

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610054212.3

[43] 公开日 2006年12月20日

[11] 公开号 CN 1880480A

[22] 申请日 2006.4.12

[21] 申请号 200610054212.3

[71] 申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

[72] 发明人 马厚勋 谢正祥 华明娟 牛永红

周平 王志芳

[74] 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所

代理人 黄珩

权利要求书2页 说明书12页 附图3页

### [54] 发明名称

检测等位基因特异引物 - PCR 方法及其在检测克老素基因多态性中的应用

### [57] 摘要

本发明提供了一种检测等位基因特异引物 - PCR 方法及其在检测克老素基因多态性中的应用。该方法根据所检测基因序列及其相应位点的 SNP 信息设计等位基因特异引物对, 设计 PCR 反应体系, PCR 条件和产物, 对反应产物进行电泳后分析检测结果。该方法特别可用于对克老素 (KLOTHO) 基因 SNP 的等位基因的检测, 其有益效果是不用内切酶, 不用测序, 节省经费, 节省时间, 操作简便, 且产生的产物的 bp 数可由设计者控制, 检测的准确度可得到进一步提高。

1. 一种检测等位基因特异引物-PCR 方法，其特征是按以下步骤进行：

- (1)、根据所检测基因序列及其相应位点的 SNP 信息设计等位基因特异引物对；
- (2)、设计 PCR 反应体系；
- (3)、设计 PCR 条件预变性、循环、延长和 PCR 产物；
- (4)、PCR 反应产物结果分析 制备 2% 琼脂糖凝胶，取 PCR 产物 10  $\mu$  l 上样，在电压为 100V，功率 5W 条件下电泳 1 小时，电泳结束后，凝胶置于 0.5  $\mu$  g/L 溴乙锭溶液中染色 15 分钟，将已染色凝胶置于紫外成像系统下照像，然后进行结果分析。

2. 如权利要求 1 所述的检测等位基因特异引物-PCR 方法，其特征是步骤 (1) 按以下方法设计等位基因特异引物对：从 5' 到 3' 方向为模板 DNA 的方向，P-C 为公共引物，该公共引物为下游引物，对模板 DNA 的反义链按核苷酸匹配规律设计；P-W 为野生型等位基因引物，该引物设计为上游引物，对模板 DNA 的正义链按核苷酸匹配规律设计；P-M 为变异型等位基因引物，该引物也设计为上游引物对模板的正义链按核苷酸匹配规律设计；P-W、P-M 分别与下游引物 P-C 构成两对等位基因特异引物。

3. 如权利要求 1 所述的检测等位基因特异引物-PCR 方法，其特征是步骤 (1) 按以下方法设计等位基因特异引物对：从 5' 到 3' 方向为模板 DNA 的方向，SSDNA 为正义序列 DNA；外侧上游引物 OSP 与下游反义等

位基因特异引物 DASP 形成第一内引物对 IPP-1，即 OSP-DASP 引物对；外侧下游反义引物 OAP 与上游正义等位基因特异引物 UASP 形成第二内引物对 IPP-2，即 UASP-OAP 引物对；外侧下游引物 OAP 与外侧上游引物 OSP 形成第三对引物 OPP；其中所述 UASP 的起点在 SNP 的左侧；DASP 的起点在 SNP 的右侧，皆以 SNP 的特异碱基为 3' 末端。

