

# 用于检测GDM易感人群的基因芯片、 检测试剂和试剂盒

申请号 CN200910153210.3

申请日 2009.10.29

公开（公告）号 [CN101967511A](#)

公开（公告）日 2011.02.09

分类号 C12Q1/68(2006.01);C40B40/06(2006.01)

申请（专利权）人 浙江大学医学院附属妇产科医院

[www.innojoy.com](http://www.innojoy.com)



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101967511 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 200910153210.3

(22) 申请日 2009.10.29

(71) 申请人 浙江大学医学院附属妇产科医院  
地址 310006 浙江省杭州市上城区学士路 1 号

(72) 发明人 陈丹青 陈怀增 柴芸 方勤  
何奔腾

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司 33200

代理人 周烽

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C40B 40/06 (2006.01)

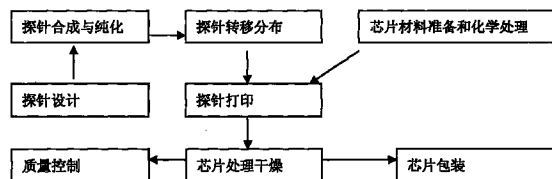
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

用于检测 GDM 易感人群的基因芯片、检测试剂和试剂盒

## (57) 摘要

本发明公开了一种用于检测 GDM 易感人群的基因芯片、检测试剂和试剂盒,本发明用于检测 GDM 易感人群的基因芯片、检测试剂和试剂盒构建了筛查 GDM 各相关基因多态性高危人群的基因芯片检测系统,可快速、准确检测临床样本中的 GDM 各相关 SNPs,通量大、灵敏度高,对于 GDM 的临床诊断和高危人群早期筛查、早期预防干预有重要的意义,可广泛用于临床高效筛查 GDM 高危人群。



1. 一种用于检测 GDM 易感人群的基因芯片,包括固相载体和固定在该载体上的寡核苷酸探针,其特征在于,该芯片上的探针可分别与 GDM 相关 SNPs 杂交。所述固相载体为经过表面化学基团修饰的玻璃基质,所述探针的 5' 末端进行氨基标记。所述 GDM 相关 SNPs 的 DNA 片段具有 Seq ID No. 1-No. 9 的核苷酸序列。所述探针具有 Seq ID No. 10-No. 81 的核苷酸序列。

2. 一种包含权利要求 1 所述基因芯片的检测试剂,其特征在于,该检测试剂还包含用于扩增各 GDM 相关 SNPs 的 PCR 引物,这些 PCR 引物具有 Seq ID No. 82-No. 90 的核苷酸序列。

3. 一种包含权利要求 4 所述检测试剂的试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包含一阴性对照样本和一阳性对照样本。

## 用于检测 GDM 易感人群的基因芯片、检测试剂和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,涉及一种基因芯片(或称为 DNA 微阵列)及其检测试剂和试剂盒,尤其涉及一种妊娠期糖尿病易患人群 SNP 检测和分型的基因芯片及其检测试剂和检测分型试剂盒。

### 背景技术

[0002] 妊娠期糖尿病(Gestational Diabetes Mellitus GDM)是指妊娠期间发生的或首次发现的糖尿病,其发生率世界各国报道为 1%~14%。我国 GDM 的发生率已由 1996 年的 2% 增加到 2003 年的 4.6%。现有证据表明:中国女性是患 GDM 的最危险人群之一。GDM 的主要并发症为巨大儿、羊水过多、妊娠期高血压疾病、感染、早产、酮症酸中毒等。且常由于难产而致新生儿头颅血肿、帽状腱膜下血肿、臂丛神经损伤、锁骨骨折等。GDM 不但会造成孕妇一系列代谢紊乱,也会造成胎儿、新生儿生长发育异常,甚至在儿童期、青春期以后出现更远期的影响,其中最多见的是糖代谢异常问题。糖尿病母亲所生婴儿出生后极易发生低血糖、器官发育不成熟现象、脏器功能低于实际孕龄、常有脑发育不成熟现象。某些 GDM 患者的孩子虽然智能发育在正常范围,却存在一些心理行为问题,如自述各种不适的感觉,学习困难,不同程度的焦虑、抑郁等。由外 GDM 患者产后随访转变为 2 型糖尿病的发生率为 60%~70%,母亲糖尿病带来的短期和长期影响以及不断上升的 GDM 患病率,使之成为在不远的将来困扰中国人健康的严重问题之一。

