

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510109054.2

[45] 授权公告日 2008 年 2 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100368564C

[22] 申请日 2005.10.18

[21] 申请号 200510109054.2

[73] 专利权人 卫生部北京医院

地址 100730 北京市东单大华路 1 号

[72] 发明人 杨 泽 孙 亮 屈彦纯

[56] 参考文献

PGC-1——一种新的核受体辅助活化因子.
张春妮, 王沪旭. 生命的化学, 第 5 期. 2003

PGC-1 基因 Gly482Ser 变异与 2 型糖尿病
的关系. 马春薇, 徐焱成. 临床内科杂志, 第
10 期. 2003

审查员 吴文英

[74] 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有
限公司

代理人 张爱群

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 2 页

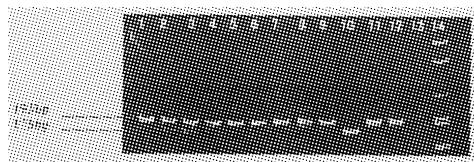
[54] 发明名称

一种鉴定 PGC-1 基因启动子-1998 位 SNP
分子标记的引物、方法及试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种在中国北方人群中发现并分型 PGC-1 基因启动子-1998 位 SNP 分子标记的方法, 通过提取宿主细胞的基因组 DNA, 根据本发明中特异性设计引物, 采用巢式 PCR 结合限制性位点引入 PCR 的方法, 测定受试者的 PGC-1 基因启动子-1998 位 SNP 标记的基因型, 结合其他 PGC-1 序列中存在的 SNP 标记以预测受试者对代谢综合征的易感程度。此方法与核苷酸测序质控方法分型结果一致, 分型结果可靠。本发明的优点: 首次发现中国北方人群中存在 PGC-1 基因启动子-1998 位 C/G 的 SNP 标记, 提供了一种筛选分型此 SNP 标记的方法和特异性引物, 直接应用于或构建单体型后应用于中国北方人群中开展代谢综合征的致病基因定位筛选, 能运用于评价代谢综合征的个体患病风

险, 以利于开展代谢综合征的早期干预和治疗。



1. 一种分离核酸，为序列表 SEQ ID NO. 1 所示的碱基序列。

2. 一组鉴定过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 基因 (PGC-1 基因) 启动子序列中 SNP 分子标记的引物，其特征在于：为 SEQ ID No. 4—SEQ ID No. 7 所示的碱基序列，SEQ ID No. 4 和 SEQ ID No. 5 为引物对，SEQ ID No. 6 和 SEQ ID No. 7 为引物对。

3. 一种鉴定 PGC-1 基因启动子序列中 SNP 分子标记的方法，其特征在于：通过提取宿主细胞的基因组 DNA，采用巢式 PCR 结合限制性位点引入 PCR 的方法，测定受试者的 PGC-1 基因启动子-1998 位 SNP 标记的基因型；

其中巢式 PCR 的引物序列是序列表 SEQ ID No. 4 和 SEQ ID No. 5；

限制性位点引入 PCR 的引物序列是序列表 SEQ ID No. 6 和 SEQ ID No. 7。

4. 一种鉴定 PGC-1 基因启动子序列中 SNP 分子标记的试剂盒，其特征在于：由以下试剂组成，保存温度为 -20°C ：

50 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液，

50 μL 10mM dNTP 混合液，

10 μL Taq DNA 聚合酶，2unit/ μL ，

各 5 μL SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 引物，10pmol/ μL ，

1ml 纯水，

20 μL 10 $\times$ K 限制性内切酶反应缓冲液，

5 μL 限制性内切酶 *Bam*H I，10u/ μL 。

一种鉴定 PGC-1 基因启动子-1998 位 SNP 分子标记的引物、方法及试剂盒

技术领域

本发明涉及一种鉴定 PGC-1 基因启动子序列中-1998 位 SNP 分子标记的引物、方法及试剂盒，属于生物技术领域。

背景技术

单核苷酸多态性 SNP，属于第三代分子标记，在人类基因组 DNA 序列测序和分析工作完成后，其能为系统的研究基因功能及相关遗传疾病提供有力的应用提供保障。由于其广泛分布于人类基因组并且相对稳定存在，因而在疾病相关基因定位及疾病的遗传机理研究应用中极具前景。通过发现特定群体中存在的 SNP 标记，并设计不同方案将发现的 SNP 进行人群规模化分型筛查，将直接为遗传性疾病的机理研究提供技术基础和手段；同时，对人类遗传性疾病的病因诊断、治疗及防治产生重大影响。