4. 检测等位基因特异引物-PCR 方法在克老素基因 G-395A SNP 的等位基因检测中的应用。

5. 检测等位基因特异引物-PCR 方法在检测 NOS 的 NOS2 C-1173T 位点 SNP 的等位基因中的应用。

## 检测等位基因特异引物-PCR 方法及其在检测 克老素基因多态性中的应用

### 技术领域

本发明涉及一种生物基因的检测方法，特别涉及检测等位基因特异引物-PCR 方法及其在检测克老素基因多态性中的应用

### 背景技术

当前广泛使用的检测生物基因 SNP 的方法（包括克老素基因的检测）有两大类：经典的酶切方法和直接测序方法。经典的酶切方法由于某些 SNP 位点尚未发现内切酶而受到限制，且酶切法产生的产物长度不可控制，有时产生很短的产物（几个 bp），难于观察和分析（谢正祥, 等. Beta 肾上腺能受体 3 种亚型基因的 5 位点 SNP 基因型的组合分布. 生物医学工程杂志. 2005; 22 (1): 99-103.），因而近期多采用直接测序方法（Arking DE, et al. Association of Human aging with a functional variant of klotho. PNAS, 2002, 99(2):856-861）。直接测序方法不但仍需 PCR 技术，而且仪器复杂、昂贵，操作工序繁琐，难于普遍采用且不适用于大规模筛选。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种不用内切酶，不用测序，节省经费，节省时间，操作简便，且产生的产物的 bp 数可由设计者控制的检测等位基因特异引物-PCR 方法及该方法在检测克老素基因 SNP 的等位基因中的应用。

具体技术方案如下：

一种检测等位基因特异引物-PCR 方法(ASP-PCR 方法)，其特征是按以下步骤进行：

(1)、根据所检测基因序列及其相应位点的 SNP 信息设计等位基因特异引物对；

(2)、设计 PCR 反应体系；

(3)、设计 PCR 条件预变性、循环、延长和 PCR 产物；

(4)、PCR 反应产物结果分析 制备 2% 琼脂糖凝胶，取 PCR 产物  $10 \mu\text{l}$  上样，在电压为 100V，功率 5W 条件下电泳 1 小时，电泳结束后，凝胶置于  $0.5 \mu\text{g/L}$  溴乙锭溶液中染色 15 分钟，将已染色凝胶置于紫外成像系统下照像，然后进行结果分析。

检测生物基因 SNP 的 ASP-PCR 方法的核心是步骤 (1) 中等位基因特异引物对的设计。根据步骤 (1) 等位基因特异引物对的设计方法不同可分为两大类：SASP-PCR(单一式 ASP-PCR: Single Allele-Specific Primer-Polymerase Chain Reaction) 和 NASP-PCR (嵌套式 ASP-PCR: Nested Allele-Specific Primer-Polymerase Chain Reaction)。

SASP-PCR (单一式 ASP-PCR: Single Allele-Specific Primer-Polymerase Chain Reaction) 设计方法是：从 5' 到 3' 方向为模板 DNA 的方向，P-C (Primer-Common) 为公共引物，该公共引物为下游引物，对模板 DNA 的反义链按核苷酸匹配规律设计；P-W(Primer-Wild) 为野生型等位基因引物，该引物设计为上游引物，对模板 DNA 的正义链按核苷酸匹配规律设计；

P-M(Primer-Mutant)为变异型等位基因引物,该引物也设计为上游引物对模板的正义链按核苷酸匹配规律设计;P-W、P-M分别与下游引物P-C构成两对等位基因特异引物。当用SASP-PCR(单一式ASP-PCR)检测Klotho基因G-395A SNP时,其PCR反应条件和产物是:

#### G等位基因

- (i) 预变性: 94°C 3min 预变性;
- (ii) 循环: 共进行35个循环的94°C 30s 变性, 63°C 30s 退火, 72°C 30s 延伸;
- (iii) 稳定: 72°C 10min;
- (iv) 产物: 147bp

#### A等位基因

- (i) 预变性: 94°C min 预变性;
- (ii) 循环: 共进行35个循环的94°C 30s 变性, 65°C 30s 退火, 72°C 30s 延伸;
- (iii) 稳定: 72°C 10min;
- (iv) 产物: 148bp。

NASP-PCR(嵌套式ASP-PCR: Nested Allele-Specific Primer-Polymerase Chain Reaction)的设计方法是:从5'到3'方向为模板DNA的方向,SSDNA为正义序列DNA;外侧上游引物OSP(Outer Sense Primer)与下游反义等位基因特异引物DASP(Downstream Allele Specific Primer)形成第一

