



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105368933 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201510675462. 8

(22) 申请日 2015. 10. 18

(66) 本国优先权数据

201510243207. 6 2015. 05. 14 CN

(71) 申请人 长沙三济生物科技有限公司

地址 410013 湖南省长沙市高新技术开发区
麓谷国际工业园 A5 栋 3 楼

(72) 发明人 滕祥云 汤维

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页
序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对及试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对及试剂盒,属于体外核酸检测技术领域。所述引物对包括 MTHFR C677T 及 MTHFR A1298C 正向扩增引物、反向扩增引物、测序引物,所述 MTHFR C677T 正向扩增引物及所述 MTHFR A1298C 反向扩增引物的 5' 端分别进行生物素标记;所述试剂盒包括扩增引物、PCR 反应液 1、PCR 反应液 2、测序引物、尿嘧啶 DNA 糖基化酶及 Taq 聚合酶。本发明提供的所述试剂盒具有检测结果准确、特异性高、检测周期短、操作简单并能有效满足临床检验要求的优点。

1. 一种焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对, 其特征在于, 所述 MTHFR 基因检测的多态性位点为 MTHFR C677T 和 / 或 MTHFR A1298C, 所述引物对包括:

(1) 对于 MTHFR C677T 等位基因,

扩增引物为:

MTHFR C677T 正向扩增引物:

5' -GCCAGCCTCTCCTGACTGTC-3' ;

MTHFR C677T 反向扩增引物:

5' -TCGGTGCATGCCTTCACA-3' ;

MTHFR C677T 测序引物: 5' -TGCGTGATGATGAAAT-3' ;

其中, 所述 MTHFR C677T 正向扩增引物的 5' 端进行生物素标记;

(2) 对于 MTHFR A1298C 等位基因,

扩增引物为:

MTHFR A1298C 正向扩增引物:

5' -AGGAGCTGCTGAAGATGTGG-3' ;

MTHFR A1298C 反向扩增引物:

5' -CTCCCGAGAGGTAAAGAACGAA-3' ;

MTHFR A1298C 测序引物: 5' -AGGAGCTGACCAGTGA-3' ;

其中, 所述 MTHFR A1298C 反向扩增引物的 5' 端进行生物素标记。

2. 一种焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的试剂盒, 其特征在于, 所述 MTHFR 基因检测的多态性位点为 MTHFR C677T 和 / 或 MTHFR A1298C, 所述试剂盒包括:

(1) 对于 MTHFR C677T 等位基因,

MTHFR C677T 正向扩增引物:

5' -GCCAGCCTCTCCTGACTGTC-3' ;

PCR 反应液 1, 所述 PCR 反应液 1 含有 MTHFR C677T 反向扩增引物:
5' -TCGGTGCATGCCTTCACA-3' ;

MTHFR C677T 测序引物: 5' -TGCGTGATGATGAAAT-3' ;

其中, 所述 MTHFR C677T 正向扩增引物的 5' 端进行生物素标记;

(2) 对于 MTHFR A1298C 等位基因,

MTHFR A1298C 反向扩增引物:

5' -CTCCCGAGAGGTAAAGAACGAA-3' ;

PCR 反应液 2, 所述 PCR 反应液 2 含有 MTHFR A1298C 正向扩增引物:
5' -AGGAGCTGCTGAAGATGTGG-3' ;

MTHFR A1298C 测序引物: 5' -AGGAGCTGACCAGTGA-3' ;

其中, 所述 MTHFR A1298C 反向扩增引物的 5' 端进行生物素标记。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒还包括:

MTHFR C677T 阳性对照品 1, 其为插有 SEQ ID NO. 8 所示核苷酸序列的 MTHFR C677T 野生纯合子质粒;

MTHFR C677T 阳性对照品 2, 其为所述 MTHFR C677T 野生纯合子质粒与插有 SEQ ID NO. 9 所示核苷酸序列的 MTHFR C677T 突变纯合子质粒组成的质粒混合物;

MTHFR C677T 阳性对照品 3, 其为插有 SEQ ID NO. 9 所示核苷酸序列的 MTHFRC677T 突变纯合子质粒;

MTHFR A1298C 阳性对照品 1, 其为插有 SEQ ID NO. 10 所示核苷酸序列的 MTHFR A1298C 野生纯合子质粒;

MTHFR A1298C 阳性对照品 2, 其为所述 MTHFR A1298C 野生纯合子质粒与插有 SEQ ID NO. 11 所示核苷酸序列的 MTHFR A1298C 突变纯合子质粒组成的质粒混合物;

MTHFR A1298C 阳性对照品 3, 其为插有 SEQ ID NO. 11 所示核苷酸序列的 MTHFRA1298C 突变纯合子质粒;

其中, 质粒载体为 pMD18-T 质粒。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述 MTHFR C677T 阳性对照品 2 中所述 MTHFR C677T 突变纯合子质粒和所述 MTHFR C677T 野生纯合子质粒的数量比为 1:1; 所述 MTHFR A1298C 阳性对照品 2 中所述 MTHFR A1298C 突变纯合子质粒和所述 MTHFR A1298C 野生纯合子质粒的数量比为 1:1。

5. 根据权利要求 2 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒还包括: 质控品和空白对照品, 所述质控品的序列为: TAYGGTTTGCA。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述空白对照品为水。

7. 权利要求 1 所述的引物对在制备用于检测 MTHFR 基因分型的试剂中的应用。

8. 权利要求 2 所述的试剂盒在制备用于检测 MTHFR 基因分型的试剂中的应用。

焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外核酸检测技术领域,尤其涉及一种焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对及试剂盒。

背景技术

[0002] 亚甲基四氢叶酸还原酶 (Methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 是叶酸代谢过程中的关键酶, MTHFR 基因位于 1 号染色体短臂上 (1p36.3), 包括 11 个外显子和 10 个内含子, cDNA 全长 2.2kb。MTHFR 在体内有重要的生物学作用, 是机体一碳基团代谢关键酶, 也是甲硫氨酸代谢中的关键酶, 可催化还原型辅酶 I (NADPH) 相关的 5,10-二甲基四氢叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸的不可逆还原反应。该酶可将还原型叶酸转变为 5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF), 前者是胸苷酸合成的重要原料之一, 是血浆中叶酸存在的主要形式, 可为 DNA 和 RNA 核酸碱基合成、S-腺苷甲硫氨酸合成、高半胱氨酸再甲基化为蛋氨酸, 以及 DNA、蛋白质、神经递质及磷脂的甲基化提供一碳基团, 参与 DNA 的合成与修复; 后者是体内主要的甲基供体, 参与 DNA 甲基化。MTHFR 对于 DNA 的合成、活化及修复有着极为重要的调控作用, 其功能异常可导致 DNA 正常功能不能维持。

[0003] 至今, 已发现 MTHFR 近 20 个基因突变位点, 其中部分多态位点的错义突变是导致酶活性降低、缺失及热稳定性改变的主要机制。目前, 研究报道较多的是与人类疾病关系密切的多态位点 C677T 和 A1298C。

