



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104404044 B

(45)授权公告日 2018.04.27

(21)申请号 201410727064.1

(22)申请日 2014.12.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104404044 A

(43)申请公布日 2015.03.11

(73)专利权人 广东医学院
地址 523000 广东省东莞市松山湖新城大道一号广东医科大学

(72)发明人 熊兴东 成捷

(74)专利代理机构 东莞市华南专利商标事务所
有限公司 44215

代理人 王雪镛

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

WO 2009100029 A1,2009.08.13,

CN 102747072 A,2012.10.24,

CN 102747076 A,2012.10.24,

Michael S. Cunnington,et

al.Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression.《PLoS Genet》.2010,第6卷(第4期),第6页右栏倒数第一段.

审查员 靳春鹏

权利要求书2页 说明书10页

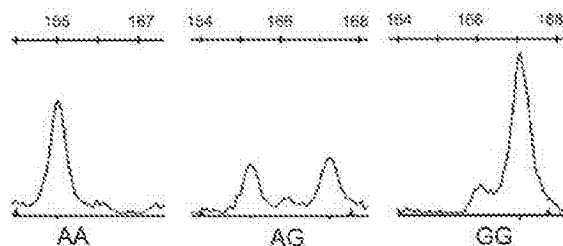
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区单核苷酸多态位点的检测方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及生物技术中心肌梗死相关基因技术领域,具体涉及与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区单核苷酸多态位点的检测方法及其应用。本发明提供了一种与心肌梗死相关的基因ANRIL及其多态位点(rs10965215和rs10738605)及检测该多态的方法,以及在心肌梗死的预防、辅助诊断与治疗等方面的用途。利用本发明提供的与心肌梗死相关的基因及其多态位点的核酸序列,构建对心肌梗死进行遗传学诊断的试剂盒,可应用于对心肌梗死的辅助诊断和对个体是否具有心肌梗死的易感性进行评判,有利于心肌梗死的预防、早期诊断和治疗。



rs10965215的等位位点G和rs10738605的等位位点C增加个体心肌梗死的发病风险。

3. 引物和探针在制备用于检测与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点的试剂盒中的用途,其特征在于:引物为权利要求1所述的用于检测与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点的引物,探针为权利要求2所述的用于检测与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点的特异性探针;所述单核苷酸多态位点rs10965215的等位位点G和rs10738605的等位位点C增加个体心肌梗死的发病风险。

与心肌梗死易感相关的*ANRIL*基因外显子区单核苷酸多态位点的检测方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术中心肌梗死相关基因技术领域,具体涉及与心肌梗死易感相关的*ANRIL*基因外显子区单核苷酸多态位点的检测方法及其应用。

背景技术

[0002] 心肌梗死(coronary artery disease)是目前我国成人心脏病住院和死亡的第一位原因,其发病率和死亡率依然呈上升趋势。一项大规模的回顾性研究预计2030年我国心肌梗死病人将增至2300万。随着我国人口老龄化趋势的加快,人们生活方式的改变以及动脉粥样硬化相关危险因素持续增加,心肌梗死等老年性心血管疾病还将呈持续上升趋势,并成为威胁我国公众健康的重要疾病之一。目前已经证实的心肌梗死主要危险因素包括:高血压、吸烟、血脂异常、糖尿病、超重和肥胖、年龄和性别等。近年来的研究发现,在一些个体中常表现出明显的家族史,提示遗传因素在诱发心肌梗死的过程中发挥重要作用。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)是影响个体对疾病遗传易感的重要遗传因素。

[0003] SNP是指基因组水平上由单个核苷酸变异所引起的DNA序列多态性。SNP是人种之间、个体之间差异的遗传物质基础之一。SNP研究的理论基础是等位基因关联,它是指疾病性状的标记等位基因发生率的显著性改变,代表与疾病性状相关的等位基因在随机发生中的偏差。当一个遗传标记的频率在患者中明显超过非患者时,即表明该标记与疾病关联。SNP在疾病基因定位中所发挥的作用主要包括:一是在疾病定位区域中寻找致病SNP,这种SNP的出现可能直接导致了基因在转录水平和翻译水平上的变化,即改变了基因表达量或者基因产物蛋白质的组成结构,从而导致某种疾病发生或使得个体对某种特殊的环境易感。二是SNP作为一个遗传标记,与疾病或表型紧密连锁。

