特异性探针对产物进行检测及富集,相比较于扩增子测序等方法排除了预扩增中的非特异扩增产物的影响,有利于数据分析；

- [0076] (4)建库方法简单,不需要进行基因组片段化和人工接头等繁琐步骤;
- [0077] (5)利用DNA连接酶直接进行SNP碱基区分,避免了延伸过程中造成的随机突变,提高了测序的精确度;
- [0078] (6)可以只使用突变探针对大规模样本进行筛查,极大的降低测序成本;
- [0079] (7)所有测序序列均已知,数据分析容易;
- [0080] (8)位点选择灵活,非常适合中等数量的突变位点进行大规模样本筛查。
- [0081] 基于DNA连接酶的这个特点,本发明设计了一种新的建库方法,根据SNP位点序列信息设计两条相邻探针,其中一条探针的3'末端对应SNP位点。当两条相邻探针与SNP位点序列完全互补时,就会被DNA连接酶连接,否则就不会被连接。利用探针上所带通用探针,进行PCR扩增建库。然后利用二代测序技术进行高通量测序,分析SNP位点信息。通过不同探针组合可以实现多个位点的检测。利用Barcode引物,可以将不同样品按照一定比例混合,一起上机测序,实现多位点、多样品、高通量检测。在进行大规模的群体突变基因筛查时,可只使用突变型探针进行检测,可以更有效的利用测序空间,节约成本。

附图说明

- [0082] 图1为本发明检测方法示意图
- [0083] 图2为质粒组I检测结果
- [0084] A为1494位点野生型质粒检测结果
- [0085] B为IVS7-2位点野生型质粒检测结果
- [0086] C为176位点野生型质粒检测结果
- [0087] D为235位点野生型质粒检测结果
- [0088] E为299位点野生型质粒检测结果
- [0089] 图3为质粒组II检测结果
- [0090] A为1494位点(C:T=1:1)的检测结果
- [0091] B为IVS7-2位点(A:G=1:1)的检测结果
- [0092] C为176位点(WT:MT=3:1)的检测结果
- [0093] D为235位点(WT:MT=3:1)的检测结果
- [0094] E为299位点(WT:MT=3:1)的检测结果
- [0095] 图4为质粒组III检测结果
- [0096] A为1494位点突变型质粒的检测结果
- [0097] B为IVS7-2位点突变型质粒的检测结果
- [0098] C为176位点(WT:MT=2:1)的检测结果
- [0099] D为235位点(WT:MT=2:1)的检测结果
- [0100] E为299位点(WT:MT=2:1)的检测结果
- [0101] 图5为235野生型基因组DNA和235de1C纯合突变型基因组DNA检测结果

具体实施方式

- [0102] 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。
- [0103] 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。

[0104] 以下具体实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0105] 图1为本发明检测方法示意图

[0106] 实施例1、基于高通量测序技术的SNP检测5个耳聋相关突变位点混合质粒样本

[0107] 本实例检测所有耳聋位点,采用的所有耳聋位点相关质粒均由博奥生物集团有限公司构建,所有质粒均经过测序验证其序列正确,相关质粒序列信息如下表1,突变类型有SNP突变或者缺失/插入突变:

[0108] 表1 为耳聋位点相关质粒序列信息

	名称	突变类型对应的位点信息
	pGEMT-299WT	235WT、176WT、299WT
	pCMV-235delC	235delC、176WT、299WT
	pCMV-176del16	235WT、176del16、299WT
[0109]	pCMV-299delAT	235WT、176WT、299delAT
	pGEMT-IVSA	IVS7-2WT
	pCMV-IVSG	IVS7-2A>G
	pGEMT-1555WT	1494WT
	pCMV-1494C>T	1494C>T

[0110] 注:WT表示此位点为野生型,del为缺失突变,>为SNP突变。

[0111] 质粒pGEMT-299WT,利用引物XPMS0299F/XPMS0299R以人类基因组DNA为模版扩增出包含235、176、299位点的片段299WT,然后克隆至pGEMT-easy载体得到。

[0112] 将片段299WT序列中235、176、299的位点分别做点突变,分别得到235delC(GJB2基因的235位点缺失碱基C,参考序列Genbank No.:KF638275.1;提交时间:2013.11.30)、176del16(GJB2基因的176-191位点缺失16个碱基,参考序列Genbank No.:KF638275.1;提交时间:2013.11.30)、299delAT(GJB2基因的299-300位点缺失碱基AT,参考序列Genbank No.:KF638275.1;提交时间:2013.11.30)片段,然后利用NaeI克隆到PCMV质粒中得到质粒pCMV-235delC、pCMV-176del16、pCMV-299delAT。

[0113] 质粒pGEMT-IVSA:利用引物XPMS0919F/XPMS0919R以人类基因组DNA为模版扩增出包含IVS7-2位点的片段IVSA(SLC26A4基因的IVS7-2位点,参考序列Genbank No.:NG_008489;提交时间:2013.7.25),然后克隆至pGEMT-easy载体得到。