[0004] C677T 是 MTHFR 最常见的突变, 产生 Ala 222Val 错义突变, 主要引起酶活性和热稳定性的改变, TT 突变纯合型酶活性仅为 CC 野生型的 30%, 而 CT 突变杂合型酶活性仅为 CC 野生型的 60%, 同时酶的热稳定性下降, 使酶活性显著降低, 使体内 5,10-亚甲基四氢叶酸 (5,10-MTHF) 水平升高、5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF) 水平随之下降, 进而影响叶酸正常代谢, 以及甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶 (5-FU) 等药物的疗效和毒副作用。

[0005] MTHFR A1298C 突变位点位于第 7 外显子, 产生 Glu 429Ala 错义突变, 同时产生限制性内切酶 Mbo II 的酶切位点。该多态性位点位于酶的 S-腺苷蛋氨酸 (SAM) 调节域, SAM 与 MTHFR 的结合可通过构象的转变抑制酶的活性。体外试验表明, MTHFR 1298CC 突变纯合型酶的活性仅是 AA 野生型的 60%, 而 1298AC 突变杂合型与 677CT 突变杂合型联合酶的活性也只是 AA 野生型的 50%-60%。

[0006] 多项研究显示, 具有 MTHFR 变异型的癌细胞 MTHFR 活性降低, 细胞增殖速度加快, 对 5-FU 药物的敏感性增高。MTHFR 基因突变型的病患使用 5-FU 药物的有效率较高。MTHFR 基因型除了影响 5-FU 的治疗效果外, 也会影响氨甲喋啶 (MTX) 的治疗效果。对胃癌、食道癌、乳腺癌、结直肠癌等疾病患者进行 MTHFR 基因型检测, 对帮助患者预测 5-FU 化疗药物治疗效果具有重要意义。

[0007] 5-氟尿嘧啶 (Fluorouracil, 5-FU) 为嘧啶类似物, 属于抗代谢药的一种, 进入体内后, 在胸苷激酶的催化下转变成 5-氟-2-脱氧尿苷-5-单磷酸盐, 再与 5,10-MTHF 及胸苷酸合成酶形成共价络合物, 从而干扰 DNA 的合成和修复。MTHFR 能将 5,10-MTHF 转变成

5-MTHF,从而参与蛋氨酸代谢循环和 DNA 甲基化。因此, MTHFR 的活性将直接影响体内 5, 10-MTHF 的浓度,进而影响 5-FU 疗效。研究结果表明, MTHFR 基因第 677 位碱基的 C>T 突变可以导致酶活性显著下降,从而增加对 5-FU 的敏感性。因此, MTHFR 基因 677C>T 多态性可用于指导该类药物的个体化使用,以提高临床治疗的针对性和可预见性。

[0008] 甲氨蝶呤 (Methotrexate, MTX) 是叶酸拮抗剂,能抑制亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR),在急性淋巴细胞白血病 (特别在侵犯中枢神经系统时)、颅内原发性中枢神经系统淋巴瘤 (Primary central nervous system lymphoma, PCNSL)、恶性葡萄胎、绒毛膜上皮癌、乳腺癌、盆腔肿瘤、头颈部肿瘤、肺癌及骨肉瘤等多种肿瘤的化疗中发挥重要作用。但在治疗过程中患者常出现不良反应,包括胃肠道反应、骨髓移植和肝功能损害等。研究发现, MTHFR 基因第 677 位碱基的 C>T 突变显著增加 MTX 的毒副作用;此外, 677C>T 多态性与叶酸及同型半胱氨酸代谢紊乱、血栓形成倾向、心脑血管病风险增高、孤独症及新生儿缺陷等疾病具有显著相关性。

[0009] 焦磷酸测序 (Pyrosequencing) 是一种基于聚合原理的 DNA 测序 (即,确定 DNA 中核苷酸的顺序) 方法,属于新一代 DNA 序列分析技术,具备同时对大量样品进行测序分析的能力,并具有高通量、特异性高、快速、直观及低成本的优点。其基本原理为,由 4 种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应,在每一轮测序反应中,只加入一种 dNTP,若该 dNTP 与模板配对,聚合酶就可以将其掺入到引物链中并释放出等摩尔数的焦磷酸基团 (PPi), PPi 可最终转化为可见光信号,并由 Pyrogram™ 转化为一个峰值,每个峰值的高度与反应中掺入的核苷酸数目成正比;然后加入下一种 dNTP,继续 DNA 链的合成;最后通过分析出峰值的情况,达到测定 DNA 序列的目的。不过,现有技术中还没有利用焦磷酸测序技术检测 MTHFR 基因分型的产品。

[0010] 目前,在现有技术中,尤其是在医院内,采用有“金标准”之称的 PCR-直接测序法对 MTHFR 基因进行检测,但该方法的敏感性不高,只能检测出突变细胞比率在 10-20% 以上的肿瘤组织及外周血,对于突变细胞比率小于 10% 的肿瘤组织及外周血,常规 PCR-直接测序法几乎无能为力;此外,该方法还存在成本高、检测周期长及操作繁琐的缺点。

发明内容

[0011] 为了解决上述方法检测 MTHFR 基因分型过程中存在敏感性不高、检测周期长、操作繁琐及成本高的技术问题,本发明提供一种敏感性高、特异性强、检测周期短、操作简单并有效满足临床检验要求的焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对及试剂盒。

[0012] 本发明提供了一种焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对,所述 MTHFR 基因检测的多态性位点为 MTHFR C677T 和 / 或 MTHFR A1298C,所述引物对包括:

[0013] (1) 对于 MTHFR C677T 等位基因,

[0014] 扩增引物为:

[0015] MTHFR C677T 正向扩增引物:

[0016] 5' -GCCAGCCTCTCCTGACTGTC-3' (SEQ ID NO. 1);

[0017] MTHFR C677T 反向扩增引物:

[0018] 5' -TCGGTGCATGCCTTCACA-3' (SEQ ID NO. 2);

[0019] MTHFR C677T 测序引物: 5' -TGCGTGATGATGAAAT-3' (SEQ ID NO. 3);

