



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105177160 B

(45)授权公告日 2018.10.16

(21)申请号 201510673660.0

CN 104673925 A,2015.06.03,

(22)申请日 2015.10.16

CN 104313698 A,2015.01.28,

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105177160 A

傅启华等.新生儿遗传代谢疾病的实验室筛查与诊断.《中华检验医学杂志》.2014,第37卷(第4期),第248-251页.

(43)申请公布日 2015.12.23

Sarah DK et al..Molecular diagnostics for congenital hearing loss including 15 deafness genes using a next generation sequencing platform.《BMC medical genomics》.2012,第5卷(第17期),摘要,方法,图3.

(73)专利权人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 谭海芹 余文菁 洪旭涛 宓娅娜

(74)专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司 33212

代理人 金祺

周帆等.第二代测序在检测人类基因突变中的应用.《生命科学研究》.2012,第16卷(第5期),第451-456页.

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

Bhattacharjee A et al..Development of DNA Confirmatory and High-Risk Diagnostic Testing for Newborns Using Targeted Next-Generation DNA Sequencing.《Genet Med》.2014,第17卷(第5期),材料和方法,结果,图1.

(56)对比文件

CN 104372093 A,2015.02.25,

CN 104884633 A,2015.09.02,

CN 104812947 A,2015.07.29,

审查员 王胜佳

权利要求书7页 说明书23页

序列表2页 附图4页

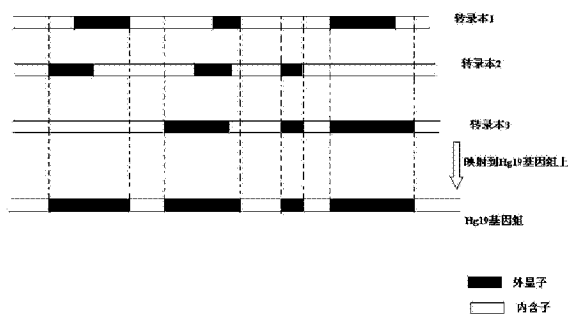
(54)发明名称

检测多种新生儿遗传代谢病致病基因的引物及试剂盒

于检测22种常见新生儿遗传病相关的基因。

(57)摘要

本发明公开了一种用于新生儿遗传代谢疾病基因体外定性检测的引物的设计方式,包括如下步骤:1)、获得遗传病相关的致病基因信息:通过OMIM数据库获得多种遗传性疾病相关的致病基因信息,包括基因位置信息、突变位点信息,然后根据得到的基因信息从NCBI数据库得到相关基因的外显子及内含子信息;2)、针对相关基因设计引物:对于每个基因的外显子及外显子内含子结合区域设计对应的特异性引物F1和R1。本发明还同时公开了综合征型耳聋的第一轮PCR引物序列列表、G6PD基因的第一轮PCR引物序列列表、SLC12A3基因第一轮PCR引物序列列表。本发明能用



CN 105177160 B

1. 用于新生儿遗传代谢疾病基因体外定性检测的引物的设计方式,其特征是包括如下步骤:

1)、获得遗传病相关的致病基因信息:

通过OMIM数据库获得多种遗传性疾病相关的致病基因信息,包括基因位置信息、突变位点信息,然后根据得到的基因信息从NCBI数据库得到相关基因的外显子及内含子信息;

2)、针对相关基因设计引物:

对于每个基因的外显子及外显子内含子结合区域设计对应的特异性引物F1和R1,设计原则为:每个外显子外延5bp,以保证将外显子内含子结合区域包含在内;引物序列区保守,即不存在突变或SNP, T_m 值均一, T_m 值的差异在 5°C 之内;扩增产物至少有10bp的重叠区;在每对引物前加上一段自行设计的序列A1和A2以及一段6个碱基的识别序列,用以二代测序结果的识别;

A1和A2的序列如下:

A1 (5' -3') : TCTTCCCTACCGACGCTCTCCGATCT

A2 (5' -3') : GTGACTGGAGTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT

识别序列有12个,分别为ATCACG, TTAGGC, ACAGTG, TGACCA, GCCAAT, CAGATC, ACTTGA, ATCACG, TAGCTT, GGCTAC, CTTGTA, GATCAG, 每段识别序列可随机加到F1和R1中, F1和R1中识别序列的组合方式可以作为测序结果中样品和基因的识别信号;

所得的用于新生儿遗传代谢疾病基因体外定性检测的引物,如表1~表3中的至少1个表格所述;

综合征型耳聋的第一轮PCR引物序列列表如下表1; G6PD基因的第一轮PCR引物序列列表如下表2; SLC12A3基因第一轮PCR引物序列列表如下表3;

表1

引物名称	引物序列 (5' -3')
F1-1	TCTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcacgGGGTCTCAGTGGAACTAACTTAAGT
R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgTCACAGTGTTCATGATTGCAGTGT
F1-2	TCTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtGGTTTGATCTCCTCGATGTCCTTAAAT
R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgACTCCACCAGCATTGGAAAAGATC
F1-3	TCTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcTTGGGAGGAATAACAGTTCTGAACTC

R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgGAAGTAGTTGTCGTAGCAGACGTT
F1-4	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaGCTCATCATTGAGTTCCTCTTCCT
R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgCTTGTATTGCCTGGGTCTGGAT
F1-5	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtgTTTCCTAGGAACTAACAAAACATTGTGTCT
R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgAGACTAGACTTGTGTAATGTTTGCCATTTA
F1-6	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatAGGTAGTTATCACATGATGGTACCTGA
R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgCAAAATGGTATAAGGAAGCTCAGAGTGT
F1-7	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcGTGGGAAGATTCATATGAGAAATTGATTGTG
R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgGCAGTAGCAATTATCGTCTGAAATAAAACA
F1-8	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaTGAGCAAATAACTATCACTTTTCTCGACA
R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgAGAGAGACAGAGAAGGCTGTGTTA
F1-9	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagACAGTGAGTGAGATTCAGTCTCCA
R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgGCCTAGAAGCAGTCTTAGTGCT
F1-10	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttTACCAAGGAACAGTGTTAGGTCT
R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgTGCCAAAGCTCCAAATGTATAATTCAGA
F1-11	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggctacCTTTCATGTCTAATATGTGACTGAGCAGA
R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgCAATAAGGTCTGGTGAAAGAATCCAAC
F1-12	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttgtaAACCCCTATGCAGACACATTGAACA
R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcacgGGGTCCAGGAAATTACTTTGTTTGTFTT
F1-13	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcacgAAACATCAGCAGAATCCAGTTCATAAC
R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGGTAAGCAACCATCTGTACAGA
F1-14	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtGAAAAGAAAGAAAAGTTGAGTGCTGCTA
R1-14	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtCTCATTGCCCTACACAAAGGGA
F1-15	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcGGGCTTACTCGCTTCAAGTT
R1-15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGAAAGCGAGCTCGCTGTAGA
F1-16	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaAGATCTACTCCATCAGACCTTACAATTTCT
R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGATACGTACATGTCATTTGTTTCATTACA
F1-17	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtgAGAACAATACAGCTGAAGAGGATTCTG
R1-17	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGCTATGAAGCCATCTTTTCTGCATTG

F1-18	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatTTTGAAAACCTCCATGGTTTTGCA
R1-18	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGGAATGAAGCAGTGCCAGATTC
F1-19	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcGGTATAACCCTGCTTCTCTGCA
R1-19	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtCCACAATCTAATTTCTCCTCTGGAGTT
F1-20	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGCAGAGTAGGCATGGGAGTTTT
R1-20	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtTAGGAAGTACAAGTCTGAAAGGCCAAATT
F1-21	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagCATATTGCTTTTGATCATCATAAAGGC
R1-21	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtTTGCACCAACCTAATAGAGGTATAATGC
F1-22	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagettATGATCGGTTTAGACACAAAATCCCA
R1-22	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtAGATCACACACAAAATAGGACTATTGAAGG
F1-23	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggctacGTATTTTGTGCTATAGGCAGGCTACTA
R1-23	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGGCCCAGACTCAGAGAATGAAT
F1-24	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttctaTTCAGAGTTAGCTACAGGAAAATGTCATC
R1-24	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtCACTGGATCAAAAAGTTTTTCATGACACTC
F1-25	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcaegCGAGTACAGCTGCAGCTACATG
R1-25	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCGAGTTCCAGGTAAGTTCATTC
F1-26	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtCAGGTGTGAGCAGCCTATCAG
R1-26	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTGGATCTGAGTCCCGCTTGTA
F1-27	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcCTATCTTCTCTGTTGGTGTGGCTT
R1-27	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGCCTAAATGGCTGTTGACATACTTAATAGT
F1-28	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaGCCTCAGTTGACTATGTACTATGGAATT
R1-28	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcAGACCTAGCCAAGATTTTCAGTTCC
F1-29	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtTGATTTGTTTATTGTTGGGTCATTGCT
R1-29	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTAAAGCTTCCATCAATCAGAAATGCAATG
F1-30	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatTGGTATTTATTGATGGTTGGCCTTCT
R1-30	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCCAGTTGGGCATGTGGTAAGAG
F1-31	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcCCAAGATAGCTGCTGTACAGTTTACTTATG
R1-31	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCCACAGGTGTTTGTTAATGAAATAAATGC
F1-32	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGACTTCCCTGATGAGCTATTTTCTTGA

R1-32	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTCAGCTTTAGTCTTGATCACAGGTTT
F1-33	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagAGGTGTGTTCTGTCATTAATGGATATTGAA
R1-33	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGGTTAGAAAGCCATATCTTTCAGGTCATC
F1-34	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttGATAAGCATTGTTGGTTCTCTGAAACTAGC
R1-34	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcACCAGTAAACTTAAGGTATTTGCTTTGTTT
F1-35	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggctacTGAATGGTATGGAAGGGTATATAAGTCA
R1-35	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGGTAAAGCAGGAAAGGAAATAATCAC
F1-36	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttgtaTGCTACAGGGAAACAGAAATGTGG
R1-36	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGCAGTCAGCACTGCACTTAGAG
F1-37	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcaegACTGGTTTGGTTGTTGCGAGAT
R1-37	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCCTCATTGATTTTGAATGTATCCAACACA
F1-38	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtCCATTAGGCTGTCGTGTCGGAAT
R1-38	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGGTGCTATAGTCAGTGAAGTGAAGTCA
F1-39	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcGAGATCAAATCTGTGCGCCCTTTTAAC
R1-39	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaTGCACAGGCTTGGAAGCTAAA
F1-40	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaCTCGGAAATTGGTCTTCTATGAGTACATC
R1-40	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGAACTGTTGTGAATAGGGAGAAATACAGTA
F1-41	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtgAGAAAAGAGACAGCTGTAGGGAGAA
R1-41	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaATGCAGCTGGGAATATCCATGAAA
F1-42	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatCTCTCTCCCACAGTCTCCAAAG
R1-42	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGTGGACATTGCTCAGCATCTCTTA
F1-43	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTeagateGACCTTTAACAGTTCTGAAAAATAGCCTTG
R1-43	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCAAGTGCATTACTATCCAATGTGGATTTTT
F1-44	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGTCAGGGAGATGCTTGCTTTTG
R1-44	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaTATGACAGCCTACTTCTTGGTCAGT
F1-45	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagAAAAAGGATCATCCTTCCGAGACT
R1-45	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGAGACCCAAGTACCAGTTTTTATCCC
F1-46	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttCAGCCATTCTTTCATTTTCTTTTCTCCTT
R1-46	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGCAATTCAGAACGTAGAGAAGAGCT