[0114] 将片段IVSA序列中IVS7-2的位点做点突变,分别得到IVS7-2A>G片段(SLC26A4基因的IVS7-2位点由A突变为G,参考序列Genbank No.:NG_008489;提交时间:2013.7.25),然后利用NaeI克隆到PCMV质粒中得到质粒pCMV-IVSG。

[0115] 质粒pGEMT-1555WT:利用引物XPMS1555F/XPMS1555FR以人类基因组DNA为模版扩增出包含1494位点的片段1494WT(线粒体12SrRNA基因上的1494位点,参考序列GenBank:J01415.2,提交日期2013.6.17),然后克隆至pGEMT-easy载体得到。

[0116] 将片段1494WT序列中1494的位点做点突变,分别得到1494C>T片段(线粒体

12SrRNA基因上的1494位点碱基C突变为T,参考序列GenBank:J01415.2,提交日期2013.6.17),然后利用NaeI克隆到PCMV质粒中得到质粒pCMV-1494C>T。质粒构建相关引物见表2。

[0117] 表2 质粒构建相关引物

	名称	序列
	XPMS0299F	CCAGACTCAGAGAAGTCTCCC (序列1)
	XPMS0299R	ATGCTAGCGACTGAGCCTTGA (序列2)
[0118]	XPMS0919F	CGTGTAGCAGCAGGAAGTAT (序列3)
	XPMS0919R	AAGAGGAACACCACACTCAC (序列4)
	XPMS1555F	TGGCTAAGGTTGTCTGGTAG (序列5)
	XPMS1555R	CCCTGATGAAGGCTACAAAG (序列6)

[0119] 一、探针和预扩增引物的设计

[0120] 1、待测样本的制备

[0121] 将表1所示的质粒定量以后,按照以下方式混匀:

[0122] 实验组I:将质粒pGEMT-299WT、pGEMT-IVSA、pGEMT-1555WT等拷贝混匀,每种质粒的起始浓度为 5×10^3 copy,即235WT、176WT、299WT、IVS7-2WT、1494WT位点的起始浓度为 5×10^3 。将混匀的质粒依次稀释,使每种质粒的浓度分为 5×10^3 、 10^3 、 5×10^2 、 10^2 、 5×10^1 、 10^1 这6个梯度,得到6个待测样本。

[0123] 实验组II:将 5×10^3 copy质粒pGEMT-299WT、pGEMT-IVSA、pGEMT-1555WT、pCMV-235delC、pCMV-299delAT、pCMV-176del116、pCMV-1494C>T、pCMV-IVSG等拷贝混合,混合后的质粒依次稀释,使每种质粒的浓度为 5×10^3 、 10^3 、 5×10^2 、 10^2 、 5×10^1 、 10^1 这6个梯度,得到6个待测样本。

[0124] 根据质粒包含的位点信息可知在混合质粒中IVS7-2和1494位点50%为突变型,且稀释度为 5×10^3 、 10^3 、 5×10^2 、 10^2 、 5×10^1 、 10^1 。235、176、299位点为25%的突变型,其稀释梯度为 10^4 、 2×10^3 、 4×10^2 、 2×10^2 、 4×10^1 。

[0125] 实验组III:将 5×10^3 copy质粒pCMV-235delC、pCMV-299delAT、pCMV-176del116、pCMV-1494C>T、pCMV-IVSG混合,混合后的质粒依次稀释,使每种质粒的浓度为 5×10^3 、 10^3 、 5×10^2 、 10^2 、 5×10^1 、 10^1 6个梯度,得到6个待测样本。

[0126] 根据质粒包含的位点信息可知在混合质粒中IVS7-2和1494位点为突变型,且稀释度为 5×10^3 、 10^3 、 5×10^2 、 10^2 、 5×10^1 、 10^1 。235、176、299位点为33.3%的突变型,其稀释梯度为 7.5×10^3 、 3×10^3 、 1.5×10^3 、 3×10^2 、 1.5×10^2 、 3×10^1 。

[0127] 2、探针和预扩增引物的设计

[0128] 1)探针设计

[0129] 原则:

[0130] 对于靶序列不同突变形式SNP突变或者插入/缺失突变,针对突变位点的40bp侧翼碱基,设计检测探针,为如下用于检测SNP位点的检测探针A或用于检测缺失或插入突变位点的检测探针B,每条探针的大小为13-25bp;

[0131] 用于检测SNP位点的检测探针A由上游位点分型探针ASO-A和下游位点特异探针LSO-A组成,且ASO-A探针和LSO-A探针的延伸方向相同;

[0132] ASO-A的3'端与SNP野生型碱基所在靶序列或SNP突变位点碱基所在靶序列相同或互补;ASO-A的3'末端碱基与SNP野生型碱基或SNP突变位点碱基相同或互补;

[0133] ASO-A探针的5'端游离于SNP野生型碱基所在靶序列或SNP突变位点碱基所在靶序列之外,且为通用探针P1;

