



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108004313 B

(45) 授权公告日 2021.03.16

(21) 申请号 201711385385.8

C12N 15/12 (2006.01)

(22) 申请日 2017.12.20

C12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108004313 A

(56) 对比文件

GB 9310842 D0, 1993.07.14

CN 104513828 A, 2015.04.15

CN 102732608 A, 2012.10.17

CN 103667301 A, 2014.03.26

(43) 申请公布日 2018.05.08

(73) 专利权人 新疆医科大学第一附属医院

地址 830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐

市鲤鱼山南路137号新疆医科大学第

一附属医院科研科

韩兵等. 罕见的CYP17A1基因外显子剪接突变导致17 α -羟化酶缺陷的分子病因学研究.《中华内分泌代谢杂志》.2010,第27卷(第11期),第911-915页.

贾学文等. CYP17A1基因多态性与冠心病遗传易感性的研究.《中国循证心血管医学杂志》.2017,第9卷(第2期),第187-198页.

(72) 发明人 谢翔 马依彤 郑颖颖 杨毅宁

李晓梅 陈铀 李龙 吴婷婷

审查员 马琪

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐合纵专利商标事务

所 65105

代理人 蒙海云 汤建武

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

权利要求书1页 说明书4页

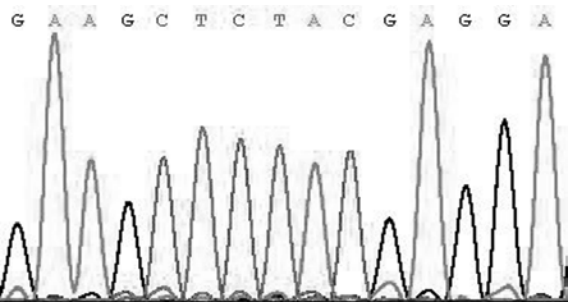
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

早发冠心病致病基因及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒和应用

(57) 摘要

本发明涉及生物工程中早发冠心病相关基因相关技术领域,是一种早发冠心病致病基因及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒和应用,该早发冠心病致病基因,即即c.987C/De1位点突变的Cyp17a基因,c.987C/De1位点突变的Cyp17a基因的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。本发明公开了早发冠心病相关基因以及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒和应用,该体外检测早发冠心病相关基因的制剂或试剂盒除了可以用于体外检测冠心病相关基因的多态性外,还可以用于检测、预防、诊断或治疗早发冠心病,从而降低冠心病的发生率,对预防和治疗冠心病具有重大的意义。



1. 一种体外检测早发冠心病致病基因的试剂在制备用于体外检测早发冠心病致病基因的制剂或试剂盒中的应用,其特征早发冠心病相关基因即c.987C/Del位点突变的Cyp17a基因,c.987C/Del位点突变的Cyp17a基因的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO: 1所示,该试剂用于检测Cyp17a基因c.987C/Del位点的突变,该试剂包括如下引物:

上游引物:5' taggggacat ctttggggct g3' ;

下游引物:5' tcactgatag ttggtgtgcg gc3' 。

2. 根据权利要求1所述的体外检测早发冠心病致病基因的试剂在制备用于体外检测早发冠心病致病基因的制剂或试剂盒中的应用,其特征早发冠心病致病基因的制剂或试剂盒包含PCR扩增酶及相应缓冲液。

早发冠心病致病基因及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程中早发冠心病相关基因相关技术领域,是一种早发冠心病致病基因及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒,所述体外检测早发冠心病致病基因的试剂在制备用于体外检测早发冠心病致病基因的制剂或试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 目前研究表明,冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)是一种多基因疾病,它的遗传基础不是一对等位基因,而是多对等位基因。这些等位基因的相互作用促成了冠心病易感性的个体差异。但是对于家族性早发冠心病(男性<55岁,女性<65岁),有学者认为可能是一种单基因遗传病。如Arya Manil et al.在一个早发冠心病家系中发现LRP6基因突变是该家族中早发冠心病的致病基因,并呈现常染色体显性遗传规律。该基因突变在其他400例冠心病患者中均未被检测到(其研究成果发表在Science杂志上)。2014年,Keramati AR等人又发现DYRK1B基因突变为家族性代谢综合征以及早发冠心病的致病基因,该基因的错义突变(R102C)导致代谢综合征以及早发冠心病家系中患病个体基因表达及相应蛋白功能异常,从而导致代谢综合征的发生并增加早发冠心病的易感性,并呈常染色体显性遗传规律(研究结果发表在New England Journal of Medicine上)。我们前期的研究也发现RECQL5基因为早发冠心病的致病相关基因,该基因的一个新的移码突变在所有的患病个体中均可以检测到,但是在未患病的个体中均未发现该突变位点。因此基于家系的连锁分析更有助于发现冠心病新的致病相关基因。