[0003] 在孕期甚至更早期及时加以干预,不仅可以降低甚至消除 GDM 对母儿的不良影响,可能成为本世纪最重要的医疗预防措施之一。GDM 是多基因遗传性疾病,遗传学上称之为复杂病(complex disease),它具有下列特点:参与发病的基因不止 1 个,每个基因的作用程度不同,起主要作用者称为主效基因,作用较小者为次要基因,不同基因之间存在交互作用;各个致病易感基因作用于代谢的不同环节。目前国内外的研究表明下列几种基因可能与 2 型糖尿病相关,亦有可能与 GDM 有关:(1) 蛋白激酶 C $\xi$  亚型基因,用单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)方法发现其 rs36045(A/G)与 2 型糖尿病相关;应用连锁不平衡分析了位于 rs36045 上、下游共 15 个 SNP 的单倍型与 2 型糖尿病的相关性,结果发现有 5 个 SNP 组成的 C-G-T-A-G 单倍型在病例组显著增多,进一步证实了该基因可能为所研究人群的易感基因;(2) ALDH1A1-E3/56 基因,在糖尿病和非糖尿病人群中,用高频 SNP 筛查基因型,发现该基因存在非常显著性。该基因可能参与中国汉人 2 型糖尿病的易感性;(3) 编码脂肪细胞分化相关蛋白的基因(ADFP)基因,该基因对脂肪组织的分化和功能非常重要,特别是与脂肪、胰岛素抵抗的形成有关。该基因突变有可能参与胰岛素抵抗和 2 型糖尿病形成;(4) CAPN10 基因,其产物是 calpain-10 蛋白,它可能与细胞内钙离子介导的信号传导有关。该基因的单核苷酸多态性位点与 2 型糖尿病发病有关。统计学数据分析,该基因的 SNP43 与组织胰岛素敏感性及糖负荷过程中胰岛素水平相关,该基因可能为中国人 2 型糖尿病的相关基因;(5) IL-6 基因启动子 C-174G 的多态性位点与 2 型糖尿病的发生有很大关联。CC 型与 GC 型相比,IL-6 的转录水平更高,使得血清中 IL-6 水平增高,而

IL-6 又可以降低体内一些保护因子,如脂联素、瘦素等,从而使得个体更容易发生糖尿病。

[0004] 基于上述这些基因可能与 GDM 发生有关,而国内外尚未涉及用基因芯片探针来预测糖尿病高危人群的研究。本专利设计了检测 GDM 易感人群的基因芯片系统,确立 SNP 模式和 GDM 对应关系。通过基因芯片可迅速便捷的对普通人群进行筛查,可在孕早期甚至孕前检查就预测出 GDM 的高危人群,从而通过饮食控制和运动疗法尽早干预,减轻甚至消除 GDM 对母儿的近远期影响。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种用于检测 GDM 易感人群的基因芯片、检测方法以及测试剂和试剂盒。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 一种用于 GDM 易感人群检测与分型的基因芯片,包括固相载体和固定在其上的寡核苷酸探针,其中该芯片上的寡核苷酸探针是针对 GDM 易感 SNP 位点检测的 DNA 片段。

[0008] 上述 SNP 位点包括:rs1799884、rs2144908、rs1800629、rs361525、rs266729、rs17300539、rs1801278、rs4994 和 rs12255372。它们的序列具有 Seq IDNo. 1-No. 9 所示的核苷酸序列的 DNA 片段。

[0009] 一种包含上述基因芯片的检测试剂,该检测试剂还包含用于扩增各 GDM 相关 SNPs 的 PCR 引物,这些 PCR 引物具有 Seq ID No. 82-No. 90 的核苷酸序列。