F1-47	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggetacCACACCACCTCTTGGGATACAG
R1-47	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaAGTTACGTCTAAGATGTGCCATCAAG
F1-48	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttgtaAGAGTCCGACTAATGAAGACACCA
R1-48	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCCTGCTGTGCAAGAGGAAATTC
F1-49	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcaegTACTTAATGTGTCTTGAAGAGCTGTTGT
R1-49	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTacagtgCCATTTAGCACCATTCACTCACTAACTCA
F1-50	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtCATCCCCGTTCCAGTGAGTT
R1-50	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTacagtgGATATGAAGCACCCGCCAGGT

表2

G6PD-F1-1	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTatcaegCTCGAAGGCATCACCTACCATC
G6PD-R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegCTCAACACCCAAGGAGCCCATT
G6PD-F1-2	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTcgatgtGGACCATCTCATTCCCAGCTGTA
G6PD-R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegCCGAAACGGTCGTACACTTC
G6PD-F1-3	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTttaggeGGAATGTGCAGCTGAGGTCAA
G6PD-R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegGCACCAGATTGAGCTGGAGAA
G6PD-F1-4	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTtgaccaTCCACACTGCTCCTTCTCTGTA
G6PD-R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegAGCTCCCAGTGGAGACTCA
G6PD-F1-5	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTacagtgCTTGAAGAAGGGCTCACTCTGT
G6PD-R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegATCAGGCAAGACAGACATGCTT
G6PD-F1-6	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTgceaatCCGGTCTGATAGCTCAGACACT
G6PD-R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegGAGGACGAATTCCTCCAGAACT
G6PD-F1-7	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTeagatATTCAAAAACCAGCCAGAGGACAA
G6PD-R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegCTACGAGGCCGTCACCAAGAACAT
G6PD-F1-8	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTacttgaGTAGGAGGCTGCATCATCGTAC
G6PD-R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegGATGTGCAGAGCTGCTAAGATG
G6PD-F1-9	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTatcaegGCAAGCCTTACATCTGGCTCAT
G6PD-R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegTCAAGCTGGAGGACTTCTTTGC
G6PD-F1-10	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTtagettTACCTGCGCTTCGTCGTC
G6PD-R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegGGGATTCGGGAGCACTACG
G6PD-F1-11	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTggetaeGGTACCCTTGTCTGAGTTCTG
G6PD-R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegCGTCTGAATGATGCAGCTCTGA
G6PD-F1-12	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTcttgtaCTTTCCTCACCTGCCATAAATATAGGG
G6PD-R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTatcaegCTCTCCCTCACAGAACGTGAAG
G6PD-F1-13	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTatcaegGGACATGACAACCTGGGCTTCA
G6PD-R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTcgatgtTGTCATAAGGAGCCTTGTGTTGG
G6PD-F1-14	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTcgatgtCCGGCTTCTTGGTCATCATCTT
G6PD-R1-14	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTcgatgtCCGTCGCTCTATGTGGAGAA
G6PD-F1-15	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTttaggeGAGGAGGAGCTCAACTTAGCAG
G6PD-R1-15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTcgatgtAGTGATTTGGGCAATCAGGTGT

G6PD-F1-16	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGACTtgaccaGGGTCTCAAGGAAGTACGAGA
G6PD-R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTegatgtCCCACCATCTGGTAAGTGTGTC

表3

SLC12A3-F1-1	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCcatcaegTCGCAGCCTATAAAAACCACCC
SLC12A3-R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCcatcaegTATTTCACTGGGGCCTCTCAA
SLC12A3-F1-2	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC cgatgtTTTAAAAGCCCCCAAGCAGC
SLC12A3-R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC cgatgtTTTGTGTGTTTGTAGTCAGCCC
SLC12A3-F1-3	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC ttaggcTACCCTCTTGCCCCATAGAAC
SLC12A3-R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC ttaggcTGCTTTCTAACCTGCACGCTT
SLC12A3-F1-4	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC tgaccaTAGCCTCCTAAGTAGCTGGGA
SLC12A3-R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC tgaccaTCATTGGGTTGGGGAAGTTGG
SLC12A3-F1-5	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC acagtgTGGCTGTCTACACCACGAGAT
SLC12A3-R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC acagtgTCCTGGACAGTGTGGCTCTAA
SLC12A3-F1-6	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC gccaatTTAGAGCCACACTGTCCAGG
SLC12A3-R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC gccaatTAGATGGTACCCTGCACCTCC
SLC12A3-F1-7	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC gccaatTAAATCATTTTCTGGCGGGGC
SLC12A3-R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC acagtg TGACACAGGAGGGGCAAGTAT
SLC12A3-F1-8	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC acagtg TCCTCCTCTCTGTGCTGGAA
SLC12A3-R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTCCACTGCCATGAAGATGCTC
SLC12A3-F1-9	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTCCATGCTCTCCTTCCCTCCTC
SLC12A3-R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTGCACTTCATTCCTACTGCG
SLC12A3-F1-10	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggcTAGGGAATGAAGTGCCACAGA
SLC12A3-R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTGATGGATGGCTTCGGGTAGA
SLC12A3-F1-11	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTTCTACCCGAAGCCATCCATC
SLC12A3-R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTGAGGAGACAGGAGAAGAGCC
SLC12A3-F1-12	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTGGTCATCCCATAGCCTGATG
SLC12A3-R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTCTGAGGTGGGTGAAGGGTTT
SLC12A3-F1-13	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTGTCTGTGGCTGTATTTGGC
SLC12A3-R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC acagtg TGATAAAGGGGAGGGGCAGAG
SLC12A3-F1-14	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC acagtg TAACTTTTCAACGTGCAGCCA
SLC12A3-R1-14	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTAAACCCAAAGCACGTTTCCA
SLC12A3-F1-15	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtgTCCAAAAGAGCAGGAAGAGCC
SLC12A3-R1-15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTGAAGGGGAGAGAATGGGGTC
SLC12A3-F1-16	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTTCTGGGCAAAAGAAAAGGGC
SLC12A3-R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTGCAGGTTTATTGCAGTGAAG
SLC12A3-F1-17	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggcTAGGGATGTAGGGTGTGGTG
SLC12A3-R1-17	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTACTACAGATGCCAGCCACTT
SLC12A3-F1-18	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTTCCATGGGCAGAGTTGAGTT
SLC12A3-R1-18	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTTGGGAAAAGTGTGGCTCTT
SLC12A3-F1-19	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggcTCCAGGGCTAGGGGAAGTATG
SLC12A3-R1-19	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTACTCCAGTTACTCAGGCACC
SLC12A3-F1-20	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTCCGGGAGAGAGAAGCTGAAA
SLC12A3-R1-20	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTCATGGCGACTTCAGCTCTTC

SLC12A3-F1-21	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTCTTGTTCATGACTCACGGGGA
SLC12A3-R1-21	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTTAACTCCCCCTCCCCTGTCGTA
SLC12A3-F1-22	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTTCTCTTCCCTCTACCCTGCT
SLC12A3-R1-22	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgtTTTGGCCCTTCTGCTTCCTA
SLC12A3-F1-23	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtgtGCCCCGTGGTAATCTCTCTT
SLC12A3-R1-23	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCatcaegTCTGTCAAGATTCACGCCCAG
SLC12A3-F1-24	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCatcaegTGTGTTGAGCTCCTGACCTCA
SLC12A3-R1-24	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgtTCTGCTTTTCTTCCCGGTGAG
SLC12A3-F1-25	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTAAGAGCACTGCCATCGAATG
SLC12A3-R1-25	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgtTCCCAGAATCCAGCTCAATG

2. 试剂盒,其特征是:该试剂盒含有如权利要求1所述的引物,该试剂盒能同时检测多种新生儿遗传病。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征是:

可以用于检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症、遗传性非综合征耳聋、Gitelman综合征这3种常见新生儿遗传病相关的基因。

检测多种新生儿遗传代谢病致病基因的引物及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和医学检测领域,特别涉及一种可用于二代测序平台的新生儿遗传代谢病基因检测方法。

背景技术

[0002] 遗传性代谢病(inherited metabolic diseases,IMD)又称为先天性代谢缺陷病(inborn errors of metabolism,IEM)是因为维持机体正常代谢所必需的某种酶、运载蛋白、膜或受体等的编码基因发生突变,使其编码的产物功能发生改变,而出现相应的实验室检查异常和临床症状的一类疾病。它涉及氨基酸、有机酸、脂肪酸、尿素循环、碳水化合物、溶酶体、类固醇等多种物质代谢的异常。该类疾病大多为单基因遗传病,少数为线粒体基因遗传病。这类疾病发病后常呈进行性加重,如未能早期识别诊断、干预、治疗,常导致早期夭折或终身残疾,且以神经、智力残疾为最多,会严重影响人口素质,造成家庭和社区的沉重负担。因此开展IEM的早期筛查,实现早期诊断成为IMD防治的关键,避免和减少残疾儿童的发生,对提高人口素质,推动国民经济发展有着重要的意义。

[0003] 目前,IMD的诊断方法主要有尿显色分析、枯草杆菌抑制试验、酶活性测定、气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)、串联质谱联用技术(MS/MS)、单基因分析等。这些诊断方法用于IMD筛查具有局限性:(1)普遍通量低,一般一次只能检测一种至几十种,不能满足IMD可检出病种的逐年增多,并且需要对遗传性代谢病有准确的预判;(2)不同IMD的检测方法各异,样本多样,如一些疾病检测蛋白水平、而另一些疾病则检测基因水平,有些疾病需要尿液样本、而另一些则需要血液样本。因此不大适合以此开展大规模的遗传性代谢病的筛查,亟需要一种能高通量检测IMD多种疾病的技术。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种常见新生儿遗传代谢病相关基因的高效检测方法,本发明的检测方法旨在降低检测成本。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种用于新生儿遗传代谢疾病基因体外定性检测的引物的设计方式,包括如下步骤:

[0006] 1)、获得遗传病相关的致病基因信息:

[0007] 通过OMIM数据库获得多种(例如为22种)遗传性疾病相关的致病基因信息,包括基因位置信息、突变位点信息,然后根据得到的基因信息从NCBI数据库得到相关基因的外显子及内含子信息;

[0008] 2)、针对相关基因设计引物:

[0009] 对于每个基因的外显子及外显子内含子结合区域设计对应的特异性引物F1和R1,设计原则为:每个外显子外延5bp,以保证将外显子内含子结合区域包含在内;引物序列区保守,即不存在突变或SNP, T_m 值均一, T_m 值的差异在 5°C 之内;扩增产物至少有10bp的重叠区;在每对引物前加上一段自行设计的序列A1和A2以及一段6个碱基的识别序列,用以二代

测序结果的识别；引物F1和R1的序列组成图见原理图，图1；

[0010] 备注说明：A1对应的是F1，A2对应的是R1。

[0011] 由于很多基因会由可变剪切形成的不同外显子组合构成的不同转录本，剪接成每个转录本的外显子在数量或大小上也有所不同，本发明中涉及到的基因的外显子是将目前NCBI中已发现的不同转录本的外显子集合为设计引物的模板，原理见图2。

[0012] 每个扩增片段长度约300bp。

[0013] A1和A2的序列如下：

[0014] A1 (5' -3') : TCTTTCCCTACCGACGCTCTTCCGATCT

[0015] A2 (5' -3') : GTGACTGGAGTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

