

【11】證書號數：I350312

【45】公告日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 11 日

【51】Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01) C12Q1/66 (2006.01)
G01N33/533 (2006.01)

發明

全 16 頁

【54】名稱：測定 SMN 基因是否發生基因轉移或突變的方法

METHOD FOR DETERMINING SMN GENE TRANSFER AND
INTRAGENIC MUTATIONS

【21】申請案號：098108379

【22】申請日：中華民國 98 (2009) 年 03 月 16 日

【11】公開編號：201035321

【43】公開日期：中華民國 99 (2010) 年 10 月 01 日

【72】發明人：吳秀梅 (TW) WU, SHOU MEI；王俊棋 (TW) WANG, CHUN CHIU；張建國 (TW) CHANG, JAN GOWTH；鐘育志 (TW) JONG, YUH JYH

【71】申請人：高雄醫學大學

KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

高雄市三民區十全一路 100 號

【74】代理人：洪澄文；顏錦順

【56】參考文獻：

Lorson MA et al, "Identification and characterization of the porcine (*Sus scrofa*) survival motor neuron (SMN1) gene: an animal model for therapeutic studies.", *Dev Dyn.* 2008 Aug;237 (8):2268-78.

Wang CC et al, "Quantification of SMN1 and SMN2 genes by capillary electrophoresis for diagnosis of spinal muscular atrophy.", *Electrophoresis.* 2008 Jul;29(13):2904-11.

Sun Y et al, "Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy.", *Hum Mutat.* 2005 Jan;25(1):64-71.

Malcov M et al, "Multiplex nested PCR for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy.", *Fetal Diagn Ther.* 2004 Mar-Apr;19(2):199-206.

[57]申請專利範圍

1. 一種測定 SMN 基因是否發生基因轉移或突變的方法，包括：提供一包括 SMN 基因之核苷酸片段；提供 SMN 基因外顯子(exon)1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8 之引子對；以該核苷酸片段為模板，進行一通用多重聚合酶連鎖反應(universal multiplex PCR)，利用該些引子對放大 SMN 基因之外顯子 1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8，以獲得 SMN 基因外顯子 1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8 之片段；另以一螢光標示引子標定該放大的外顯子 1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8 片段，以獲得經螢光標定的外顯子片段，以及以毛細管電泳分析該些經螢光標定的外顯子片段，其中若外顯子 7 及 8 的 SMN1/SMN2 比例不同，則表示該 SMN 基因發生基因轉移；且若外顯子片段出現分叉波峰，表示此片段內之 SMN 基因含有突變。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 SMN 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該通用多重聚合酶連鎖反應的條件為 95℃，10 分鐘，1 循環；95℃，45 秒，60℃，2 分

(2)

鐘，重複 3 循環；95 秒，45 秒，50 秒，1.5 分鐘，72 秒，1 分鐘，重複 25 循環；72 秒，10 分鐘，1 循環。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該螢光分子標定該放大的外顯子片段的方法係為利用一經螢光標定之引子進行聚合酶連鎖反應。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 1 之引子對為序列識別號：1、2。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 2a 之引子對為序列識別號：3、4。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 2b 之引子對為序列識別號：5、6。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 3 之引子對為序列識別號：7、8。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 4 之引子對為序列識別號：9、10。
9. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 5 之引子對為序列識別號：11、12。
10. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 6 之引子對為序列識別號：13、14。
11. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 7 之引子對為序列識別號：15、16。
12. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 8 之引子對為序列識別號：17、18。
13. 如申請專利範圍第 1 項所述之測定 *SMN* 基因是否發生基因轉移或突變的方法，其中該生物樣本包括血液、羊水、腦脊液、或來自皮膚、肌肉、結膜、胎盤或腸胃道之組織液。
14. 一種測定個體是否帶有脊髓性肌肉萎縮症基因型的方法，包括：由該個體中獲得一生物樣本，其包括一具有 *SMN* 基因之核苷酸片段，其中該個體為一人類個體；提供 *SMN* 基因外顯子 1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8 之引子對，包括序列識別號：1-18；以該核苷酸為模板，進行一通用多重聚合酶連鎖反應(universal multiplex PCR)，利用該些引子對放大 *SMN* 基因之外顯子 1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8，以獲得 *SMN* 基因外顯子 1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8 之片段；以一螢光標示引子標定該放大的外顯子 1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8 片段，以獲得經螢光標定的外顯子片段，以及以毛細管電泳分析該些經螢光標定的外顯子片段，其中若外顯子 7 及 8 片段的 *SMN1/SMN2* 比例不同，或外顯子 1、2a、2b、3、4、5、6、7 及 8 片段出現分叉波峰，則表示該個體罹患脊髓性肌肉萎縮症的風險較高。
15. 如申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 1 之引子對為序列識別號：1、2。
16. 申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 2a 之引子對為序列識別號：3、4。
17. 申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 2b 之引子對為序列識別號：5、6。