内引物对 IPP-1 (Inner Primer Pair-1), 即 OSP-DASP 引物对; 外侧下游反义引物 OAP (Outer Anti-sense Primer) 与上游正义等位基因特异引物 UASP (UPstream Allele Specific Primer) 形成第二内引物对 IPP-2 (Inner Primer Pair-2), 即 UASP-OAP 引物对; 外侧下游引物 OAP 与外侧上游引物 OSP 形成第三对引物 OPP (外侧引物对: Outer Primer Pair); 其中所述 UASP 的起点在 SNP 的左侧; DASP 的起点在 SNP 的右侧, 皆以 SNP 的特异碱基为 3' 末端。选用 NASP-PCR 的设计方法检测 NOS2 C-1173T SNP 时, PCR 反应条件和产物是:

(i) 预变性: 95°C 5min 预变性;

(ii) 循环: 共进行 40 个循环的 94°C 30s 变性, 57°C 30s 退火, 72°C 30s 延伸;

(iii) 稳定: 72°C 10min;

(iv) 产物: 外引物对产生的产物长度: 331bp; 两内引物对产生的产物为: 268bp 和 102bp;

两类 ASP-PCR 方法都可以用于生物基因的检测, 其主要差异在于: 对于 SASP-PCR 方法, 要用不同的等位基因特异引物对作两次 PCR; 而 NASP-PCR 则是在同一个反应体系中同时有两种不同的等位基因特异引物及外侧引物对作一次 PCR。两种方法的 PCR 反应条件和产物要作相应的调整。

Klotho (KL) 基因是 Kuro-o 等在 1997 年研究原发性高血压时发现的与衰老有关的新基因。研究发现: KL 基因是一种与寿命和各种老年性疾病表

型相关的基因。人和小鼠的 KL 基因定位于染色体 13q12 区域。KL 基因全长约 50kb, 其外显子 1 及旁侧 2000bp 序列中, G+C 的平均含量为 66.75%, 最高达到了 89%, 提示在这一区域有 CPG 岛的形成, 而距 KL 基因转录起始点上游大约 6kb 处, 有一个 8kb 片段的缺失, 这可能就是 KL 基因表达缺失的原因(Matsumura Y, et al. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jan 26;242(3): 626-30.)。有报道 KL 的 Exon2 的 F352V 及 C370S 两个 SNPs 与冠心病有关系, KL-VS 突变型是冠心病的独立危险因素 (Arking et al. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 22; 99(2):856-61; Arking et al. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res.* 2005 Mar 4;96(4):412-8.)。启动区的 G-395A SNP 影响 DNA 与蛋白质的结合, 从而影响 KL 的表达, 进而影响代谢特别是骨代谢 (Saito Y, Kuroo M, Nabeshima Y, et al. The protective role of Klotho gene on vascular endothelium. *Nippon Rinsho,* 1999, 57(7);1514-1518.)。因此认为 KL 蛋白可能是一种循环体液因子或膜结合受体成份, 对衰老及衰老相关性疾病进行着相应的调节。深入研究 KL 基因功能, 将会为揭示人类衰老、与衰老相关疾病和抗衰老的分子机理提供重要的新线索, 但目前研究较少。

应用本发明所述方法，不仅可以适用于任何生物基因的检测，特别可以检测 KLOTHO 基因的 3 个位点的 SNP：G-395A，F352V，C370S。发现 G-395A 与糖尿病有关( $P<0.002$ )，其中 GG 野生型纯合子携带者的糖尿病的患病率最低，是 AG 杂合子的 0.277 倍，AA 变异型纯合子的 0.277 倍。F352V 与高血压有关 ( $P=0.0120$ )，其中杂合子 FV 携带者具有最低的高血压患病率，是野生型纯合子 FF 的 0.438 倍，是变异型纯合子 VV 的 0.429 倍；还与冠心病有关 ( $P<0.0001$ )，其中杂合子 FV 携带者是野生型纯合子 FF 的 0.024 倍，是变异型纯合子 VV 的 0.023 倍。C370S 也与冠心病有关 ( $P<0.0001$ )，其中杂合子 CS 携带者是野生型纯合子 SS 的 0.111 倍，是变异型纯合子 CC 的 0.110 倍。

