

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：21620130154137

UDC _____

廈門大學

博士学位论文

基于多色探针熔解曲线技术的
基因变异检测研究

Research on Multicolor Melting Curve Analysis-Based
Approaches for Gene Mutations Detection

王旭东

指导教师姓名：李庆阁 教授

专业名称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2017年4月

论文答辩时间：2017年5月

学位授予日期： 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2017年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

| | |
|--|-----------|
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 3 |
| 第一章 绪论 | 5 |
| 第一节 基因变异与基因检测 | 5 |
| 第二节 荧光探针熔解曲线技术 | 6 |
| 第三节 本论文的研究内容 | 10 |
| 参考文献 | 12 |
| 第二章 多色探针熔解曲线技术用于非综合征性耳聋常见基因突变的检测..... | 19 |
| 第一节 引言 | 19 |
| §1.1 耳聋的概述..... | 19 |
| §1.2 耳聋的分子遗传学概述..... | 19 |
| §1.3 耳聋的诊断概述..... | 24 |
| 第二节 材料和方法 | 29 |
| §2.1 野生型质粒、突变型质粒的构建..... | 29 |
| §2.2 基因组 DNA 模板..... | 33 |
| §2.3 引物和探针的设计..... | 33 |
| §2.4 人工合成的靶序列熔解曲线分析考察探针检测突变的能力..... | 36 |
| §2.5 单重实时 PCR 体系及熔解曲线分析体系的建立..... | 38 |
| §2.6 多重多色实时 PCR 体系及熔解曲线分析体系的建立..... | 38 |
| §2.7 线粒体异质性突变检测能力的考察..... | 39 |
| §2.8 多重多色突变检测体系的检测灵敏度考察..... | 40 |
| §2.9 耳聋质粒参考品的制备及考察..... | 40 |
| §2.10 临床标本检测..... | 43 |
| 第三节 结果 | 43 |

| | |
|---|-----------|
| §3.1 非综合征性耳聋突变检测实验设计..... | 43 |
| §3.2 29 种非综合征性耳聋基因突变质粒的构建..... | 45 |
| §3.3 人工合成的靶序列熔解曲线分析考察探针检测突变的能力..... | 45 |
| §3.4 单重实时 PCR 体系及熔解曲线分析体系的建立..... | 50 |
| §3.5 多重实时 PCR 体系及熔解曲线分析体系的建立..... | 50 |
| §3.6 线粒体异质性突变检测能力的考察..... | 52 |
| §3.7 多重多色突变检测体系的检测灵敏度..... | 53 |
| §3.8 多重多色突变检测体系的检测通量比较..... | 57 |
| §3.9 临床标本的双盲检测..... | 58 |
| 第四节 讨论 | 61 |
| 参考文献 | 65 |
| 第三章 厦门地区非综合征性耳聋流行病学调查..... | 73 |
| 第一节 引言 | 73 |
| 第二节 材料和方法 | 74 |
| §2.1 研究对象..... | 74 |
| §2.2 非综合征性耳聋常见基因突变检测..... | 75 |
| §2.3 Sanger 测序验证 | 76 |
| 第三节 结果 | 77 |
| §3.1 唾液基因组 DNA 的提取与质控..... | 77 |
| §3.2 132 例耳聋患者表型分析..... | 78 |
| §3.3 132 例耳聋患者基因检测结果分析..... | 78 |
| §3.4 Sanger 测序验证 | 83 |
| 第四节 讨论 | 84 |
| 参考文献 | 88 |
| 第四章 多色探针熔解曲线技术用于非缺失型 α-地中海贫血基因突变的检测..... | 91 |
| 第一节 引言 | 91 |
| 第二节 材料和方法 | 92 |

