



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106367518 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610860175.9

(22)申请日 2016.09.28

(71)申请人 湖北工业大学

地址 430068 湖北省武汉市武昌区南湖李家墩1村1号

(72)发明人 周策凡 唐景峰 陈兴珍 张毅

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 42222

代理人 张火春

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

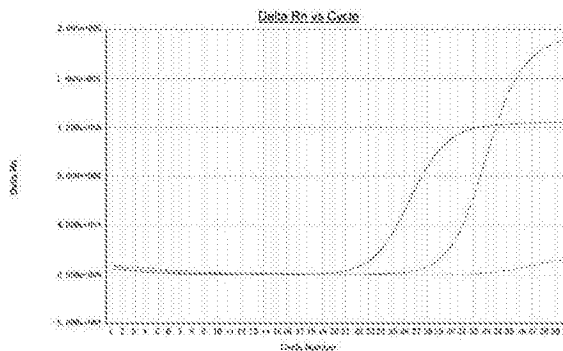
权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种Ras相关C3肉毒梭菌毒素1基因突变检测的试剂及应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于Ras相关C3肉毒梭菌毒素1(Rac1)基因突变检测的试剂、PCR检测方法及应用,属于基础生物研究及生物检测技术领域。检测试剂包括引物、肽核酸荧光探针及野生型互补的肽核酸序列,正向引物如序列表中SEQ ID NO.1;反向引物如序列表中SEQ ID NO.2;肽核酸荧光探针如序列表中SEQ ID NO.3、NO.4;野生型互补肽核酸序列如序列表中SEQ ID NO.5、NO.6。本发明从转录水平能快速发现Wnt信号通路下游Rac1基因突变情况,具有特异性强、灵敏度高显著优点,为抗癌药物筛选,新靶向药物探讨、基础科学研究提供工具。



1. 一种用于Ras相关C3肉毒梭菌毒素1 Rac1基因突变检测的试剂,其特征在于,包括用于阻断野生型Rac1基因扩增的野生型PNA序列、用于特异性扩增Y40S、G142S突变型Rac1基因序列的一组引物对及突变型PNA荧光探针:

所述检测Rac1基因Y40S或G142S突变正向引物如序列表中SEQ ID NO.1;

所述检测Rac1基因Y40S或G142S突变反向引物如序列表中SEQ ID NO.2;

所述检测Rac1基因Y40S突变PNA荧光探针如序列表中SEQ ID NO.3;

所述检测Rac1基因G142S突变PNA荧光探针如序列表中SEQ ID NO.4;

所述特异性结合包含Rac1基因40密码子野生型PNA序列如序列表中SEQ ID NO.5;

所述特异性结合包含Rac1基因142密码子野生型PNA序列如序列表中SEQ ID NO.6;

所述PNA荧光探针的5'端的荧光报告基因为:FAM、HEX、TET、JOE、VIC、ROX、Cy3或Cy5, 3'端的淬灭基因为:TAMRA、Eclipse、BHQ1、BHQ2、BHQ3或DABCYL。

2. 根据权利要求1所述的用于Ras相关C3肉毒梭菌毒素1 Rac1基因突变检测的试剂,其特征在于,所述的检测试剂还包括PCR反应液、含40密码子和142密码子突变型参考品、含40密码子和142密码子野生型参考品;其中PCR反应液包括: DEPC水、具有5'→3'外切活性的DNA聚合酶、dNTPs、10×PCR Buffer、RNASIN、M-MLV逆转录酶、oligo(dT)和含Mg离子的溶液;所述含40、142密码子突变型参考品为含SEQ NO.7的重组质粒DNA;所述含40、142密码子野生型参考品为含SEQ NO.8的重组质粒DNA。

3. 根据权利要求2所述的用于Ras相关C3肉毒梭菌毒素1 Rac1基因突变检测的试剂,其特征在于,所述具有5'→3'外切活性的DNA聚合酶为Taq酶。

4. 根据权利要求3所述的用于Ras相关C3肉毒梭菌毒素1 Rac1基因突变检测的试剂,其特征在于,所述PCR反应液各组分在PCR扩增反应体系中的终浓度为:Taq酶0.01U/μL~0.05U/μL,dNTPs 0.2~0.6 mM,10×PCR Buffer 1×,RNASIN 40U/μL~60U/μL,M-MLV逆转录酶200U/μL~320U/μL,MgCl₂ 1.5~5.0mM,溶剂为DEPC水;所述正向引物的终浓度为0.05~0.9μM,所述反向引物的终浓度为0.05~0.9μM,所述oligo(dT)终浓度为0.05~0.9μM,所述互补PNA序列终浓度为0.05~0.9μM,所述荧光探针的终浓度为0.05~0.9μM。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的用于Ras相关C3肉毒梭菌毒素1Rac1基因突变检测的试剂,其特征在于,所述的试剂进行实时荧光定量PCR的反应程序为:42°C 逆转录20 min;94°C预变性,2 min;95°C变性,30 s,58°C,45 s,此时收集荧光,进行40个循环。