研究发现，SNP 在人类基因组中的平均密度估计为 1/1000bp，在整个基因组的分布达 3×10^6 个，且密度高于第二代分子标记 STR。大多数 SNP 来源于物种形成之后，种群出现之前，由于每一代中核苷酸的变异频率极低（约 10^{-8} ）以及碱基变化的随机性，使得单碱基等位基因十分稳定，人类 SNP 中大部分（85%）是共有的（但在不同种群中发生的频率不同）。发现特定群体中存在的 SNP，并研究其分布规律将为相对透彻并全面的揭示人类基因组中疾病基因定位情况提供强有力的切入点。

虽然人类基因组 DNA 序列测序工作的完成对人类具有及其重大的实用意义，特别是在疾病遗传病因学的寻找和群体遗传学的领域中；但是，由于人类基因组计划的完成是基于有限群体基础之上，针对特定群体（如洲际、国家、地区等）研究时，则需要在借鉴和参考的前提下具体分析问题。简要的说，就是根据具体的研究应用领域选取特定人类基因组区段在特定群体对象中结合人类基因组 DNA 序列结果进行剖析，筛选特定群体对象中其基因组区段中存在的具有生物学意义的结构特征（即分子标记），并对特定群体中实际存在可研究的分子标记进行规模化、高通量的分型，从而为后续的广阔应用领域奠定技术基础。

本发明中涉及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 基因（peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1, PGC-1）启动子序列中 SNP 分子标记在中国北方群体中的发现及规模化分型试剂盒的实例。PGC-1 是一种多功能的转录调节因子，能参与调节能量代谢的诸多方面，刺激线粒体生物合成及线粒体氧

化代谢,以适应不同的代谢需求。其表达受寒冷、饥饿、耐力运动、感染等刺激调控,以调节线粒体能量代谢、肝糖异生等代谢稳态,适应机体需要。其能广泛参与线粒体生物合成及能量代谢、肝糖代谢及脂肪酸 β 氧化等多条代谢通路的调节的特点,预示了 PGC-1 基因在代谢综合征的基础研究及临床干预中将可能极具应用前景。

真核基因表达调控中,转录调控是最关键的环节,转录因子通过与目标靶基因的启动子进行结合,从而促进或抑制靶基因的表达,改变生物学程序,最终影响生物体生命活动。通过对目标靶基因的启动子区域进行筛查,一方面能发现其启动子核苷酸序列中可能存在的特定人群中的 SNP 标记,间接通过连锁分析和连锁不平衡分析实现致病基因的定位研究;另一方面还可能直接发现启动子中的致病突变 SNP,由于此 SNP 发生突变,改变了转录因子和位于启动子中的顺式调控元件的结合状态,从而影响目标靶基因表达量改变,最终导致病理状态的发生。可见,在疾病遗传学的研究中,基因启动子区段的扫描是发现特定群体中 SNP 分布特点及规律的有力手段。

经现有国内外文献检索,全世界未见任何关于人类 PGC-1 基因启动子区域序列中第三代分子标记 SNP 的识别及分型研究方法的报道,也未见任何人类 PGC-1 基因启动子中 SNP 和/或其参与构建的单体型与代谢综合征研究的相关报道。

发明内容

本发明的目的是提供一种发现并鉴定中国北方人 PGC-1 基因启动子区域-1998 位 SNP 标记的特异性方法设计及 PCR 引物序列。

本发明的第二个目的是提供一种使用方便、灵敏度高的包含上述引物的检测试剂盒。

为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

一种鉴定 PGC-1 基因启动子序列中 SNP 分子标记的方法,通过提取宿主细胞的基因组 DNA,采用巢式 PCR 结合限制性位点引入 PCR 的方法,测定受试者的 PGC-1 基因启动子-1998 位 SNP 标记的基因型;其中巢式 PCR 的外引物序列如序列表 SEQ ID No. 4 和 SEQ ID No. 5;内引物即限制性位点引入 PCR 的引物序列如序列表 SEQ ID No. 6 和 SEQ ID No. 7。

一种分离核酸,具有序列表 SEQ ID NO. 1 所示的碱基序列,在第-1998 位为 C/G 复等位基因的 SNP 标记 (SEQ ID NO. 1 序列中用 $\square$ 表示)。命名方法为:将 PGC-1 基因翻译起始密码子 ATG 中,腺嘌呤 A 定义为 1 号位时,其下游序列中胸腺嘧啶 T、鸟嘌呤 G 分别为 2、3 号位;同理,其上游序列依次为 0、-1、-2……位,在中国北方人群中,第-1998 位为 C/G 多态性标记。SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列为部分 PGC-1