[0016] 识别序列有12个(择一使用)，分别为ATCACG, TTAGGC, ACAGTG, TGACCA, GCCAAT, CAGATC, ACTTGA, ATCACG, TAGCTT, GGCTAC, CTTGTA, GATCAG, 每段识别序列可随机加到F1和R1中，F1和R1中识别序列的组合方式可以作为测序结果中样品和基因的认识信号。

[0017] 本发明还同时提供了用于新生儿遗传代谢疾病基因体外定性检测的引物：综合征型耳聋的第一轮PCR引物序列列表如下表1；G6PD基因的第一轮PCR引物序列列表如下表2；SLC12A3基因第一轮PCR引物序列列表如下表3；

[0018] 表1

[0019]

引物名称	引物序列 (5' -3')
F1-1	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTatcaegGGGTCTCAGTGGAACTAACTTAAGT
R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcaegTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGT
F1-2	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTcgatgtGGTTTTGATCTCCTCGATGTCCTTAAAT
R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcaegACTCCACCAGCATTGGAAAGATC

[0020]

F1-3	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTttaggcTTGGGAGGAATAACAGTTCTGAACTC
R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcacgGAAGTAGTTGTCGTAGCAGACGTT
F1-4	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTtgaccaGCTCATCATTGAGTTCCTCTTCCCT
R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcacgCTTGTATTGCCTGGGTCTGGAT
F1-5	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTacagtgTTTCCTAGGAACTAACAAAACATTGTGTCT
R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcacgAGACTAGACTTGTGTAATGTTTGGCCATTTA
F1-6	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTgccaatAGGTAGTTATCACATGATGGTACCTGA
R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcacgCAAAATGGTATAAGGAAGCTCAGAGTGT
F1-7	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTcagatcGTGGGAAGATTCATATGAGAATTGATTGTG
R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcaegGCAGTAGCAATTATCGTCTGAAATAAAAAA
F1-8	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTacttgaTGAGCAAATAACTATCACTTTTCTCGACA
R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcacgAGAGAGACAGAGAAGGCTGTGTTA
F1-9	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTgatcagACAGTGAGTGAGATTCAGTCTCCA
R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcacgGCCTAGAAGCAGTCTTAGTGCT
F1-10	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTtagettTACCAAGGAACAGTGTGTAGGTCT
R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcacgTGCCAAAGCTCCAAATGTATAATTCAGA
F1-11	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTggctacCTTTCATGTCTAATATGTGACTGAGCAGA
R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcaegCAATAAGGTCTGGTCAAAGAATCCAAC
F1-12	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTettgtaAACCCATATGCAGACACATTGAACA
R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTatcaegGGGTCCAGGAAATTACTTTGTTTTGTTTT
F1-13	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTatcaegAAACATCAGCAGAAATCCAGTTCATAAC
R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTegatgtGGTAAGCAACCATCTGTACAGA
F1-14	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTcgatgtGAAAAGAAAAGAAAGTTGAGTGCTGCTA
R1-14	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTcgatgtCTCATTGCCCTACACAAAGGGA
F1-15	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTttaggcGGGCTTACTCGCTTCAAGTT
R1-15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTcgatgtGAAAGCGAGCTCGCTGTAGA
F1-16	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTtgaccaAGATCTACTCCATCAGACCTTACAATTTCT
R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTcgatgtTGATACGTACATGTCATTTGTTCAATCACA
F1-17	TCTTTCCCTAACGACGCTCTTCCGATCTacagtgAGAACAATACAGCTGAAGAGGATTCTG

[0021]

R1-17	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGCTATGAAGCCATCTTTTCTGCATTTG
F1-18	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatTTTGAAAACCTCCATGGTTTTGCA
R1-18	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGGAATGAAGCAGTGCCAGATTC
F1-19	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcGGTATAACCCTGCTTCTCTGCA
R1-19	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtCCACAATTCTAATTTCTCCTCTGGAGTT
F1-20	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGCAGAGTAGGCAITGGGAGTTTT
R1-20	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtTAGGAAGTACAAGTCTGAAAGGCAAATT
F1-21	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagCATATTGCTTTTGCATCATCATAAAGGC
R1-21	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtTTGCACCAACCTAATAGAGGTATAATGC
F1-22	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttATGATCGGTTTAGACACAAAATCCCA
R1-22	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtAGATCACACACAAAATAGGACTATTGAAGG
F1-23	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggctacGTATTTTGTGCTATAGGCAGGCTACTA
R1-23	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGGCCCAGACTCAGAGAATGAAT
F1-24	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttgtaTTCAGAGTTAGCTACAGGAAAAATGTCATC
R1-24	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtCACTGGATCAAAAAGTTTTTCATGACACTC
F1-25	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTateacgCGAGTACAGCTGCAGCTACATG
R1-25	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCGAGTTTCCAGGTAAGTTCATTTC
F1-26	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtCAGGTGTGAGCAGCCTATCAG
R1-26	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTGGATCTGAGTCCCGCTTGTA
F1-27	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcCTATCTTCTCTGTTGGTGTGGCTT
R1-27	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGCCTAAAATGGCTGTTGACATACTTAATAGT
F1-28	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaGCCTCAGTTGACTATGTACTATGGAATT
R1-28	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcAGACCTAGCCAAGATTTTCAGTTCC
F1-29	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtTGATTTGTTTATTTGTTGGGTCATTGCT
R1-29	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTAAAGCTCCATCAATCAGAAATGCAATG
F1-30	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatTGGTATTTATIGATGGTTGGCCTTCT
R1-30	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCCAGTTGGGCATGTGGTAAGAG
F1-31	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcCCAAGATAGCTGCTGTACAGTTTACTTATG
R1-31	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCCACAGGTGTTTGTTTAATGAAATAAATGC

[0022]

F1-32	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGACTTCCCTGATGAGCTATTTTCTTGA
R1-32	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTCAGCTTTAGTCTTGATCACAGGTTT
F1-33	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagAGGTGTGTTCTGTCAATTAATGGATATTGAA
R1-33	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGGTTAGAAGCCATATCTTTCAGGTCATC
F1-34	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttGATAAGCATTTTGGTTCTCTGAACTAGC
R1-34	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcACCAGTAAACTTAAGGTATTTGCTTTGTTT
F1-35	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTggetacTGAATGGTATGGAAGGGTATATAAGTCA
R1-35	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGGGTAAAGCAGGAAAGGAAATAATCAC
F1-36	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttghtaTGCTACAGGGAAACAGAAATGTGG
R1-36	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGCAGTCAGCACTGCACCTTAGAG
F1-37	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTateacgACTGGTTTGGTTGTTCCGAGAT
R1-37	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCCTCATTGATTTTGAATGTATCCAACACA
F1-38	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtCCATTAGGCTGTCTGTCGGAAT
R1-38	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGGTGCTATAGTCAGTGAACCTGAACTC
F1-39	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcGAGATCAAATCTGTGCCCTTTTAAC
R1-39	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaTGCACAGGCTTGGAAGCTAAA
F1-40	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaCTCGAAATTTGGTCTTCTATGAGTACATC
R1-40	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGAACTGTTGTGAATAGGGAGAAATACAGTA
F1-41	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtgAGAAAAGAGACAGCTGTAGGGAGAA
R1-41	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaATGCAGCTGGGAATATCCATGAAA
F1-42	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatCTCTCTTCCCACAGTCTCCAAAG
R1-42	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGTGGACATTGCTCAGCATCTCTTA
F1-43	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcGACCTTTAACAGTTCTGAAAAATAGCCTTG
R1-43	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCAAGTGCATTACTATCCAATGTGGATTTTT
F1-44	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGTCAGGGAGATGCTTGCTTTTG
R1-44	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaTATGACAGCCTACTTCTTGGTCAGT
F1-45	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagAAAAAGGATCATCCTTTCCGAGACT
R1-45	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGAGACCCAAGTACCAGTTTTTATCCC
F1-46	TCTTTCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttCAGCCATTTCTTTCATTTTCTTTTCTCCTT

[0023]

R1-46	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGCAATTCAGAACGTAGAGAAGAGCT
F1-47	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggctacCACACCACCTCTTGGGATACAG
R1-47	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaAGTTACGTCTAAGATGTGCCATCAAG
F1-48	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTottgtaAGAGTCCCTGACTAATGAAGACACCA
R1-48	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCCTGCTGTGCAAGAGGAAATTC
F1-49	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTateacgTTACTTAATGTGTCTTGAAGAGCTGTGT
R1-49	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTacagtgCCATTTAGACCATTCACTACTAATCA
F1-50	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTegatgtCATCCCCGTTCCAGTGAGTT
R1-50	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTacagtgGATATGAAGCACC GCCAGGT

[0024] 表2

[0025]

G6PD-F1-1	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTateacgCTCGAAGGCATCACCTACCATC
G6PD-R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgCTCAACACCCAAGGAGCCCATT
G6PD-F1-2	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTegatgtGGACCATCTCATTCCCAGCTGTA
G6PD-R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgCCGAAACGGTCGTACACTTC
G6PD-F1-3	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTttaggcGGAATGTGCAGCTGAGGTCAA
G6PD-R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgGCACCAGATTGAGCTGGAGAA
G6PD-F1-4	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTtgaccaTCCACACTGCTCCTTCTCTGTA
G6PD-R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgAGCTCCCAGTACACTCA
G6PD-F1-5	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTacagtgCTTGAAGAAGGGCTCACTCTGT
G6PD-R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgATCAGGCAAGACAGACATGCTT
G6PD-F1-6	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTgccaatCCGGTCTGATAGCTCAGACACT
G6PD-R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgGAGGACGAATTCCTCCAGAACT
G6PD-F1-7	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTeagatcATTCAAAACCAGCCAGAGGACAA
G6PD-R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgCTACGAGGCCGTCACCAAGAACAT
G6PD-F1-8	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTaettgaGTAGGAGGCTGCATCATCGTAC
G6PD-R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgGATGTGCAGAGCTGCTAAGATG
G6PD-F1-9	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTateacgGCAAGCCTTACATCTGGCTCAT
G6PD-R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgTCAAGCTGGAGGACTTCTTTGC
G6PD-F1-10	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTtagettTACCTGCGCTTCGTCTGTC
G6PD-R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgGGGATTCCGGAGCACTACG
G6PD-F1-11	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTggctacGGTACCCTTGTCTGAGTTCTG
G6PD-R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgCGTCTGAATGATGCAGCTCTGA
G6PD-F1-12	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTettgtaCTTTCCTCACCTGCCATAAATATAGGG
G6PD-R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgCTCTCCCTCACAGAACGTGAAG
G6PD-F1-13	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTateacgGGACATGACAACCTTGGGCTTCA
G6PD-R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTegatgtGTCACTAGGAAGCCTTGTTTGG
G6PD-F1-14	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTegatgtCCGGCTTCTTGGTCATCATCTT

[0026]

G6PD-R1-14	CTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTcgatgtCCGTCGTCCTCTATGTGGAGAA
G6PD-F1-15	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGACTttaggcGAGGAGGAGCTCAACTTAGCAG
G6PD-R1-15	CTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTcgatgtAGTGATTTGGGCAATCAGGTGT
G6PD-F1-16	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGACTtgaccaGGGTCTCAAGGAAGTACGAGA
G6PD-R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTcgatgtCCCACCATCTGGTAAGTGTGTC

[0027] 表3

[0028]