6. 权利要求1所述的试剂在制备检测癌细胞的检测试剂中的应用,所述癌细胞为肾透明细胞癌、头颈部鳞状细胞癌。

一种Ras相关C3肉毒梭菌毒素1基因突变检测的试剂及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学及临床分子诊断技术领域,特别是涉及一种Ras相关C3肉毒梭菌毒素1(Rac1)基因突变检测的试剂及应用。

背景技术

[0002] Wnt信号通路广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中,是一类在物种进化过程中高度保守的信号通路。Wnt信号在动物胚胎的早期发育、器官形成、组织再生和其它生理过程中,具有至关重要的作用。如果这条信号通路中的关键蛋白发生突变或者异常表达,导致信号异常活化,就可能诱导癌症的发生。Wnt信号通路包括经典的Wnt信号通路与非经典的Wnt信号通路,在经典通路即Wnt- β -catenin信号通路中,Wnt因子通过激活细胞膜上的Frizzles/LRP5/6协同受体后抑制细胞内游离 β -catenin蛋白的磷酸化和降解,细胞质中的 β -catenin蛋白水平升高后将发生 β -catenin蛋白的核移位,导致细胞核中 β -catenin蛋白升高,胞核中 β -catenin蛋白能够联合Pygo2、Bcl-9以及FoxM1蛋白共同与TCF/LEF-1转录因子家族形成复合体并激活Wnt信号通路下游靶基因的转录激活。

[0003] Rac1是小G蛋白Rho家族rac亚家族的主要成员之一。活化的Rac1参与细胞骨架重组、细胞迁移、细胞凋亡及基因转录调节。Rac1在Wnt信号通路中主要是通过通过与散乱蛋白(dishevelled-3,Dvl-3)接触活化,导致GSK3B-Axin2-APC复合体解体,促进 β -catenin入核,刺激Tcf介导的Wnt下游靶基因转录从而调控肿瘤细胞的恶性表型,在Wnt信号通路中发挥着重要的作用。目前越来越多的研究已经发现,在很多肿瘤中Rac1蛋白均呈现不同程度的突变。

[0004] 目前研究核心信号通路的核心分子调控机制,以及某些重要成员在细胞中的表达水平,已经成为治疗肿瘤的一种关键手段。近年来Wnt信号通路在癌症中的研究,以及Rac1蛋白作为调控Wnt信号通路活性因子,其突变水平的研究,已经成为研究开发肿瘤药物急需解决的重要问题。尤其是在Rac1蛋白RAS家族保守结构域中发生的突变,对Rac1蛋白发挥功能启动非常重要的作用。例如在肾透明细胞癌中检测出Y40S突变,头颈部鳞状细胞癌中检测出G142S突变等。

[0005] 肽核酸(peptide nucleic acids,PNA)是一类以多肽骨架取代糖磷酸主链的DNA类似物。它是在第一代、第二代反义试剂的基础上,通过计算机设计构建并最终人工合成的第三代反义试剂,是一种全新的DNA类似物,即以中性的肽链酰胺2-氨基乙基甘氨酸键取代了DNA中的戊糖磷酸二酯键骨架,其余的与DNA相同,PNA可以通过Watson-Crick碱基配对的形式识别并结合DNA或RNA序列,形成稳定的双螺旋结构。由于PNA不带负电荷,与DNA和RNA之间不存在静电斥力,因而结合的稳定性和特异性都大为提高;不同于DNA或DNA、RNA间的杂交,PNA与DNA或RNA的杂交几乎不受杂交体系盐浓度影响,与DNA或RNA分子的杂交能力远优于DNA/DNA或DNA/RNA,表现在很高的杂交稳定性、优良的特异序列识别能力、不被核酸酶和蛋白酶水解。