[0003] 基因位于10q24.3,有8个外显子及7个内含子,主要在肾上腺及性腺表达。CYP17A基因编码P450c17蛋白,该酶属于细胞色素P450超家族酶之一,催化许多反应,包括药物代谢及胆固醇、类固醇和其他脂类的合成,它含有17 α -羟化酶和17,20-碳链裂解酶两种酶活性,是肾上腺及性腺类固醇激素(包括性激素)合成的关键酶之一。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种早发冠心病致病基因及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒和应用。

[0005] 本发明的技术方案之一是通过以下措施来实现的:一种早发冠心病致病基因,即c.987C/De1位点突变的Cyp17a基因,c.987C/De1位点突变的Cyp17a基因的核苷酸序列如序列SEQ ID NO: 1所示。

[0006] 本发明的技术方案之二是通过以下措施来实现的:一种体外检测技术方案之一所述的早发冠心病致病基因的试剂,该试剂用于检测Cyp17a基因c.987C/De1位点的突变,该试剂包括如下引物:

[0007] 上游引物:5' taggggacat ctttggggct g3' ;

[0008] 下游引物:5' tcactgatag ttggtgtgcg gc3' 。

[0009] 下面是对上述发明技术方案之二的进一步优化或/和改进:

[0010] 上述该试剂用于聚合酶链式反应与限制性片段长度多态性分析相结合的试剂或用于聚合酶链式反应与直接测序法相结合的试剂。

[0011] 本发明的技术方案之三是通过以下措施来实现的:一种含有技术方案之二所述的体外检测早发冠心病致病基因的试剂的制剂或试剂盒,其特征在于该制剂或试剂盒包含PCR扩增酶及相应缓冲液。

[0012] 本发明的技术方案之四是通过以下措施来实现的:一种体外检测早发冠心病致病基因的试剂在制备用于体外检测早发冠心病致病基因的制剂或试剂盒中的应用。

[0013] 下面是对上述发明技术方案之四的进一步优化或/和改进:

[0014] 上述该制剂或试剂盒包含PCR扩增酶及相应缓冲液。

[0015] 本发明公开了早发冠心病相关基因以及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒和应用,该体外检测早发冠心病相关基因的制剂或试剂盒除了可以用于体外检测冠心病相关基因的多态性外,还可以用于检测、预防、诊断或治疗早发冠心病,从而降低冠心病的发生率,对预防和治疗冠心病具有重大的意义。

附图说明

[0016] 附图1为本发明的c.987C/De1位点的测序图谱,其显示待测个体c.987C/De1位点的基因型为GC/GC纯合子。

[0017] 附图2为本发明的c.987C/De1位点的测序图谱,其显示待测个体的c.987C/De1位点为GC/G-杂合子。

具体实施方式

[0018] 为了更清楚地理解本发明,现参照下列实施例及附图进一步描述本发明,实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。除非特别说明,本发明中的%均为质量百分数;除非特别说明,制备过程在常温、常压状态下进行;除非特别说明,本发明中采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备;除非特别说明,本发明中采用的试验条件为本技术领域常规试验条件;除非特别说明,本发明中所用试剂均为市购;除非特别说明,本发明中的水为去离子水;除非特别说明,本发明中的溶液均为溶剂为水的水溶液,例如,若未做特别说明,盐酸溶液为盐酸水溶液。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件进行:如Sambrook等人所著的《分子克隆:实验手册》(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0019] 实施例1,一种早发冠心病相关基因即c.987C/De1位点突变的Cyp17a基因,c.987C/De1位点突变的Cyp17a基因的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO: 1所示。

[0020] 含有Cyp17a的基因的待测样品可以从来自实验者的细胞获得,如来自血液、尿、唾液、胃液、头发、活组织检查和尸体解剖材料的细胞,优选来自血液。

[0021] 实施例2,一种体外检测早发冠心病致病基因的试剂,该试剂用于检测Cyp17a基因c.987C/De1位点的突变,该试剂包括如下引物:

[0022] 上游引物(如序列表SEQ ID No: 2所示):5' taggggacat ctttggggct g3' ;

[0023] 下游引物(如序列表SEQ ID No: 3所示):5' tcactgatag ttggtgtgcg gc3' 。

[0024] 本领域普通技术人员已知,本发明所述的突变位点为单核苷酸多态性(SNP)位点,即基因组序列中单核苷酸发生改变;核苷酸序列的差异可以体现在DNA水平上或者RNA水平上,所以,本发明的早发冠心病相关基因可以体现在DNA水平, RNA水平上,优选DNA水平,更优选基因组DNA。

[0025] 由于早发冠心病是一种单基因疾病,因此常常采用家系连锁分析的方法。所以本发明采用家系连锁分析研究。所述家系连锁分析就是在采用收集的典型早发冠心病家系汇总检测该基因的突变位点。

[0026] 本发明在一个早发冠心病家系中经过大量的实验,最后以确凿的证据证明了具有本发明的c.987C/De1位点的Cyp17a基因为早发冠心病的致病基因,携带该突变型等位基因的个体均在较早的年龄患冠心病。

[0027] 本实施例2所述的体外检测早发冠心病致病基因的试剂能够用于体外检测具有本发明的c.987C/De1位点的Cyp17a基因。

[0028] 实施例3,作为上述实施例2的优选,该试剂为用于聚合酶链式反应与直接测序法相结合的试剂。

[0029] 实施例4,一种含有体外检测早发冠心病相关基因的试剂的制剂或试剂盒,该制剂或试剂盒包含PCR扩增酶及相应缓冲液。

[0030] 本发明检测c.987C/De1位点的早发冠心病相关基因的制剂或试剂盒可以用于体外检测早发冠心病相关基因的多态性;c.987C/De1位点突变的冠心病相关基因的试剂盒可以用于检测、预防、诊断或治疗冠心病;体外检测早发冠心病相关基因的方法可以用于检测、预防、诊断或治疗冠心病。

[0031] 实施例5,一种体外检测早发冠心病致病基因的试剂在制备用于体外检测早发冠心病致病基因的制剂或试剂盒中的应用。

[0032] 本发明检测c.987C/De1位点突变的早发冠心病相关基因的制剂或试剂盒可以用于体外检测冠心病相关基因的突变;c.987C/De1位点突变的早发冠心病相关基因的制剂或试剂盒可以用于检测、预防、诊断或治疗早发冠心病;体外检测早发冠心病相关基因的方法可以用于检测、预防、诊断或治疗早发冠心病。

[0033] 实施例6,作为上述实施例5的优选,试剂盒还包含PCR扩增酶及相应缓冲液。

[0034] 实施例7,研究对象选取1个早发冠心病家系的三代成员,其中早发冠心病患者11例,均在50岁之前患冠心病。对照者为该家系中未患病的个体,共24例。

[0035] 采用聚合酶链反应-直接测序的方法检测本发明的早发冠心病相关基因c.987C/De1位点的突变。

[0036] 方法:PCR反应体系(50 μ l):基因组模板DNA 50ng(来自血液标本,按照常规方法将白细胞内的DNA用苯酚-氯仿法或者用盐析法提取出来即可)、2*powder Taq PCR master mix 25 μ l, 21 μ l of去离子水,上、下引物各1 μ l,在96孔PCR自动循环仪上进行PCR反应,PCR循环参数:96℃预变性5分钟;经94℃ 30秒,61.0℃30秒,72℃1分钟;循环35周后于72℃延伸10分钟。引物如下:

[0037] 上游引物:5' taggggacat ctttggggct g3' ;

[0038] 下游引物:5' tcactgatag ttggtgtgcg gc3' 。

[0039] 扩增产物长度为157碱基,将扩增直接在测序仪上进行测序。测序条件参见生产厂

家的操作手册。

[0040] 测序结果:如图1、2所示,其中野生型个体显示c.987C/De1位点的基因型为GC/GC纯合子;突变型显示待测个体的c.987C/De1位点为GC/G-杂合子。

[0041] 实施例8,体外检测早发冠心病相关基因即Cyp17a基因的试剂盒,

[0042] 该试剂盒包含:

[0043] 1) 扩增c.987C/De1位点的引物:

[0044] 上游引物:5' taggggacat ctttggggct g3' ;

[0045] 下游引物:5' tcactgatag ttggtgtgcg gc3' ;