18. 申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 3 之引子對為序列識別號：7、8。
19. 申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 4 之引子對為序列識別號：9、10。
20. 申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 5 之引子對為序列識別號：11、12。
21. 申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 6 之引子對為序列識別號：13、14。
22. 申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 7 之引子對為序列識別號：15、16。
23. 申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該 *SMN* 基因外顯子 8 之引子對為序列識別號：17、18。
24. 如申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該個體為一哺乳動物。
25. 如申請專利範圍第 14 項所述之測定罹患脊髓性肌肉萎縮症風險的方法，其中該生物樣本包括血液、羊水、腦脊液、或來自皮膚、肌肉、結膜、胎盤或腸胃道之組織液。
26. 一種檢測脊髓性肌肉萎縮症之套組，包括：複數個引子對，包括序列識別號：1-2、3-4、5-6、7-8、9-10、11-12、13-14、15-16 與 17-18，以及一使用說明。
27. 如申請專利範圍第 26 項所述之檢測脊髓性肌肉萎縮症之套組，更包括一內部標準引子對，其為序列識別號：19、20 及 19、22，一螢光標示引子，其為序列識別號：21。

圖式簡單說明

第 1(a)圖顯示 *SMN1/SMN2* 為 4 : 0 之毛細管電泳圖。

第 1(b)圖顯示 *SMN1/SMN2* 為 3 : 1 之毛細管電泳圖。

第 1(c)圖顯示 *SMN1/SMN2* 為 2 : 1 之毛細管電泳圖。

第 1(d)圖顯示 *SMN1/SMN2* 為 2 : 2 之毛細管電泳圖。

第 1(e)圖顯示 *SMN1/SMN2* 為 1 : 1 之毛細管電泳圖。

第 1(f)圖顯示 *SMN1/SMN2* 為 1 : 2 之毛細管電泳圖。

第 1(g)圖顯示 *SMN1/SMN2* 為 1 : 3 之毛細管電泳圖。

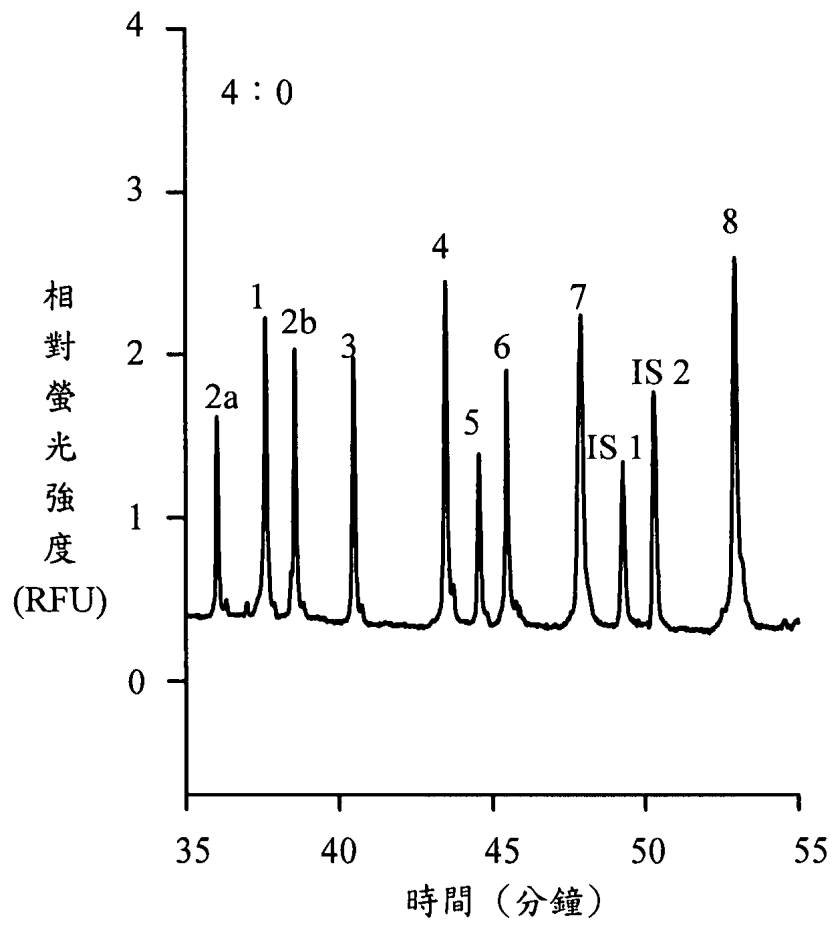
第 1(h)圖顯示 *SMN1/SMN2* 為 0 : 4 之毛細管電泳圖。

第 2 圖顯示 *SMN1/SMN2* 在 exon 7 為 0 : 2，*SMN1/SMN2* 在 exon 8 為 1 : 1 之毛細管電泳圖。

第 3a-3b 圖顯示 SMA 帶原者之毛細管電泳圖及定序資料。

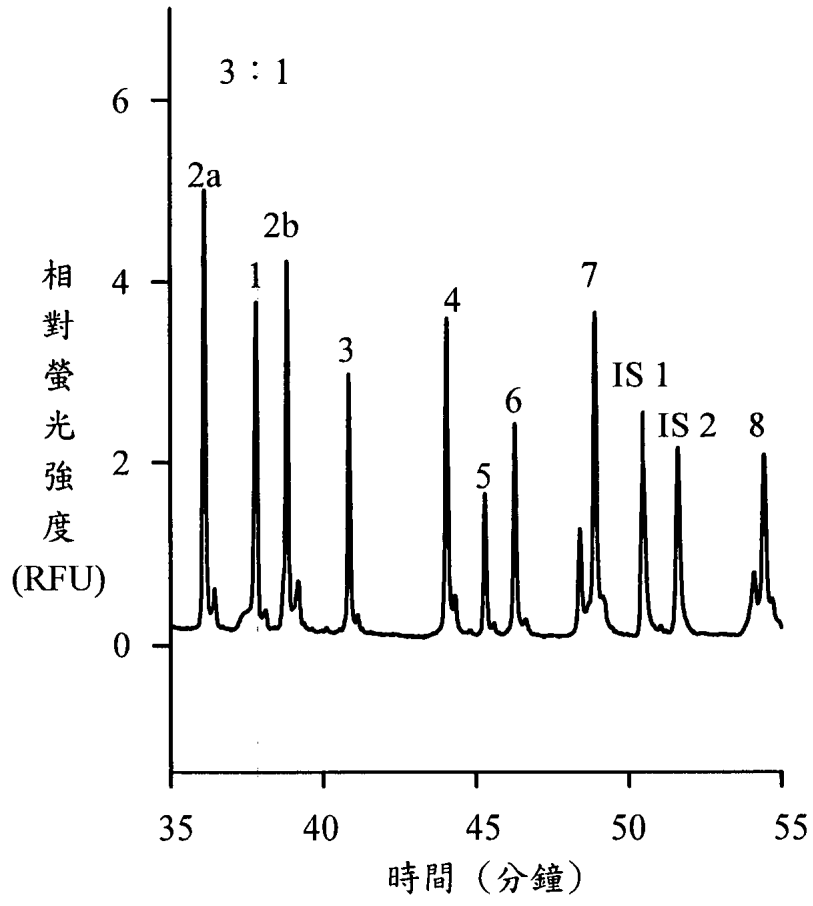
第 4a-4b 圖顯示正常人之毛細管電泳圖及定序資料。

(4)



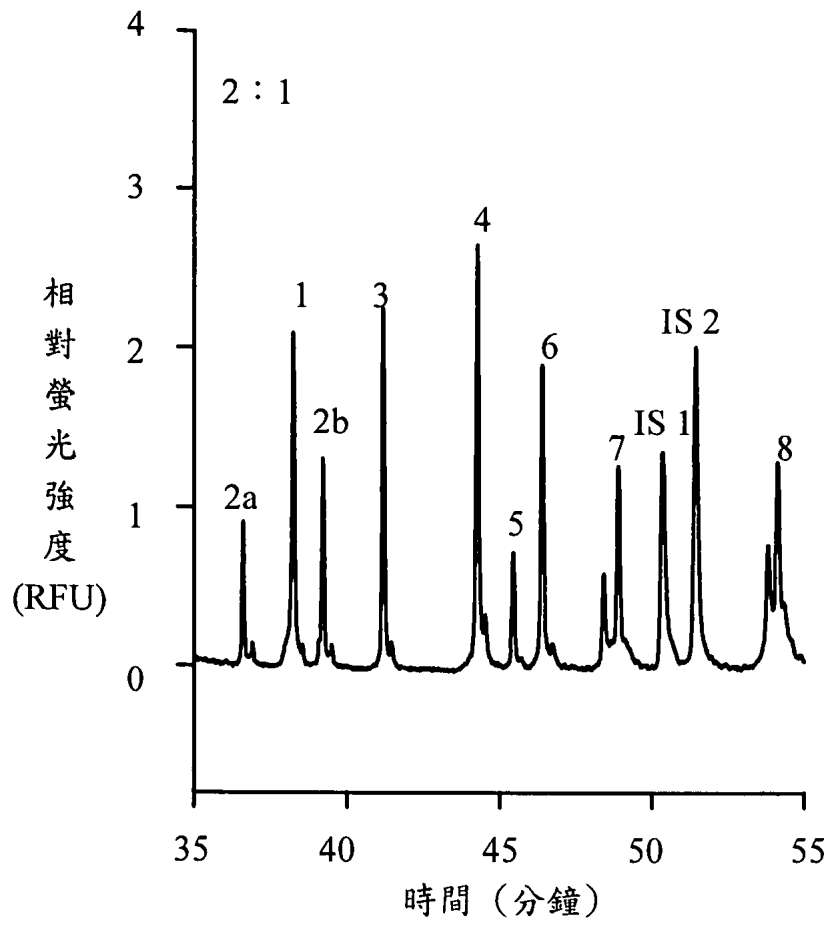
第 1a 圖

(5)