[0006] 本方法采用特异序列的PNA寡聚物作为探针。由于PNA是一种人工合成的核酸的类

似物,并且为非手性、不带电荷的分子,避免了寡核苷酸与其靶基因结合时因电荷相互排斥所导致的杂交不稳定性,结合不易受杂交液离子强度的影响,从而显示出极强的杂交优势,大大提高了检测灵敏度。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有技术中如何确定Wnt信号通路中的核心调节分子Rac1基因突变情况,以及如何解释核心分子Rac1在肿瘤细胞中的突变水平变化的困难,提供了一种检测Wnt信号通路中Rac1基因突变检测试剂及应用。

[0008] 本发明的目的是提供一种用于Rac1基因突变检测的试剂,包括用于阻断野生型Rac1基因扩增的野生型PNA序列、用于特异性扩增Y40S、G142S突变型Rac1基因序列的一组引物对及突变型PNA荧光探针:

[0009] 所述检测Rac1基因Y40S或G142S突变正向引物如序列表中SEQ ID NO.1;

[0010] 所述检测Rac1基因Y40S或G142S突变反向引物如序列表中SEQ ID NO.2;

[0011] 所述检测Rac1基因Y40S突变PNA荧光探针如序列表中SEQ ID NO.3;

[0012] 所述检测Rac1基因G142S突变PNA荧光探针如序列表中SEQ ID NO.4;

[0013] 所述特异性结合包含Rac1基因40密码子野生型PNA序列如序列表中SEQ ID NO.5;

[0014] 所述特异性结合包含Rac1基因142密码子野生型PNA序列如序列表中SEQ ID NO.6;

[0015] 所述PNA荧光探针的5'端的荧光报告基团为:FAM、HEX、TET、JOE、VIC、ROX、Cy3或Cy5,3'端的淬灭基团为:TAMRA、Eclipse、BHQ1、BHQ2、BHQ3或DABCYL。

[0016] 本发明所述的检测试剂还包括PCR反应液、40密码子和142密码子突变型参考品、含40密码子和142密码子野生型参考品,其中PCR反应液包括:DEPC水、具有5'→3'外切活性的DNA聚合酶、dNTPs、10×PCR Buffer、RNASIN、M-MLV逆转录酶、oligo (dT) 和含Mg离子的溶液。

[0017] 所述含40、142密码子突变型参考品为含SEQ NO.7的重组质粒DNA;

[0018] 所述含40、142密码子野生型参考品为含SEQ NO.8的重组质粒DNA;

[0019] 所述具有5'→3'外切活性的DNA聚合酶为Taq酶;

[0020] 所述PCR反应液各组分在PCR扩增反应体系中的终浓度为:Taq酶0.01U/μL~0.05U/μL,dNTPs 0.2~0.6mM,10×PCR Buffer 1×,RNASIN 40U/μL~60U/μL,M-MLV逆转录酶200U/μL~320U/μL,MgCl₂ 1.5~5.0mM,溶剂为DEPC水。

[0021] 具体地,所述正向引物的终浓度为0.05~0.9μM,所述反向引物的终浓度为0.05~0.9μM,所述oligo (dT) 终浓度为0.05~0.9μM,所述互补PNA序列终浓度为0.05~0.9μM,所述荧光探针的终浓度为0.05~0.9μM。

[0022] 本发明所述的试剂进行实时荧光定量PCR的反应程序为:42℃逆转录20min;94℃预变性,2min;95℃变性,30s,58℃,45s(收集荧光),进行40个循环。

[0023] 本发明的原理是通过构建与Rac1基因野生型互补的一段肽核酸PNA序列,当肽核酸PNA序列与Rac1基因互补结合时,任一突变均可导致PNA/DNA产生错配,从而使得溶解温度发生改变。进而根据Rac1基因突变型设计特异性的肽核酸PNA探针以及引物对Rac1突变型基因进行荧光定量PCR扩增,经过一轮的PCR扩增后,即可将Rac1基因突变型与野生型进

行区分开来。

[0024] 进一步地,本发明还提供了所述的试剂在制备检测癌细胞的检测试剂中的应用,所述癌细胞为肾透明细胞癌、头颈部鳞状细胞癌。

[0025] 与现有技术相比,本发明的优点和积极效果是:Rac1基因是Wnt信号通路中 β -catenin蛋白上游发挥着重要功能的基因,本发明提供了直接检测Wnt信号通路中Rac1基因突变检测的试剂,借助于所述检测试剂能够通过实时荧光定量PCR法在转录水平快速检测出Rac1基因的突变,而与普通实时荧光定量PCR不同的是,本发明设计野生型PNA序列,可有效抑制野生型基因组扩增,只富集突变型基因扩增,大大提高了检测特异性,我们使用的突变型PNA荧光探针更加灵敏,本发明为抗癌药物的筛选,新靶向药物的机制研究都提供了非常有利的工具。