- [0020] 其中,所述 MTHFR C677T 正向扩增引物的 5' 端进行生物素标记;
- [0021] (2) 对于 MTHFR A1298C 等位基因,
- [0022] 扩增引物为:
- [0023] MTHFR A1298C 正向扩增引物:
- [0024] 5' -AGGAGCTGCTGAAGATGTGG-3' (SEQ ID NO. 4);
- [0025] MTHFR A1298C 反向扩增引物:
- [0026] 5' -CTCCCGAGAGGTAAAGAACGAA-3' (SEQ ID NO. 5);
- [0027] MTHFR A1298C 测序引物:5' -AGGAGCTGACCAGTGA-3' (SEQ ID NO. 6);
- [0028] 其中,所述 MTHFR A1298C 反向扩增引物的 5' 端进行生物素标记。
- [0029] 本发明还提供了一种焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的试剂盒,所述 MTHFR 基因检测的多态性位点为 MTHFR C677T 和 / 或 MTHFR A1298C,所述试剂盒包括:
- [0030] (1) 对于 MTHFR C677T 等位基因,
- [0031] MTHFR C677T 正向扩增引物:
- [0032] 5' -GCCAGCCTCTCCTGACTGTC-3';
- [0033] PCR 反应液 1, 所述 PCR 反应液 1 含有 MTHFR C677T 反向扩增引物: 5' -TCGGTGCATGCCTTCACA-3';
- [0034] MTHFR C677T 测序引物:5' -TGCGTGATGATGAAAT-3';
- [0035] 其中,所述 MTHFR C677T 正向扩增引物的 5' 端进行生物素标记;
- [0036] (2) 对于 MTHFR A1298C 等位基因,
- [0037] MTHFR A1298C 反向扩增引物:
- [0038] 5' -CTCCCGAGAGGTAAAGAACGAA-3';
- [0039] PCR 反应液 2, 所述 PCR 反应液 2 含有 MTHFR A1298C 正向扩增引物: 5' -AGGAGCTGCTGAAGATGTGG-3';
- [0040] MTHFR A1298C 测序引物:5' -AGGAGCTGACCAGTGA-3';
- [0041] 其中,所述 MTHFR A1298C 反向扩增引物的 5' 端进行生物素标记。
- [0042] 在本发明提供的所述试剂盒的一种较佳实施例中,所述试剂盒还包括:
- [0043] MTHFR C677T 阳性对照品 1, 其为插有 SEQ ID NO. 8 所示核苷酸序列的 MTHFR C677T 野生纯合子质粒;
- [0044] MTHFR C677T 阳性对照品 2, 其为所述 MTHFR C677T 野生纯合子质粒与插有 SEQ ID NO. 9 所示核苷酸序列的 MTHFR C677T 突变纯合子质粒组成的质粒混合物;
- [0045] MTHFR C677T 阳性对照品 3, 其为插有 SEQ ID NO. 9 所示核苷酸序列的 MTHFR C677T 突变纯合子质粒;
- [0046] MTHFR A1298C 阳性对照品 1, 其为插有 SEQ ID NO. 10 所示核苷酸序列的 MTHFR A1298C 野生纯合子质粒;
- [0047] MTHFR A1298C 阳性对照品 2, 其为所述 MTHFR A1298C 野生纯合子质粒与插有 SEQ ID NO. 11 所示核苷酸序列的 MTHFR A1298C 突变纯合子质粒组成的质粒混合物;
- [0048] MTHFR A1298C 阳性对照品 3, 其为插有 SEQ ID NO. 11 所示核苷酸序列的 MTHFR A1298C 突变纯合子质粒;
- [0049] 其中,质粒载体为 pMD18-T 质粒;所述 MTHFR C677T 阳性对照品 2 中所述 MTHFR

C677T 突变纯合子质粒和所述 MTHFR C677T 野生纯合子质粒的数量比为 1:1 ;所述 MTHFR A1298C 阳性对照品 2 中所述 MTHFR A1298C 突变纯合子质粒和所述 MTHFR A1298C 野生纯合子质粒的数量比为 1:1。

[0050] 在本发明提供的所述试剂盒的一种较佳实施例中,所述试剂盒还包括:质控品(control oligo)和空白对照品,所述质控品的序列为:TAYGGTTTGCA(SEQ ID NO.7);所述空白对照品为水;质控品的序列是由 QIAGEN 设计合成的一段寡聚核苷酸链,用于检测 PyroMark Q24 测序仪的各项性能指标。

[0051] 所述的 PCR 反应液 1 和 PCR 反应液 2 中其他组分为常规的 10x PCR Buffer、dNTPS 和 H₂O,各组分按常规体积比配置(10x PCR Buffer、dNTPs、H₂O 和反应液中引物的体积比为 5:3:37.5:1)。

[0052] 所述试剂盒中其他试剂及溶液为 PCR 和 DNA 焦磷酸测序的常规试剂,如由 DNA 聚合酶、三磷酸腺苷硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶组成的酶混合物,由 5'-磷酸硫酸和荧光素组成的底物混合物,尿嘧啶 DNA 糖基化酶、Taq 聚合酶等。

[0053] 本发明还提供了如上所述的引物对在制备用于检测 MTHFR 基因分型的试剂中的应用。

[0054] 本发明还提供了如上所述的试剂盒在制备用于检测 MTHFR 基因分型的试剂中的应用。

[0055] 相较于现有技术,本发明提供的焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对及试剂盒具有以下有益效果:

[0056] 一、通过利用焦磷酸测序法技术设计了灵敏度高和特异性好的引物对及其试剂盒,使得所述试剂盒在检测 MTHFR 基因分型时,具有定性准确,灵敏度高及特异性强的优点;此外,还具有样品处理简单、测序步骤简单、测序速度快、半个小时完成一次上机反应、直接给出检测位点频率分析及结果直观的优点;

[0057] 二、通过利用焦磷酸测序法技术设计了灵敏度高和特异性好的引物对及其试剂盒,使得所述试剂盒在检测 MTHFR 基因分型时,可实时监测反应进程、反应时间短、PCR 产物简单处理即可上焦磷酸测序仪测序、操作简便及高通量样品检测,并比金标准方法,即毛细管电泳测序法灵敏度更高,更适合用于临床检验的要求;

[0058] 三、通过在所述试剂盒中设置了空白对照品、阳性对照品和质控品,使得所述试剂盒在检测 MTHFR 基因分型时,可以更好的确保检测结果的准确性。

附图说明

[0059] 图 1 为临床样品 MTHFR C677T 野生型的焦磷酸测序图;

[0060] 图 2 为临床样品 MTHFR C677T 突变杂合型的焦磷酸测序图;

[0061] 图 3 为临床样品 MTHFR C677T 突变纯合型的焦磷酸测序图;

[0062] 图 4 为临床 MTHFR C677T 空白对照品的焦磷酸测序图;

[0063] 图 5 为临床样品 MTHFR A1298C 野生型的焦磷酸测序图;

[0064] 图 6 为临床样品 MTHFR A1298C 突变杂合型的焦磷酸测序图;

[0065] 图 7 为临床样品 MTHFR A1298C 突变纯合型的焦磷酸测序图;

[0066] 图 8 为临床 MTHFR A1298C 空白对照品的焦磷酸测序图;

[0067] 图 9 为临床质控品 control oligo 的焦磷酸测序图；

[0068] 图 10 至图 11 为 MTHFR C677T 多组设计引物的焦磷酸测序图；其中图 10 的测序结果不准确，图 11 的测序结果真实可靠；

[0069] 图 12 至图 13 为 MTHFR A1298C 多组设计引物的焦磷酸测序图；其中图 12 的测序结果不准确，图 13 的测序结果真实可靠。

具体实施方式

[0070] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，下面结合附图及实施例，对本发明进行进一步的详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0071] 实施例 1：试剂盒的制备

[0072] 一、引物和探针的设计与合成

[0073] 针对人 MTHFR 基因的多态性位点 MTHFR C677T 和 MTHFR A1298C 等位基因，选择特异的突变位点，使用 PyroMark Assay Design2.0 软件，设计引物；其中扩增引物和测序引物先经过 PAGE 纯化，再经 HPLC 纯化，其中 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.5 的 5' 端进行生物素标记。

[0074] 表 1. 突变位点与类型：

[0075]

Mutation	Base change
MTHFR C677T	TGCGGGAG[C/T]CGATTCATCA
MTHFR A1298C	CAGTGAAG[A/C]AAGTGTCTTG