| | |
|--|------------|
| §2.1 野生型质粒、突变型质粒和基因组 DNA 模板 | 92 |
| §2.2 引物探针设计 | 93 |
| §2.3 人工合成的靶序列熔解曲线分析考察探针检测突变的能力 | 94 |
| §2.4 单重四色实时 PCR 及熔解曲线分析体系的建立 | 95 |
| §2.5 单重四色突变检测体系的检测灵敏度考察 | 96 |
| §2.6 临床标本双盲检测 | 96 |
| 第三节 结果 | 97 |
| §3.1 非缺失型 α -地贫突变检测体系的设计 | 97 |
| §3.2 人工合成的靶序列熔解曲线分析考察探针检测突变的能力 | 98 |
| §3.3 单重四色实时 PCR 及熔解曲线分析体系的建立 | 99 |
| §3.4 单重四色突变检测体系的检测灵敏度考察 | 102 |
| §3.5 临床标本双盲检测 | 105 |
| 第四节 讨论 | 108 |
| 参考文献 | 111 |
| 第五章 多色探针熔解曲线技术用于 α-地中海贫血基因突变的基因分型 | 113 |
| 第一节 引言 | 113 |
| 第二节 材料和方法 | 114 |
| §2.1 含有 α -地中海贫血常见突变质粒的构建 | 114 |
| §2.2 基因组 DNA 模板 | 115 |
| §2.3 引物探针设计 | 116 |
| §2.4 人工合成的靶序列熔解曲线分析考察探针检测突变的能力 | 118 |
| §2.5 内参基因的引入 | 119 |
| §2.6 单重实时 PCR 及熔解曲线分析体系的建立 | 119 |
| §2.7 两管三色实时 PCR 及熔解曲线分析体系的建立 | 120 |
| §2.8 两管三色突变检测体系的检测灵敏度考察 | 121 |
| §2.9 两管三色突变检测体系的重复性考察 | 121 |
| §2.10 两管三色突变检测体系的混合模板突变检测能力考察 | 121 |
| §2.11 临床标本双盲检测 | 122 |

| | |
|-------------------------------------|------------|
| 第三节 结果 | 122 |
| §3.1 α -地贫突变检测体系的设计 | 122 |
| §3.2 人工合成的靶序列熔解曲线分析考察探针检测突变的能力..... | 124 |
| §3.3 单重实时 PCR 及熔解曲线分析体系的建立 | 126 |
| §3.4 两管三色实时 PCR 及熔解曲线分析体系的建立 | 127 |
| §3.5 两管三色突变检测体系的检测灵敏度考察..... | 128 |
| §3.6 两管三色突变检测体系的重复性考察..... | 130 |
| §3.7 两管三色突变检测体系的混合模板突变检测能力考察..... | 131 |
| §3.8 临床标本双盲检测..... | 133 |
| 第四节 讨论 | 139 |
| 参考文献 | 142 |
| 英文缩写索引 | 147 |
| 博士期间发表交流论文 | 148 |
| 致 谢 | 149 |

CONTENTS

| | |
|---|-----------|
| Abstract (in Chinese) | 1 |
| Abstract (in English) | 3 |
| Chapter I Introduction | 5 |
| Section I Gene mutation and gene detection | 5 |
| Section II Probe-based melting curve analysis | 6 |
| Section III Purpose and contents of this dissertation | 10 |
| References | 12 |
| Chapter II Multiple nonsyndromic hearing loss mutations detection by multicolor melting curve analysis | 19 |
| Section I Introduction | 19 |
| §1.1 Overview of hearing loss | 19 |
| §1.2 Molecular genetics of hearing loss | 19 |
| §1.3 Diagnosis of hearing loss | 24 |
| Section II Material and methods | 29 |
| §2.1 Construction of wild-type and mutant plasmids | 29 |
| §2.2 Genomic DNA samples | 33 |
| §2.3 Design of primers and probes | 33 |
| §2.4 Melting curve analysis of probes and targets..... | 36 |
| §2.5 Establishment of uniplex real-time PCR assay | 38 |
| §2.6 Establishment of multiplex real-time PCR assay..... | 38 |
| §2.7 Detection heteroplasmic mitochondrial mutations | 39 |
| §2.8 Detection sensitivity of the multiplex assay | 40 |
| §2.9 Preparation and detection of the reference plasmids | 40 |
| §2.10 Validation of the assays with clinical samples in a double-blind manner . | 43 |
| Section III Results | 43 |