[0026] 同时本发明的实验体系可以在任何一台实时荧光定量PCR仪器上进行,上述引物置于八联管中,进行实时荧光定量PCR检测,实验操作简单,费用低廉,结果重复性,敏感性好,是研究肿瘤相关药物作用机理及基础科学研究的一种重要手段。

附图说明

[0027] 图1是本发明实施例中所述肽核酸质谱图;

[0028] 图2是样品、Y40S突变型和野生型参考品PCR扩增图;

[0029] 图3是样品、G142S突变型和野生型参考品PCR扩增图;

具体实施方式

[0030] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0031] 本发明通过肾透明细胞癌细胞进行举例说明,但是本发明不局限于肾透明细胞癌细胞,本发明所述检测试剂还可以应用于头颈部鳞状细胞癌。

[0032] 实施例中的有关DNA和RNA基本操作均参考《分子克隆:实验室操作指南》(金冬雁等译,科学出版社,北京(1998))和《精编分子生物学指南》(颜子译,科学出版社,北京(1998))。

[0033] 本发明中Caki-2(人肾透明细胞癌细胞系)购自美国ATCC,培养细胞所使用的RPMI-1640培养基及10%胎牛血清均购自英俊(invitrogen)公司,其他试剂主要购自宝生物工程(大连)有限公司。

[0034] **【实施例1】**引物探针设计

[0035] 根据美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 报道的Rac1mRNA序列(NCBI Reference Sequence:NM_006908.4),使用Applied Biosystems公司开发的Primer Express Software for Real-Time PCR软件设计特异的Rac1引物与探针。

[0036] Rac1Y40S:

[0037] Rac1-F:5'-CTTGCTACTGATCAGTTACACAACC-3';(SEQ NO.1)

[0038] Rac1-R:5'-CGGATCGCTTCGTCAAACAC-3';(SEQ NO.2)

[0039] 突变型Rac1(PNA)-P:5'FAM-CTTTGACAATTCTTCTGCCAATGT-BHQ 3';(SEQ NO.3)

[0040] 野生型Rac1-PNA:5'-ACATTGGCAGAATAATTGTCAAAG-3'; (SEQ NO.5)

[0041] 靶序列:

[0042] GACGGAGCTGTAGGTAAAACCTTGCTACTGATCAGTTACACAACCAATGCATTTCCCTGGAGAATATATCCCTACTGTCTTTGACAATTATTCTGCCAATGTTATGGTAGATGGAAAACCGGTGAATCTGGGCTTATGGGATACAGCTGGACAAGAAGATTATGACAGATTACGCCCCCTATCCTATCCGCAAACAGATGTGTTCTTAATTTGCTTTTCCCTTGTGAGTCCTGCATCATTTGAAAATGTCCGTGCAAAGTGGTATCCTGAGGTGCGGCACCACTGTCCCAACACTCCCATCATCCTAGTGGGAACTAAAACCTTGATCTTAGGGATGATAAAGACACGATCGAGAACTGAAGGAGAAGAAGCTGACTCCATCACCTATCCGAGGGTCTAGCCATGGCTAAGGAGATTGGTGCTGTAAAATACCTGGAGTGCTCGGCGCTCACACAGCGAGGCCTCAAGACAGTGTGGTGGACGAAGCGATCCGAGCAGTCTCTCTGC

[0043] Rac1G142S:

[0044] Rac1-F:5'-CTTGCCTACTGATCAGTTACACAACC-3'; (SEQ NO.1)

[0045] Rac1-R:5'-CGGATCGCTTCGTCAAACAC-3'; (SEQ NO.2)

[0046] Rac1 (PNA)-P:5'FAM-TATCCGACAGTCTAGCCAT-BHQ 3'; (SEQ NO.4)

[0047] Rac1-PNA:5'-ATGGCTAGACCCTGCGGATA-3'; (SEQ NO.6)

[0048] 靶序列同上;