SLC12A3-F1-1	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCcatcacgTCGCAGCCTATAAAAACCACCC
SLC12A3-R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCcatcacgTATTTCACTGGGGCCTCTCAA
SLC12A3-F1-2	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCcgatgtTTTAAAAGCCCTCAAGCAGC
SLC12A3-R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCcgatgtTTTGTGTGTTTAGTGCAGCCC
SLC12A3-F1-3	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggcTACCCCTTGCCCCATAGAAC
SLC12A3-R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTGCTTTCTAACCTGCACGCTT
SLC12A3-F1-4	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTAGCCCTCCTAAGTAGCTGGGA
SLC12A3-R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTCATTGGGTTGGGGAAGTTGG
SLC12A3-F1-5	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtgTGGCTGTCTACACCACGAGAT
SLC12A3-R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTCCTGGACAGTGTGGCTCTAA
SLC12A3-F1-6	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTTTAGAGCCACACTGTCCAGG
SLC12A3-R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTAGATGGTACCCTGCCTCC
SLC12A3-F1-7	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTAAATCATTTTCTGGCGGGGC
SLC12A3-R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTGACACAGGAGGGGCAAGTAT
SLC12A3-F1-8	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtgTCCTTCCTCTCTGTGCTGGAA
SLC12A3-R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTCCACTGCCATGAAGATGCTC
SLC12A3-F1-9	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTCCATGCTCTCCTTCCTCCTC
SLC12A3-R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTGCCTTCATTCCTACTGCG
SLC12A3-F1-10	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggcTAGGGAATGAAGTGCCACAGA
SLC12A3-R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTGATGGATGGCTTCGGGTAGA
SLC12A3-F1-11	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTTCTACCCGAAGCCATCCATC
SLC12A3-R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTGAGGAGACAGGAGAAGAGCC
SLC12A3-F1-12	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTGGTCATCCCATAGCCTGATG
SLC12A3-R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTCTGAGGTGGGTGAAGGGTTT
SLC12A3-F1-13	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTGTCTGTGGCTGTATTGGC
SLC12A3-R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTGATAAAGGGGAGGGGAGAG
SLC12A3-F1-14	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtgTAACTTTTCAACGTGCAGCCA
SLC12A3-R1-14	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTAACACCAAAGCAGTTTCCA
SLC12A3-F1-15	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtgTCCAAAAGAGCAGGAAGAGCC
SLC12A3-R1-15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTGAAGGGGAGAGAATGGGGTC
SLC12A3-F1-16	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTTCTGGGCAAAAAGAAAAGGGC
SLC12A3-R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTGGGAGGTTATTGCAGTGAG
SLC12A3-F1-17	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggcTAGGGATGTAGGGTGTGGTG
SLC12A3-R1-17	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTACTACAGATGCCAGCCACTT
SLC12A3-F1-18	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTTCCATGGGCAGAGTTGAGTT
SLC12A3-R1-18	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTTGGGAAAACATGATGGGCTCT

[0029]

SLC12A3-F1-19	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggcTCCAGGGCTAGGGGAAGTATG
SLC12A3-R1-19	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTACTCCAGTTACTCAGGCACC
SLC12A3-F1-20	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTCCGGGAGAGAGAAGCTGAAA
SLC12A3-R1-20	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggcTCATGGCGACTTCAGCTCTTC
SLC12A3-F1-21	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTCTTGTCATGACTCACGGGGA
SLC12A3-R1-21	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTTAACTCCCCTCCCTGTCGTA
SLC12A3-F1-22	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTTCTCTCCCTTACCCTGCT
SLC12A3-R1-22	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTTTTGGCCCTTCTGCTTCCTA
SLC12A3-F1-23	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtgTGCCCCGTGGTAATCTCTCTT
SLC12A3-R1-23	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCcatcacgTCTGTCAAGATTCACGCCAG
SLC12A3-F1-24	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCcatcacgTGTGTTGAGCTCCTGACCTCA
SLC12A3-R1-24	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTCTGCTTTTCTTCCCGGTGAG
SLC12A3-F1-25	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTAAGAGCACTGCCATCGAATG
SLC12A3-R1-25	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTCCCAGAATCCAGCTCAATG

[0030] 本发明还同时提供了一种试剂盒,该试剂盒含有上述表1~表3所述的引物,该试剂盒能同时检测多种新生儿遗传病。

[0031] 具体而言,该试剂盒可以用于检测苯丙酮尿症、精氨酸血症、精氨基琥珀酸尿症、瓜氨酸血症I型、瓜氨酸血症II型、枫糖尿症、酪氨酸血症I型、酪氨酸血症II型、酪氨酸血症III型、鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症、半乳糖血症、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症、异戊酸血症、丙酸血症、戊二酸血症I型、肉碱转运障碍、肉碱棕榈酰转移酶I缺乏症、肉碱棕榈酰转移酶II缺乏症、遗传性非综合征耳聋、Gitelman综合征这22种常见新生儿遗传病相关的基因。

[0032] 本发明还同时提供了一种新生儿遗传代谢疾病基因体外定性检测的方法。

[0033] 本发明的方案具体如下:

[0034] 1、获得遗传病相关的致病基因信息(同上);

[0035] 2、针对相关基因设计引物(同上),

[0036] 3、PCR扩增目的片段:

[0037] 以人的基因组DNA为模板,起始量为20ng,进行PCR扩增,得到两端分别带有A1和A2识别序列的目的片段,并进行纯化,得到第一次PCR产物P1。

[0038] 4、以P1为模板,进行第二轮PCR扩增。

[0039] 针对第一次的PCR产物P1设计第二轮PCR的引物F2和R2,F2和R2的序列如下:

[0040] F2(5'-3'):

[0041] ATGATACGGCGACCACCGATCTACTCTTTCCCTACACGACGCTC

[0042] R2(5'-3'):

[0043] CAGCAGAAGACGGCATAACGAGTCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTG

[0044] 以P1为模板,起始量为50ng,进行第二轮PCR扩增,得到产物P2,对P2进行纯化,即得到了可以直接用Illumina二代测序平台进行测序的文库L。

[0045] 利用本发明的方法只进行两轮PCR扩增便可以快速地获得致病基因相关的外显子、外显子内含子结合区序列的测序文库,直接可以利用Illumina测序平台进行高通量测序,对于一个样本多个基因的多个外显子,可以将第一轮PCR产物纯化后进行等量混合之

后,作为一个模板进行第二轮PCR扩增,大大节省了操作时间和费用。

[0046] 该方法的原理图如图1和图2所示。

[0047] 本发明所述的方法可以用于检测苯丙酮尿症、精氨酸血症、精氨基琥珀酸尿症、瓜氨酸血症I型、瓜氨酸血症II型、枫糖尿症、酪氨酸血症I型、酪氨酸血症II型、酪氨酸血症III型、鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症、半乳糖血症、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症、异戊酸血症、丙酸血症、戊二酸血症I型、肉碱转运障碍、肉碱棕榈酰转移酶I缺乏症、肉碱棕榈酰转移酶II缺乏症、遗传性非综合征耳聋、Gitelman综合征等22种常见新生儿遗传病相关的基因(如表4所示),该试剂盒可以对22种常见新生儿遗传代谢病相关的40个致病基因的外显子及外显子内含子结合区域的序列进行二代测序和分析、应用该试剂盒能够准确高效的检测相关基因的突变信息,实现对多种新生儿遗传病的高效检测,并能大大降低检测成本。

[0048] 该试剂盒包括的常见新生儿遗传代谢病及相关基因见表4:

[0049] 表4 22种常见新生儿遗传病的基因信息表

[0050]

遗传病名称	相关基因	染色体位置	外显子数	遗传病名称	相关基因	染色体位置	外显子数
苯丙酮尿症	PAH	12q23.2	13	肉碱棕榈酰转移酶II缺乏症	CPT2	1p32.3	5
精氨酸血症	ARG1	9q34.11	8	中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症	ACADM	1p31.1	16
精氨基琥珀酸尿症	ASL	7q11.21	16	甲基丙二酸尿症	MMAA	4q31.21	6
瓜氨酸血症I型	ASS1	9q34.11	14		MMAB	12q24.11	9
瓜氨酸血症II型	SLC25A13	7q21.3	19		MMACHC	1p34.1	4
枫糖尿症	DBT	1p21.2	11		MMADHC	2q23.2	7
	BCKDHB	6q14.1	10		LMBRD1	6q13	16
	BCKDHA	19q13.2	10	CD320	19p13.2	5	

[0051]

酪氨酸血症 I 型	FAH	15q25.1	14		ABCD4	14q24.3	19
酪氨酸血症 II 型	TAT	16q22.2	11		MUT	6p12.3	12
酪氨酸血症 III 型	HPD	12q24.31	15		SUCLG1	2p11.2	9
鸟氨酸甲酰基转移酶缺乏症	OTC	Xp11.4	10		ACSF3	16q24.3	10
半乳糖血症	GALT	9p13.3	12		HCFC1	Xq28	26
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症	G6PD	Xq28	14	非综合征型耳聋	GJB2	13q12.11	2
异戊酸血症	IVD	15q15.1	12		GJB3	1p34.3	2
丙酸血症	PCCB	3q22.3	16		SLC26A4	7q22.3	20
	PCCA	13q32.3	24		12SrRNA	线粒体	
戊二酸血症 I 型	GCDH	19p13.2	12		COCH	14q12	11
原发性肉碱缺乏症	CPT2	1p32.3	5		DFNA5	7p15.3	10
肉碱棕榈酰转移酶 I 缺乏症	CPT1A	11q13.3	19	Gitelman 综合征	SLC12A3	16q13	26

[0052] 综上所述,本发明针对常见且危害性较高的新生儿遗传代谢性疾病,如苯丙酮尿症、精氨酸血症、枫糖尿症、鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症、半乳糖血症、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症、异戊酸血症、遗传性非综合征耳聋、Gitelman综合征等22种常见遗传性疾病,针对常见致病基因设计相应引物,通过多重PCR扩增外显子、外显子内含子结合区域,采用扩增子测序方法,能够高通量检测遗传性疾病,用以快速、简便、高效地筛查遗传性疾病,实现疾病的早期诊断和早期治疗,减少遗传病的致死率和致残率,减轻家庭和社会的负担。

[0053] 本发明具有如下优势与创新点:

[0054] 1. 优势:疾病基因突变位置不是固定的,因此无法用taqman探针法进行检测,必须用测序法。目前,一代测序每次只能检测500—1000bp长度,基因如果达到几百kb,检测会变的非常昂贵,且检测花费时间很长。直接利用全基因组二代测序或者全外显子测序,则成本过高,同时大量无用的测序结果,也会使分析变的非常困难。本发明只针对某些遗传代谢病的致病基因外显子和外显子内含子结合区进行扩增子测序,大大简化了检测程序,并使后续分析更简单,能够快速得到结果。

[0055] 2. 创新点:本发明只需要进行两次PCR扩增,就可以将相关基因的外显子区域扩增出来,其产物可以直接用于二代测序,对于该过程中的第一次PCR扩增的引物设计跟普通的PCR引物相比,在目标片段的引物前端增加了一段特殊的序列和一段6碱基的标识序列,具有创新性;另外本发明首次对基因的不同转录本的外显子区域进行合并,将合并后的外显子集合作为该基因外显子的模板进行引物设计,更全面的覆盖了该基因的外显子区域,能够更多的发现外显子区域的突变位点,使得结果更全面、更可信。