本发明所述方法可用于研究基因（单核苷酸多态性）及其与疾病的联系，制定基因水平的（疾病的）个体化治疗方案。

本发明所述方法的有益效果是：

1. 普适性强：不需内切酶，可克服某些 SNP 位点尚未发现内切酶的障碍。
2. 经济意义大：不需昂贵的测序，不需昂贵内切酶。
3. 操作简便：省去 PCR 产物的酶切步骤，因而简化了操作，更易于掌握。
4. 适合国情：不需内切酶，不受制于人，也不必用测序技术，因而十分适合当前中国国情。
5. 易于推广：该技术经济、实用、操作简便，易于掌握。
6. 产生的产物的 bp 数可由设计者控制，易于观察和分析。

## 附图说明

图 1 是 SASP-PCR 方法的 ASP 设计原理图

图 2 是 NASP-PCR 方法的 ASP 设计原理图

图 3 是 KLOTHO 的 G-395A 位点 SNP 电泳图

图 4 是 KLOTHO 的 F352V (T1062G) 位点 SNP 电泳图

图 5 是 NOS 的 NOS2 C-1173T 位点 SNP 电泳图

## 具体实施例 (共 3 例)

实施例 1 用 SASP-PCR 方法检测 KLOTHO 的 G-395A 位点 SNP 所用的引物对及 PCR 反应条件如下:

### (1) 引物对: 公用上游引物设计方法

上游引物: 5' -AATCGGCTCC AGCAATGTCC AG-3', Tm 60.0, GC% 54.5

下游引物

G 等位基因: 5' -AGAAAAGTCG CCGACCAACT TTC-3', Tm 58.4, GC% 47.8;

A 等位基因: 5' -G AGAAAAGGCG ACGACCACT TTT-3', Tm 58.7, GC% 45.8。

### (2) 模板与引物匹配设计

1561 tAATTGGCTC CAGCAATGTC CAGccggagc ttctttgggc ctccgagtgg gagaaaagtg

(AATCGGCTC CAGCAATGTC CAG, Tm 68.0, GC% 54.5) 上游引物与反义

模板互补 5' ———▶3'22nt(上游引物长度, nt 为核苷酸单位, 下同)

对 G 等位基因

1681 tcgggGAAAG TTGGTCGGCG CCTTTTCTcc ccgacgaagc cgtccaggg ctgctctcag

(CTTTC AACCAGCCGC TGAAAAGA Tm 66, GC% 47.8) 下游引物

与正义模板互补 3' ←—— 5'23nt

对 A 等位基因

1681 tcgggAAAAG TTGGTCGGCG CCTTTTCTCc ccgacgaagc cgctccaggg

(TTTTC TACCAGCCGC GGAAAAGAG Tm 66,GC% 47.8) 下游引物与

正义模板互补 3' ←—— 5' 24nt

注：引物中的加框灰底色核苷酸为人工错配，以改善引物性能；灰底色核苷酸为 SNP 特异等位基因。

### (3) PCR 反应体系

PCR 反应体系								
Allele	Buffer ( $\mu$ l)	MgCl <sub>2</sub> (mM/L)	dNTP ( $\mu$ M/L)	P <sub>1</sub> ( $\mu$ M/L)	P <sub>2</sub> ( $\mu$ M/L)	Taq (U)	Template DNA (ng)	ddH <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)
G	2	1.5	125	0.41	0.415	0.5	100	*
A	2	1.5	125	0.41	0.41	0.5	100	*

注：\*：加至 20 微升

### (4) PCR 条件和产物

G 等位基因

(i) 预变性: 94°C 3min 预变性;

(ii) 循环: 共进行 35 个循环的 94°C 30s 变性, 63°C 30s 退火, 72°C  
30s 延伸;