[0134] SNP突变位点每个突变形式对应一条ASO-A探针;

[0135] LSO-A探针的5'端与靶序列相同或互补,且其5'末端碱基与靶序列按照探针延伸方向SNP位点下游第一个紧邻碱基相同或互补,且5'末端碱基磷酸化,LSO-A探针3'端游离于靶序列之外且为通用探针P2(序列11自5'末端第22-42位核苷酸);

[0136] 用于检测插入/缺失突变位点的检测探针B由1条用于检测插入/缺失突变位点的上游位点分型探针ASO-B、1条用于检测野生型位点的上游位点分型探针ASO-B和1条下游位点特异探针LSO-B组成,且3条探针的延伸方向相同;

[0137] 用于检测插入/缺失突变位点的上游位点分型探针ASO-B为用于检测插入突变位点的上游位点分型探针ASO-B或用于检测插缺失突变位点的上游位点分型探针ASO-B;

[0138] 用于检测插入突变位点的上游位点分型探针ASO-B的3'端与插入突变位点所在的靶序列相同或互补,且其3'末端碱基与插入突变位点序列的最后一位碱基相同或互补;

[0139] 用于检测缺失突变位点的上游位点分型探针ASO-B的3'端与缺失突变位点所在的靶序列相同或互补,且其3'末端碱基与野生型位点所在靶序列上缺失突变位点序列中第一位碱基的上游紧邻碱基相同或互补;

[0140] 插入/缺失突变位点所在的靶序列为野生型位点所在的靶序列的第n个碱基前插入或者缺失突变位点得到的序列;

[0141] 用于下游位点特异探针LSO-B的5'端与野生型位点所在的靶序列相同或互补,且其5'末端碱基与野生型位点所在的靶序列沿探针延伸方向第n位碱基相同或互补;

[0142] LSO-B探针的3'端游离于野生型位点所在的靶序列之外且为通用探针P2;

[0143] 每个突变位点的每条上游位点分型探针ASO与其对应的下游位点特异探针LSO均可无间隙、非重叠拼接为该突变位点对应的目的靶序列反向互补序列;

[0144] A所示的检测探针由4条上游位点分型探针(ASO)和1条下游位点特异探针(LSO)组成,且两种探针的延伸方向相同,且两种探针非重叠紧邻拼接后为靶序列的反向互补序列;

[0145] 所述SNP突变位点需设计4条ASO-A探针,4条所述ASO-A的3'末端碱基分别为A、T、C、G;所述ASO-A探针的5'端游离于所述靶序列之外且为通用探针P1(序列7自5'末端第1-20位核苷酸);

[0146] 可只使用其中3条ASO-A探针,2条所述ASO-A的3'末端碱基分别对应SNP的野生型碱基或突变型形式碱基,另外一条ASO-A的3'末端碱基可选择除SNP的野生型碱基或突变型形式碱基以外的一种碱基。所述ASO-A探针的5'端游离于所述靶序列之外且为通用探针P1(序列7自5'末端第1-20位核苷酸);

[0147] 可只使用其中2条ASO-A探针,2条所述ASO-A的3'末端碱基分别对应SNP的野生型碱基或突变型形式碱基。所述ASO-A探针的5'端游离于所述靶序列之外且为通用探针P1(序列7自5'末端第1-20位核苷酸);

[0148] 当只检测SNP位点某一种碱基形式时,可使用1条所述ASO-A探针,ASO-A探针的3'末端碱基对应需检测SNP的碱基形式相同或互补。ASO探针的5'端游离于靶序列之外且为通用探针P1(序列7自5'末端第1-20位核苷酸);

[0149] LS0探针的5'端与靶序列互补,且其5'末端碱基与靶序列SNP位点按照探针延伸方向的下流的第一个紧邻碱基互补,且5'末端磷酸化修饰,LS0探针3'端游离于靶序列之外且为通用探针P2(序列11自5'末端第22-42位核苷酸)。

[0150] B所示的检测探针由1条用于检测突变位点的上游位点分型探针(ASO)、1条用于检测野生型的上游位点分型探针(ASO)和1条下游位点特异探针(LS0)组成;3条探针的延伸方向相同,且用于检测突变位点的上游位点分型探针与下游位点特异探针非重叠紧邻拼接后形成突变靶序列的反向互补序列,用于检测野生型的上游位点分型探针与下游位点特异探针非重叠紧邻拼接后形成野生型靶序列的反向互补序列;

[0151] 用于检测野生型的上游位点分型探针与下游位点特异探针非重叠紧邻拼接后形成野生靶序列的反向互补序列;突变靶序列为在野生靶序列的第n个碱基前插入或者缺失突变位点得到的序列;

[0152] 根据上述设计原则,针对耳聋相关5种突变位点(235delC、176del16、299delAT、IVS7-2A>G、1494C>T)侧翼大约40bp左右的碱基,设计检测探针。为了保证探针的灵敏度和特异性,其中1494位点的探针与模板结合的碱基数为13nt且GcCCG突变为GgCCG。探针序列如表3所示:

[0153] 表3 为探针序列

[0154]

名称	序列	探针类型 (名称/类型 /突变类型/突变碱基)
IVSUG17	ACACGACGCTCTTCCGATCTAGTAGCAATTATCGTCT (序列 7)	IVSUG17/AS0/snp/T
IVSUC17	ACACGACGCTCTTCCGATCTAGTAGCAATTATCGTCA (序列 8)	IVSUG17/AS0/snp/A
IVSUA17	ACACGACGCTCTTCCGATCTAGTAGCAATTATCGTCG (序列 9)	IVSUG17/AS0/snp/G
IVSUT17	ACACGACGCTCTTCCGATCTAGTAGCAATTATCGTCC (序列 10)	IVSUG17/AS0/snp/C
IVSD3	GAAATAAAACAAAAGATGTTAGATCGGAAGAGCACACGTCT (序列 11)	IVSUG17/LS0
176WU-2	ACACGACGCTCTTCCGATCTCCAGGCTGCAAGAACGTGTG (序列 12)	176/AS0/野生(WT)
176MU-2	ACACGACGCTCTTCCGATCTTGCAACACCTGCAGCCAG (序列 13)	176/AS0/缺失(MT)
176DP	CTACGATCACTACTTCCCCAGATCGGAAGAGCACACGTCT (序列 14)	176/LS0
235WU	ACACGACGCTCTTCCGATCTACATCCGGCTATGGGCC (序列 15)	235/AS0/野生(WT)
235MU	ACACGACGCTCTTCCGATCTCACATCCGGCTATGGGC (序列 16)	235/AS0/缺失(MT)
235DP	CTGCAGCTGATCTTCGTGTCGATCGGAAGAGCACACGTCT (序列 17)	235/LS0
299WU	ACACGACGCTCTTCCGATCTTGGCCTACCGGAGACAT (序列 18)	235/AS0/野生(WT)
299MU	ACACGACGCTCTTCCGATCTCGTGGCCTACCGGAGAC (序列 19)	299/AS0/缺失(MT)
299DP	GAGAAGAAGAGGAAGTTCATGATCGGAAGAGCACACGTCT (序列 20)	299/LS0
1494UG13	ACACGACGCTCTTCCGATCTACCGgCCGTCACG (序列 21)	1494/AS0/snp/G
1494UC13	ACACGACGCTCTTCCGATCTACCGgCCGTCACC (序列 22)	1494/AS0/snp/C
1494UA13	ACACGACGCTCTTCCGATCTACCGgCCGTCACA (序列 23)	1494/AS0/snp/A
1494UT13	ACACGACGCTCTTCCGATCTACCGgCCGTCAC (序列 24)	1494/AS0/snp/T
1494DP	CTCCTCAAGTATACTTCAAAGATCGGAAGAGCACACGTCT (序列 25)	1494/LS0

[0155] 2)、预扩增引物的设计

[0156] 设计原则:根据检测核苷酸,设计能够扩增出含有突变位点靶序列的引物,用于检测样品预扩增及biotin标记;

[0157] 根据耳聋相关5位点(IVS7-2A>G、176del16(176位点缺失了16个碱基)、299del1A、235del1C、1494C>T)的序列设计预扩增引物。引物序列如表4所示:

[0158] 表4 为预扩增引物序列

	名称	序列
	1555F1	AGTGCTTAGTTGAACAGGGCC (序列 26)
	1555R1-B	Biotin-GGTTCGTCCAAGTGCACTTTC (序列 27)
[0159]	GJB234F1	AAAGGAGGTGTGGGGAGATGA (序列 28)
	GJB234R1-B	Biotin-CTGGGTTTTGATCTCCTCGATG (序列 29)
	IVS7-2F1-B	Biotin-tcaCCATTGTCGTCTGTATGGCA (序列 30)
	IVS7-2R1	CCAGGTTGGCTCCATATGAAatg (序列 31)

[0160] 其中GJB234F1/GJB234R1-B扩增产物包含176del116、299del1AT、235del1C三个位点。1555F1/1555R1-B扩增产物为1494C>T位点。IVS7-2F1-B/IVS7-2R1扩增产物为IVS7-2A>G位点。

[0161] 将上述6条引物等摩尔混合,命名为Multi-p3。

[0162] 二、预扩增

[0163] 用上述一的Multi-p3对实验组1-3每组中6个样本分别进行预扩增。预扩增体系为10uL,包含1uL DNA模版,1uL 1×PCR buffer,0.5U DNA聚合酶、1uL biotin标记混合引物Multi-p3(50nM/条),200uM dNTP,4.5mM MgCl₂,加水补足10uL;PCR条件为:首先,95℃变性5min,然后95℃变性20s,60℃退火4min,进行20Cycle.,并在预扩增过程中进行biotin标记,预扩增完成后,分别向扩增产物中加入终浓度1U/u1核酸外切酶I(ExoI)和终浓度0.1U/u1碱性磷酸酶(AP)去除预扩增体系中的引物和dNTP,37℃反应3h,得到实验组1的biotin标记6个核酸、实验组2的biotin标记6个核酸、实验组3的biotin标记6个核酸。