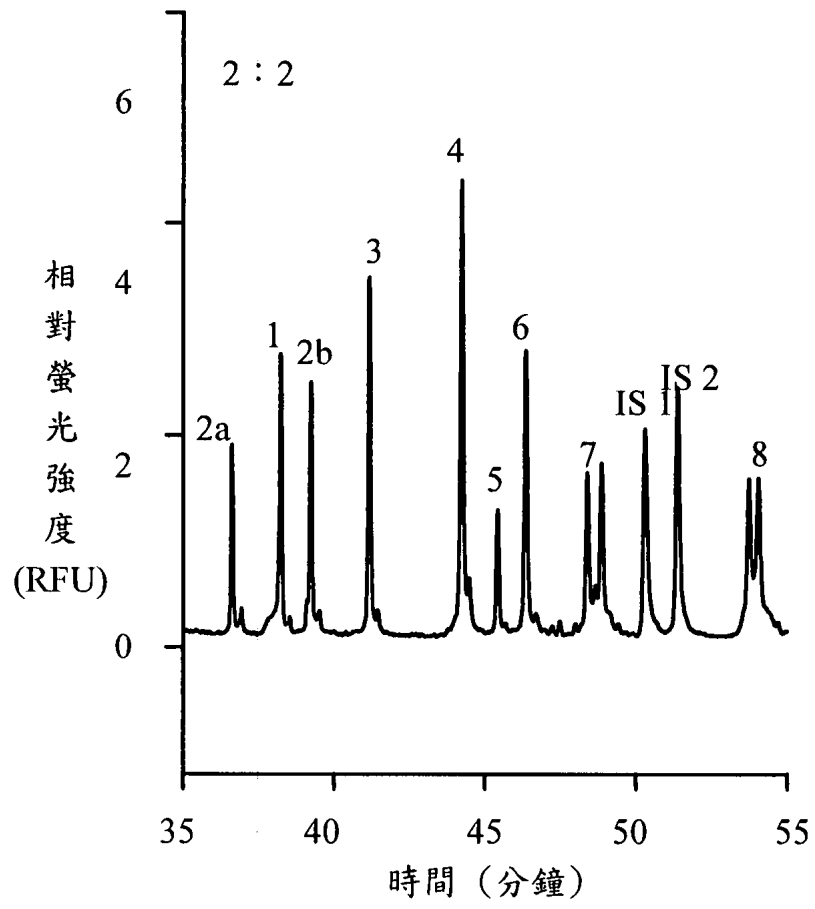
第 1b 圖

(6)