[0076] 扩增序列如表 2：

[0077] 表 2. 特异性扩增引物及引物序列

[0078]

序列名称	寡核苷酸序列 (5'-3')	碱基长度(bp)
检测位点 MTHFR C677T 正向扩增引物	GCCAGCCTCTCCTGACTGTC (SEQ ID NO.1)	20
检测位点 MTHFR C677T 反向扩增引物	TCGGTGCATGCCTTCACA (SEQ ID NO.2)	18
检测位点 MTHFR C677T 测序引物	TGCGTGATGATGAAAT (SEQ ID NO.3)	16
检测位点 MTHFR A1298C 正向扩增引物	AGGAGCTGCTGAAGATGTGG (SEQ ID NO.4)	20
检测位点 MTHFR A1298C 反向扩增引物	CTCCCGAGAGGTAAGAAGCGAA (SEQ ID NO.5)	22
检测位点 MTHFR A1298C 测序引物	AGGAGCTGACCAGTGA (SEQ ID NO.6)	16

[0079] 二、对照品选择

[0080] 使用人工合成的一段寡聚核苷酸链 TAYGGTTTGCA control oligo 为质控品；DNase/RNase-Free 水为空白对照品。

[0081] 三、PCR 反应液组成

[0082] 表 3. PCR 反应液 1 组成

[0083]

原料名称	体积 (μL)
10x PCR Buffer	5
dNTP	3
MTHFR C677T 反向扩增引物	1
H ₂ O	37.5
总体积	46.5 μL

[0084] 表 4. PCR 反应液 2 组成

[0085]

原料名称	体积 (μL)

10x PCR Buffer	5
dNTP	3
MTHFR A1298C 正向扩增引物	1
H ₂ O	37.5
总体积	46.5 μL

[0086] 由于针对两个检测位点进行扩增,所以有 2 种不同的 PCR 反应液,分别对 MTHFR C677T 和 MTHFR A1298C 位点进行检测。

[0087] 实施例 2:试剂盒的使用

[0088] 一、样品检测

[0089] 溶解引物干粉(引物溶解后有效期为 1 个月)。按照模板数配制体系:取 PCR 反应液,加入溶好的引物、尿嘧啶 DNA 糖基化酶、Taq DNA 聚合酶,分装体系,加入样品 DNA、空白对照品或阳性对照品为模板,组成 PCR 反应体系。按照 PCR 反应程序进行 PCR 扩增。

[0090] MTHFR C677T 和 MTHFR A1298C 体系各主要成分分别如下:

[0091] 表 5. MTHFR C677T 体系各主要成分

[0092]

PCR 反应液 1	46.5μL
尿嘧啶 DNA 糖基化酶	0.05μL
Taq 酶	0.5μL

[0093]

MTHFR C677T 正向扩增引物	1μL
模版	2 μL
总体积	50 μL

[0094] 表 6. MTHFR A1298C 体系各主要成分

[0095]

PCR 反应液 2	46.5μL
尿嘧啶 DNA 糖基化酶	0.05μL
Taq 酶	0.5μL
MTHFR A1298C 反向扩增引物	1μL
模版	2 μL
总体积	50 μL

[0096] 该体系反应程序如下:

[0097] 表 7. PCR 反应程序

[0098]

步骤	温度	时间	循环数
1	50°C	2 分钟	1
2	95°C	5 分钟	1
3	95°C	30 秒	1
4	61°C	30 秒	35
5	72°C	30 秒	
6	72°C	7 分钟	1
7	4°C	holding	1

[0099] 扩增完成之后,琼脂糖凝胶检验 PCR 结果,以进行下一步程序。

[0100] 二、焦磷酸测序

[0101] 按照焦磷酸测序标准操作规程进行测序操作,主要步骤为:样品的制备和纯化,然后将纯化后的样品加入含有退火液和测序引物的 MIX 中上机测序。焦磷酸测序仪试剂仓中加入运行程序相应的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP、酶混合物、底物混合物。质控品 control oligo 自带测序引物,最终浓度为 0.2 μM。

[0102] 三、结果判断

[0103] 质控品碱基检出率为 100%;空白对照品检出率为 0。

[0104] 四、质控标准

[0105] 各类对照质控品判断结果如下表:

[0106] 表 8. 质控品标准检测结果

[0107]

	对照品	标准检验结果
1	质控品	峰高峰型正常、序列准确
2	空白对照品	碱基检出率为 0

[0108] 五、结果报告:

[0109] 结果如图 1、图 2、图 3、图 5、图 6 及图 7 所示,样品结果的判断标准如下:

[0110] 表 9. 报告样品检测结果

[0111]

	样本检测结果	报告结果
1	MTHFRC677T (C ≥ 90%, T ≤ 10%)	野生型
2	MTHFRC677T (C ≤ 10%, T ≥ 90%)	突变纯合型

3	MTHFRC677T ($40\% \leq C \leq 60\%$, $40\% \leq T \leq 60\%$)	突变杂合型
4	MTHFRA1298C ($A \geq 90\%$, $C \leq 10\%$)	野生型
5	MTHFRA1298C ($A \leq 10\%$, $C \geq 90\%$)	突变纯合型
6	MTHFRA1298C ($40\% \leq A \leq 60\%$, $40\% \leq C \leq 60\%$)	突变杂合型

[0112] 图1及图5分别显示的是临床样品检测结果中MTHFR C677T及MTHFR A1298C的野生型,图2及图6分别显示的是临床样品检测结果中MTHFR C677T及MTHFR A1298C的突变杂合型,图3及图7分别显示的是临床样品检测结果中MTHFR C677T及MTHFR A1298C的突变纯合型,图4、图8及图9分别显示的是临床检测结果中MTHFR C677T空白对照品、MTHFR A1298C空白对照品及质控品 control oligo的焦磷酸测序图。图10至图11显示的是设计的MTHFR C677T多组引物的焦磷酸测序效果图,其中图11的引物为最佳,是我们产品中选定的MTHFR C677T引物;图12至图13显示的是设计的MTHFR A1298C多组引物的焦磷酸测序效果图,其中图13的引物为最佳,是我们产品中选定的MTHFR A1298C引物。

[0113] 本发明提供的焦磷酸测序法检测MTHFR基因分型的引物对及试剂盒具有以下有益效果:

[0114] 一、通过利用焦磷酸测序法技术设计了灵敏度高和特异性好的引物对其试剂盒,使得所述试剂盒在检测MTHFR C677T及MTHFR A1298C位点时,具有定性准确,灵敏度高及特异性强的优点;此外,还具有样品处理简单、测序步骤简单、测序速度快、半个小时完成一次上机反应、直接给出检测位点频率分析及结果直观的优点;

[0115] 二、通过利用焦磷酸测序法技术设计了灵敏度高和特异性好的引物对其试剂盒,使得所述试剂盒在检测MTHFR C677T及MTHFR A1298C位点时,可实时监测反应进程、反应时间短、PCR产物简单处理即可上焦磷酸测序仪测序、操作简便及高通量样品检测,并比金标准方法,即毛细管电泳测序法灵敏度更高,更适合用于临床检验的要求;