[0164] 三、杂交

[0165] 将上述一中的19条探针等摩尔混匀,得到检测探针组;

[0166] 将上述二得到的每个biotin标记核酸均与检测探针组(其中每条探针的用量为100fmol)杂交,利用磁珠吸附捕获每个杂交产物;

[0167] 具体如下:

[0168] 将上述8uL每个biotin的核酸、2u1的检测探针组(每条探针的浓度为50pM),加入20uL杂交2×buffer(100mM Tris-HCl,500mM NaCl,1mM EDTA,0.2% tween80,pH=7.6)中,高温变性,然后进行低温退火(95℃,5min,然后45℃,10min退火),使得探针AS0和LS0与检测位点周围序列充分杂交;加入磁珠,45℃温育2h,使用1×washing buffer(50mM Tris-HCl,100mM NaCl,0.5mM EDTA,0.1% tween80,pH=7.6)和Taq ligation buffer(NEB)洗涤磁珠,除去未杂交的探针,得到实验组1的6个杂交产物、实验组2的6个杂交产物、实验组3的6个杂交产物。

[0169] 四、连接

[0170] 将实验组1的6个杂交产物、实验组2的6个杂交产物、实验组3的6个杂交产物分别加入DNA连接酶进行连接反应,完全配对的探针之间进行连接,连接反应完成,去连接反应液,用适量ddH₂O重悬磁珠,95℃加热5min解离下连接好的探针,获得实验组1的6个靶序列、实验组2的6个靶序列、实验组3的6个靶序列。

[0171] 五、扩增、测序

[0172] Barcode primer:

[0173] CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAxXXXXxGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT(序列32),

[0174] 其中XXXXXX为区分样本所需Barcode序列,为A、T、C和G随机组合的6碱基;

[0175] Common primer:

[0176] AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT(序列33)

[0177] Barcode和Common primer的3'端20个碱基分别与P1和P2序列互补。用Barcode特异性引物和Common primer对实验组1的6个靶序列、实验组2的6个靶序列、实验组3的6个靶序列分别进行PCR扩增,回收扩增产物,用二代测序仪器进行高通量测序。

[0178] 六、数据分析

[0179] 将每一种突变位点和野生型位点对应所述目的靶序列反向互补序列分别与所述测序结果进行比对,获得所述测序结果中与其杂交的测序靶序列数目为突变位点数目或野生型位点数目,计算突变位点比例。

[0180] 所述突变位点比例为突变位点占总位点的比例,所述总位点由突变位点和野生型位点总和。根据该突变位点占总位点的比例来判该位点的基因型信息。位点基因型信息的判断,需要根据对已知信息的各位点所占比例进行统计学分析,设定合适的阈值,并通过阈值来判断所检测位点的信息。

[0181] 在此实施例中,若该突变位点比例大于90%,则所述待测样本含有或候选含有该突变位点或所述待测样本的基因型为或候选为突变位点纯合型;若该突变位点比例为20-90%,则所述待测样本含有或候选含有该突变位点或所述待测样本的基因型为或候选为突变位点杂合型;若该突变位点比例为小于20%,则所述待测样本不含有或候选不含有该突变位点或所述待测样本的基因型为或候选为野生型;

[0182] 实验结果显示本发明的方法对质粒组I(1494位点、IVS7-2位点、176位点、235位点、299位点全为野生型),可以很好的检测到 5×10^1 copy(图2);对于质粒组II(1494位点、IVS7-2位点50%为突变型,176位点、235位点、299位点25%为突变型),对1494位点、IVS7-2位点可以很好的检测到 10^1 copy,对176位点、235位点、299位点,可以检测到 4×10^1 copy(图3)。对于质粒组III(IVS7-2和1494位点为突变型,235、176、299位点33.3%的基因为突变型)对1494位点、IVS7-2位点、实验所用方法可以很好的检测到 5×10^1 copy,对176位点、235位点、299位点,实验所用方法可以检测到 3×10^1 copy(图4)。

[0183] 实施例2、基于高通量测序技术的SNP检测人类基因组DNA样本

[0184] 一、探针和预扩增引物的设计

[0185] 1、待测样本的制备

[0186] 耳聋病人血液基因组DNA(已将验证235纯化突变基因组DNA)和正常人血液基因组DNA(野生型基因组DNA),每个样品设置3次重复,核酸使用浓度为10ng/uL。

[0187] 2、探针和预扩增引物的设计

[0188] 1)探针设计

[0189] 设计原则同实施例1,探针为如下表5:

[0190] 表5 为探针

[0191]