(iii) 保温: 72°C 10min;

(iv) 产物: 147bp

## A 等位基因

(i) 预变性: 94°C min 预变性;

(ii) 循环: 共进行 35 个循环的 94°C 30s 变性, 65°C 30s 退火, 72°C 30s 延伸;

(iii) 保温: 72°C 10min;

(iv) 产物: 148bp

(5) 反应产物结果分析 制备 2%琼脂糖凝胶, 取 PCR 产物 10 $\mu$ L 上样, 在电压为 100V, 功率 5W 条件下电泳 1 小时, 电泳结束后, 凝胶置于 0.5 $\mu$ g/L 溴乙锭溶液中染色 15 分钟, 将已染色凝胶置于紫外成像系统下照像。其电泳图如附图 3 所示:

M 代表 DNA 电泳产物 bp 值的标准品, G/G 为野生型纯合子, G/A 为杂合子, A/A 为突变型纯合子。

### 实施例 2 SASP-PCR 方法检测 KLOTHO 的 F352V (T1062G) 位点 SNP

#### 1. 引物对: 公用上游引物设计方法

上游引物: 5' -TACAATACT TCTTTCCGTC CC-3' Tm 53.9 GC% 42.9

下游引物:

T 等位基因: 5' -ACTTTTTTCGC AGATTCAGTA AA-3' Tm 50.7, GC% 32;

G 等位基因: 5' -CTTTTTTCGCA GATTCAGTAA C-3' Tm 51.9, GC% 38

注: 引物中的灰底色核苷酸为 SNP 特异等位基因。

#### 2. PCR 反应体系

PCR Reaction System								
Allele	Buffer ( $\mu$ l)	MgCl <sub>2</sub> (mM/L)	dNTP ( $\mu$ M/L)	P <sub>1</sub> ( $\mu$ M/L)	P <sub>2</sub> ( $\mu$ M/L)	Taq (U)	Template DNA (ng)	ddH <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)
F	2	1.5	125	0.475	0.41	0.5	100	*
V	2	1.5	125	0.475	0.41	0.5	100	*

注：\* 意为加至 20 微升

### 3. PCR 条件和产物

- (1) 预变性: 94°C 3min 预变性;
- (2) 循环: 共进行 35 个循环的 94°C 30s 变性, 54°C 30s 退火, 72°C 30s 延伸;
- (3) 保温: 72°C 10min 延长;
- (4) 产物: G 等位基因为 230bp, T 等位基因为 231bp。

### 4. PCR 反应产物分析方法

制备 2% 琼脂糖凝胶, 取 PCR 产物 10 $\mu$ l 上样, 在电压为 100V, 功率 5W 条件下电泳 1 小时, 电泳结束后, 凝胶置于 0.5 $\mu$ g/L 溴乙锭溶液中染色 15 分钟, 将已染色凝胶置于紫外成像系统下照像。其电泳图如附图 4:

M 代表 DNA 电泳产物 bp 值的标准品, T/T 为野生型纯合子,

T/G 为 杂合子, G/G 为突变型纯合子

### 实施例 3 NASP-PCR 方法检测 NOS 的 NOS2 C-1173T 位点 SNP

#### (1) 设计引物对

外侧引物对 (OSP-OAP)、等位基因特异引物对 (UASP-DASP)、引物

长度 (LP)、GC 值 (GC) 及 AT 值 (AT) 如下表。单位 nt 为核苷酸个数。

\*内的核苷酸为 SNP 特异等位基因。

SNP	PRIMERS	LP(nt)	GC(nt)	AT(nt)
NOS2	OSP:GAC AAA GTT AAT ATA TTA TGC	23	6	17
C-1173T	TG	20	10	10
	UASP: TGG TAG CAA AGT GTT GGG	20	10	10
	<b>AC</b>	20	10	10
	DASP: AGT CAC CCT TGA TCT CAC			
	<b>CA</b>			
	OAP: CTG GGT TTC ACC ATG TTG			
	TC			