[0116] 三、通过在所述试剂盒中设置了空白对照品、阳性对照品和质控品,使得所述试剂盒在检测MTHFR C677T及MTHFR A1298C位点时,可以更好的确保检测结果的准确性。

[0117] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效流程变换,或直接或间接运用在其它相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

SEQUENCE LISTING

<110>	长沙三济生物科技有限公司	
<120>	焦磷酸测序法检测 MTHFR 基因分型的引物对及试剂盒	
<160>	11	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	1	
	gccagcctct cctgactgtc	20
<210>	2	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	2	
	tcggtgcatg ccttcaca	18
<210>	3	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	3	
	tgcgtgatga tgaat	16
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	4	
	aggagctgct gaagatgtgg	20
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	5	
	ctcccgagag gtaaagaacg aa	22
<210>	6	
<211>	16	
<212>	DNA	

<213> 智人	
<400> 6	
aggagctgac cagtga	16
<210> 7	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 7	
tayggtttgc a	11
<210> 8	
<211> 166	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 8	
ggccagcctc tcctgactgt catccctatt ggcaggttac cccaaaggcc accccgaagc	60
agggagcttt gaggctgacc tgaagcactt gaaggagaag gtgtctgcgg gagccgattt	120
catcatcacg cagcttttct ttcgctttgt gaaggcatgc accgac	166
<210> 9	
<211> 166	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 9	
ggccagcctc tcctgactgt catccctatt ggcaggttac cccaaaggcc accccgaagc	60
agggagcttt gaggctgacc tgaagcactt gaaggagaag gtgtctgcgg gagtcgattt	120
catcatcacg cagcttttct ttcgctttgt gaaggcatgc accgac	166
<210> 10	
<211> 82	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 10	
gaggagctgc tgaagatgtg gggggaggag ctgaccagtg aagaaagtgt ctttgaagtt	60
tcgtttcttta cctctcggga ga	82
<210> 11	
<211> 82	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 11	
gaggagctgc tgaagatgtg gggggaggag ctgaccagtg aagcaagtgt ctttgaagtt	60
tcgtttcttta cctctcggga ga	82