176WU-2	ACACGACGCTCTTCCGATCTCCAGGCTGCAAGAACGTGTG (序列 12)	176/ASO/野生(WT)
176MU-2	ACACGACGCTCTTCCGATCTTGCAACACCCTGCAGCCAG (序列 13)	176/ASO/缺失(MT)
176DP	CTACGATCACTACTTCCCCAGATCGGAAGAGCACACGTCT (序列 14)	176/LSO
235WU	ACACGACGCTCTTCCGATCTACATCCGGCTATGGGCC (序列 15)	235/ASO/野生(WT)
235MU	ACACGACGCTCTTCCGATCTCACATCCGGCTATGGGC (序列 16)	235/ASO/缺失(MT)
235DP	CTGCAGCTGATCTTCGTGTCGATCGGAAGAGCACACGTCT (序列 17)	235/LSO
299WU	ACACGACGCTCTTCCGATCTTGGCCTACCGGAGACAT (序列 18)	235/ASO/野生(WT)
299MU	ACACGACGCTCTTCCGATCTCGTGGCCTACCGGAGAC (序列 19)	299/ASO/缺失(MT)
299DP	GAGAAGAAGAGGAAGTTCATGATCGGAAGAGCACACGTCT (序列 20)	299/LSO

[0192] 2)、预扩增引物的设计

[0193] 设计原则同实施例1,引物为GJB234F1/GJB234R1-B。

[0194] 二、预扩增:与实施例1相同;

[0195] 三、杂交:与实施例1相同;

[0196] 四、连接:与实施例1相同;

[0197] 五、扩增、测序:与实施例1相同;

[0198] 六、数据分析

[0199] 检测结果如图5所示,耳聋病人235纯化突变、176野生型、299野生型基因组DNA,与样本相符。

[0001]

<110> 博奥生物集团有限公司 清华大学

<120> 一种基于高通量测序的 SNP 检测方法

<130> 1

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 1

ccagactcag agaagtctcc c

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 2

atgctagega ctgagccttg a

21

<210> 3

[0002]

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 3

cgtgtagcag caggaagtat

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 4

aagaggaaca ccacactcac

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 5

tggctaaggt tgtctggtag

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列

[0003]

<220>

<223>

<400> 6

ccctgatgaa ggctacaaag

20

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 7

acacgacgct ctccgatct agtagcaatt atcgctc

37

<210> 8

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 8

acacgacgct ctccgatct agtagcaatt atcgctc

37

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 9

[0004]

acacgacgct cttccgatct agtagcaatt atcgtcg 37

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 10

acacgacgct cttccgatct agtagcaatt atcgtcg 37

<210> 11

<211> 41

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 11

gaaataaaac aaaagatggt agatcggaag agcacacgtc t 41

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 12

acacgacgct cttccgatct ccaggtgca agaacgtgtg 40

[0005]

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 13

acacgacget ctccgatct tgcacaccc tgcagccag

39

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 14

ctacgatcac tacttcccca gatcggaaga gcacagctct

40

<210> 15

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 15

acacgacget ctccgatct acatccggt atgggcc

37

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

[0006]

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 16

acaagacget ctccgatct cacatccggc tatgggc

37

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 17

ctgcagctga tcttcgtgtc gatcggaaga gcacacgtct

40

<210> 18

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 18

acaagacget ctccgatct tggectaccg gagacat

37

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

[0007]

<400> 19

acacgaacgt ctccgatct cgtggectac cggagac

37

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 20

gagaagaaga ggaagttcat gatcggaaga gcacacgtct

40

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 21

acacgaacgt ctccgatct accggccgtc acg

33

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 22

acacgaacgt ctccgatct accggccgtc acc

33

[0008]

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 23

acaacgaacgt ctccgatct accggccgtc aca

33

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 24

acaacgaacgt ctccgatct accggccgtc act

33

<210> 25

<211> 40

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 25

ctcctcaagt atacttcaaa gatcggaaga gcacacgtct

40

<210> 26

<211> 21

[0009]

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 26

agtgccttagt tgaacagggc c 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 27

ggttcgtcca agtgcacttt c 21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 28

aaaggaggtg tggggagatg a 21

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

[0010]