### (2) 检测 NOS2 C-1173T 位点 SNP 的 PCR 反应体系

检测 NOS2 C-1173T 位点 SNP 的 PCR 反应体系，反应体系如下表，

反应体系体积为 20 $\mu$ l。

NOS2 C-1173T 位点 SNP 的反应体系表

SNP	ddH <sub>2</sub> O	Buffer	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	P1	P2	P-wild	P-mutated	Taq	Template
	( $\mu$ L)	( $\mu$ l)	(mM)	( $\mu$ M)	( $\mu$ mol/L)	( $\mu$ mol/L)	( $\mu$ mol/L)	( $\mu$ mol/L)	polymerase	DNA
									(U)	(ng)
NOS2	*	2	1.5	200	0.125	0.125	0.5	0.5	0.5	100
C-1173T										

注：\* 意为加至 20 微升

### (3) 检测 NOS2 C-1173T 位点 SNP 的 PCR 反应条件

PCR 反应条件如下表：

NOS2 C-1173T 位点 SNP 的 PCR 反应条件表

Genotype	Predenaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Cycle number
NOS2 C-1173T	95°C 5min	94°C 30s	57°C 30s	72°C 30s	40

注：Genotype:基因型， Predenaturation: 预变性， Denaturation: 变性，  
Annealing): 退火， Extension: 延伸， Cycle number: 循环数。

#### (4) 产物长度和电泳结果

产物长度:

外引物对产生的产物长度: 331bp; 两内引物对产生的产物为: 268bp  
和 102bp;

电泳结果见附图 5: 图中 Marker 为标记 DNA 电泳产物 bp 值的标准品, 商品名为 DL2000; CT 表示 NOS2 C-1173T 为杂合子, 以有三个电泳带为特征; CC 表示 NOS2 C-1173T 为野生型纯合子, 以距离较近 (63bp) 的两个电泳带为特征; TT 表示 NOS2 C-1173T 的变异型纯合子, 以距离较远 (229bp) 的两个电泳带为特征。