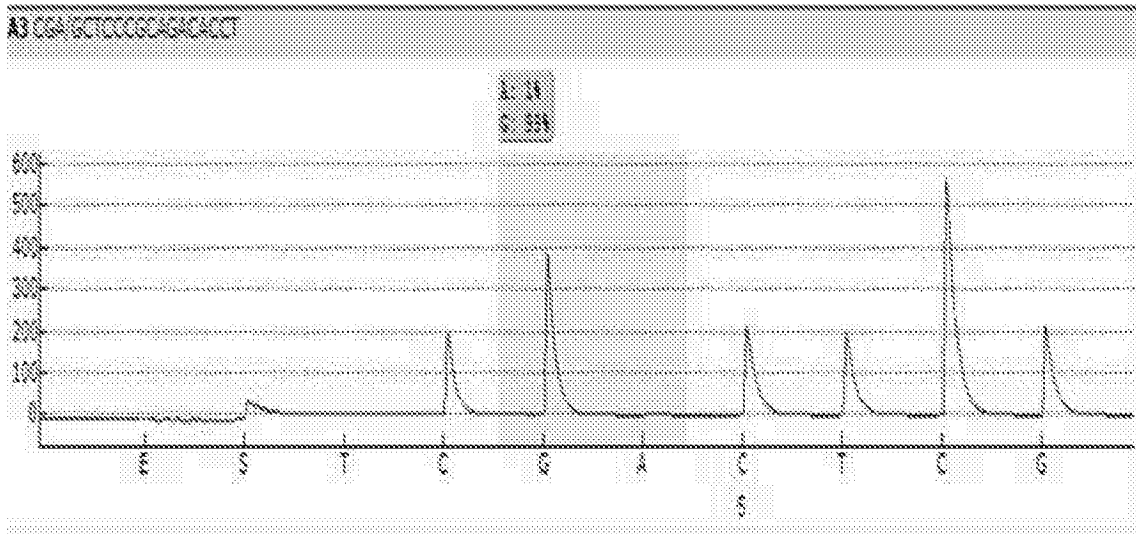


图 1

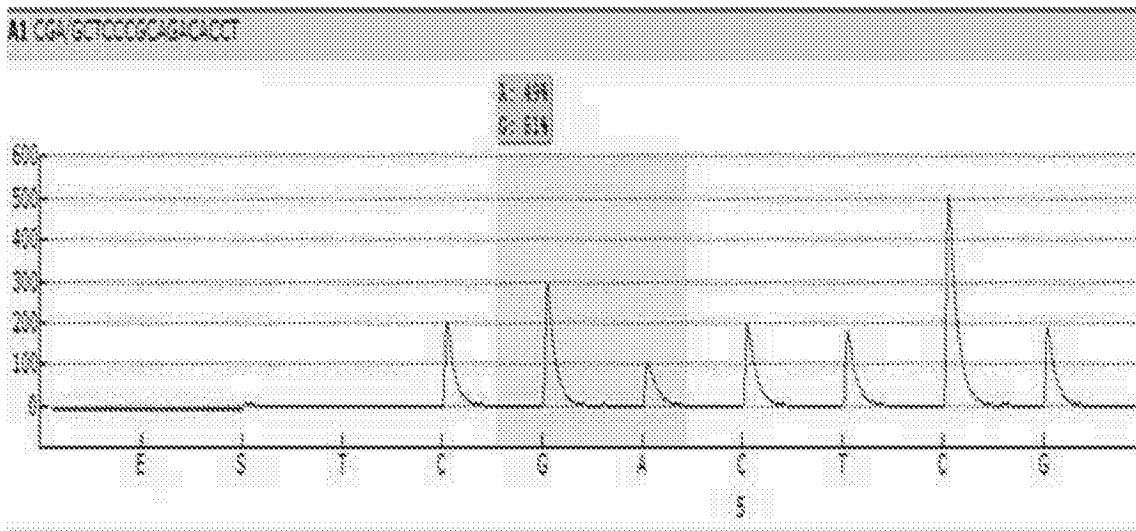


图 2

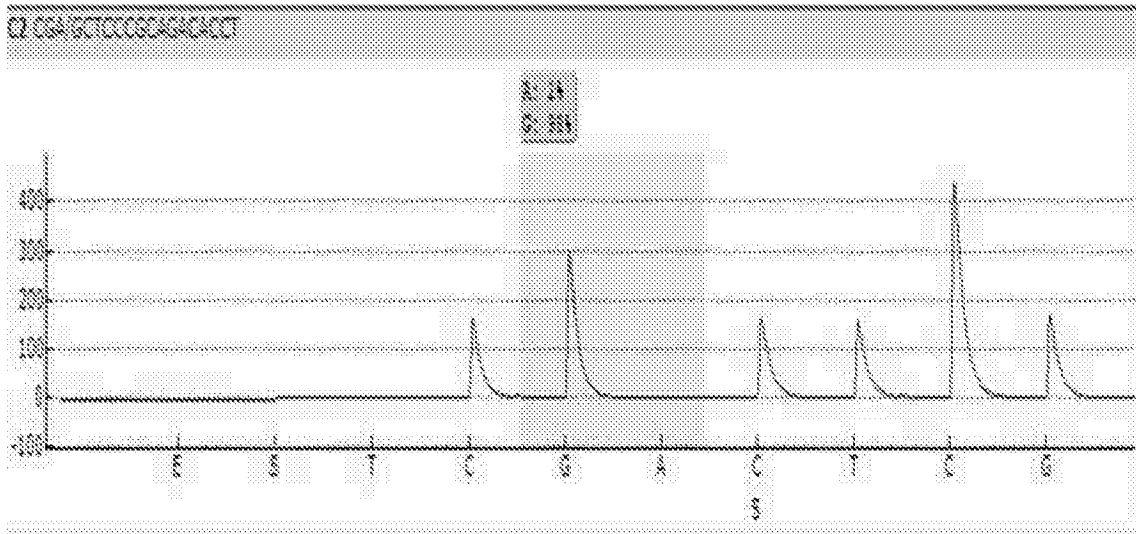


图 3

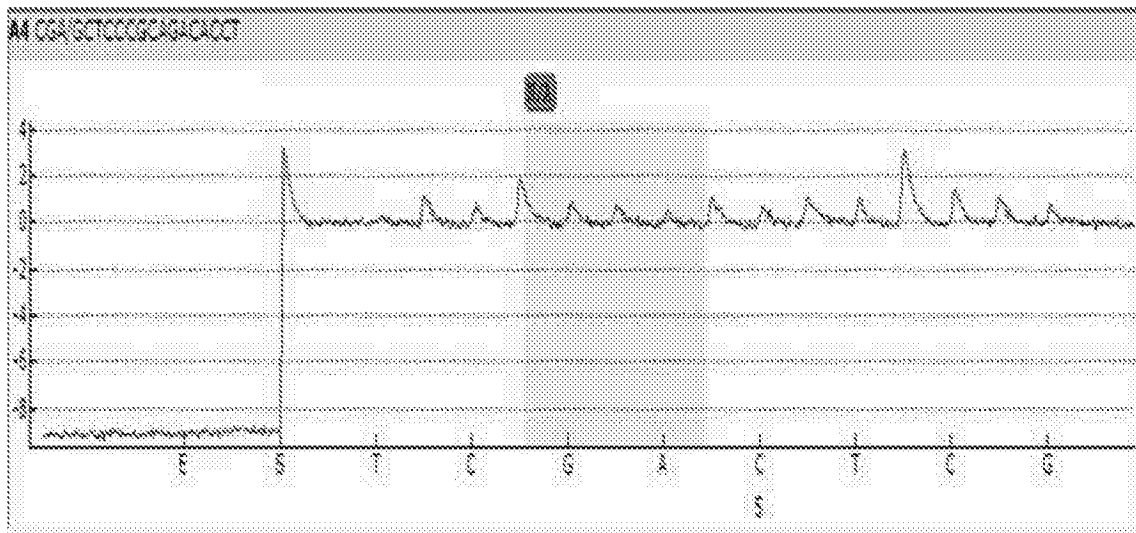


图 4