[0010] 一种用于 GDM 易感人群检测与分型的试剂盒,至少包括基因芯片,PCR 扩增引物,阴性对照和阳性对照样本。该试剂盒还包括杂交盒,杂交液。

[0011] 本发明对不同 GDM 易感相关 SNP 位点设计特异性探针进行检测,通过基因芯片杂交结果进行判读,预测检测样本疾病易感性。

[0012] 本发明的有益效果是:本发明用于检测 GDM 易感人群的基因芯片、检测试剂和试剂盒构建了筛查 GDM 各相关基因多态性高危人群的基因芯片检测系统,可快速、准确检测临床样本中的 GDM 各相关 SNPs,通量大、灵敏度高,对于 GDM 的临床诊断和高危人群早期筛查、早期预防干预有重要的意义,可广泛用于临床高效筛查 GDM 高危人群。

### 附图说明

[0013] 图 1 为基因芯片的一般制作流程图;图 2 为 PCR 扩增流程图。

### 具体实施方式

[0014] 以玻璃基质为载体的 DNA 芯片技术采用的是微量点样 DNA 微阵列技术,其基本原理如下:DNA 探针为含有特定 DNA 序列的寡核苷酸片段,其末端带有氨基标记。经化学修饰处理的玻璃基质基片带有活化醛基基团,可以与 DNA 探针附带的修饰氨基共价结合,利用这种方法可将 DNA 探针按一定的排列规律固定在基片表面。其主要优点是简便易行,能根据使用者的要求简便的制出符合目的的芯片。在此基础上结合 PCR 技术对微量待测样品进行大量快速扩增,扩增后含有荧光标记物的待测样品与芯片上的探针进行特异性杂交和扫描,此后对杂交信号强弱和有无进行分析,即可判断样品中靶基因的数量和性质,基因芯片的制作流程如图 1 所示。

[0015] 本发明的基因芯片包括一基底和固定于该基底上的探针,固定于基片上的探针为

可与 GDM 各相关基因 SNP 多态性核酸杂交的特异型探针。

[0016] 本发明的 GDM 各相关基因 SNP 多态性核酸选取如下：

[0017] 表 1 :GDM 各相关基因 SNP 多态性核酸基因序列表；

[0018]

Seq ID	Gene	dbSNP	SNP Sequence
No. 1	葡萄糖激酶	rs1799884	CATGACAACACACAGGCCCTCTCAGGA [A/G] CACAGT AAGCCCTGGCAGGAGAATC
No. 2	肝细胞核因子	rs2144908	TATGTCATCAATTGCTGAGGACAGAG [A/G] GCCAGG GAATGACAGAAATCAGGGCC
No. 3	TNF $\alpha$ 基因多态性	rs1800629	GGAGGCAATAGGTTTTCAGGGGCATG [A/G] GGACGG GGTTCAGCCCTCCAGGGTCC
No. 4	TNF $\alpha$ 基因多态性	rs361525	TGGCCAGAAACCCCTCGGAAATC [A/G] GAGCAG GGAGGATGGGGAGTGTGAG
No. 5	脂联素基因多态性	rs266729	CTTGCAAGAACCCGGCTCAGATCCCTGC [C/G] CTTCAA AAACAACCATGAGCGTGC
No. 6	脂联素基因	rs17300539	ATCAGAAATGTGTGGCTTGCAAGAACC [A/G] GCTCAG

[0019]

	多态性		ATCCTGCCCTTCAAAAACA
No. 7	胰岛素受体 及受体底物 的多态性	rs1801278	TGGGAGACTGGGCCCTGCACCTCCC[A/G]GGGCTG CTAGCATTTGCAGGCCTAC
No. 8	$\beta$ 3 肾上腺素 能受体基因	rs4994	ACCTGCTGGTCATCGTGGCCATCGCC[C/T]GGACTCC GAGACTCCAGACCATGAC
No. 9	转录因子 7	rs12255372	CTGCCAGGAATATCCAGGCAAGAAT[G/T]ACCATA TTCTGATAATTACTCAGGC

[0020] GDM 各相关基因多态性的特异性探针序列如下：

[0021] 表 2. 根据 SNP 位点和侧翼序列设计 SNP 检测探针 (Seq ID No. 10-No. 81 针对每个 SNP 位点, 正反 2 条 DNA 链共设计 8 条探针)：

[0022]