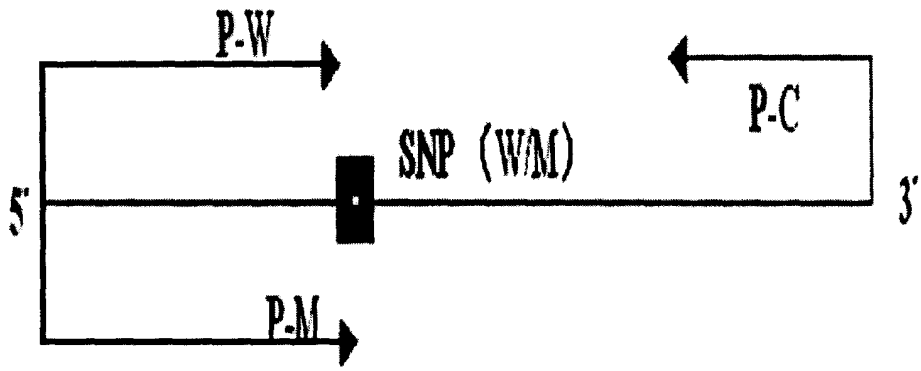


图 1

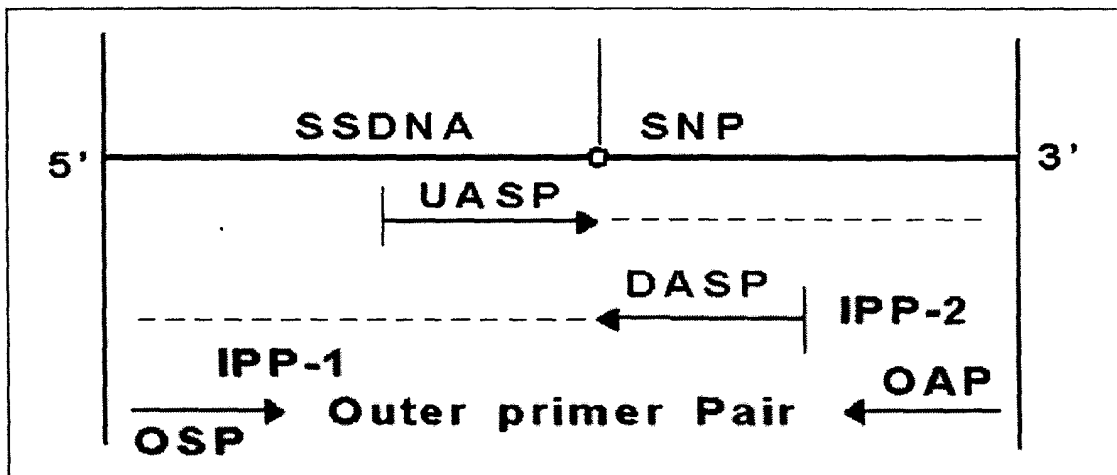


图 2

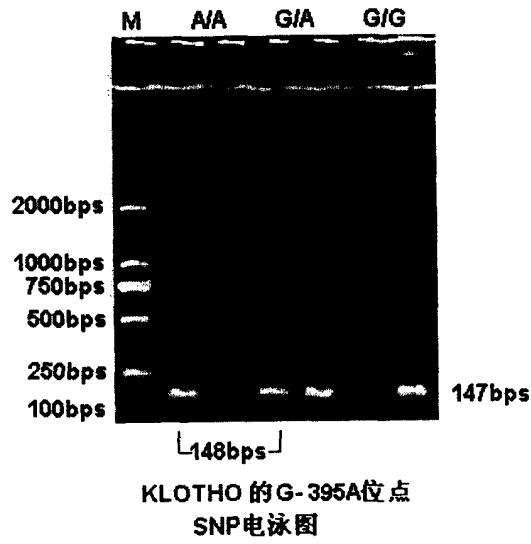


图 3



图 4

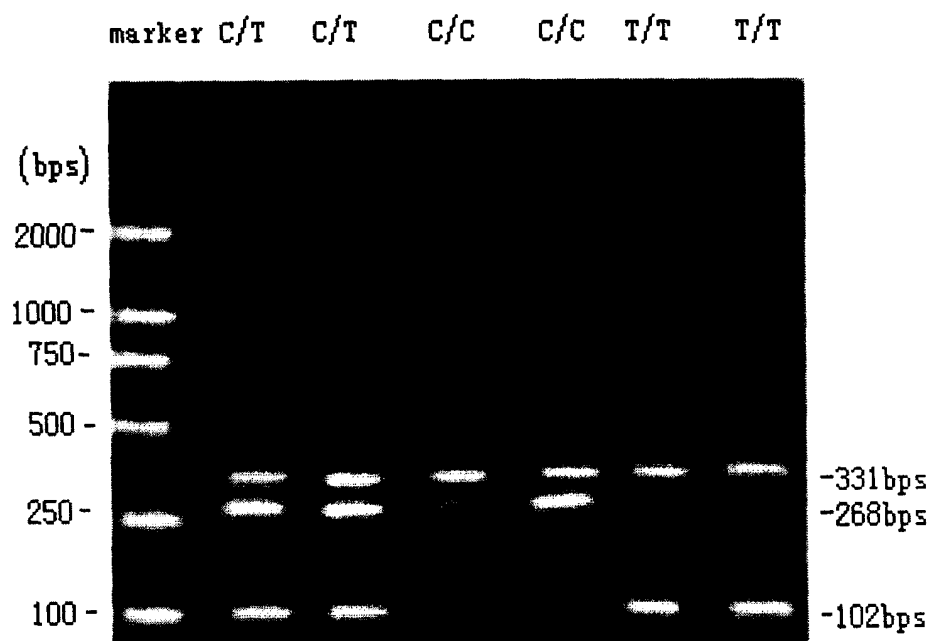


图 5