[0049] 以上:F:forward,正向;Rac1-F表示用于检测核酸的正向引物。

[0050] R:reverse,反向;Rac1-R表示用于检测核酸的反向引物。

[0051] P:probe,荧光探针;Rac1-P表示用于检测核酸的荧光探针,该荧光探针为TaqMan荧光探针。

[0052] 在本发明实施例中,修饰荧光探针的5'端的荧光报告基团可以为:FAM,HEX,TET,JOE,VIC,ROX,Cy3或Cy5;修饰荧光探针的3'端的淬灭基团可以为:TAMRA,Eclipse,BHQ1,BHQ2,BHQ3或DABCYL,该荧光报告基团与淬灭基团不影响荧光定量PCR的扩增,只需根据探针的荧光报告基团和淬灭基团选择所用的仪器的型号设置可检测的荧光信号范围。本发明实施例提供的荧光探针荧光报告基团:FAM、HEX、TET和FAM的激发波长为470-650nm,接收波长为500-700nm;淬灭基团:Eclipse、TAMRA、BHQ1。引物合成后的纯化方式可以为:HAP、PAGE和HPLC纯化方式。

[0053] 【实施例2】构建含有Rac1基因突变型和野生型的DNA片段的重组质粒

[0054] 一、人肾透明细胞癌Caki-2细胞系培养与传代

[0055] 1) 细胞培养

[0056] 所有细胞系使用RPMI-1640培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10%胎牛血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 于37°C、5%CO₂环境下培养。

[0057] 2) 细胞传代

[0058] 首先使用灭菌吸管将细胞培养皿中的培养液吸出,加入PBS缓冲液清洗2遍,往细胞中慢慢滴加适量胰蛋白酶,待细胞变圆,调整角度细胞能够移动后加入3ml的含10%胎牛血清的DMEM培养基,反复轻轻吹打后,显微镜下观察细胞形态并计数,根据培养皿中细胞的含量将适量的细胞传代至其他灭菌的培养皿中,加入5ml的DMEM培养基后放入5%CO₂培养箱。

[0059] 细胞计数公式(个/ml):(4大格细胞总数)×10⁴×稀释倍数/4

[0060] 二、总RNA的提取

[0061] 1) 倒掉培养基, PBS清洗后, 直接将1ml Trizol注入培养瓶(其中细胞 5×10^6 个/ml), 反复抽吸均匀;

[0062] 2) 在装有裂解物的离心管中加入0.2ml的氯仿(为Trizol总体积的1/5), 振荡混均30秒, 室温下静置5分钟;

[0063] 3) 12000rpm 4℃离心15分钟, 分相为三层。上层: RNA(约为Trizol的60%); 中间: DNA; 下层: 蛋白质(酚-氯仿);

[0064] 4) 小心吸取上清液, 转移到另一EP管中。1ml裂解物产生的上清液体积约为0.4~0.6ml。有机相和中间层含有DNA和蛋白质, 避免触及;

[0065] 5) 上清液加入约0.5ml的异丙醇, 振荡混均30秒。室温下静置10分钟;

[0066] 6) 12000rpm 4℃离心10分钟;

[0067] 7) RNA沉淀将在离心底的侧面形成。小心吸弃上清液, 注意避免吸弃RNA沉淀;

[0068] 8) 离心管加入1ml预冷的75%乙醇(1ml Trizol至少1ml乙醇清洗DNA), 振荡混均30秒, 使沉淀振荡起来, 室温12000rpm离心1~2分钟。尽可能吸弃上清液, 防止RNA沉淀丢失。重复以上清洗步骤一次。在75%乙醇中, RNA在4℃至少保存1周, -20℃至少保存1年;

[0069] 9) 室温选择流动性小, 倒置离心管于滤纸上, 干燥RNA, 但不能完全干燥(5~10分钟)。用DEPC水15μL溶解沉淀, 55-60℃孵育10~15分钟。

[0070] 10) RNA纯度检测

[0071] 滴加2μL RNA溶液于超微量分光光度计(型号:P330-311), 并读取仪器中OD260/OD280比值。

[0072] 三、构建重组质粒

[0073] 1) 将含有Rac1基因突变型和野生型的DNA片段进行PCR扩增;

[0074] 含Y40S、G142S密码子突变型的DNA片段为SEQ NO.7所示的序列;

[0075]