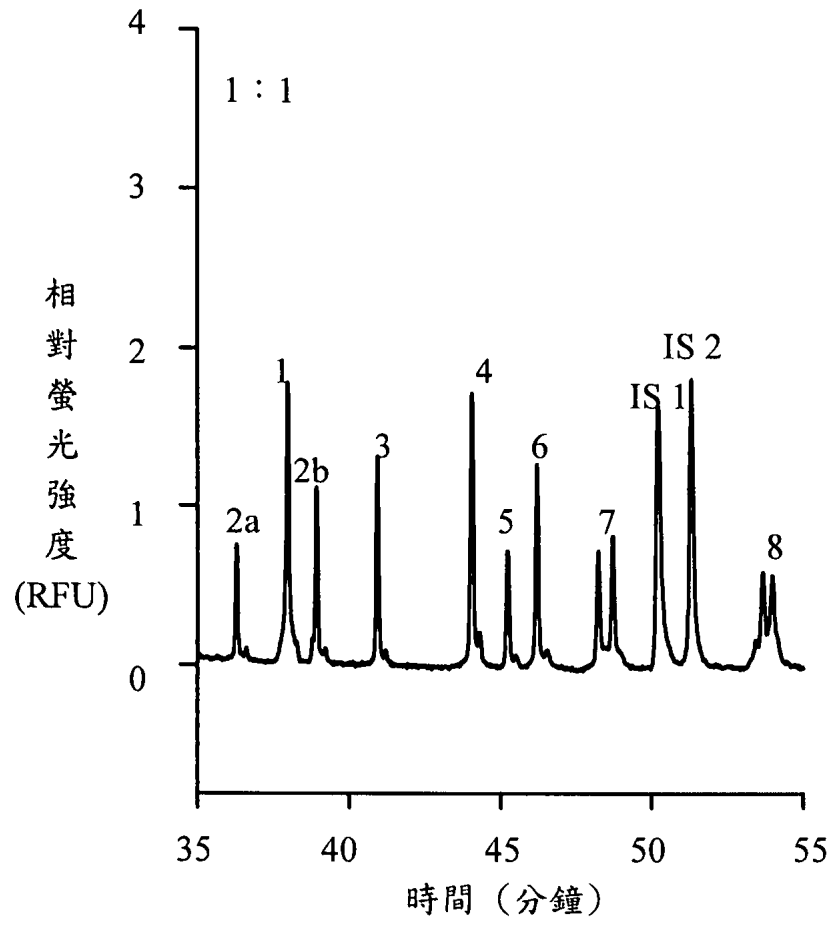
第 1c 圖

(7)



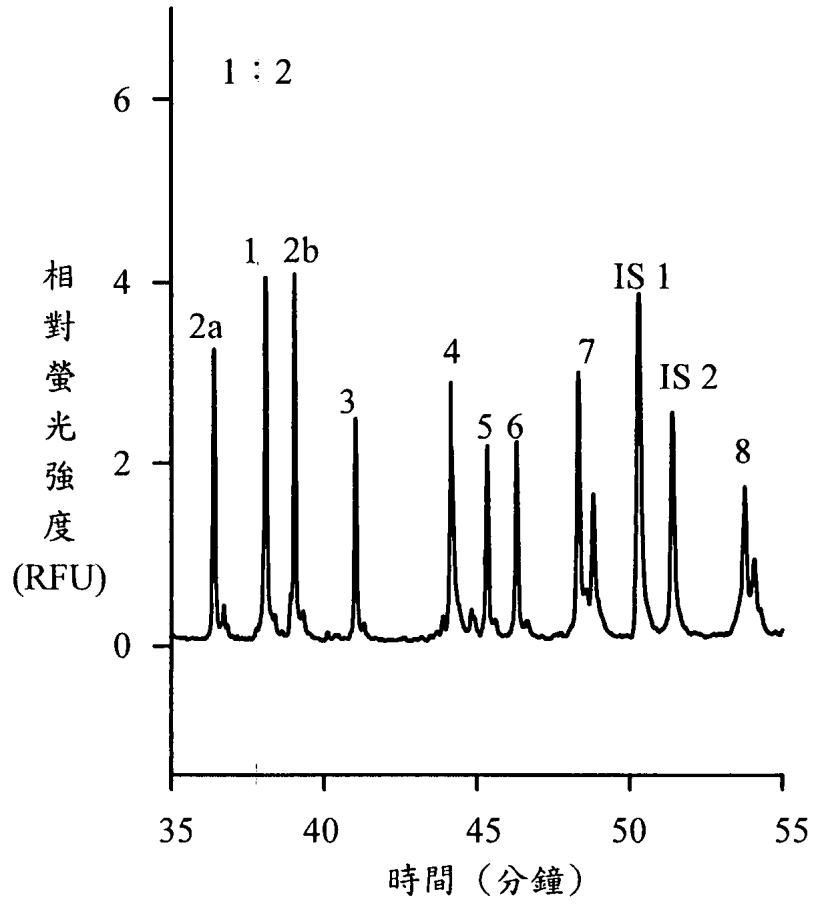
第 1d 圖

(8)