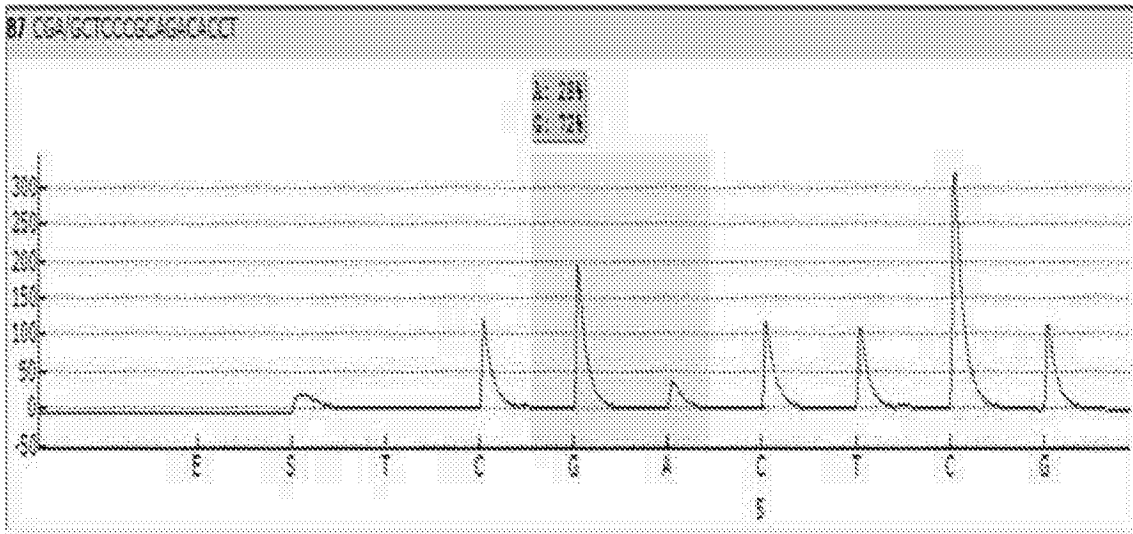


图 5

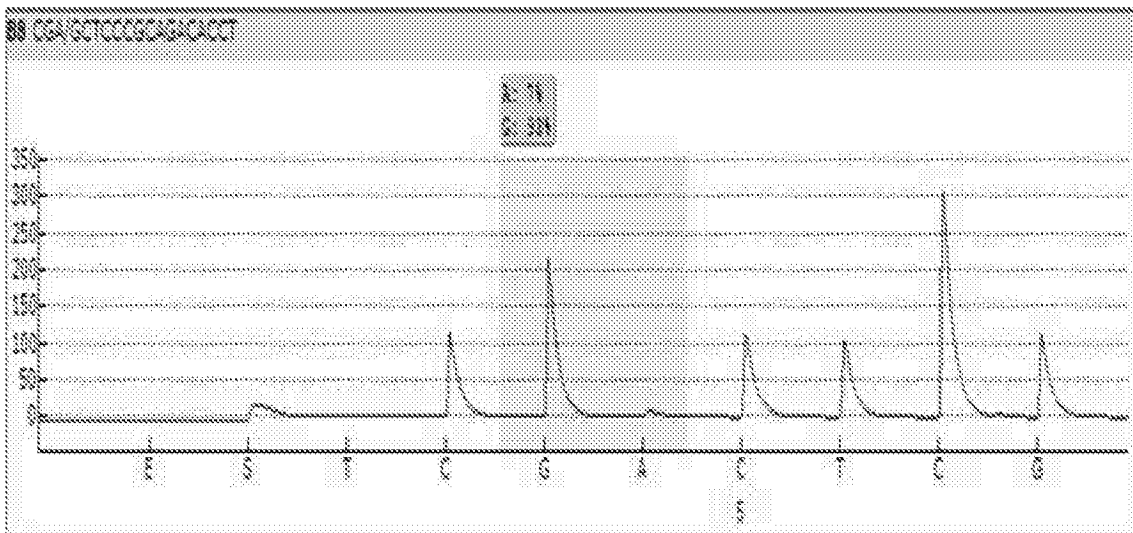


图 6

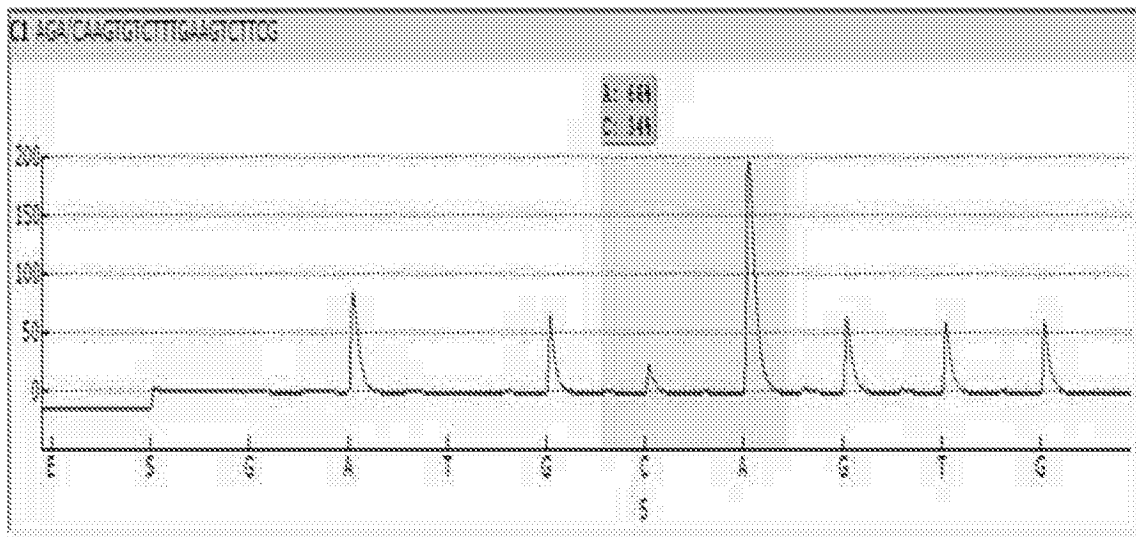


图 7

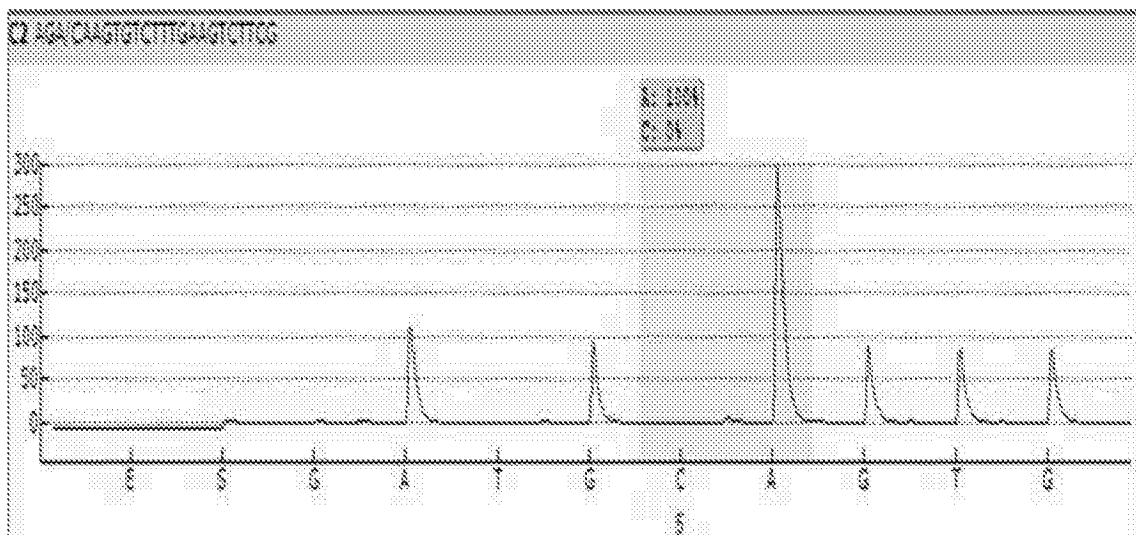


图 8

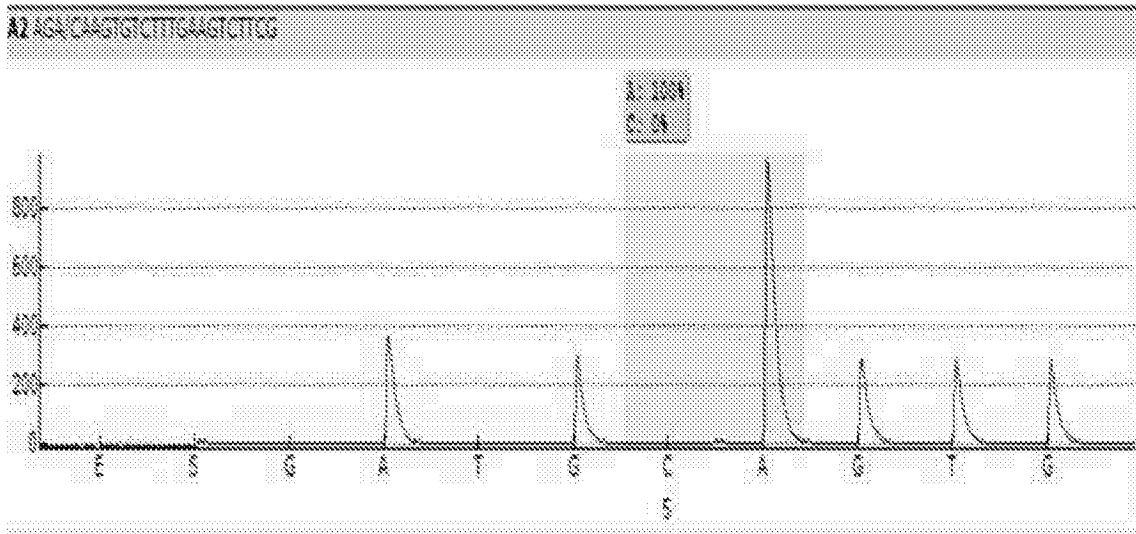