基因启动子序列。此基因组序列可从 Genbank 中获得, 原始基因组完整序列在 Genbank 中的编号为 (AC092834)。

本领域的技术人员都清楚, 有很多分析方法可以用于检测 PGC-1 基因启动子序列中是否存在单核苷酸多态性。这些技术包括 (但并不限于): DNA 测序、杂交测序、DNA 芯片、PCR-RFLP、PCR-SSCP、酶促错配切割、变性梯度凝胶电泳、变性高效液相色谱 (DHPLC) 等。

首次通过直接测序法, 在中国北方人群中 30 名 2 型糖尿病患者与 10 名年龄、性别匹配正常对照群体间发现中国北方人群中 PGC-1 启动子区域-1998 位存在 C/G 多态性 SNP 标记位点。用于本发明方法或检测试剂盒基于特异设计的引物, 采用两步法巢式 PCR (nested-PCR) 配合限制性位点生成 PCR 法 (Restriction site generation-PCR, RG-PCR) 实现 PGC-1 启动子区域-1998 位 C/G 多态性 SNP 标记位点基因型分型。进行巢式第一步 PCR 反应扩增后得到 SEQ ID NO. 2 所示序列片段, 所使用的引物具有如下序列 (SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5):

SEQ ID NO. 4 5'-GGG CAG GTT AGA ATA TCA A-3';

SEQ ID NO. 5 5'-GGC TAA TGC AGG TAG GTG-3'。

结合限制性位点生成 PCR 法所设计的引物, 被用于进行巢式第二步 PCR 反应使用, 经限制性内切酶消化反应后能够特异性鉴定此 SNP 标记, 扩增后得到 SEQ ID NO. 3 所示序列片段, 所使用的引物具有如下序列 (SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7):

SEQ ID NO. 6 5'-CAG TAG TAT TTC ACA GTG GAT C-3';

SEQ ID NO. 7 5'-AAT AAC AGG AAA ATA CAA CCT C-3'。

一种使用方便、灵敏度高的包含上述引物的检测试剂盒, 它含有所述的 PCR 特异扩增引物 (SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7) 和用于 PCR 扩增检测的试剂盒的常规组件、试剂、缓冲液等, 本领域技术人员熟知这些常规组件和检测方法。检测扩增产物与正常 PGC-1 基因启动子区第-1998 位 SNP 相互对比是否存在变异时, 所需的化学试剂还包括特异性的限制性内切酶等。本发明试剂盒中的全部组分、含量、来源和使用方法如下:

本发明试剂盒供 10 人份检测应用, 其组分、含量和来源包括:

50 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液 (Pharmacia),

50 μ L 10mM dNTP 混合液 (Pharmacia),

10 μ L (2unit/ μ L) Taq DNA 聚合酶 (TAKARA),

各 5 μ L (10pmol/ μ L) SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7

引物,

1ml 纯水,

20 μ L 10 $\times$ K 限制性内切酶反应缓冲液 (TAKARA),

5 μ L (10u/ μ L) 限制性内切酶 *Bam*H I (TAKARA)。

使用方法:

1) 通过 PCR 扩增 PGC-1 基因部分启动子片段, 简言之, 制备混合液, 加入基因组 DNA 溶液 20ng、2 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液、0.4 μ L 10mM dNTP、0.5 μ L Taq DNA 聚合酶、0.3 μ L 正义引物 (SEQ ID NO. 4, 10pmol/ μ L)、0.3 μ L 反义引物 (SEQ ID NO. 5, 10pmol/ μ L), 15.5 μ L 纯水, 使总体积为 20 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 45s、57 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 60s、25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。反应完成后, 将 3 μ L PCR 反应液在 8.0% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测, 如扩增为出 1055bp 的片段, 获得了单一条带, 即为扩增成功。

2) 通过错配碱基设计后, 在第一次 PCR 扩增基础之上, 进行巢式 PCR 扩增 PGC-1 基因部分启动子片段。将聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增成功的第一次 PCR 产物 2 μ L 加入 18 μ L 纯水中, 混匀后从中取出 1 μ L, 加入 2 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液、0.4 μ L 10mM dNTP、0.5 μ L Taq DNA 聚合酶、0.3 μ L 正义引物 (SEQ ID NO. 6, 10pmol/ μ L)、0.3 μ L 反义引物 (SEQ ID NO. 7, 10pmol/ μ L), 15.5 μ L 纯水, 使总体积为 20 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 45s、58 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 45s、30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。反应完成后, 将 3 μ L PCR 反应液在 8.0% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测, 如扩增为出 193bp 的片段, 获得了单一条带, 即为扩增成功。