[0046] 2) PCR扩增酶及相应缓冲液;

[0047] 3) 测序相应的图谱。

[0048] 综上所述,本发明公开了早发冠心病相关基因以及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒和应用,该体外检测早发冠心病相关基因的制剂或试剂盒除了可以用于体外检测冠心病相关基因的多态性外,还可以用于检测、预防、诊断或治疗早发冠心病,从而降低冠心病的发生率,对预防和治疗冠心病具有重大的意义。

[0049] 以上技术特征构成了本发明的实施例,其具有较强的适应性和实施效果,可根据实际需要增减非必要的技术特征,来满足不同情况的需求。

[0001]	序列表
[0002]	<110>新疆医科大学第一附属医院
[0003]	<120>早发冠心病致病基因及其体外检测的试剂、制剂或试剂盒和应用
[0004]	<130>
[0005]	<160>3
[0006]	<170>
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 1801
[0009]	<212> mRNA
[0010]	<213> 人类(Homo sapiens)
[0011]	<400> 1
[0012]	atgtgggagc tcgtggctct cttgctgctt accctagctt atttgttttg gccaagaga 60
[0013]	aggtgccctg gtgccaagta cccaagagc ctctgtccc tgcccctggt gggcagcctg 120
[0014]	ccattcctcc ccagacacgg ccatatgcat aacaacttct tcaagctgca gaaaaaatat 180
[0015]	ggccccatct attcggttcg tatgggcacc aagactacag tgattgtcgg ccaccaccag 240
[0016]	ctggccaagg aggtgcttat taagaaggc aaggacttct ctgggcggcc tcaaatggca 300
[0017]	actctagaca tcgcgtccaa caaccgtaag ggtatcgctt tcgctgactc tggcgcacac 360
[0018]	tggcagctgc atcgaaggct ggcgatggcc acctttgccc tgttcaagga tggcgatcag 420
[0019]	aagctggaga agatcatttg tcaggaaatc agtacattgt gtgatatgct ggccaccac 480
[0020]	aacggacagt ccatagacat ctctttcct gtcttcgttg cggtaaccaa tgtcatctcc 540
[0021]	ttgatctgct tcaatacctc ctacaagaat ggggaccctg agttgaatgt catacagaat 600
[0022]	tacaatgaag gcatcataga caacctgagc aaagacagcc tgggtggacct agtcccctgg 660
[0023]	ttgaagattt tccccacaa aacctggaa aaattaaaga gccatgttaa aatacgaat 720
[0024]	gatctgctga ataaaatact tgaaaattac aaggagaaat tccggagtga ctctatcacc 780
[0025]	aacatgctgg acacactgat gcaagccaag atgaactcag ataatggcaa tgctggccca 840
[0026]	gatcaagact cagagctgct ttcagataac cacattctca ccaccatagg ggacatcttt 900
[0027]	ggggctggcg tggagaccac cacctctgtg gttaaattga ccctggcctt cctgctgcac 960
[0028]	aatcctcagg tgaagaagaa gctctacgag gagattgacc agaattgtggg ttccagccgc 1020
[0029]	acaccaacta tcagtaccg taaccgtctc ctctgctgg aggccaccat ccgagaggtg 1080
[0030]	cttcgcctca ggcccgtggc ccctatgctc atccccaca aggccaacgt tgaactccagc 1140
[0031]	atcggtagt ttgctgtgga caagggcaca gaagtatca tcaatctgtg ggcgctgcat 1200
[0032]	cacaatgaga aggagtggca ccagccgat cagttcatgc ctgagcgttt cttgaatcca 1260
[0033]	gcggggaccc agctcatctc accgtcagta agctatttgc ctttcggagc aggacctcgc 1320
[0034]	tcctgtatag gtgagatcct ggcccgcag gagctcttcc tcatcatggc ctggctgctg 1380
[0035]	cagaggttcg acctggaggt gccagatgat gggcagctgc cctccctgga aggcaccccc 1440
[0036]	aagtggtctt ttctgatcga ctctttcaaa gtgaagatca aggtgcgcca ggcctggagg 1500
[0037]	gaagcccagg ctgagggtag cacctaaagg ctgtaactca cagcccctgt ccaccctatg 1560
[0038]	tggccccaca acacagattt agagatacaa cccccaccc ttctccgcca ttcttcccta 1620
[0039]	ctcccaaccc actctgcctt ctttttcagc ttgtggcaat gccagtgatg tgcataaaca 1680
[0040]	gttttttttt ttccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
[0041]	aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800