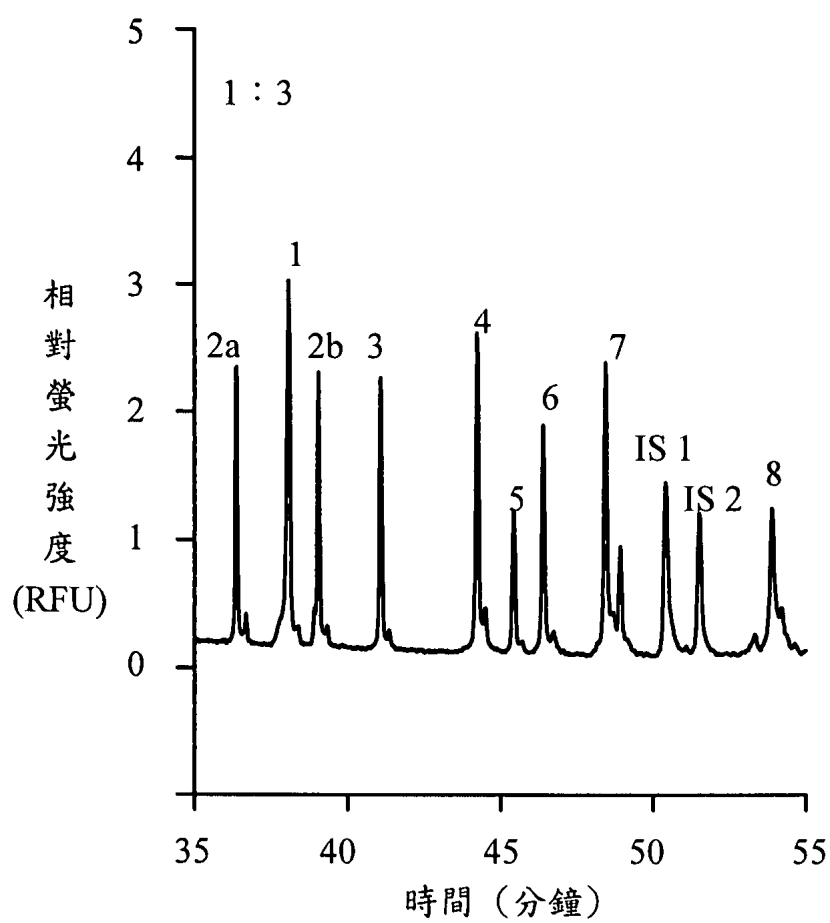


第 1e 圖

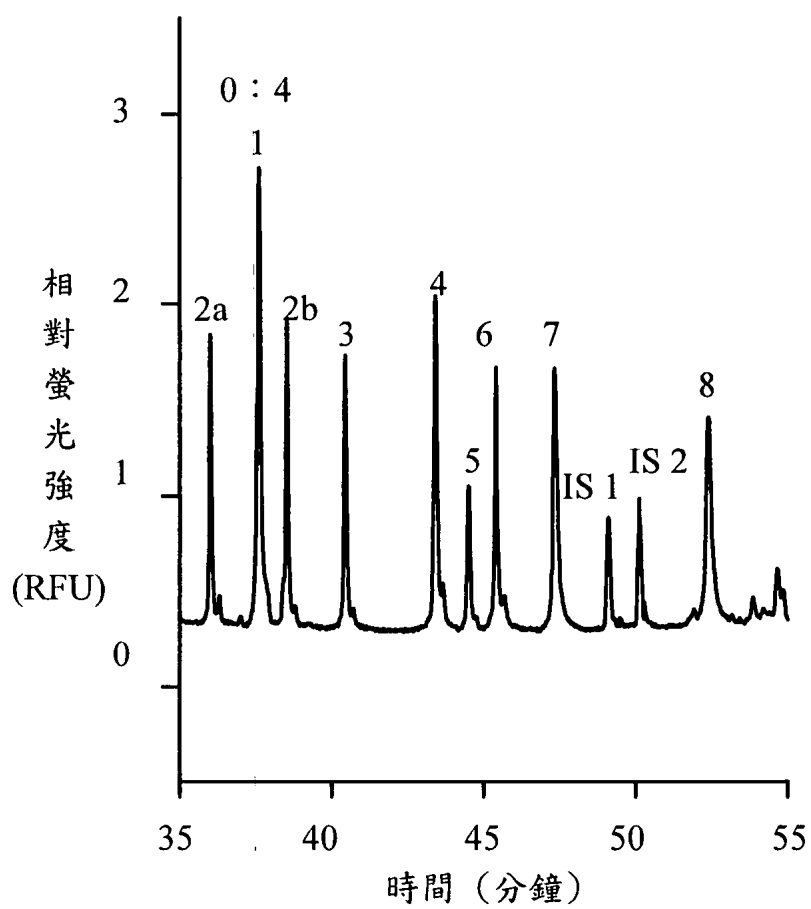
(9)