3) 通过用限制性内切酶处理 PCR 反应产物测定 PGC-1 基因启动子区域-1998 位 SNP 多态性。从聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增成功的第二次 PCR 产物中吸取 3 μ L, 加入 1 μ L 10 $\times$ K 限制性内切酶反应缓冲液、0.3 μ L 限制性内切酶 *Bam*H I (10u/ μ L)、纯水 5.7 μ L, 混匀后在 37 $^{\circ}$ C 水浴中消化 4h。之后, 在 8.0% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。

4) 多态性定型: 用限制性内切酶 *Bam*H I 处理片段, 在 PGC-1 基因启动子区域-1998 位 SNP 碱基是 C 等位基因时, 出现 175bp 和 18bp 的条带。如为 G 等位基因时, 仅出现 193bp 一个条带。

本发明的测定方法测定了来源于人的基因组 DNA, 样品没有限制如, 体液 (如血液、腹水和尿液)、组织细胞 (如肝组织) 等。通过提取和纯化这些样品可制备基因组 DNA。

从基因组 DNA 中, 可扩增含 PGC-1 基因启动子-1998 位突变点的核酸片段, 以获得测

定的大量样本。这种通过两步法巢式PCR配合限制性位点生成PCR方法设计得到含PGC-1基因突变点的DNA片段获得的样品，适于用作测定材料，进行后续SNP的识别和分型。

对此设计无限制，只要用酶切割DNA区获得的片段长度在突变基因和野生型基因的两种情形中不同。因此，根据PCR方法扩增的所需DNA片段，通过上述合理选择的限制性内切酶得以设计。酶切产生的片段通过电泳证实，它们显示特定的条带。根据在上述方法中获得的带型，可测定PGC-1基因启动子区域-1998位SNP的多态性。

在利用本发明进行等位基因分型时，优选使用用于测定根据PGC-1基因的突变类型存在的辅助诊断试剂，辅助诊断试剂包括作为必要成分的特定试剂，其对应于用于测定PGC-1基因突变类型的方法。特定的试剂按采用的测定方法来适当地选择。

本发明的优点是：本发明首次发现了中国北方人群中PGC-1基因启动子区域-1998位存在SNP分子标记（C/G），并详细提供了一种使用方便、灵敏度高的包含上述引物的检测试剂盒方法，该方法可用于PGC-1启动子区域-1998位SNP的识别及鉴定，继而可用于包括中国北方群体中代谢综合征等疾病的早期辅助诊断和筛查。

下面结合具体实施方式对本发明做进一步说明，以使公众对本发明内容有更详尽的了解，并非对本发明的限定，凡是依照本发明公开内容进行的任何本领域公知的等同替换，均属于对本发明的侵犯。

附图说明

图1为PCR-直接测序法所得的多核苷酸序列结果经生物信息学比对后识别PGC-1基因启动子-1998（C/G）SNP标记。

图2为BamH I酶切电泳图谱。其中，1、5、6、7、8、11、12泳道为G/G基因型；2、3、4、9泳道为C/G基因型，10泳道为C/C基因型，13泳道为空白对照，14泳道为分子量标志物（鼎国公司SD011）。

图3为BamH I试剂盒酶切电泳分型方法结果由DNA测序验证图。PGC-1启动子-1998（C/G）SNP使用本专利试剂盒基因型分型结果与DNA测序结果一致。

具体实施方式

用于下列实施例中表示试剂的英文缩写如下。

EDTA：乙二胺四乙酸二钠

SDS：十二烷基硫酸钠

TE：10mM Tris—HCl（pH7.5），1mM EDTA（pH8.0）

10×PCR缓冲液: 100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl, 15mM氯化镁(MgCl₂) 0.01 % (W / V) 白明胶

dNTP: 脱氧核苷三磷酸

APS: 过硫酸铵 → 10×TBE: Tris(108g), 硼酸(55g), EDTA2Na(9.3g), 溶于纯水中, 总体积为1升。

实施例1 血液样本收集和基因组 DNA 的提取

按 WHO (1999) 标准明确诊断入选病例, 须经空腹 8-12 小时口服溶入 300ml 温水中的 75g 无水葡萄糖, 2 小时后检测其血浆葡萄糖值 ≥ 11.1 mmol/L 或者以前经由县市以上级别医院明确诊断的糖尿病患者, 共计收集来自黑龙江和北京的无亲缘关系 T2DM 患者 396 例, 平均年龄 50.0 岁 $\pm$ 12.7 岁, 其中男性 191 例, 同地区的健康对照志愿者 319 例, 平均年龄 45.2 岁 $\pm$ 5.7 岁, 其中男性 181 例。所有受检者均为汉族, 且签署知情同意书, 这一研究也得到了本单位伦理委员会批准。