SNP(rs_)	probe_strand 1	probe_strand 2
4994	GTGGCCATCGCCAGGACTCCGAGAC	GTCTCGGAGTCCAGGCGATGGCCAC
4994	GTGGCCATCGCCCGGACTCCGAGAC	GTCTCGGAGTCCCGGCGATGGCCAC
4994	GTGGCCATCGCCGGGACTCCGAGAC	GTCTCGGAGTCCGGGCGATGGCCAC
4994	GTGGCCATCGCCTGGACTCCGAGAC	GTCTCGGAGTCCGGCGATGGCCAC
361525	TTGAGGGGCATGAGGACGGGGTTCA	TGAACCCCGTCCACATGCCCTCAA
361525	TTGAGGGGCATGCGGACGGGGTTCA	TGAACCCCGTCCCATGCCCTCAA
361525	TTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCA	TGAACCCCGTCCGCATGCCCTCAA
361525	TTGAGGGGCATGTGGACGGGGTTCA	TGAACCCCGTCCATGCCCTCAA
1801278	CCTGCACCTCCCAGGGCTGCTAGCA	TGCTAGCAGCCCAGGGAGGTGCAGG
1801278	CCTGCACCTCCCCGGGCTGCTAGCA	TGCTAGCAGCCCAGGGAGGTGCAGG
1801278	CCTGCACCTCCCGGGCTGCTAGCA	TGCTAGCAGCCCAGGGAGGTGCAGG
1801278	CCTGCACCTCCCTGGGCTGCTAGCA	TGCTAGCAGCCCTGGGAGGTGCAGG
1799884	GCCCTCTCAGGAACACAGTAAGCCC	GGGCTTACTGTGATCCTGAGAGGGC
1799884	GCCCTCTCAGGACCACAGTAAGCCC	GGGCTTACTGTGCTCCTGAGAGGGC
1799884	GCCCTCTCAGGAGCACAGTAAGCCC	GGGCTTACTGTGGTCTGAGAGGGC
1799884	GCCCTCTCAGGATCACAGTAAGCCC	GGGCTTACTGTGTTCTGAGAGGGC
1800629	TTGAGGGGCATGAGGACGGGGTTCA	TGAACCCCGTCCACATGCCCTCAA
1800629	TTGAGGGGCATGCGGACGGGGTTCA	TGAACCCCGTCCCATGCCCTCAA
1800629	TTGAGGGGCATGGGGACGGGGTTCA	TGAACCCCGTCCGCATGCCCTCAA
1800629	TTGAGGGGCATGTGGACGGGGTTCA	TGAACCCCGTCCATGCCCTCAA
12255372	TCCAGGCAAGAAAGACCATATTCTG	CAGAATATGGTCATTCTTGCCTGGA
12255372	TCCAGGCAAGAACGACCATATTCTG	CAGAATATGGTCTTCTTGCCTGGA
12255372	TCCAGGCAAGAAGGACCATATTCTG	CAGAATATGGTCGTTCTTGCCTGGA
12255372	TCCAGGCAAGAATGACCATATTCTG	CAGAATATGGTCTTCTTGCCTGGA
266729	CTCAGATCCTGCACTTCAAAAACAA	TTGTTTTTGAAGAGCAGGATCTGAG
266729	CTCAGATCCTGCCCTTCAAAAACAA	TTGTTTTTGAAGCGCAGGATCTGAG
266729	CTCAGATCCTGCGCTTCAAAAACAA	TTGTTTTTGAAGGGCAGGATCTGAG
266729	CTCAGATCCTGCTCTTCAAAAACAA	TTGTTTTTGAAGTGCAGGATCTGAG
17300539	CTTGCAAGAACCAGCTCAGATCCTG	CAGGATCTGAGCAGGTTCTTGCAAG
17300539	CTTGCAAGAACCCGCTCAGATCCTG	CAGGATCTGAGCCGTTCTTGCAAG
17300539	CTTGCAAGAACCGGCTCAGATCCTG	CAGGATCTGAGCGGTTCTTGCAAG
17300539	CTTGCAAGAACCTGCTCAGATCCTG	CAGGATCTGAGCTGTTCTTGCAAG
2144908	CTGAGGACAGAGAGCCAGGGAATGA	TCATTCCCTGGCACTCTGTCTCAG
2144908	CTGAGGACAGAGCGCCAGGGAATGA	TCATTCCCTGGCCCTCTGTCTCAG
2144908	CTGAGGACAGAGGGCCAGGGAATGA	TCATTCCCTGGCGCTCTGTCTCAG

[0023]