[0004] 长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)是一类转录本长度超过200nt的功能性RNA分子,它们一般不参与蛋白质编码。lncRNA主要从表观遗传、转录调控及转录后调控等多个层面实现对基因表达的调控,参与调节细胞增殖、分化和凋亡等多种生命进程,并在心血管疾病的发生发展过程中起着至关重要的作用。近年来,lncRNA作为一种功能性RNA分子在心血管疾病方面的作用也越来越受到人们关注。*ANRIL* (antisense noncoding RNA in the *INK4* locus,*ANRIL*) 是*INK4a-ARF-INK4b*基因簇上转录出来的反义非编码RNA,是染色体9p21区域中冠状动脉疾病遗传易感性最强的位点,且与心肌梗死密切相关。最近研究表明,*ANRIL*在冠状动脉性疾病患者外周血PBMCs及动脉粥样斑块中高表达。通过对冠状动脉性疾病患者外周血PBMCs和动脉粥样硬化斑块组织等样本的分析,发现*ANRIL*与动脉粥样硬化密切相关,其表达水平的升高与病情严重程度直接相关,这提示*ANRIL*的表达丰度与冠状动脉粥样硬化的形成直接相关。还有研究发现,*ANRIL*基因的非编码区SNPs如rs1333049、rs10757274、rs2383206、rs2383297和rs10757278的风险等位基因可以显著提高*ANRIL*的表达丰度,并与p14^{ARF}、p15^{INK4b}和p16^{INK4a}的表达丰度密切相关,从而在动脉粥

样硬化的形成过程中发挥重要作用,并进一步引起冠状动脉疾病,提示这些SNP可能通过影响ANRIL的表达,进而促进冠状动脉粥样硬化斑块的形成和发展,并显著增加心肌梗死的发病风险。

[0005] 上述这些对ANRIL与心肌梗死易感的关联研究主要集中在其非编码区SNPs。迄今有关ANRIL基因外显子区的SNPs与心肌梗死遗传易感的关系尚未见报道。非编码RNA基因的外显子区SNPs往往通过直接影响该非编码RNA的空间结构,进而影响其稳定性和表达,因此在疾病易感中更有研究意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一在于针对现有技术的不足,提供与心肌梗死易感相关的ANRIL基因。

[0007] 本发明的目的之二在于针对现有技术的不足,提供与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区单核苷酸多态位点的检测方法。

[0008] 本发明的目的之三在于针对现有技术的不足,提供用于检测与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点的引物。

[0009] 本发明的目的之四在于针对现有技术的不足,提供用于检测与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点的特异性探针。

[0010] 本发明的目的之五在于针对现有技术的不足,提供用于检测与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点的试剂盒。

[0011] 本发明的目的之六在于针对现有技术的不足,提供与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点在对心肌梗死的辅助诊断和对个体是否具有心肌梗死易感性进行判断的应用。

[0012] 为了实现上述目的之一,本发明采用如下技术方案:

[0013] 提供与心肌梗死易感相关的ANRIL基因,所述ANRIL基因的核苷酸序列具有SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2所示的序列;

[0014] 其中,SEQ ID NO: 1所示的序列中,第269位为G;

[0015] SEQ ID NO: 2所示的序列中,第300位为C。

[0016] 所述ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点为:rs10965215,其等位基因点对为G/A(即SEQ ID NO: 1所示的序列中第269位的核苷酸)和所述ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点为:rs10738605,其等位基因点对为C/G(即SEQ ID NO: 2所示的序列中第300位的核苷酸);

[0017] 所述单核苷酸多态位点rs10965215和rs10738605与心肌梗死易感程度相关。

[0018] 为了实现上述目的之二,本发明采用如下技术方案:

[0019] 提供上述所述的与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区单核苷酸多态位点的检测方法,它包括以下步骤:

[0020] 步骤一,确定ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点(rs10965215和rs10738605),即SEQ ID NO: 1所示的序列中第269位的核苷酸和SEQ ID NO: 2所示的序列中第300位的核苷酸;

[0021] 步骤二,采用聚合酶链式反应—连接酶链式反应(PCR-LDR)的分子生物学技术检

附图说明

[0062] 图1是ANRIL基因的多态位点 rs10965215的LDR测序电泳图。

[0063] 图2是ANRIL 基因的多态位点rs10738605的LDR测序电泳图。

具体实施方式

[0064] 为了使本发明所解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合附图和实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0065] 实施例1。

[0066] 与心肌梗死易感相关的ANRIL基因,该ANRIL基因的核苷酸序列具有SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2所示的序列;

[0067] 其中,SEQ ID NO: 1所示的序列中,第269位为G;

[0068] SEQ ID NO: 2所示的序列中,第300位为C。

[0069] 其中,该ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点为:rs10965215,其等位基因点对为G/A(即SEQ ID NO: 1所示的序列中第269位的核苷酸)和该ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点为:rs10738605,其等位基因点对为C/G(即SEQ ID NO: 2所示的序列中第300位的核苷酸);

[0070] 该单核苷酸多态位点rs10965215和rs10738605与心肌梗死易感程度相关。

[0071] 实施例2。

[0072] 与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区单核苷酸多态位点的检测方法,它包括以下步骤:

[0073] 步骤一,确定ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点(rs10965215和rs10738605),即SEQ ID NO: 1所示的序列中第269位的核苷酸和SEQ ID NO: 2所示的序列中第300位的核苷酸;

[0074] 步骤二,采用聚合酶链式反应—连接酶链式反应(PCR-LDR)的分子生物学技术检测所检测样品中的ANRIL基因外显子区是否存在单核苷酸多态性以及单核苷酸多态的类型。

[0075] 其中,步骤二中,聚合酶链式反应体系为:每个样品进行两个总体积为20u1体系的扩增反应,分别扩增出SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2所示的序列,并包括:所制备的基因组DNA稀释液1u1,2mM dNTP 2u1,3mM MgCl₂ 0.6u1,对应的正反向扩增引物各1.0u1,1×Buffer 2u1,1个单位的Taq DNA聚合酶0.2u1,ddH₂O 12.2u1;

[0076] 聚合酶链式反应程序为:SEQ ID NO: 1所示序列的扩增反应在95℃预变性2分钟,94℃变性30秒后,进行40个50℃退火1分30秒,65℃延伸30秒的扩增循环,最后进行65℃10分钟的补平;SEQ ID NO: 2所示序列的扩增反应在95℃预变性2分钟,94℃变性30秒后,进行40个53℃退火1分30秒,72℃延伸30秒的扩增循环,最后进行72℃10分钟的补平。

[0077] 其中,步骤二中,连接酶链式反应体系以总量10μL计包括:PCR 产物4u1,特异性探针1u1,1×Buffer 1u1,2个单位的连接酶0.05u1,ddH₂O 4u1;

[0078] 连接酶链式反应程序为:反应在95℃预变性2分钟后,进行40个94℃变性15s,50℃

[0106] 与心肌梗死易感相关的ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点在对心肌梗死的辅助诊断和对个体是否具有心肌梗死易感性进行判断的应用,该ANRIL基因外显子区的单核苷酸多态位点为实施例1的rs10965215和rs10738605。

[0107] 实验

[0108] 一、血液样本的收集和基因组DNA的提取

[0109] 从佛山市第一人民医院和广东医学院附属医院采集到的286份心肌梗死标本,平均年龄 62.03 ± 12.04 岁(标准差),其中222例为男性。心肌梗死诊断标准参照国际心脏病学会及WHO临床命名《缺血性心脏病的命名及诊断标准》,所有患者均根据典型的临床表现,特异性的心电图改变以及心肌酶浓度测量发现,并全部经冠状动脉造影证实。对照组是经心脏ECT(心脏核素扫描)、冠脉CTA(CT冠脉成像)或冠状动脉造影等检查排除心肌梗死的个体,有646份,平均年龄 61.58 ± 12.28 岁(标准差),其中378例为男性。所有心肌梗死患者和正常对照个体均为无血缘关系的华南地区汉族人群,排除先天性心脏病、心肌病、严重肝脏和肾脏疾病,其基本特征见表1。