根据下列方法, 用人外周血制备基因组 DNA。在抗凝剂 EDTA 存在下, 将收集的 10ml 人外周血在 2500rpm, 离心分离 30 分钟除去血清。接着加入 0.2% NaCl 溶液, 使总体积为 50ml。轻轻振荡溶液 5-6 次, 并使其放置于冰上 15 分钟。此后, 在 2500rpm 离心分离 30 分钟, 借此收集沉淀物。用 0.2% 的 NaCl 溶液, 以类似于前面的方式再进行洗涤。在如此获得的沉淀物中, 加入 10mM Tris-HCl (pH8.0) 和 10mM EDTA (4ml), 以悬浮该沉淀物。将 10% SDS, 25mg / ml 的蛋白酶 K 和 10mg / ml 的 RNaseA 加入悬液中, 其加入量分别为 4ml、16ul 和 20ul, 接着上下颠倒悬液轻轻混合。然后, 在 37℃ 过夜温育悬液。过夜后, 加入 4ml 酚 / Tris 溶液, 上下颠倒混合物混合所得的混合物。以 3000rpm 进行离心分离 10 分钟除去水层。将水层和 4ml 酚 / 氯仿溶液混合, 接着逆合并并以 3000rpm 离心分离 10 分钟。除去水层。最后, 用氯仿提取两次, 以获得水相, 往其中加 1 / 10, 3M NaAC (pH5.2), 两倍量的冷无水乙醇, 使 DNA 沉淀。用 70% 的乙醇洗涤以获得基因组 DNA。使这样获得的 DNA, 基因组 DNA 溶解于 TE 中, 然后定量测定混合物在 260nm 的吸光度。DNA 工作液浓度校正至 50ng/ul, 置 -20℃ 冰箱保存。

实施例2 SNP 的识别确定

本发明采用两步法巢式 PCR、错配碱基引入限制性位点方法对 PGC-1 基因启动子区域进行 SNP 标记筛查并进行分型鉴定。

1) 特异性引物如下:

SEQ ID NO.4 5'-GGG CAG GTT AGA ATA TCA A-3';

SEQ ID NO.5 5'-GGC TAA TGC AGG TAG GTG-3'。

SEQ ID NO.6 5'-CAG TAG TAT TTC ACA GTG GAT C-3';

SEQ ID NO.7 5'-AAT AAC AGG AAA ATA CAA CCT C-3'

2) PCR 扩增 PGC-1 基因部分启动子片段: 反应容器中加入实施例 1 制备的基因组 DNA 溶液 20ng、2 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液、0.4 μ L 10mM dNTP、0.5 μ L Taq DNA 聚合酶、0.3 μ L 正义引物 (SEQ ID NO.4, 10pmol/ μ L)、0.3 μ L 反义引物 (SEQ ID NO.5, 10pmol/ μ L), 15.5 μ L 纯水, 使总体积为 20 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 45s、57 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 60s、25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。反应完成后, 将 3 μ L PCR 反应液在 8.0% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, Bio-Rad 凝胶成像系统 Gel Doc2000 检测, 如扩增为 1055bp 的片段, 获得了单一条带, 即为扩增成功。

3) 扩增所得 1055bp 的片段, 纯化后直接进行 PCR 产物测序。委托华大中生科技发展有限公司进行序列测定工作。本工作在中国北方人群中 30 名 2 型糖尿病患者与 10 名年龄、性别匹配正常对照群体中进行。测序结果经 GENESTAR 工具生物信息学多序列比对后 (见图 1), 发现中国北方群体中 PGC-1 启动子区域 -1998 位存在 C/G 多态标记位点。

4) 错配碱基设计内引物进行二次 PCR 扩增: 生物信息学设计含错配碱基引物 SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7 后, 在第一次 PCR 扩增基础之上, 进行巢式 PCR 扩增 PGC-1 基因部分启动子片段。将聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增成功的第一次 PCR 产物 2 μ L 加入 18 μ L 纯水中, 混匀后从中取出 1 μ L, 加入 2 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液、0.4 μ L 10mM dNTP、0.5 μ L Taq DNA 聚合酶、0.3 μ L 正义引物 (SEQ ID NO.6, 10pmol/ μ L)、0.3 μ L 反义引物 (SEQ ID NO.7, 10pmol/ μ L), 15.5 μ L 纯水, 使总体积为 20 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 45s、58 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 45s、30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。反应完成后, 将 3 μ L PCR 反应液在 8.0% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, Bio-Rad 凝胶成像系统 Gel Doc2000 检测, 如扩增为 193bp 的片段, 获得了单一条带, 即为扩增成功。