17300539	CTTGCAAGAACCCGCTCAGATCCTG	CAGGATCTGAGCCGGTCTTGCAAG
17300539	CTTGCAAGAACCCGCTCAGATCCTG	CAGGATCTGAGCCGGTCTTGCAAG
17300539	CTTGCAAGAACCTGCTCAGATCCTG	CAGGATCTGAGCTGGTCTTGCAAG
2144908	CTGAGGACAGAGAGCCAGGGAATGA	TCATTCCCTGGCACTCTGTCCTCAG
2144908	CTGAGGACAGAGCGCCAGGGAATGA	TCATTCCCTGGCCCTCTGTCCTCAG
2144908	CTGAGGACAGAGGGCCAGGGAATGA	TCATTCCCTGGCGCTCTGTCCTCAG
2144908	CTGAGGACAGAGTGCCAGGGAATGA	TCATTCCCTGGCTCTCTGTCCTCAG

[0024] 在上述序列中,针对每一个 GDM 相关的 SNP 设计了正、反两条序列。

[0025] 在上述设计的 GDM 各相关 SNPs 的基础上,本领域技术人员可以通过本领域常规方法进行探针合成,并进行 5' 端 Poly(T) 和氨基修饰。

[0026] 在本发明的一个实施方案中,芯片制备通过芯片点样仪进行,将探针溶解在点样液中,根据设定的点样程序进行点样,点样后的基因芯片经过水合和硼氢化钠还原后即可应用于检测。

[0027] 用于检测样本中 GDM 各相关性 SNPs 的检测试剂至少包括一对用于扩增样本中各 SNPs 的 PCR 引物以及上述本发明的基因芯片。本发明的 PCR 引物根据 GDM 各相关 SNPs 的特点,利用其各自特异的侧翼序列设计引物,通过 9 次 PCR 反应可广谱扩增特异性 SNP 序列。在本发明的一个较佳实施方案中,设计了如 SEQ IDNO. 82-90 引物序列如下:

[0028] 表 3. 根据 SNP 位点两端的更远侧序列设计的用于 PCR 扩增的上下游引物 (Seq ID No. 82-No. 90):

[0029]

SNP (rs_)	primer_f	seq	primer_r	seq	length
4994	4994_f1	CCAATACCGCCAACA CCA	4994_r1	FAM-CCAGCGAAGTCACGAACAC	174bp
361525	361525_f1	GAAGGAAACAGACCA CAGACC	361525_r1	FAM-GGACACACAAGCATCAAGG A	185bp
1801278	1801278_f1	GGAGTACATGAAGAT GGACCTG	1801278_r1	FAM-TGCTGAGGATGAGGAGGC	301bp
1799884	1799884_f1	GCTCTTTGCCACCAG TCC	1799884_r1	FAM-TCCTCTCCCTTCTGTGACC T	271bp
1800629	1800629_f1	GAAGGAAACAGACCA CAGACC	1800629_r1	FAM-GGACACACAAGCATCAAGG A	185bp
12255372	1225537_2_f1	GAAACTAAGCGTGA GGG	1225537_2_r1	FAM-AATGGAGGCTGAATCTGG	219bp
266729	266729_f1	TCTGTGTGGACTGTG GAGATG	266729_r1	FAM-ACCTTGACTTTCTTGCA C	220bp
17300539	1730053_9_f1	TCTGTGTGGACTGTG GAGATG	1730053_9_r1	FAM-ACCTTGACTTTCTTGCA C	220bp
2144908	2144908_f1	CGTGCCTCTTGCTTT CTTTC	2144908_r1	FAM-TTTCTTCAGCCTCTGCCAT T	276bp



[0030] 引物合成过程中对没对引物之一的 5' 端预先进行荧光标记,

[0031] 在使用时,抽提待检测样品的基因组 DNA,以每个待检测 SNP 位点设计上下游引物并进行 PCR 扩增,在扩增过程中引入荧光标记。荧光标记的核酸靶标分子通过碱基互补配对原则与芯片上的探针杂交,通过芯片扫描获得每个位点的荧光信号。

[0032] 上述样本处理试剂、PCR 扩增试剂、杂交试剂均可以使用本领域技术人员所熟知的在这些操作过程中需使用的各种试剂,这些试剂必要时可以包括在试剂盒中,也可以将其配方列明在试剂盒的说明书中由使用者按照说明书中的指示自行配制。