GGAGCTGTAGGTAAAACCTTGCCCTACTGATCAGTTACACAACCAATGCATTTCCCTGGAGAATATATCCCTACTGTCTT
TGACAATTCTTCTGCCAATGTTATGGTAGATGGAAAACCGGTGAATCTGGGCTTATGGGATACAGCTGGACAAGAAG
ATTATGACAGATTACGCCCCCTATCCTATCCGCAAACAGATGTGTTCTTAATTTGCTTTTCCCTTGTGAGTCCTGCA
TCATTTGAAAATGTCCGTGCAAAGTGGTATCCTGAGGTGCGGCACCACTGTCCCAACACTCCCATCATCCTAGTGGG
AACTAAACTTGATCTTAGGGATGATAAAGACACGATCGAGAACTGAAGGAGAAGAAGCTGACTCCCATCACCTATC
CGCAGAGTCTAGCCATGGCTAAGGAGATTGGTGCTGTAAAATACCTGGAGTGCTCGGCGCTCACACAGCGAGGCCTC
AAGACAGTGTGTTGACGAAGCGATCCGAGCAGTCCTCTGCCCCGCT; (SEQ NO.7)

[0076] 含40、142密码子野生型的DNA片段为SEQ NO.8所示的序列;

[0077]

GGAGCTGTAGGTAAAACCTTGCCCTACTGATCAGTTACACAACCAATGCATTTCCCTGGAGAATATATCCCTACTGTCTT
TGACAATTATTCTGCCAATGTTATGGTAGATGGAAAACCGGTGAATCTGGGCTTATGGGATACAGCTGGACAAGAAG
ATTATGACAGATTACGCCCCCTATCCTATCCGCAAACAGATGTGTTCTTAATTTGCTTTTCCCTTGTGAGTCCTGCA
TCATTTGAAAATGTCCGTGCAAAGTGGTATCCTGAGGTGCGGCACCACTGTCCCAACACTCCCATCATCCTAGTGGG
AACTAAACTTGATCTTAGGGATGATAAAGACACGATCGAGAACTGAAGGAGAAGAAGCTGACTCCCATCACCTATC
CGCAGGGTCTAGCCATGGCTAAGGAGATTGGTGCTGTAAAATACCTGGAGTGCTCGGCGCTCACACAGCGAGGCCTC
AAGACAGTGTGTTGACGAAGCGATCCGAGCAGTCCTCTGCCCCGCT; (SEQ NO.8)

[0078] 2) 将PCR产物进行双酶切;

[0079] 载体和PCR产物分别用一下条件进行双酶切(反应体系均为30u1, 37°C, 酶切2小时);

[0080] 3) 将双酶切产物电泳后割胶回收(按照试剂盒说明书进行操作);

[0081] 4) 将酶切产物与质粒载体进行连接;

[0082] 上述双酶切产物经过纯化(其中载体酶切产物割胶回收, PCR片段酶切后纯化步骤与上述PCR产物纯化步骤相同), 在T4DNA连接酶作用下16°C连接过夜。连接体系如下: 载体, 2u1; PCR片段, 6u1; 10xT4buffer, 1u1; T4DNA ligase, 1u1。

[0083] 5) 转化大肠杆菌感受态;

[0084] 取上述连接液5u1转化到预先制备的DH5a化学感受态细胞中, 冰浴30分钟, 42°C热激2min, 置冰上5min, 加入1ml LB培养液37°C摇床45min, 离心5000rpm, 1-5min(不要离心太久, 以免太实), 最后均匀涂布在含有100ng/ml抗生素的LB平板上(100-150u1)。将平板在37°C倒置培养过夜。挑取阳性克隆菌落转划到另一块含有100ng/ml抗生素的LB平板上, 并对之进行编号, 37°C倒置培养过夜。

[0085] 6) QIAGEN试剂盒抽提质粒(按照说明书进行), 制成参考品。

[0086] **【实施例3】实时荧光定量PCR法扩增样本**

[0087] 取提取的总RNA 1-5ug, 加入PCR反应液, PCR反应液包括: 无菌水、具有5'→3'外切活性的DNA聚合酶、dNTPs、10×PCR Buffer、RNASIN、M-MLV逆转录酶、oligo(dT)和含Mg离子的溶液。其中, 浓度为5U/μL的具有5'→3'外切活性的DNA聚合酶0.3μL, 浓度为10mmol/L的dNTPs 2μL, 10×PCR Buffer 5μL, 浓度为40U/μL的RNASIN 0.6μL, 浓度为200U/μL的M-MLV逆转录酶0.6μL, 浓度为25mmol/L的MgCl₂溶液5μL, 添加无菌水至体积为50μL。其中, 具有5'→3'外切活性的DNA聚合酶可以为Taq酶。

[0088] PCR扩增: 将各反应管放入荧光定量PCR仪器的反应槽内, 设置标记荧光基团种类、样品名称及类型, 选择要用的Taqman荧光探针(本产品荧光报告基团为FAM、HEX、TAT, 荧光淬灭基团为Eclipse), 定义样品孔, 并按下表提供的扩增程序进行PCR扩增:

[0089] 表1为PCR扩增反应扩增程序

[0090]

步骤	温度	时间	循环数
1	42°C	20 min	1
2	94°C	2 min	1
3	{ 95°C 58°C	{ 30s 45s	40

[0091] 在扩增程序的第三步的终了读取荧光值;

[0092] 数据分析判断:

[0093] 同时选定所检样本与该样本检测位点对应的突变型和野生型参考品孔, 对比三孔PCR扩增曲线(C_T_A表示样本孔CT值, C_T_W表示野生型CT值, C_T_M表示突变型CT值):

[0094] 当C_T_M ≤ C_T_A < C_T_W时, 表明该样本存在突变;

[0095] 当C_T_W = C_T_A时, 表明该样本为野生型。

[0096] 图1是本发明实施例中所述肽核酸质谱图；

[0097] 图2是本发明实施例中所述Y40S突变型和野生型参考品PCR扩增图,图中上、中、下三条线各表示Rac1第40位密码子突变型参考品、样本以及野生型参考品的扩增曲线；

[0098] 图3是本发明实施例中所述G142S突变型和野生型参考品PCR扩增图,图中上、中、下三条线各表示Rac1第142位密码子突变型参考品、样本以及野生型参考品的扩增曲线；

[0099] 以上实施例仅用来说明本发明的技术方案,而非对其进行限制,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的普通技术人员来说,依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换,而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明所要求保护的技术方案的精神和范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 湖北工业大学

<120> 一种Ras相关C3肉毒梭菌毒素1基因突变检测的试剂及应用

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Y40S或G142S突变正向引物

<400> 1

cttgccctact gatcagttac acaace

26

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Y40S或G142S突变反向引物

<400> 2

cggatcgctt cgtcaaacac

20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Y40S突变PNA荧光探针

<400> 3

ctttgacaat tcttctgcca atgt

24

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> G142S突变PNA荧光探针

<400> 4

tatccgcaga gtctagccat

20

<210> 5

<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	40密码子野生型PNA序列	
<400>	5	
	acattggcag aataattgtc aaag	24
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	142密码子野生型PNA序列	
<400>	6	
	atggctagac cctgcggata	20
<210>	7	
<211>	507	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	40、142密码子突变型参考品	
<400>	7	
	ggagctgtag gtaaaacttg cctactgac agttacacaa ccaatgcatt tcctggagaa	60
	tatatcccta ctgtctttga caattcttct gccaatgtta tggtagatgg aaaaccggtg	120
	aatctgggct tatgggatac agctggacaa gaagattatg acagattacg ccccctatcc	180
	tatccgcaaa cagatgtggt ctaaatttgc ttttccttg tgagtctgc atcatttgaa	240
	aatgtccgtg caaagtggta tctgaggtg cggcaccact gtccaacac tcccatcac	300
	ctagtgggaa ctaaacttga tcttaggat gataaagaca cgatcgagaa actgaaggag	360
	aagaagctga ctcccatcac ctatccgcag agtctagcca tggctaagga gattggtgct	420
	gtaaaatacc tggagtgtc ggcgtcaca cagegagcc tcaagacagt gtttgacgaa	480
	gcgatccgag cagtcctctg cccgct	507
<210>	8	
<211>	507	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220>		
<223>	40、142密码子野生型参考品	
<400>	8	
	ggagctgtag gtaaaacttg cctactgac agttacacaa ccaatgcatt tcctggagaa	60

tatatcccta	ctgtctttga	caattattct	gccaatgtta	tggtagatgg	aaaaccggtg	120
aatctgggct	tatgggatac	agctggacaa	gaagattatg	acagattacg	ccccctatcc	180
tatccgcaaa	cagatgtggt	cttaatttgc	ttttcccttg	tgagtccctgc	atcatttgaa	240
aatgtccgtg	caaagtggta	tcctgagggtg	eggcaccact	gtcccaacac	tcccatcatc	300
ctagtgggaa	ctaaacttga	tcttagggat	gataaagaca	cgatcgagaa	actgaaggag	360
aagaagctga	ctcccatcac	ctatccgcag	ggtctagcca	tggtctaagga	gattggtgct	420
gtaaaatacc	tggagtgctc	ggcgtcaca	cagcgaggcc	tcaagacagt	gtttgacgaa	480
gcgatccgag	cagtcctctg	cccgcct				507