5) 通过用限制性内切酶处理 PCR 反应产物测定 PGC-1 基因启动子区域 -1998 位 SNP 多态性。从聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增成功的第二次 PCR 产物中吸取 3 μ L, 加入 1 μ L 10 $\times$ K 限制性内切酶反应缓冲液、0.3 μ L 限制性内切酶 *Bam*HI, 纯水 5.7 μ L, 混匀后

在 37℃ 水浴中消化 4h。之后，在 8.0% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。Bio-Rad 凝胶成像系统 Gel Doc2000 检测，如 PGC-1 启动子-1998 位为 C 等位基因时出现 175bp 和 18bp 的条带。如为 T 等位基因时，仅出现 193bp 一个条带，见图 2 所示。

实施例3 检测试剂盒

1) 制备检测 PGC-1 启动子区域-1998 (C/G) SNP 标记的试剂盒，包含有可扩增出含有-1998 (C/G) SNP 标记的 PGC-1 基因部分启动子序列的四条引物，及其 PCR-RFLP 相应试剂，成分和含量如下 (10 人份)，于 -20℃ 保存：

50 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液 (Pharmacia)，

50 μ L 10mM dNTP 混合液 (Pharmacia)，

10 μ L (2unit/ μ L) Taq DNA 聚合酶 (TAKARA)，

各 5 μ L (10pmol/ μ L) SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 引物，

1ml 纯水，

20 μ L 10 $\times$ K 限制性内切酶反应缓冲液 (TAKARA)，

5 μ L (10u/ μ L) 限制性内切酶 *Bam*H I (TAKARA)。

2) 按照本发明中 PGC-1 基因启动子序列中-1998 (C/G) 分型方案设计，使用本实施例中的检测盒对中国北方人群共 396 例 T2DM 患者进行规模化分型实验。根据试剂盒实验分型结果，每种基因型个体中各抽样 5 例个体，取其巢式 PCR 第一步 PCR (使用引物 SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5) 后产物 20 μ L，经脱盐纯化后，由北京华大中生科技发展有限公司测序验证，进行质量控制。质控结果显示，所有样本的 PGC-1 启动子序列-1998 (C/G) SNP 标记位点，经试剂盒基因基因型分型结果与核酸序列测定结果一致 (见图 3 所示)，表明此试剂盒可信度较高，可以用于推广并规模化应用。

本发明具有实用性的例证：

1) 本发明中发现了一种存在于中国北方人群 PGC-1 基因启动子中-1998 位 (C/G) SNP 分子标记，并设计提供了对此 SNP 分子标记检测和特异分型的方法。PGC-1 基因位于人常染色体 4p15.1，此新识别的 SNP 位于 PGC-1 基因启动子序列中第-1998 位，发现此位点存在 C/G 两种复等位基因，可直接应用于或构建单体型后应用于中国北方人群中开展代谢综合征的致病基因定位筛选，并可能运用于代谢综合征的个体患病风险，以利于

开展代谢综合征的早期干预和治疗。

2) 利用本发明阐述的PGC-1基因启动子序列-1998位碱基变异, 作为分子标记运用于DNA芯片产品, 合并其他PGC-1基因区域存在的SNP分子标记, 快速检出PGC-1基因区域多SNP标记突变情况, 综合全效评价PGC-1基因在特定人群中可能存在的代谢综合征病因学意义。

3) 利用本发明阐述的PGC-1基因启动子序列-1998位碱基变异, 作为生物标志物之一, 可用作药物设计的分子靶标的筛选, 以帮助寻找具有调节PGC-1表达的活性分子, 促进代谢综合征新药开发。

4) 本发明建立的检测PGC-1基因启动子-1998位SNP多态性的核酸序列和特异性的引物设计, 可高灵敏度, 特异性地应用于PGC-1基因启动子-1998位SNP标记分型试剂盒。

本发明叙述了中国北方人群中存在的 PGC-1 基因启动子序列-1998 位 C/G 的新 SNP 标记, 并提供了一种测定 PGC-1 基因启动子序列-1998 位 C/G 的新 SNP 标记多态性的方法。而且, 根据本发明, 只需要少量 DNA 样品就足以测定 PGC-1 基因启动子序列-1998 位 C/G SNP 标记的多态性。结果, 本发明提供了一种测定 PGC-1 基因启动子序列-1998 位 C/G 的新 SNP 标记的方法。

序列表

<110> 卫生部北京医院

<120> 一种鉴定 PGC-1 基因启动子-1998 位 SNP 分子标记的引物、方法及试剂盒

<130>

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 229

<212> DNA

<213> 人属, 人种 (Homo sapiens, human)