| | |
|--|-----------|
| §3.1 Experimental design of the nonsyndromic hearing loss detection..... | 43 |
| §3.2 Construction of 29 plasmids of nonsyndromic hearing loss..... | 45 |
| §3.3 Melting curve analysis of probes and targets..... | 45 |
| §3.4 Establishment of uniplex real-time PCR assay..... | 50 |
| §3.5 Establishment of multiplex real-time PCR assay..... | 50 |
| §3.6 Detection heteroplasmic mitochondrial mutations..... | 52 |
| §3.7 Detection sensitivity of the multiplex assay..... | 53 |
| §3.8 Comparison of throughput of the multiplex assay..... | 57 |
| §3.9 Validation of the assays with clinical samples in a double-blind manner ... | 58 |
| Section IV Discussion..... | 61 |
| References..... | 65 |
| Chapter III Epidemiological survey of hereditary hearing loss in Xiamen..... | 73 |
| Section I Introduction..... | 73 |
| Section II Material and methods..... | 74 |
| §2.1 Research objects..... | 74 |
| §2.2 Gene detection of nonsyndromic hearing loss..... | 75 |
| §2.3 Confirmation of Sanger sequencing..... | 76 |
| Section III Results..... | 77 |
| §3.1 Extraction and quality control of saliva genomic DNA..... | 77 |
| §3.2 Phenotypic analysis of 132 patients..... | 78 |
| §3.3 Gene analysis of 132 patients..... | 78 |
| §3.4 Confirmation of Sanger sequencing..... | 83 |
| Section IV Discussion..... | 84 |
| References..... | 88 |
| Chapter IV Multiple non-deletional α-thalassaemia mutations detection by multicolor melting curve analysis..... | 91 |
| Section I Introduction..... | 91 |

| | |
|--|------------|
| Section II Material and methods | 92 |
| §2.1 Plasmids and genomic DNA templates..... | 92 |
| §2.2 Design of primers and probes | 93 |
| §2.3 Melting curve analysis of probes and targets..... | 94 |
| §2.4 Establishment of the uniplex MMCA assay | 95 |
| §2.5 Detection sensitivity of the multiplex MMCA assay..... | 96 |
| §2.6 Validation of the assays with clinical samples in a double-blind manner ... | 96 |
| Section III Results | 97 |
| §3.1 Design of the non-deletional α -thalassaemia mutations detection..... | 97 |
| §3.2 Melting curve analysis of probes and targets..... | 98 |
| §3.3 Establishment of the uniplex MMCA assay | 99 |
| §3.4 Detection sensitivity of the multiplex MMCA assay..... | 102 |
| §3.5 Validation of the assays with clinical samples in a double-blind manner . | 105 |
| Section IV Discussion | 108 |
| References..... | 111 |
| | |
| Chapter V Multiple α-thalassaemia mutations detection by multicolor melting curve analysis..... | 113 |
| Section I Introduction..... | 113 |
| Section II Materials and methods..... | 114 |
| §2.1 Construction of plasmids | 114 |
| §2.2 Genomic DNA samples | 115 |
| §2.3 Design of primers and probes | 116 |
| §2.4 Melting curve analysis of probes and targets..... | 118 |
| §2.5 Introduction of internal control..... | 119 |
| §2.6 Establishment of uniplex real-time PCR assay | 119 |
| §2.7 Establishment of multiplex real-time PCR assay..... | 120 |
| §2.8 Detection sensitivity of the multiplex MMCA assay..... | 121 |
| §2.9 Reproducibility study of the multiplex MMCA assay..... | 121 |
| §2.10 Lowest variant allele frequency study in mosaic samples | 121 |

| | |
|---|------------|
| §2.11 Clinical validation by using clinical samples in a double-blind manner . | 122 |
| Section III Results | 122 |
| §3.1 Design of the α -thalassaemia mutations detection..... | 122 |
| §3.2 Melting curve analysis of probes and targets..... | 124 |
| §3.3 Establishment of uniplex real-time PCR assay..... | 126 |
| §3.4 Establishment of multiplex real-time PCR assay..... | 127 |
| §3.5 Detection sensitivity of the multiplex MMCA assay..... | 128 |
| §3.6 Reproducibility study of the multiplex MMCA assay..... | 130 |
| §3.7 Lowest variant allele frequency study in mosaic samples..... | 131 |
| §3.8 Clinical validation by using clinical samples in a double-blind manner ... | 133 |
| Section IV Discussion..... | 139 |
| References..... | 142 |
| English abbreviation index | 147 |
| Publications | 148 |
| Acknowledgement..... | 149 |