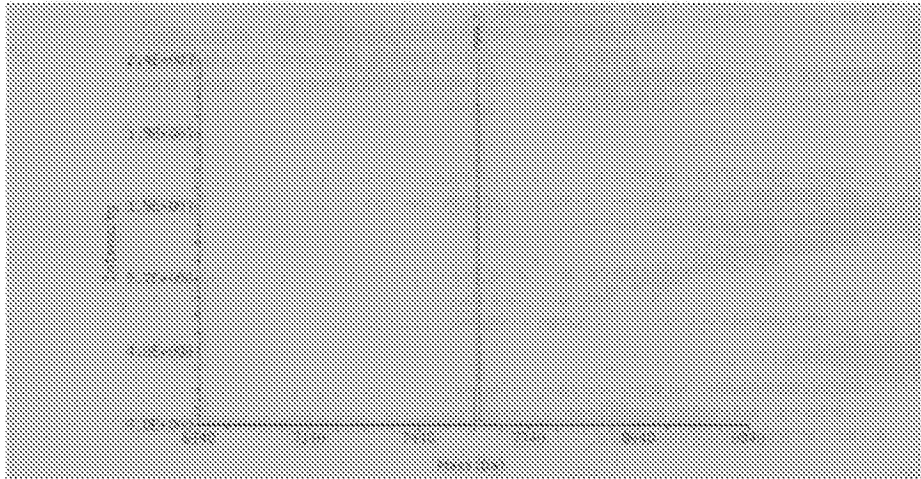


图1

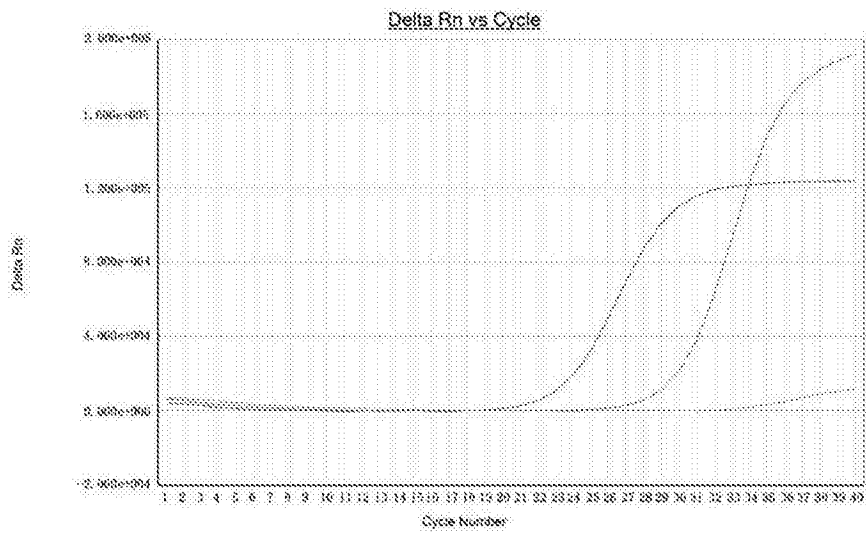


图2

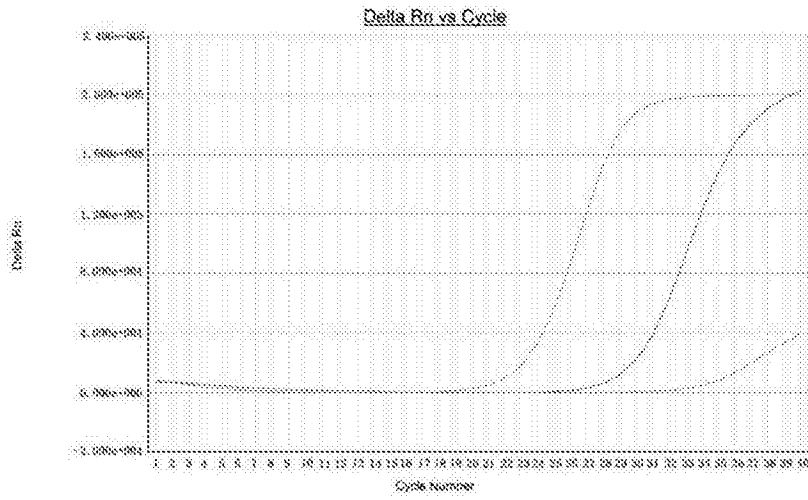


图3