图 9

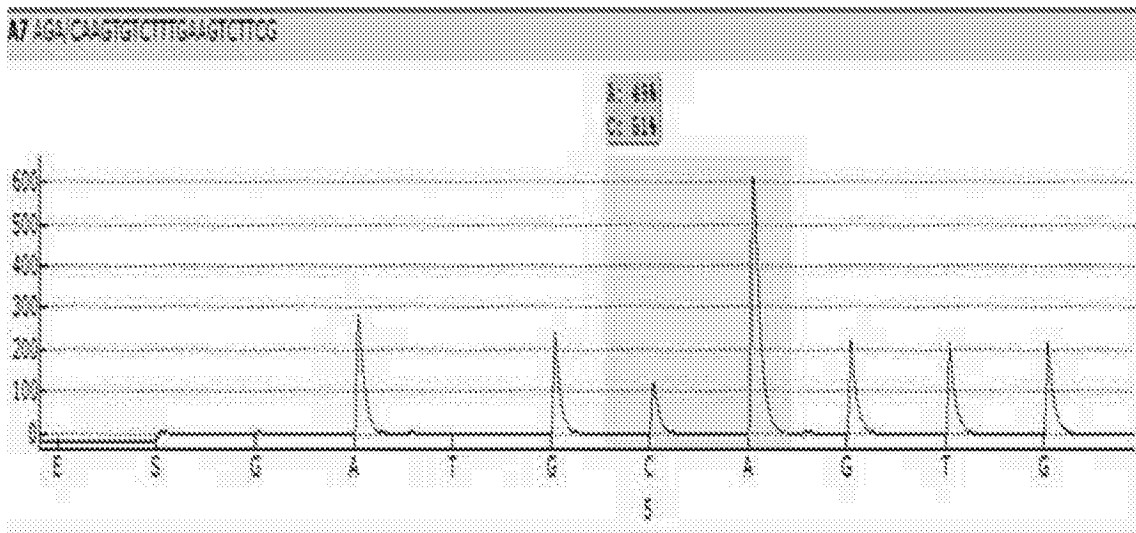


图 10

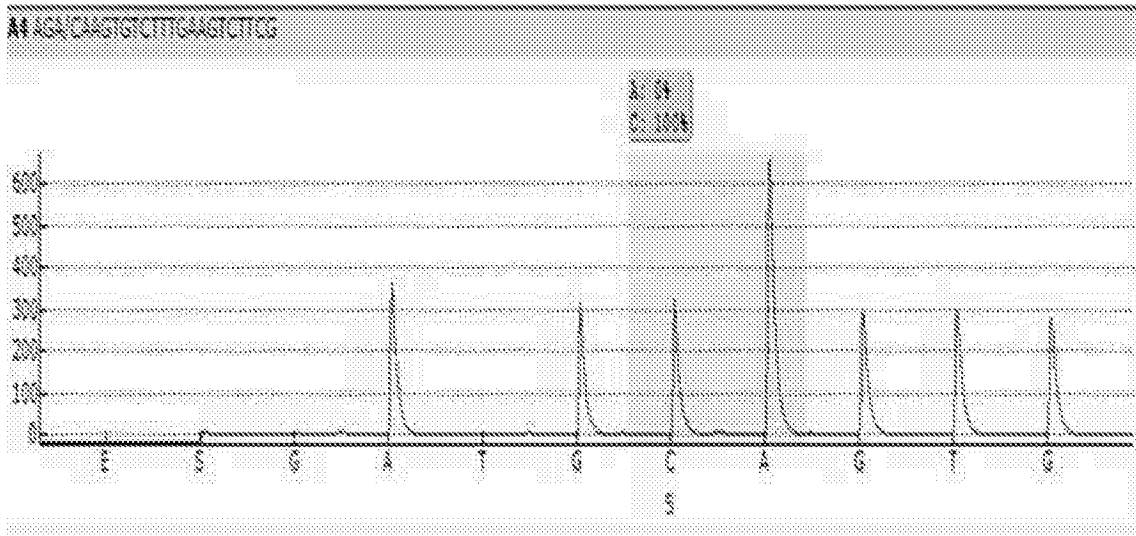


图 11

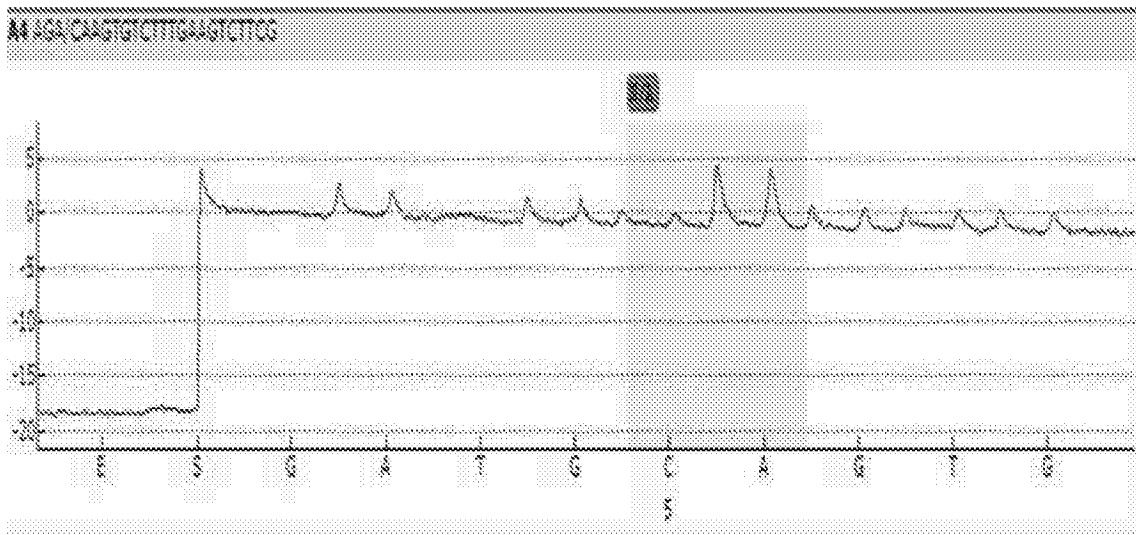


图 12

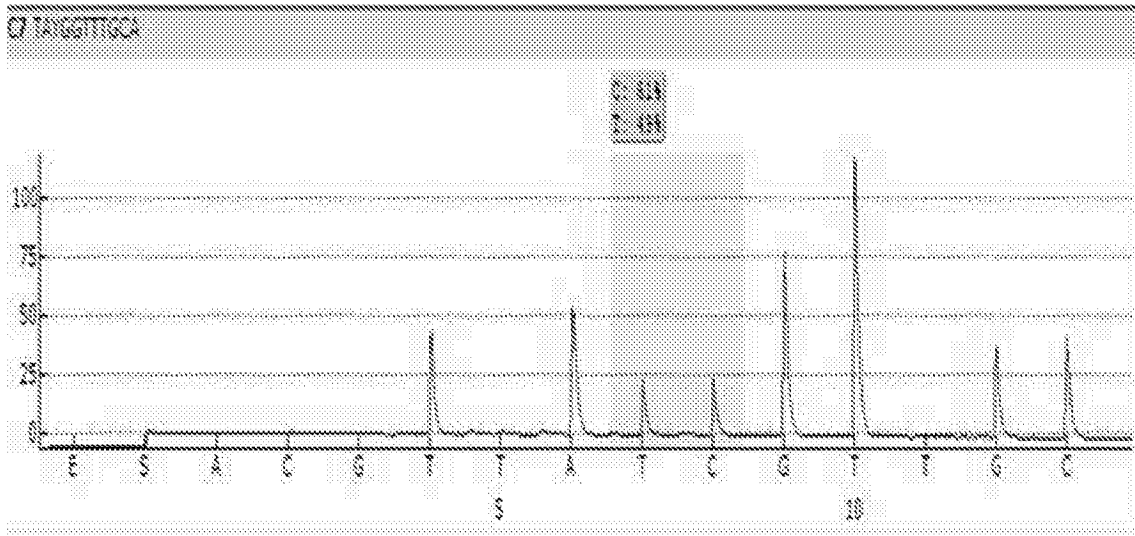


图 13