[0056] 备注说明:如果去除本发明所述的“标识序列”会导致在无数的测序序列中无法识

别出本发明所需要的序列;即,无法实现本发明。

附图说明

[0057] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0058] 图1为目的基因外显子扩增原理图;

[0059] 图2为某基因3个转录本的外显子集合方式示意图。

[0060] 图3是SLC26A4基因Sanger测序结果;箭头示c.919-2T>C纯合突变。

[0061] 图3中,上图为标准序列(野生型),下图为患者样本测序结果,箭头表示纯合突变。

[0062] 图4是GJB2基因Sanger测序结果;箭头示c.109G>A (p.Val137Ile) 杂合突变。

[0063] 图4中,上图为标准序列(野生型),下图为患者样本测序结果,箭头表示杂合突变。

[0064] 图5是G6PD基因的Sanger测序结果。上图为正常人的反向序列(野生型),下图为患者样本反向测序结果,箭头处为c.678C>G的纯合突变。

[0065] 图6是SLC12A3基因的Sanger测序结果。上图为正常人序列(野生型),下图为患者样本测序结果,箭头处为移码突变起始处,基因型为杂合性缺失。

具体实施方式

[0066] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0067] 实施例1:本实施例选取了非综合征型耳聋相关致病基因GJB2、GJB3、SLC26A4、12SrRNA、COCH和DFNA5共六个基因,

[0068] 一、样本准备(测序文库的获得)

[0069] 对该基因的外显子及外显子内含子结合区进行两轮PCR扩增获得测序文库的步骤如下:

[0070] 1.致病基因信息的获得。

[0071] 在OMIM(Online Mendelian Inheritance in Man)网站或NCBI的OMIM数据库中进行非综合征型耳聋的搜索,获得与其相关的热点致病基因,得到相关突变位点信息。

[0072] 2.在NCBI中搜索各相关致病基因的外显子和内含子的序列及位置信息。

[0073] 3.多重PCR引物设计与合成

[0074] 针对以上基因的外显子设计相应PCR引物,根据前述设计原则,共设计了50对引物,所有PCR扩增的引物委托英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,HPLC纯化,具体引物序列见表2:

[0075] 表1第一轮PCR引物序列表

[0076]

引物名称	引物序列 (5' -3')
F1-1	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcaegGGGTCTCAGTGGAACTAACTTAAGT
R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegTCACAGTGTTTCATGATTGCAGTGT
F1-2	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtGGTTTTGATCTCCTCGATGTCCTTAAAT
R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegACTCCACCAGCATTGGAAAGATC
F1-3	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcTTGGGAGGAATAACAGTTCTGAACTC
R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegGAAGTAGTTGTCGTAGCAGACGTT
F1-4	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaGCTCATCATTGAGTTCCTCTTCCT
R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegCTTGTTATTGCCTGGGTCTGGAT
F1-5	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtgTTTCCTAGGAACTAACAAAACATTGTGTCT
R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegAGACTAGACTTGTGTAATGTTTGCCATTTA
F1-6	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatAGGTAGTTATCACATGATGGTACCTGA
R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegCAAAATGGTATAAGGAAGCTCAGAGTGT
F1-7	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcGTGGGAAGATTCATATGAGAATTGATTGTG
R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegGCAGTAGCAATTATCGTCTGAAATAAAAACA
F1-8	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaTGAGCAAATAACTATCACTTTTCTCGACA
R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegAGAGAGACAGAGAAGGCTGTGTTA
F1-9	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgateagACAGTGACTGAGATTCAGTCTCCA
R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegGCCTAGAAGCAGTCTTAGTGCT
F1-10	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttTACCAAGGAACAGTGTGTAGGTCT
R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegTGCCAAAGCTCCAAATGTATAAATTCAGA
F1-11	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggctacCTTTCATGTCTAATATGTGACTGAGCAGA
R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaegCAATAAGGTCTGGTGAAAGAATCCAAC
F1-12	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTettgtaAACCCATATGCAGACACATTGAACA

[0077]

R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTatcaagGGGTCCAGGAAATTACTTTGTTTTGTTTT
F1-13	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcaagAAACATCAGCAGAATCCAGTTCATAAC
R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGGTAAGCAACCATCTGTCACAGA
F1-14	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtGAAAAGAAAAGTTGAGTGTGCTA
R1-14	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtCTCATTGCCCTACACAAAGGGA
F1-15	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcGGGCTTACTCGCTTCAAGTT
R1-15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGAAAGCGAGCTCGCTGTAGA
F1-16	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgaceaAGATCTACTCCATCAGACCTTACAATTTCT
R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtTGATACGTACATGTCATTTGTTTCATTCACA
F1-17	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtgAGAACAATACAGCTGAAGAGGATTCTG
R1-17	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGCTATGAAGCCATCTTTTCTGCATTTG
F1-18	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatTTTGAAAACCTCCATGGTTTTGCA
R1-18	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGGAATGAAGCAGTGCCAGATTC
F1-19	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcGGTATAACCCTGCTTCTCTGCA
R1-19	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtCCACAATTCTAATTTCTCTCTGGAGTT
F1-20	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGCAGAGTAGGCATGGGAGTTTT
R1-20	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtTTAGGAAGTACAAGTCTGAAAGGCAAATT
F1-21	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagCATATTGCTTTTGCATCATCATAAAGGC
R1-21	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtTTGCACCAACCTAATAGAGGTATAATGC
F1-22	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttATGATCGGTTTAGACACAAAATCCCA
R1-22	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtAGATCACACACAAATAGGACTAATGAAGG
F1-23	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggetaeGTATTTTGTGCTATAGGCAGGCTACTA
R1-23	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtGGCCCAGACTCAGAGAATGAAT
F1-24	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttghttCAGAGTTAGCTACAGGAAAATGTCATC
R1-24	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTcgatgtCACTGGATCAAAAAGTTTTTCATGACACTC
F1-25	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcaegCGAGTACAGCTGCAGCTACATG
R1-25	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCGAGTTTCCCAGGTAAGTTCATTTC
F1-26	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcgatgtCAGGTGTGACGAGCCTATCAG
R1-26	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTGGATCTGAGTCCCGCTTGTA

[0078]

F1-27	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcCTATCTTCTCTGTTGGTGTGGCTT
R1-27	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGCCTAAATGGCTGTTGACATACTTAATAGT
F1-28	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaGCCTCAGTTGACTATGTACTATGGAATT
R1-28	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcAGACCTAGCCAAGATTTTCAGTTCC
F1-29	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtGTGATTTGTTTATTGTTGGGTCATTGCT
R1-29	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTAAAGCTTCCATCAATCAGAAATGCAATG
F1-30	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatTGGTATTTATTGATGGTTGGCCTTCT
R1-30	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCCAGTTGGGCATGTGGTAAGAG
F1-31	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagatcCCAAGATAGCTGCTGTACAGTTTACTTATG
R1-31	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcCCACAGGTGTTGTTTAATGAAATAAATGC
F1-32	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGACTTCCCTGATGAGCTATTTTCTTGA
R1-32	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcTCAGCTTTAGTCTTGATCACAGGTTT
F1-33	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgatcagAGGTGTGTCTGTCATTAATGGATATTGAA
R1-33	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGGTTAGAAGCCATATCTTTCAGGTCATC
F1-34	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagcttGATAAGCATTGTTGTTCTCTGAAACTAGC
R1-34	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcACCAGTAAACTTAAGGTATTTGCTTTGTTT
F1-35	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggctacTGGAAATGGTATGGAAGGGTATATAAGTCA
R1-35	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGGTAAAGCAGGAAAGGAAATAATCAC
F1-36	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttgtaTGCTACAGGGAAACAGAAATGTGG
R1-36	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTttaggcGCAGTCAGCACTGCACTTAGAG
F1-37	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTateacgACTGGTTTGGTTGTTTCGCAGAT
R1-37	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCCTCATTGATTTTGAATGTATCCAACACA
F1-38	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTc gatgtCCATTAGGCTGTCTGTCGGAAT
R1-38	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGGTGCTATAGTCAGTGAAACTGAACTC
F1-39	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTttaggcGAGATCAAATCTGTCGCCCTTTTAAC
R1-39	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaTGCACAGGCTTGGAAAGCTAAA
F1-40	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtgaccaCTCGGAAATGGTCTTCTATGAGTACATC
R1-40	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGAACTGTTGTGAATAGGGAGAAATACAGTA
F1-41	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacagtGAGAAAAGAGACAGCTGTAGGGAGAA

[0079]

R1-41	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaATGCAGCTGGGAATATCCATGAAA
F1-42	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgccaatCTCTCTCCCACAGTCTCCAAAG
R1-42	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGTGGACATTGCTCAGCATCTCTTA
F1-43	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcagateGACCTTTAACAGTTCTGAAAAATAGCCTTG
R1-43	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCAAGTGCATTACTATCCAATGTGGATTTTT
F1-44	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTacttgaGTCAGGGAGATGCTTGCTTTTG
R1-44	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaTATGACAGCCTACTTCTTGTCAGT
F1-45	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTgateagAAAAAGGATCATCCTTTCCGAGACT
R1-45	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGAGACCCAAGTACCAGTTTTTATCCC
F1-46	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTtagettCAGCCATTTCTTTCATTTTCTTTTCTCCTT
R1-46	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaGCAATTCAGAACGTAGAGAAGAGCT
F1-47	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTggctacCACACCACCTCTTGGGATACAG
R1-47	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaAGTTACGTCTAAGATGTGCCATCAAG
F1-48	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTcttgtaAGAGTCCTGACTAATGAAGACACCA
R1-48	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTtgaccaCCTGCTGTGCAAGAGGAAATTC
F1-49	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTatcaegTTACTTAATGTGTCTTGAAGAGCTGTTGT
R1-49	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTacagtgCCATTTAGCACCATTCACTCAACTCA
F1-50	TCTTTCCCTAACGACGCTCTCCGATCTegatgtCATCCCCGTCCAGTGAGTT
R1-50	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTacagtgGATATGAAGCACCCAGGT

[0080] 注：表中六个小写字母的碱基序列为识别序列。

[0081] 4. 基因组DNA的提取

[0082] 血液样本来自浙江省某医院，临床诊断为非综合征型耳聋，血液样本200μl，用 QIAGEN DNeasy Blood&Tissue Kit (250) 试剂盒(货号：69506) 进行基因组DNA的提取，Nanodrop1000测浓度为22ng/μl。

[0083] 第一轮PCR扩增。

[0084] 5.1以上提取得到的基因组DNA为模板(起始量为30ng)，以表2的50对引物序列为两端引物，分别进行第一轮PCR扩增，从而分别得到50个扩增产物，分别命名为P1-1~P1-50。

[0085] 5.2本轮PCR扩增的体系如下：

反应成分	体积 (μl)
------	---------

	模板 (30ng) *	1.36
	5×Q5 reaction Buffer*	5
	Q5 DNA 聚合酶	0.25
[0087]	Primer F1 (2.5pmol/μl)	2.5
	Primer R1 (2.5pmol/μl)	2.5
	dNTPs*	0.65
	加水至 25μl	

[0088] *Q5 DNA聚合酶购自NEB的Q5扩增试剂盒,货号:E0555L;

[0089] *5×Q5 reaction Buffer,货号B9027S;

[0090] *dNTP Mixture购自Takara公司,货号为4019。

[0091] 5.3将PCR反应管放于PCR仪上,运行下表所示程序:

[0092]

步骤	温度	时间
步骤 1	94℃	3 分钟
步骤 2	94℃	20 秒
步骤 3	55℃	30 秒
步骤 4	72℃	40 秒
步骤 5		重复步骤 2~步骤 4,30 个循环
步骤 6	72℃	10 分钟
步骤 7	4℃	保存

[0093] 以上反应结束后,将得到的PCR产物分别用磁珠进行纯化,取5μl PCR产物1%凝胶电泳分析PCR产物片段大小,测定PCR产物浓度。

[0094] 6第二轮PCR扩增

[0095] 6.1步骤5.3中得到的50个PCR产物进行等量(每个产物30ng)混合后得到混合液,取50ng作为第二轮PCR扩增的模板,以F2和R2作为第二轮PCR的引物。

[0096] 6.2PCR反应体系如下:

	反应成分	体积 (μl)
	模板	加至 50ng
[0097]	5×Q5 reaction Buffer	5
	Q5 DNA 聚合酶	0.25
	Primer F1 (2.5pmol/μl)	2.5

	Primer R1 (2.5pmol/μl)	2.5
[0098]	dNTPs	0.65
	加水至 25μl	

[0099] *Q5 DNA聚合酶购自NEB的Q5扩增试剂盒,货号:E0555L;

[0100] *dNTP Mixture购自Takara公司,货号为4019。

[0101] 6.3将PCR反应管放于PCR仪上,运行下表所示程序:

[0102]

步骤	温度	时间
步骤 1	94℃	3 分钟
步骤 2	94℃	20 秒
步骤 3	60℃	30 秒
步骤 4	72℃	40 秒
步骤 5		重复步骤 2~步骤 4, 8 个循环
步骤 6	72℃	10 分钟
步骤 7	4℃	保存

[0103] 以上反应结束后,将得到的PCR产物用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN),按照操作说明纯化扩增产物,此产物即可用于Illumina测序平台进行上机测序。

[0104] 7按标准程序进行Illumina上机。

[0105] 二、结果分析

[0106] 1.对Illumina Miseq测序仪产生的原始数据,采用BWA比对算法软件进行原始读长序列(reads)与参考基因组进行初步比对。

[0107] 2.重新比对与重新校准处理

[0108] 分别采用三种重要的工具:(1)碱基质量得分重新矫正;(2)indel临近区域局部重新匹配比对处理;(3)屏蔽重复读长序列。屏蔽重复测序读长的处理目的是考虑处理在pair-end测序双端存在的由PCR所导致的序列冗余,同时用于处理重复读长在indel区域内所获得边界存在不同匹配的情形(1)高效率的与已知位点(indel,SNP)进行重新匹配与比对处理,可对低覆盖度区域进行操作(仅对已知indel进行重新匹配)。(2)采用碱基错配方式用以判定位点是否需要重新匹配比对,并进行全面的局部重新匹配处理。

[0109] 3.第二阶段(phase 2)异体识别与基因型计算,首先针对矫正重新匹配的序列进行比对结果的合并处理,将所有全基因组测序的比对结果进行合并用于后续变异体和基因型的识别。

[0110] 4.多重样本SNP与Indel识别采用基于贝叶斯基因型似然比模型算法的通用基因型识别算法对SNP和indel进行识别。贝叶斯基因型似然比模型算法的原理是同时估计在一个包含N个样本的群体或单独个体样本中最可能出现的基因型和等位基因频率,并准确计算出每个核苷酸位置上的变异体和基因型的后验概率。通用基因型识别算法用来识别统计

学上所判断的非参考序列等位基因的变异体 (SNP、Indel) 位置和基因型。

[0111] 5. 按标准程序进行 Illumina Miseq 上机, 产出约 150M 数据量。

[0112] 6. 数据分析

[0113] 按照高通量测序常规的生物信息分析技术, 得到的病人样本突变如下表所示 (仅列举了耳聋相关基因):

[0114]

基因名称	Freq_d bSNP	Freq_ Hap Map	Freq_1k genome	RS 号	杂合 / 纯 合	发生位 置	突变类型	氨基酸突变	核酸突 变
**GJB2 基因 (NM_004004)	0.024	0	0.0238	rs7247 4224	Het	EX2/C DS1	Missense	p.Val37Ile	c.109G> A
COCH 基因 (NM_001135058)	0.498	0.569	0.4652	rs1045 644	Het	EX10/ CDS10	Missense	p.Thr352Ser	c.1055C >G
DFNA5 基因 (NM_004403)	0.321	0.316	0.3159	rs1714 9912	Het	EX9/C DS8	Synonymo us	p.Ala400Ala	c.1200A >G
DFNA5 基因 (NM_004403)	0.366	0.482	0.3114	rs7545 55	Het	EX4/C DS3	Synonymo us	p.Thr163Thr	c.489G> A
DFNA5 基因 (NM_004403)	0.476	0.963	0.5339	rs8763 05	Hom	EX4/C DS3	Synonymo us	p.Glu149Glu	c.447A> G
DFNA5 基因 (NM_004403)	0.366	0.451	0.3104	rs7545 54	Het	EX4/C DS3	Missense	p.Pro142Thr	c.424C> A
**SLC26A4 基 因(NM_000441)	0	0	0	rs1110 33313	Hom	IN7	Splice	c.919-2T>C	c.919-2T >C

[0115] 注: Freq_dbSNP 表示该突变在 dbSNP 数据库中的频率; Freq_HapMap 表示该突变在 dbSNP 数据库中的频率; Freq_1k genome 表示该突变在 dbSNP 数据库中的频率; ** 表示致病突变。

[0116] 结果分析: 在 OMIM 数据库 (<http://omim.org>) 中查询, 发现该病人样本中有两个基因存在致病突变, 如表中 ** 表示, SLC26A4 基因上 (Intron7) 发现 1 个剪切突变 c.919-2T>C, 为纯合子; 已有相关文献报道其致病性, 且其在人群中发生的概率较低。SLC26A4 基因是 Pendred 综合征 (Pendred syndrome; OMIM 号: #274600) 和常染色体隐性耳聋伴前庭导水管扩大症 (Deafness, autosomal recessive 4, with enlarged vestibular aqueduct; OMIM 号: #600791) 的致病基因, 均为常染色体隐性遗传。在其 GJB2 基因编码区 (EX2/CDS1) 发现 1 个错义突变 c.109G>A (p.Val37Ile), 为杂合子; 已有相关文献报道其致病性。GJB2 为常染色体隐性耳聋 1A 型 (Deafness, Autosomal Recessive 1A, OMIM: #220290) 和常染色体显性耳

聋3A型 (Deafness, Autosomal Dominant 3A, OMIM:#601544) 的致病基因。在非综合征型耳聋相关基因上还发现多个剪切、错义或同义变异。因此,推测SLC26A4基因的剪切突变c.919-2T>C和GJB2基因的错义突变c.109G>A (p.Val137Ile) 为耳聋病人的可疑致病性突变。

[0117] 对其中SLC26A4基因的c.919-2T>C突变用金标准Sanger法进行验证,发现与本发明检测到的突变类型完全一致(如图3所示)。同理,GJB2基因Sanger测序结果,箭头示c.109G>A (p.Val137Ile) 杂合突变。与本发明检测到的突变类型完全一致(如图4所示)。

[0118] 以上结果显示,利用本发明的方法可以基于二代测序平台进行遗传代谢病致病突变的检测,结果准确有效,为医生进一步对遗传代谢病患者进行针对性的治疗提供有力的理论指导。

[0119] 备注说明:OMIM数据库已告知了与疾病相关的已报道的突变基因位点信息。

[0120] 经过二代测序的分析,我们只发现GJB2基因和SLC26A4基因存在已被证实的致病突变,其他基因的突变都是非致病突变,因此只需要对致病突变位点进行一代测序法的验证即可。

[0121] 实施例2:参考实例1的方法,对某葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症病人,利用本发明的方法设计引物,第一轮引物序列如下表2:

[0122] 表2、G6PD基因第一轮PCR引物序列表

[0123]

G6PD-F1-1	TCTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTatcaagCTCGAAGGCATCACCTACCATC
G6PD-R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTatcaagCTCAACACCCAAGGAGCCCATT
G6PD-F1-2	TCTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTcgatgtGGACCATTCATTCCCGACTGTA
G6PD-R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTatcaagCCGGAAACGGTCGTACACTTC
G6PD-F1-3	TCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGACTttaggcGGAATGTGCAGCTGAGGTCAA
G6PD-R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTatcaagGCACCAGATTGAGCTGGAGAA
G6PD-F1-4	TCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGACTtgaccaTCCACACTGCTCCTTCTCTGTA
G6PD-R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTatcaagAGCTCCCACTGAGACACTCA
G6PD-F1-5	TCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGACTacagtgCTTGAAGAAGGGCTCACTCTGT
G6PD-R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGACTatcaagATCAGGCAAGACAGACATGCTT

[0124]

G6PD-F1-6	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTgccaatCCGGTCTGATAGCTCAGACACT
G6PD-R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgGAGGACGAATTCCTCCAGAACT
G6PD-F1-7	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTcagatcATTCAAAACCAGCCAGAGGACAA
G6PD-R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgCTACGAGGCCGTACCAAGAACAT
G6PD-F1-8	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTacttgaGTAGGAGGCIGCATCATCGTAC
G6PD-R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgGATGTGCAGAGCTGCTAAGATG
G6PD-F1-9	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTateacgGCAAGCCTTACATCTGGCTCAT
G6PD-R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgTCAAGCTGGAGGACTTCTTTGC
G6PD-F1-10	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTtagettTACCTGCGCTTCGTGCTC
G6PD-R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgGGGATTCGGGAGCACTACG
G6PD-F1-11	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTggctacGGTCACCCTTGTCTGAGTTCTG
G6PD-R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgCGTCTGAATGATGCAGCTCTGA
G6PD-F1-12	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTcttgtactTTTCCCTCACCTGCCATAAATATAGGG
G6PD-R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTateacgCTCTCCCTCACAGAACGTGAAG
G6PD-F1-13	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTateacgGGACATGACAACCTTGGGCTTCA
G6PD-R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTcogatgtTGICTACTAGGAAGCCTTGTTTGG
G6PD-F1-14	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTcogatgtCCGGCTTCTTGTCATCATCTT
G6PD-R1-14	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTcogatgtCCGTCGTCCTCTATGTGGAGAA
G6PD-F1-15	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTttaggcGAGGAGGAGCTCAACTTAGCAG
G6PD-R1-15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTcogatgtAGTGATTTGGGCAATCAGGTGT
G6PD-F1-16	TCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGACTtgaccaGGGTCCTCAAGGAAGTACGAGA
G6PD-R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGACTcogatgtCCCACCATCTGGTAAGTGTGTC

[0125] 第一轮PCR完成后,进行第二轮PCR后高通量测序(具体步骤和方法见实例1),得到的结果如下:

[0126] G6PD缺乏症患者的高通量测序结果为:

[0127]

基因名称	Freq_d bSNP	Freq_Ha pMa p	Freq_1 k genome	RS 号	杂合 / 纯 合	发生 位置	突变 类型	氨基酸突 变	核酸 突变
G6PD 基因 NM_000402	0	0	0	无	半合 子	EX6/ CDS6	错义 突变	p.Ile226M et	c.678 C>G

[0128] 对其中G6PD基因的c.678C>G突变位点用金标准Sanger法进行验证(以正常人为对照),发现与本发明检测到的突变类型完全一致,如图5所示:

[0129] 图5是G6PD基因的Sanger测序结果。上图为正常人的反向序列(野生型),下图为患者样本反向测序结果,箭头处为c.678C>G的纯合突变。

[0130] 未发现该患者在产品检测范围内存在其他已知或疑似致病性突变。结合疾病的发病率、位点在各数据库中的频率及受检者临床主述,检出1个临床意义未明位点。临床意义

未明位点不足以解释疾病的发生,仅作为医生参考。

[0131] 位点详情:G6PD;NM_000402;c.678C>G;p.Ile226Met;CDS6;Hemi:错义突变,暂无该位点致病性的相关文献报道,临床意义未明。该位点在人群中发生频率极低。经SIFT和Polyphen对其进行蛋白功能预测,结果均为有害。

[0132] 以上结果显示,利用本发明的方法可以检测出G6PD基因的有害突变位点,为医生进一步对遗传代谢病患者进行针对性的治疗提供有力的理论指导。

[0133] 实例3:参考实例1的方法,对某Gitelman综合征病人的新生儿,利用本发明的方法对相关致病基因SLC12A3基因设计引物(第一轮PCR的引物如表3)进行PCR扩增后高通量测序,判断该病人的儿子是否患Gitelman综合征,得到以下结果:

[0134] 表3、SLC12A3基因第一轮PCR引物列表

[0135]

SLC12A3-F1-1	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCcatcaagTCGCAGCCTATAAAAACCACCC
SLC12A3-R1-1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCcatcaagTATTTCACTGGGGCCTCTCAA
SLC12A3-F1-2	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATC egatgtTTTAAAAGCCCCCTCAAGCAGC
SLC12A3-R1-2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC egatgtTTTGTGTGTTAGTGCAGCCC
SLC12A3-F1-3	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATC ttaggcTACCCTCTTGCCCCATAGAAC
SLC12A3-R1-3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC ttaggcTGCTTTCTAACCTGCACGCTT
SLC12A3-F1-4	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATC tgaccaTAGCCTCCTAAGTAGCTGGGA
SLC12A3-R1-4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC tgaccaTCATTGGGTTGGGGAAAGTTGG
SLC12A3-F1-5	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATC acagtgTGGCTGTCTACACCACGAGAT
SLC12A3-R1-5	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC acagtgTCCTGGACAGTGTGGCTCTAA
SLC12A3-F1-6	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATC gccaatTTTAGAGCCACACTGTCCAGG
SLC12A3-R1-6	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC gccaatTAGATGGTACCCTGCCTCC
SLC12A3-F1-7	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATC gccaatTAAATCATTTTCTGGCGGGGC
SLC12A3-R1-7	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC acagtg TGACACAGGAGGGCAAGTAT
SLC12A3-F1-8	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATC acagtg TCCTTCCTCTCTGTGCTGGAA
SLC12A3-R1-8	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTCCACTGCCATGAAGATGCTC
SLC12A3-F1-9	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTCCATGCTCTCCTTCCTCCTC
SLC12A3-R1-9	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTGCACTTCATTCCCTACTGCG
SLC12A3-F1-10	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggcTAGGGAATGAAGTGCCACAGA
SLC12A3-R1-10	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTGATGGATGGCTTCGGGTAGA
SLC12A3-F1-11	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTTCTACCCGAAGCCATCCATC
SLC12A3-R1-11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTGAGGAGACAGGAGAAGAGCC
SLC12A3-F1-12	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTGGTCATCCCATAGCCTGATG
SLC12A3-R1-12	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTCTGAGGTGGGTGAAGGGTTT
SLC12A3-F1-13	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTGTCCGTGTGGCTGTATTTGGC
SLC12A3-R1-13	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC acagtg TGATAAAGGGGAGGGGCAGAG
SLC12A3-F1-14	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATC acagtg TAACTTTTCAACGTGCAGCCA
SLC12A3-R1-14	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtgTAAACACCAAAGCACGTTTCCA

[0136]

SLC12A3-F1-15	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtTCCAAAAGAGCAGGAAGAGCC
SLC12A3-R1-15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTGAAGGGGAGAGAATGGGGTC
SLC12A3-F1-16	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTTCFGGGCAAAAAGAAAAGGGC
SLC12A3-R1-16	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggeTCCGGAGGTTATTGCAGTGAG
SLC12A3-F1-17	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggeTAGGGATGTAGGGTGTGGTG
SLC12A3-R1-17	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCgccaatTACTACAGATGCCAGCCACTT
SLC12A3-F1-18	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTCCATGGGCAGAGTTGAGTT
SLC12A3-R1-18	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggeTTGGGAAAAGTATGGGCTCT
SLC12A3-F1-19	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCttaggeTCCAGGGCTAGGGGAAGTATG
SLC12A3-R1-19	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggeTACTCCAGTTACTCAGGCACC
SLC12A3-F1-20	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTCCGGGAGAGAGAAGCTGAAA
SLC12A3-R1-20	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCttaggeTCATGGCGACTTCAGCTCTTC
SLC12A3-F1-21	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTCTTGTATGACTCACGGGGA
SLC12A3-R1-21	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCtgaccaTAACTCCCCTCCCTGTGCGTA
SLC12A3-F1-22	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCtgaccaTTCCTTCCCTCTACCCTGCT
SLC12A3-R1-22	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtTFTTGGCCCTTCTGCTTCCTA
SLC12A3-F1-23	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCacagtTGCCCCGTGGTAATCTCTCTT
SLC12A3-R1-23	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCatcaagTCTGTCAAGATTACGCCCAG
SLC12A3-F1-24	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCatcaagTGIGTTGAGCTCCTGACCTCA
SLC12A3-R1-24	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtTCTGCTTTTCTTCCCGGTGAG
SLC12A3-F1-25	TCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCgccaatTAAGAGCACTGCCATCGAATG
SLC12A3-R1-25	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCacagtTCCCAGAATCCAGCTCAATG

[0137] Gitelman综合征患者的新生儿的高通量测序结果为：

[0138]

基因名称	Freq_ dbSNP	Freq_ HapMa	Freq_ 1k genomc	RS 号	杂合 / 纯合	发生 位置	突变 类型	氨基酸 突变	核酸突 变
SLC12A3 基因						chr5:1			C.176_1
NM_000339.2	0	0	0	无	杂合	12174	缺失	移码突 变	79delAC AAA

[0139] 对其中SLC12A3基因的C.176_179del1ACAAA缺失突变位点用金标准Sanger法进行验证,发现与本发明检测到的突变类型完全一致,缺失了ACAAA序列后,造成了移码突变,同时为杂合子,造成后续的双峰(箭头指示处开始发生移码),如图6所示。

[0140] 图6为SLC12A3基因的Sanger测序结果。上图为正常人序列(野生型),下图为患者样本测序结果,箭头处为移码突变起始处,基因型为杂合性缺失。

[0141] 该C.176_179del1ACAAA缺失在dbSNP等数据库中均未出现,为新的缺失突变,该缺失导致后续的氨基酸移码,而该突变为杂合性缺失,对该常染色体隐性病来说,该新生儿为致病基因携带者。本结果可以做为医生临床参考。

[0142] 结果显示,本发明的探针可用于新一代测序,检测遗传代谢病患者的突变位点,为医生进一步对遗传代谢病患者进行针对性治疗提供理论指导。

[0143] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的一个具体实施例,本发明不限于以上实施例,还可以有许多种变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容中直接导出或者联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

[0001]

<110> 浙江大学

<120> 检测多种新生儿遗传代谢病致病基因的引物及试剂盒

<160> 6

<210> 1

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 F1-1

<400> 1

tctttcceta acgacgetct tccgatctat cacggggtct cagtggaact aacttaagt 59

<210> 2

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 R1-1

<400> 2

gtgactggag ttcagacgtg tgetettccg atctatcacg tcacagtgtt catgattgca 60
gtgt 64

<210> 3

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 F1-2

<400> 3

tctttcceta acgacgetct tccgatctcg atgtggtttt gatctctctcg atgtccttaa 60

[0002]