<223>

<400> 29

ctgggttttg atctcctcga tg

22

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 30

tcaccattgt cgtctgtatg gca

23

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400> 31

ccaggttggc tccatatgaa atg

23

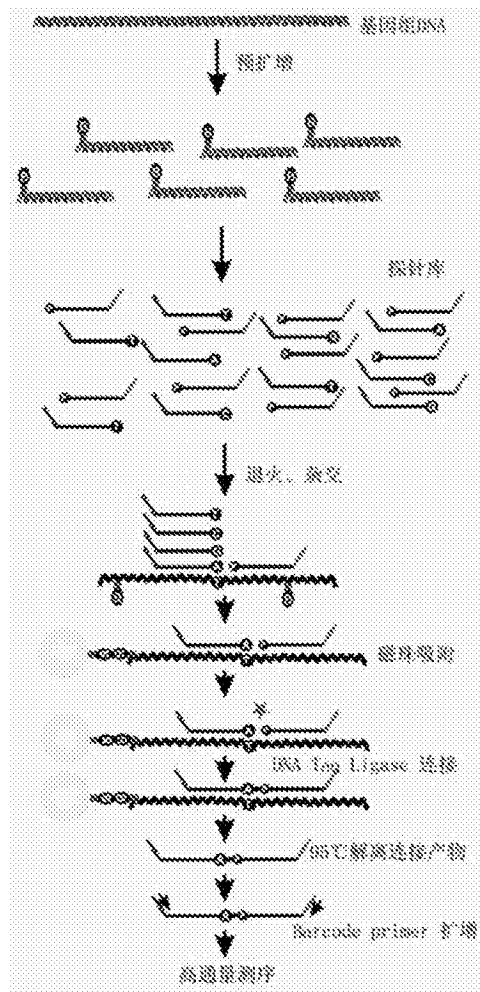


图1

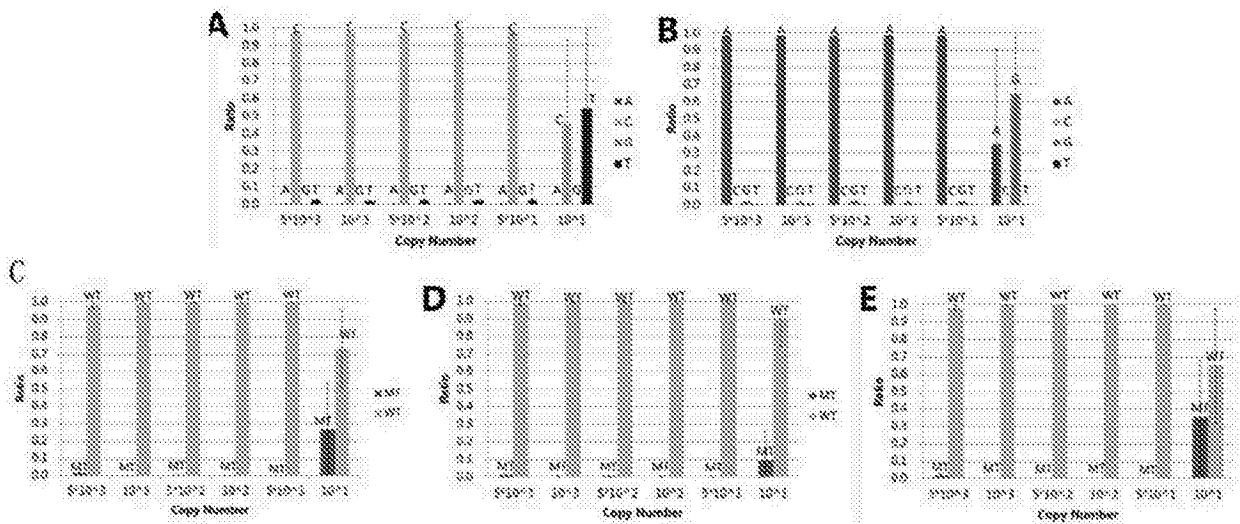


图2

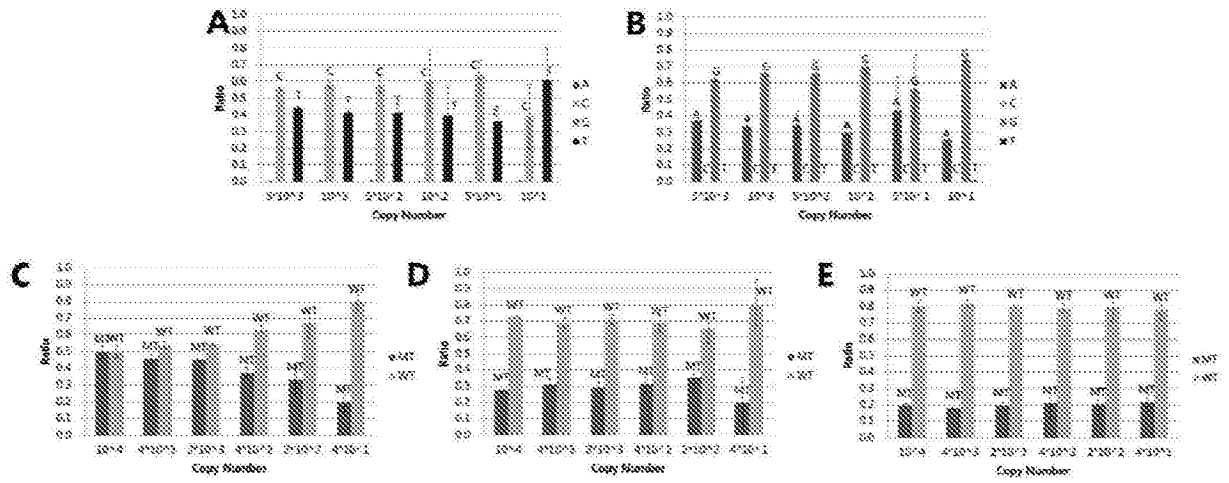


图3

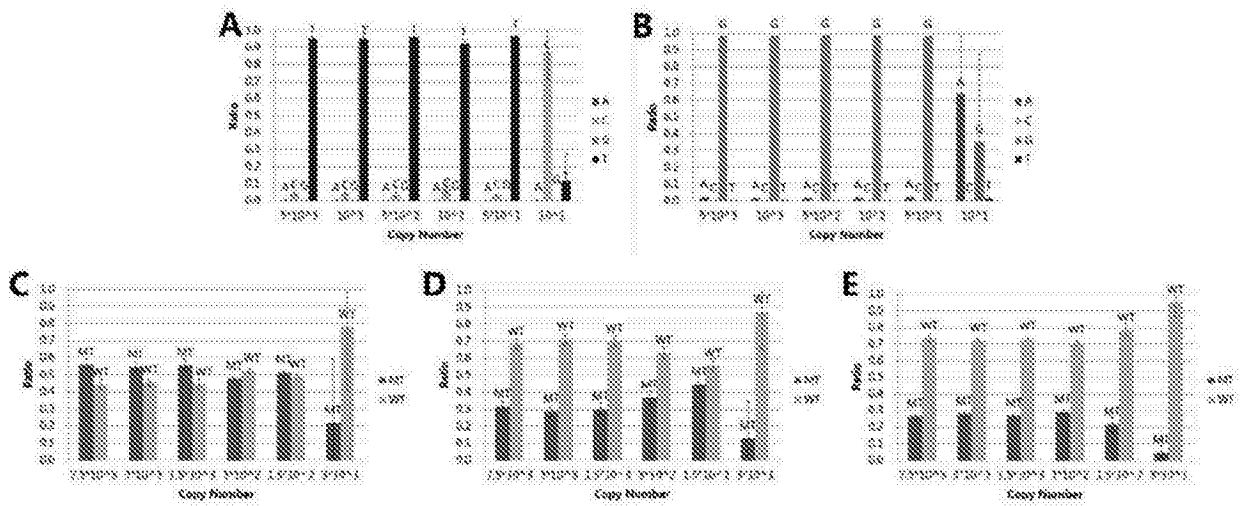


图4

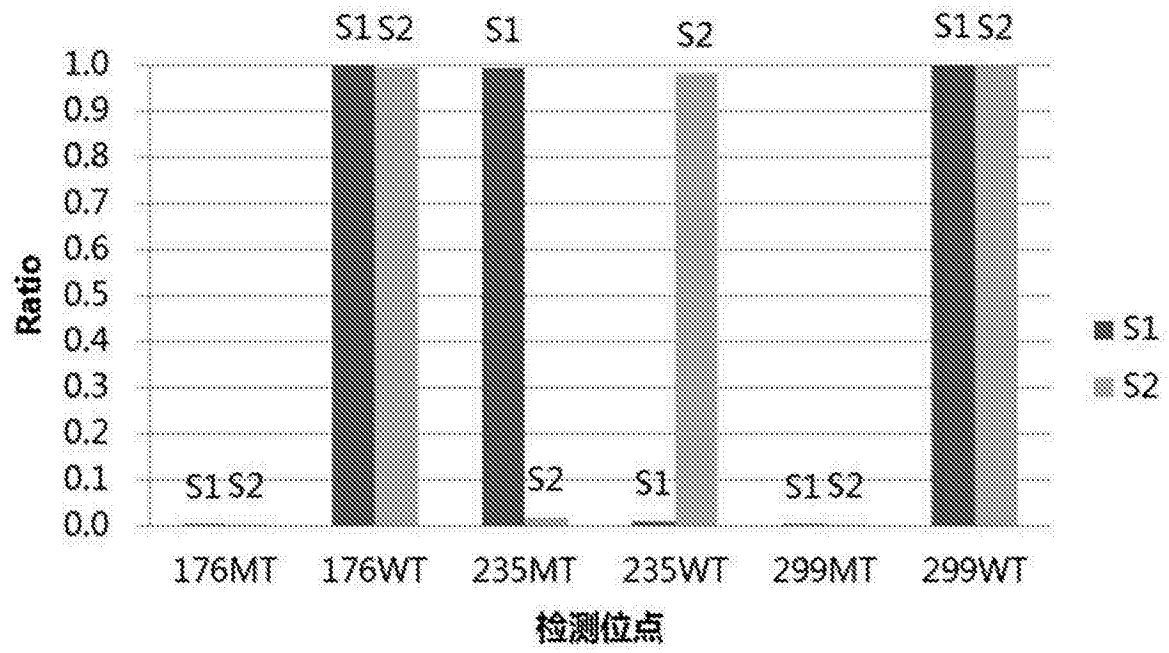


图5