<400> 1

aaacacaaat aaaggtatca gtgaatatca caatggaaga atcacatgat aataattaat 60

aaacattgac tcttcttggc caggtgacca atattatttc acagttgatc cttgagggca 120

gagccaatga cctttgtcct gaattttaat aatttactga agttttacat taaatcagaa 180

tataattggg aagaaaatta gtgtttcttt gtggggagtg cagagtaat 229

<210> 2

<211> 1090

<212> DNA

<213> 人属，人种 (Homo sapiens, human)

<400> 2

gggcaggtta gaatatcaaa aattataacg agcctgttct aatgtaaaga acatctctaa	60
aagatgtgaa taggttttaa aaatatgatg aatatctagc attggataaa cacaaataaa	120
ggtatcagtg aatatcacia tggaagaatc acatgataat aattaataaa cattgactct	180
tcttgccag gtgaccaata ttatttcaca gttgatcctt gagggcagag ccaatgacct	240
ttgtcctgaa ttttaataat ttactgaagt ttacattaa atcagaatat aattgggaag	300
aaaattagtg tttctttgtg gggagtgcag agtaatgcca ctaattgctt gtataaaagc	360
attcccgagg ttgtattttc ctgttctttc attagaaaat taaaactaca gtaattttct	420
gctgtttata aaagggaaaa tgtgctggtg aactgtattc agcaaactta aaatgtcaaa	480
gctcttgcc acctttttat gccagtaat gataaactgt caacttcctt acattatttg	540
ggaatttact agcaacttgt tgcagctctc acagcacaca aatctcttat aatatgtatg	600
gtctgaaaga agcagcagtc tgctggtatt ttgtttcttt tgttctttct ttcactttaa	660
tatttgagca atttaatat taaaatatgt gttagggcaa ataaccatgt ttttctgttt	720
aaggagatgg acaatgaaga acagtgtaaa ttaacctcag tagaataatg ctttaciaat	780
tatathtagg taactggggg attgttttca ggtaaattat tatcaagtaa aagaattgag	840

ctgattctaa aagtatatg ggtttaacat tttatgaaa catgtttatt cacacagata 900

catacacgtg tacatctcct gggaacttgg aagggttaag tcagaccact gtcatgttac 960

aggaagtgtt tttccactgt gtccagtacc ttgagtttgt tatgtattca atatgtagtg 1020

tcatacataaa acagttgcac ctacctgcat tagcc 1055

<210> 3

<211> 193

<212> DNA

<213> 人属, 人种 (Homo sapiens, human)