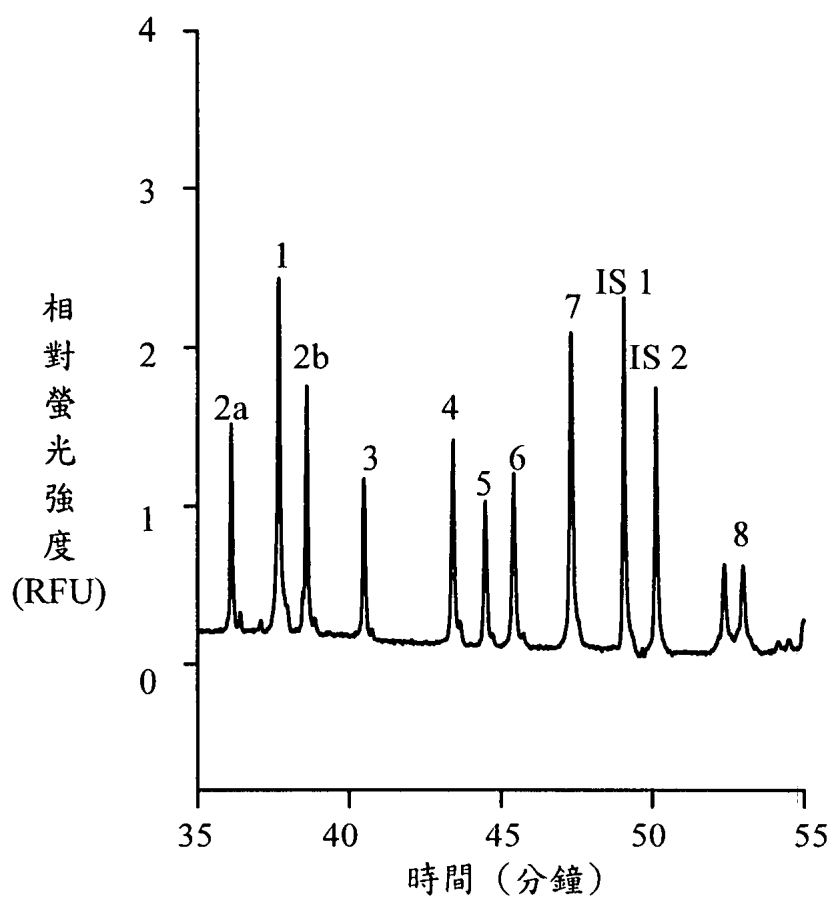
第 1f 圖



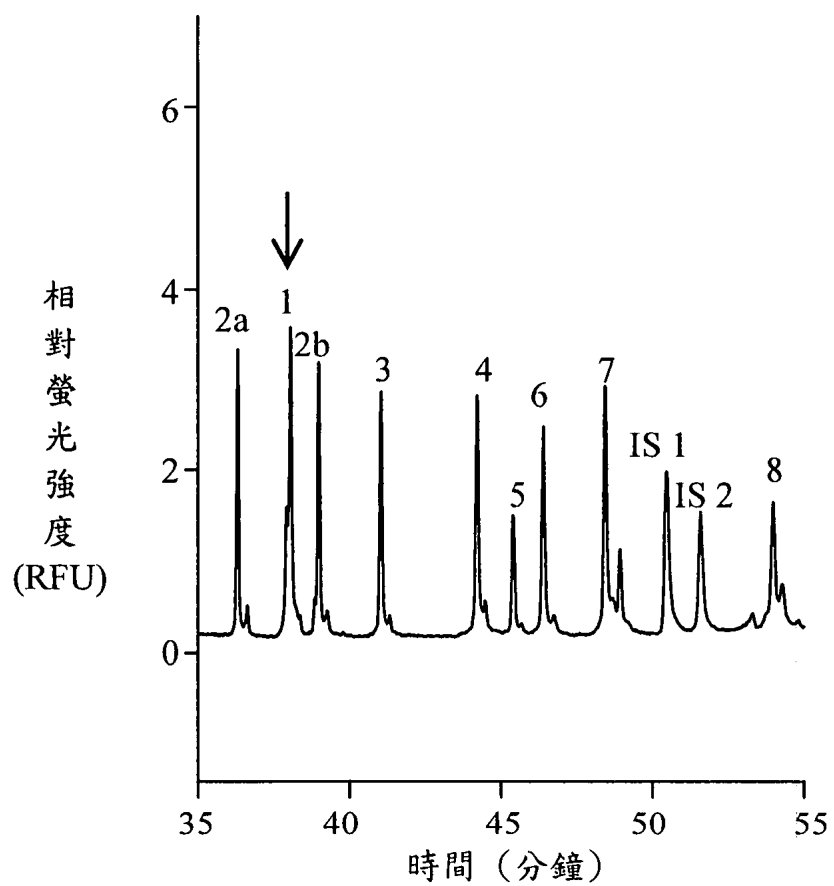
第 1g 圖



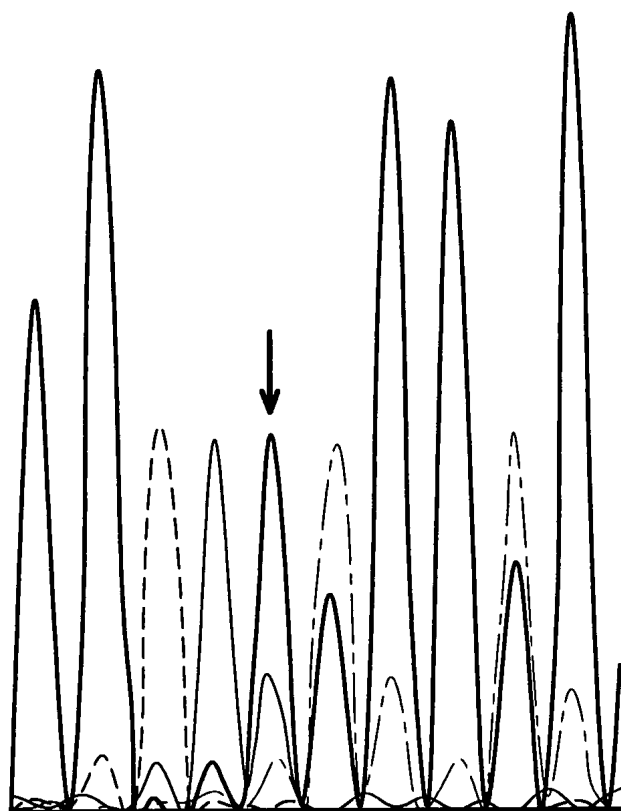