[0110] 用TIANamp血液基因组提取试剂盒(TIANGEN)从上述收集到的血液标本提取基因组DNA后,将样品DNA统一稀释为 $20\text{ng}/\mu\text{l}$,作为DNA模板。

[0111] 表1 对照组和心肌梗死组的基本特征

	对照组(n = 646)	心肌梗死(n = 286)	<i>P</i> ^a
年龄(岁)	61.58 ± 12.28	62.03 ± 12.04	0.598
男性(比例)	378 (58.5%)	222 (77.6%)	<0.001
吸烟(比例)	167 (25.9%)	173 (60.5%)	<0.001
喝酒(比例)	91 (14.1%)	79 (27.6%)	<0.001
高血压(比例)	228 (35.3%)	181 (63.3%)	<0.001
糖尿病(比例)	105 (16.3%)	135 (47.2%)	<0.001
高脂血症(比例)	243 (37.6%)	203 (71.0%)	<0.001
收缩压(mm Hg)	132.34 ± 18.81	140.21 ± 19.11	<0.001
舒张压(mm Hg)	72.82 ± 10.41	75.71 ± 11.56	<0.001
空腹血糖(mM)	5.82 ± 1.91	6.61 ± 1.73	<0.001
三酰甘油(mM)	1.49 ± 0.82	2.05 ± 0.95	<0.001
总胆固醇(mM)	4.61 ± 1.14	4.70 ± 1.21	0.266
高密度脂蛋白胆固醇(mM)	1.37 ± 0.67	1.19 ± 0.39	<0.001
低密度脂蛋白胆固醇(mM)	2.64 ± 0.91	3.02 ± 0.96	<0.001

[0112] 其中,表1中a为校正年龄、性别、吸烟、喝酒、高血压、糖尿病和高血脂等变量。

[0114] 二、单核苷酸多态位点的分型

[0115] 本发明采用基于聚合酶链式反应的单核苷酸多态性技术(PCR-LDR),对ANRIL基因外显子区中存在的多态位点rs10965215(其等位基因点对为G/A)和rs10738605(其等位基

- [0001] 基因序列表
- [0002] <110> 广东医学院
- [0003] <120> 与心肌梗死易感相关的*ANRIL*基因外显子区单核苷酸多态位点的检测方法及其应用
- [0004] <160> 2
- [0005] <210> SEQ ID NO: 1
- [0006] <211> 533
- [0007] <212> DNA
- [0008] <213> *ANRIL*
- [0009] <400> SEQ ID NO: 1
- [0010] GGTGACAAAACCATTTGGTAGACAGTGGTTGAGAAACAGAATAGTCTCAGGATATCACTCCGTAGATTTA
TTCATTAATTA AAAAGAGAAAATGTGCTTTGAGAGAGAGAAAAGCTATTACCGTCTTTATCAAATAGGAGAGCCTGAT
CATGTGTGGTCTGAAGTTTATCTAATGGGATTCCTGATGGAATGTTTAGTCTGAATCTAATCACATAGAGACTTGTC
TGACAAATCCAGATTTTTTGGATGTTTTGCAGGACTATTTGCCACGACATTTCAAAGGATCCAAGAGAGAATATTG
GTGTCCATGCTGTGATGATTCCTCAGCTCCTCTCATCTGATCTCCGTCCTGGCCCCATGACTTTCTTTGTGGTAGT
TAGGGTGTGGTATGTGCCACTGAGGCCACACCTATTGCTGTAAGTGCTGTTGGGAAACCATCATCTTTCAGGTCT
GTGTGATAAAAGAAGAGCCTTGGGGAAATGTTCTCTCCAAATTTAATCTTTACATTATTAGAAAATATTTTGATGA
CC
- [0011] <210> SEQ ID NO: 2
- [0012] <211> 534
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> *ANRIL*
- [0015] <400> SEQ ID NO: 2
- [0016] TGACAATGAGAAATATTTAATGGCAAACCTTAGTCTTCTAATTTGAAAATGGAAATCATAACAGTTCTTG
CCTCTTAGGGATAGTGTGAGACAAGTGAAATAATCCATGTAAGAGGTATAGTACTATGCTTGCCATTCTTTAAGAGC
TCAACAAATATTTCACTTTTTACCTATTAGTATCAATCTTAATTCTAAAATTCTATTATTTAATATTTTCCAGTGGTG
TTTCTAAATAATATCTAATGACTAGGCTAATACACTATGTGGTCTTCTAGGGTTCAAGCATCACTGTTAGGTGTGC
TGGAATCCTTTCCCGAGTCAGTACTGCTTTCTAGAAGAAAACCGGGGAGATCTATTTGGAATGTATCTAACTCCAAA
GAAACCATCAGAGGTAACAGGTAGGAGATATGAAACGACCTTTTAGATATGAACCCTAATTGAATAAAAAGTTGCCAA
ACAACCTGTTCCCAAACATCTAAAGAAGAGTTTTAGTCTAAGTGGAATGGCTGGAGAGTATGGGAAGAGTTCTTTCCT
ACT