[0033] 本发明的试剂盒中还包括相应的阴性对照和 / 或阳性对照样本。

[0034] 根据本发明的再一方面,提供一种评估待测样本中 GDM 各相关 SNPs,从而高效筛查 GDM 高危人群的方法。将来自待检测个体的样本使用本发明的检测试剂检测,通过样本中 GDM 各相关 SNPs 的表达情况评估该个体发生 GDM 甚至今后进展为 2 型糖尿病的可能性大小。

[0035] 下面,结合附图,通过对本发明较佳实施方式的描述,详细说明但不限制本发明。

[0036] 实施例 1 :GDM 各相关 SNPs 检测芯片的制备

[0037] 1. 生产原材料的厂商、规格

[0038]

名称	厂商	规格	商品名
醛基基片	Capitalbio	75.5×25.2×1.0	高分子三维基片 D
基因芯片点样液	Capitalbio	5ml	

[0039] 探针序列设计如 Seq ID No. 10-No. 81 所示,按照本领域技术人员熟知的方法合成 5' 端氨基标记探针。

[0040] 2. 芯片制备过程 :

[0041] (1) 将合成的探针溶解于基因芯片点样液中,用 SmartArray™(CapitalBioCorp.) 点样仪点制在一张 75×25mm、经过醛基修饰的芯片基片上,干燥后保存。

[0042] (2) 芯片使用前需经过如下前处理 :

[0043] 1) 将芯片置于密闭、100%湿度的湿盒中,37℃过夜处理。

[0044] 2) 将芯片放于 0.25% NaBH<sub>4</sub> 溶液中,水平摇床 (80rpm) 上还原处理 5min。

[0045] 3) 在蒸馏水中,水平摇床 (80rpm) 上清洗 5min。

[0046] 4) 重复 3) 一次。

[0047] 5) 把芯片放置于 50ml 专门的离心甩干管中,2000rpm 离心 1min。经如

[0048] 上处理的芯片即可用于杂交。

[0049] 实施例 2 :GDM 各相关 SNPs 检测试剂盒样本检测

[0050] 临床验证结果表明,本发明的检测系统通量大、灵敏度高,基因芯片技术的引入使得该方法具有与荧光定量 PCR 相当的灵敏度。具体试剂、检测方法如下 :

[0051] 1. 试剂盒组成

[0052]

组成成分	数量	保存条件	组成成分	数量	保存条件
裂解液	50 人份	4℃	POD 母液	1 管 (100ul)	4℃
PCR Mix1-9	50 管	-20℃	TMB (2mg/ml)	1 瓶 (20ul)	4℃
PC	1 管 (100ul)	-20℃	无菌纯水	1 管	-20℃

[0053] 其中, PCR Mix1-9 含 SEQ ID NO. 82-90 的引物。

[0054] 2. 需配备的仪器及配制的试剂如下:

[0055] DNA 电泳仪、PCR 仪、芯片杂交仪、摇床、0.25% NaBH<sub>4</sub> 溶液。

[0056] 其他需要的试剂按照以下配方配制:

[0057]

20×SSC NaCl 175.3g 柠檬酸钠 88.2g 加 H <sub>2</sub> O 溶至 1000ml, 用 pH 计调 pH 至 7.0, 高压灭菌	10% SDS, pH7.0 将 20gSDS 加 H <sub>2</sub> O180ml 溶解, 用 HCl 调 pH 至 7.0 最后定容至 200ml
A 液 (2×SSC, 0.1% SDS, pH 7.4) 20×SSC 100ml 10% SDS 10ml 加 H <sub>2</sub> O 溶至 1000ml, 调 pH 至 7.4	B 液 (0.5×SSC, 0.1% SDS, pH7.4) 20×SSC 25ml 10% SDS 10ml 加 H <sub>2</sub> O 溶至 1000ml, 调 pH 至 7.4
C 液 (0.1M 柠檬酸钠, pH5.0) 柠檬酸钠 14.7g 溶于 450ml 水, 用浓 HCl 调 pH 至 5.0, 最后定容至 500ml	