[0042] a 1801
[0043] <210> 2
[0044] <211>21
[0045] <212> mRNA
[0046] <213> 人工序列
[0047] <400> 1
[0048] taggggacat ctttggggct g 21
[0049] <210> 3
[0050] <211>22
[0051] <212> mRNA
[0052] <213> 人工序列
[0053] <400> 1
[0054] tcactgatag ttggtgtgcg gc 22

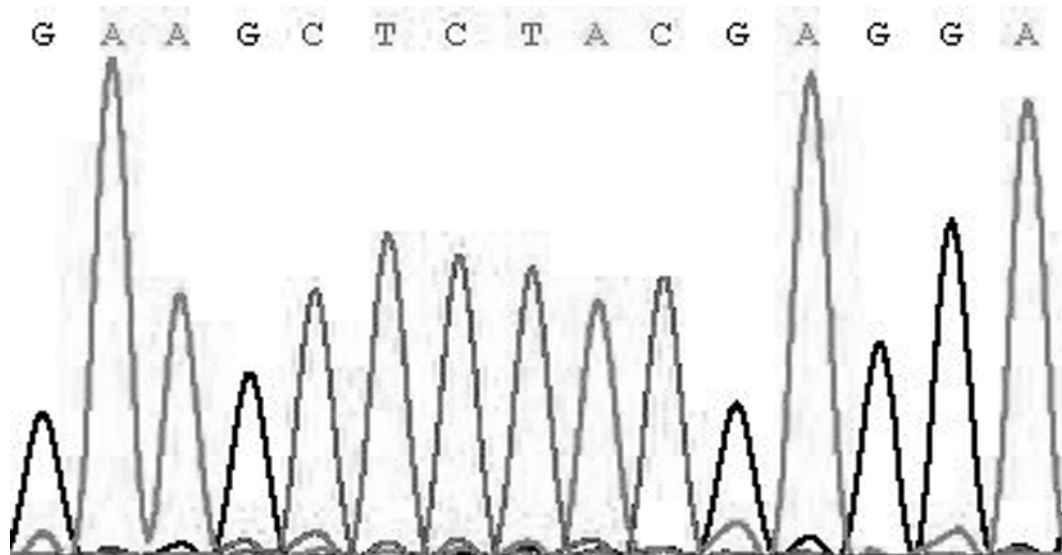


图1

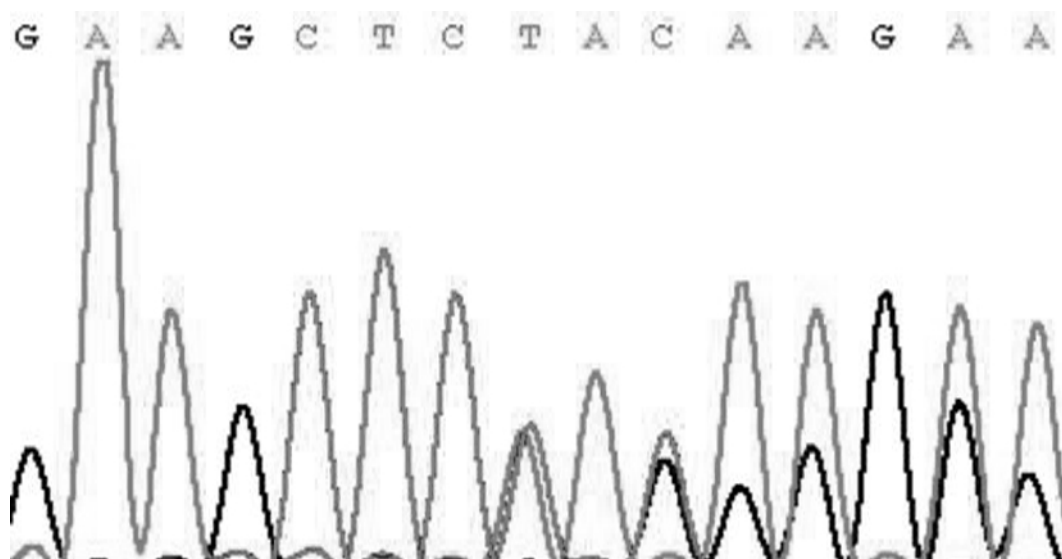


图2