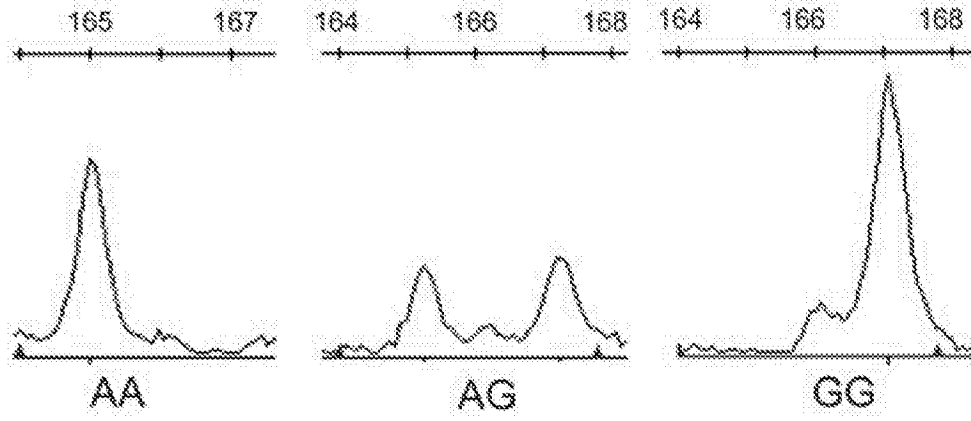


图1

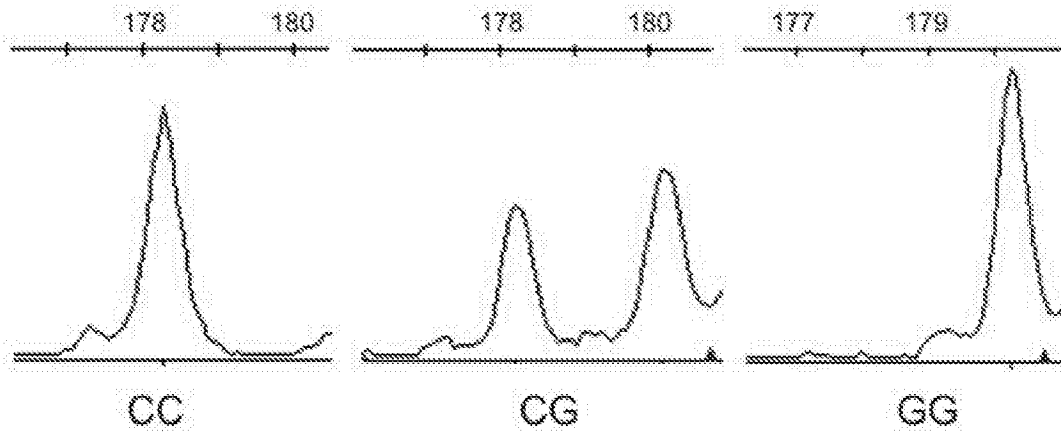


图2