[0058] 3、操作步骤

[0059] (1) 样本收集及保存

[0060] GDM 易感人群筛查样本主要取外周静脉血样本进行检测。采集的样本在室温放置不超过 2 小时, 4℃ 保存不超过 24 小时, -20℃ 保存不超过 3 个月。样本应避免反复冻融。

[0061] (2) 样本处理

[0062] 将血液样本转移到 1.5ml 微量离心管中, 13000rpm 离心 10 分钟, 弃去上清, 保留管底的细胞块。

[0063] 加入 50ul 裂解液悬浮沉淀, 100℃ 加热 10 分钟, 13000rpm 离心 10 分钟, 保留上清待用。

[0064] (3) PCR 扩增

[0065] 取 PCR 反应管, 在管壁上做好标记, 分别加入已提取的待测样品 DNA 5 μl, 反应总体积为 25 μl。每次实验, 必须设置一个阴性对照, 即以 5 μl 无菌纯水为模板。

[0066] 按图 2 流程进行扩增:

[0067]

[0068]

[0069]

[0070] (4) 杂交

[0071] 取同一待检样品的各个 PCR 扩增产物各 2 μl 混合, 经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 加入杂交液 15 μl, 95℃ 变性处理 3min, 冰上放置 2min 以上后上样于芯片。

[0072] (5) 芯片清洗

[0073] 取出芯片, 移至装有预热 B 液的 50ml 管中, 于 42℃ 轻摇洗涤 5 分钟。

[0074] (6) 扫描

[0075] 将芯片放置于扫描仪 (LuxScan 10K) 中按既定程序扫描。

[0076] (7) 结果判定

[0077] 作为对照的杂交点会在 PC 位置出现绿色荧光信号,提示本次杂交成功;同时其他位点不应该显色,此时结果的判读视为有效。

[0078] 结果见下表。

[0079] 膜条上的探针排列顺序

[0080]

[0081]

基因 1SNP1	基因	基因 1SNP3	基因
----------	----	----------	----

	1SNP2		1SNP4
基因 2SNP1	基因 2SNP2	基因 2SNP3	基因 2SNP4
基因 3SNP1	基因 3SNP2	基因 3SNP3	基因 3SNP4
基因 4SNP1	基因 4SNP2	基因 4SNP3	基因 4SNP4
基因 5SNP1	基因 5SNP2	基因 5SNP3	基因 5SNP4
对照 PC			

[0082] 由信号点显现的位置即可断定该患者是否携带 GDM 各相关 SNPs。

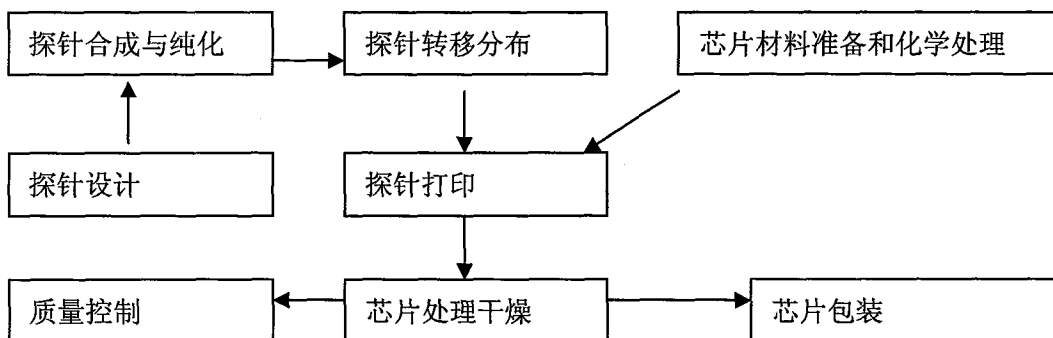


图 1

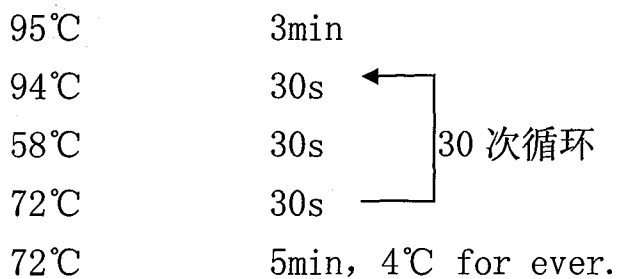


图 2