<400> 3

cagtagtatt tcacagtgga tccttgaggg cagagccaat gacctttgtc ctgaatttta 60

ataatttact gaagttttac attaaatcag aatataattg ggaagaaaat tagtgtttct 120

ttgtggggag tgcagagtaa tgccactaat tgcttgata aaagcattcc cgaggttgta 180

ttttcctgtt att 193

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

gggcaggtta gaatatcaa

19

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 5

ggctaattgca ggtaggtg

18

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 6

cagtagtatt tcacagtgga tc

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 7

aataacagga aaatacaacc tc

22

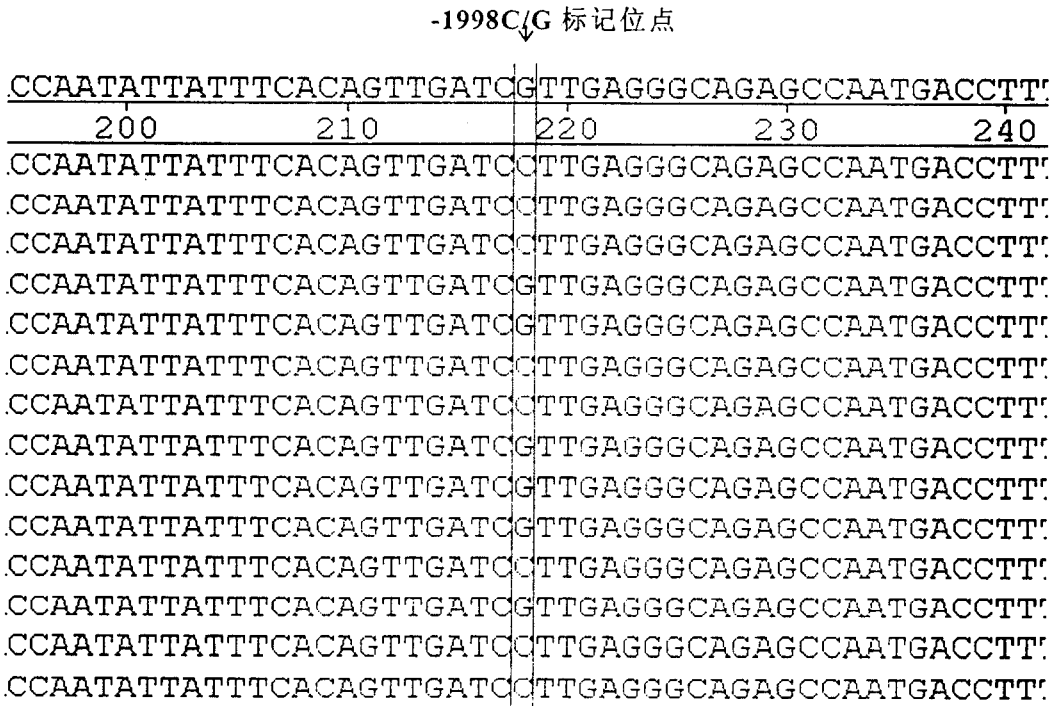


图 1

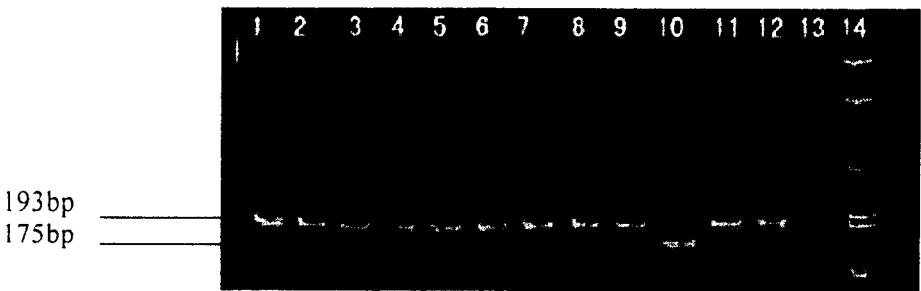


图 2

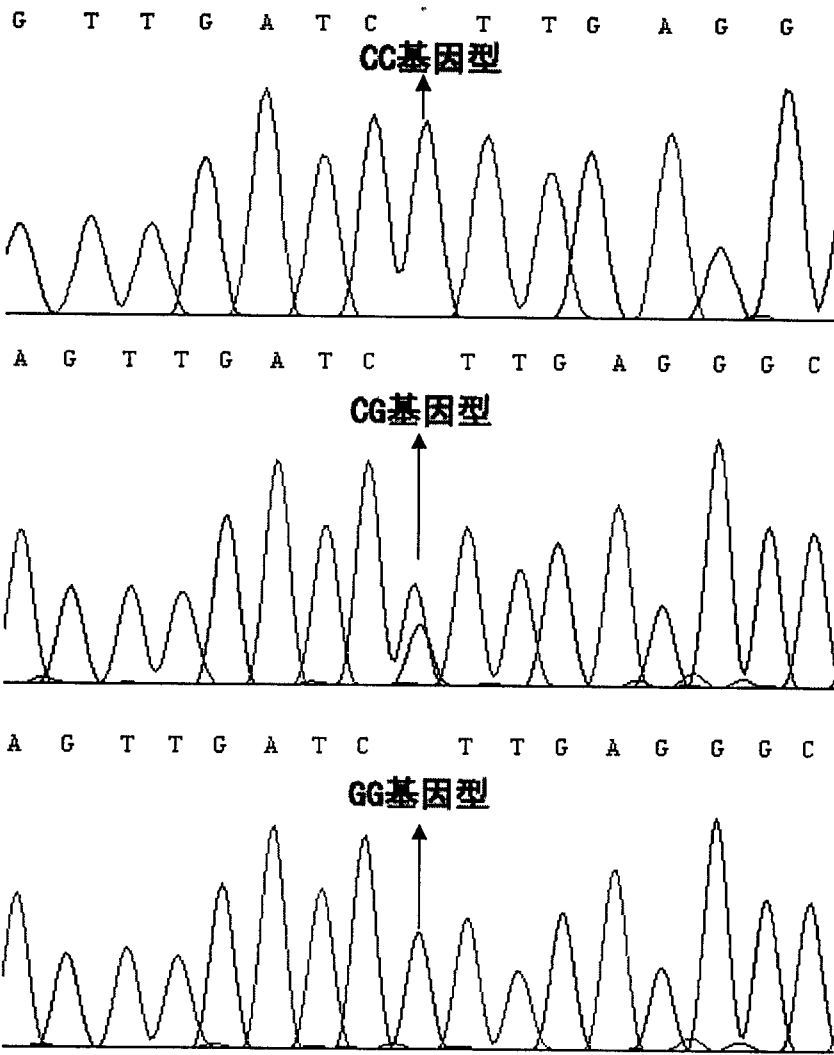


图 3