第 1h 圖



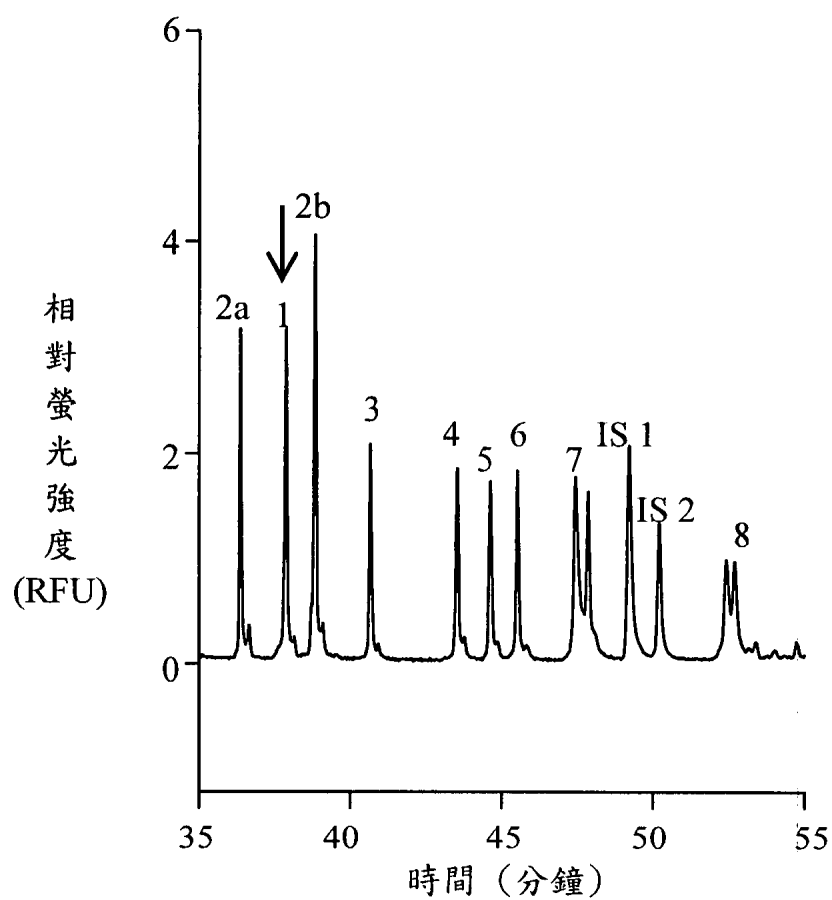
第 2 圖



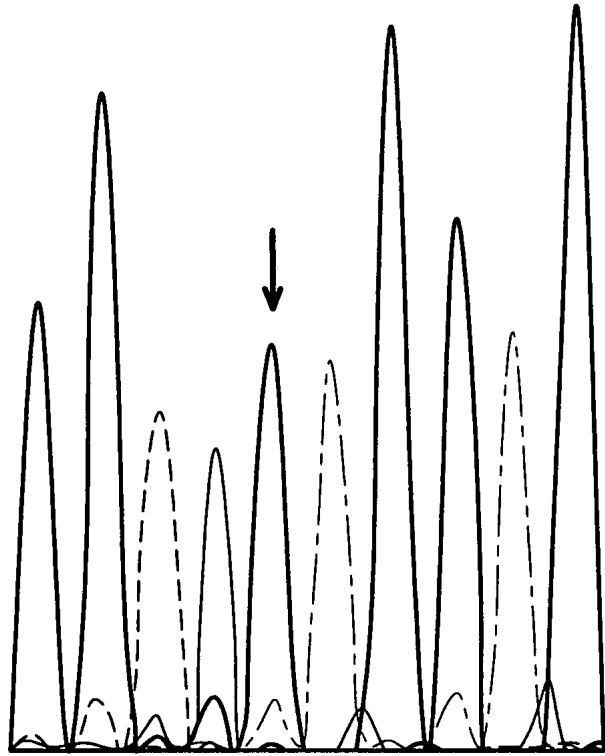
第 3a 圖



第 3b 圖



第 4a 圖



第 4b 圖