at 62

<210> 4

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 R1-2

<400> 4

gtgactggag ttcagacgtg tgccttccg atctatcag actccaccag cattggaaag 60

atc 63

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 F1-3

<400> 5

tccttcccta acgacgtct tccgatctt aggcttggga ggaataacag ttctgaactc 60

<210> 6

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 R1-3

<400> 6

gtgactggag ttcagacgtg tgccttccg atctatcag gaagtagttg tcttagcaga 60

cggt 64

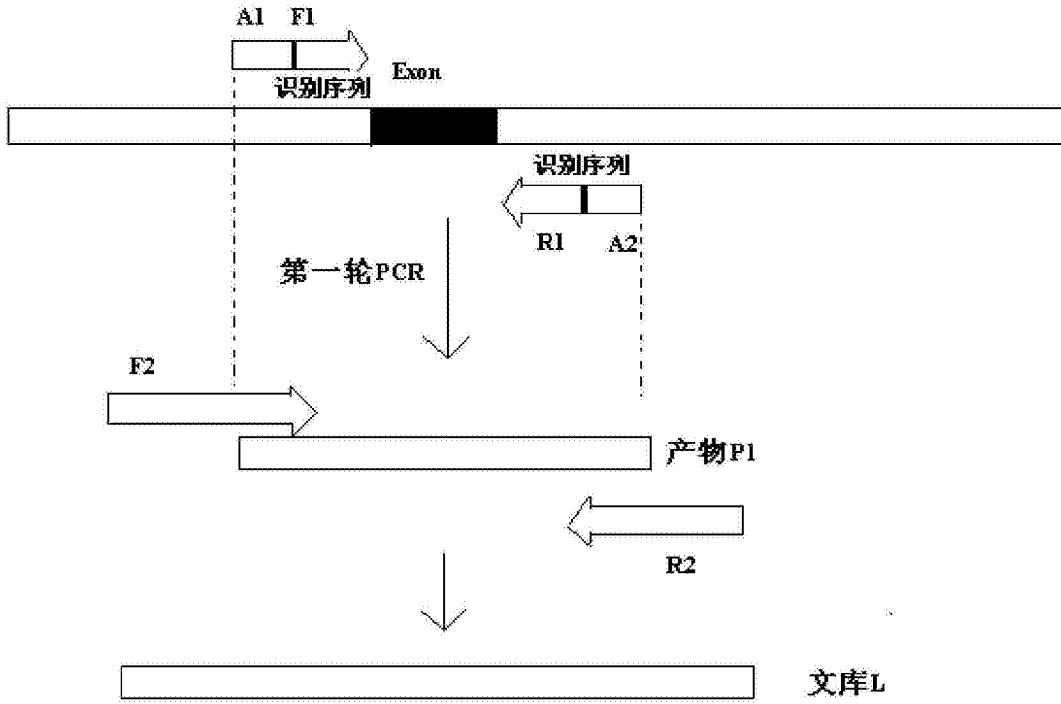


图1

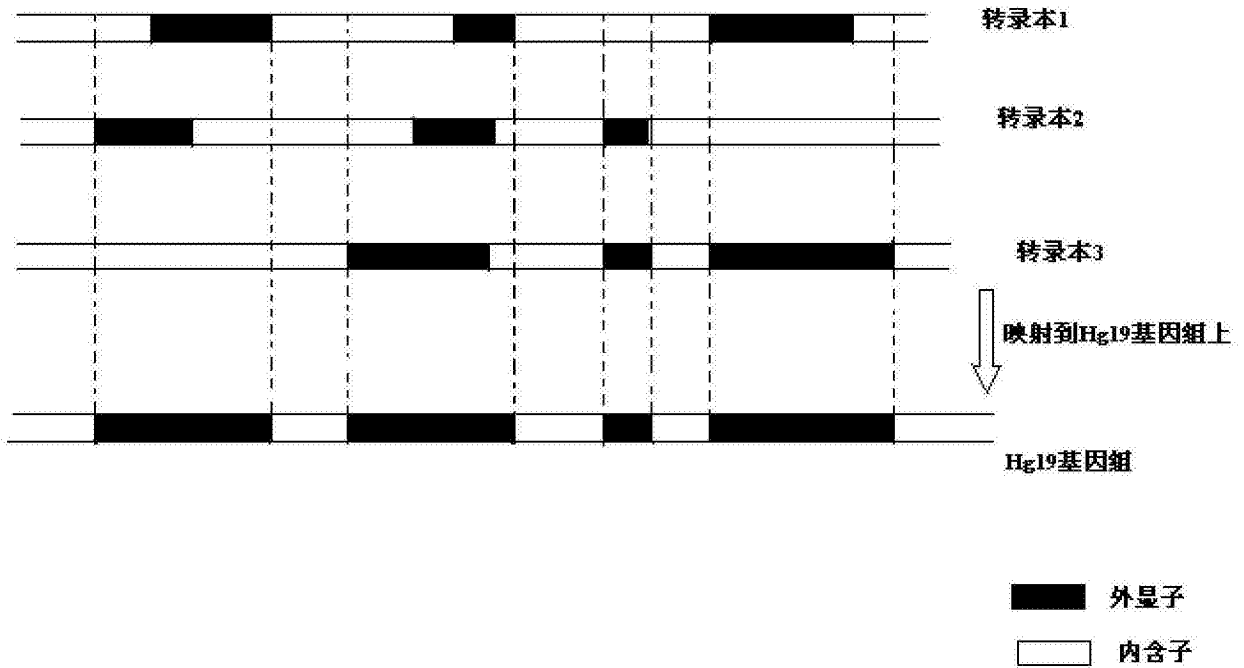


图2



图3

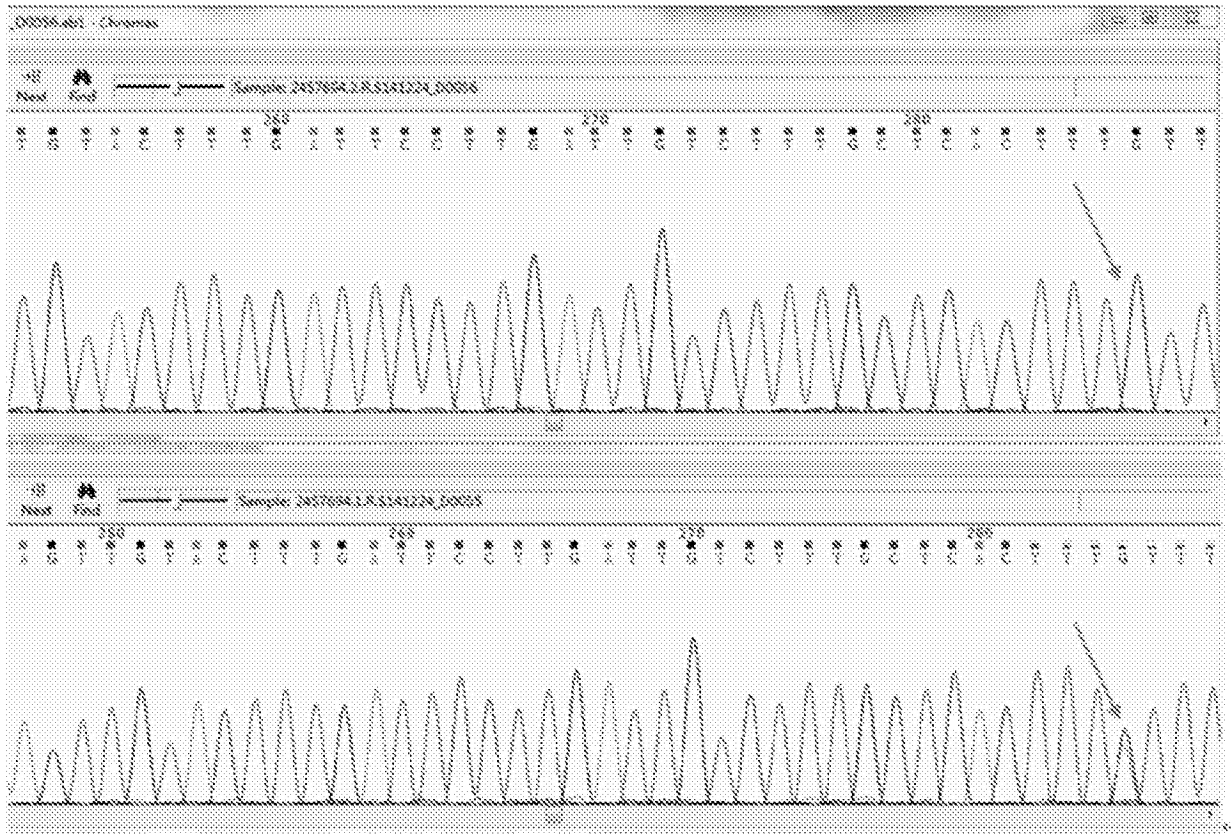


图4

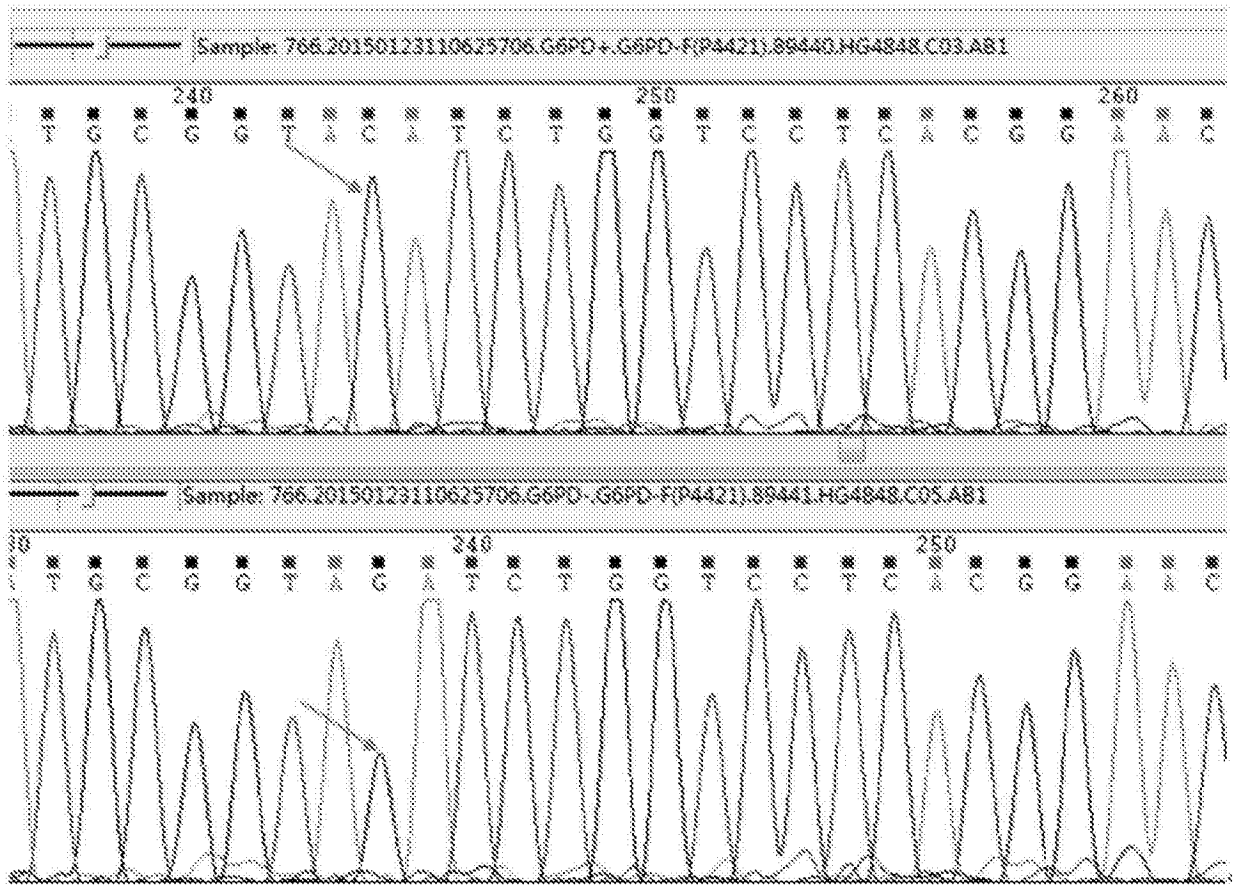


图5

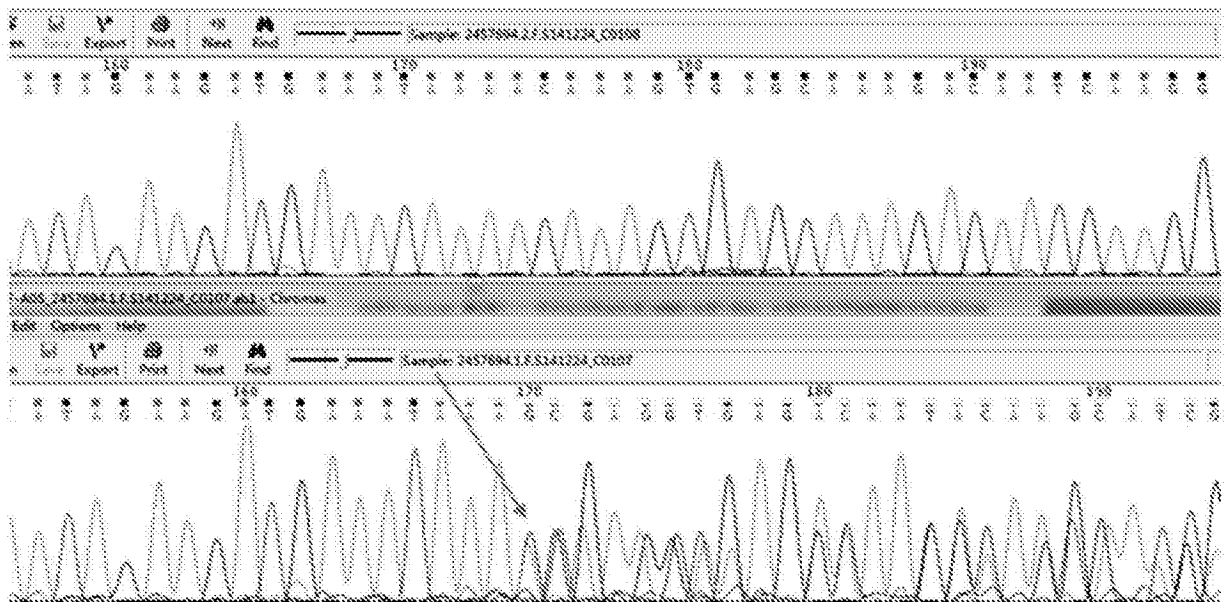


图6