摘 要

作为一种新型的均相实时 PCR 检测技术,多色探针熔解曲线技术具有简便快速、特异性好、灵敏度高、结果准确可靠、检测成本低等优点,因此被用于遗传、肿瘤及微生物等领域的检测。然而,该技术的检测对象主要是点突变(包括错义突变、移码突变、小片段缺失或插入突变等),目前尚无报道将该技术用于大片段缺失突变的检测和高 GC 含量的长片段 PCR 扩增子的检测。因此,本论文围绕多色探针熔解曲线技术在不同类型基因变异中的检测进行研究,旨在进一步证明该技术的灵活性及适用性。

第一章为绪论部分,首先简要介绍了基因变异与人类疾病之间的关系以及基因检测技术的发展,然后系统介绍了探针熔解曲线分析技术的发展、特点以及目前适合的荧光探针类型,最后提出了本论文的研究目的、研究内容和研究意义。

第二章,以非综合征性耳聋为研究对象,考察多色探针熔解曲线技术用于多基因多突变的检测能力以及异质性突变的检测能力。本章成功建立了一个四管四色突变检测体系,实现了对中国人群 4 个常见致病基因的 20 种突变类型的检测,并使用质粒 DNA 模板和 294 份临床标本对该体系的分析性能和临床性能进行系统评价。结果表明,本章所建立的突变检测体系具有 100% 的重现性,能够稳定检测低至 100 pg/反应的不同基因型的人类基因组 DNA,并且基因分型结果与金标准 Sanger 测序结果的一致率为 100%。

第三章,为深入了解厦门地区非综合征性耳聋的主要分子病因以及热点基因突变,使用第二章建立的四管四色耳聋突变检测体系对 132 例来自厦门地区的耳聋患者的唾液样本进行基因分型。132 名耳聋患者共检测出耳聋基因异常者 42 例(31.8%),其中 22 例携带 *GJB2* 基因突变,16 例携带 *SLC26A4* 基因突变,4 例携带线粒体基因 m.1555A>G 均质性突变。本次调查结果显示,*GJB2* 基因的 c.235delC(15.9%,21/132)及 *SLC26A4* 基因的 c.919-2A>G(10.6%,14/132)为厦门地区的两大热点突变。

第四章,以非缺失型 α -地中海贫血为研究对象,初步探究多色探针熔解曲

线技术在长片段高 GC 含量 PCR 扩增中的点突变检测能力。本章建立了一个单管四色突变体系,实现了对中国人群 6 种常见的非缺失型 α -地中海贫血基因突变的检测,并使用 700 份临床标本对该体系的分析性能和临床性能进行系统评价。结果表明,本章所建立的单管四色突变检测体系具有良好的重现性,能够稳定检测低至 1 ng/反应的不同基因型的人类基因组 DNA,并且基因分型结果与反向点杂交法(RDB)和 Sanger 测序的分型结果完全一致。

第五章,以 α -地中海贫血为研究对象,深入探究多色探针熔解曲线技术在长片段高 GC 含量 PCR 扩增中的大片段缺失突变检测能力。本章建立了一个双管三色突变检测体系,实现了对 α -地中海贫血的 4 种主要缺失型突变和 3 种常见非缺失型突变的同时检测和基因分型。该双管三色突变检测体系能够在 3.5 小时内完成 PCR 扩增和熔解曲线分析,它可以稳定检测 5 ng/反应的不同基因型的人类基因组 DNA,并且可以在嵌合样本中稳定检测到低至 5%的突变频率。同时,使用 1213 份临床标本对该体系的临床性能进行了系统评价。1213 份标本双盲检测结果显示,该方法可以准确检测体系覆盖的 7 种突变型,其分型结果和对照方法的结果一致率为 99.3%,其中 8 份结果不一致的标本(7 份 $HKaa/\alpha\alpha$ 和 1 份 $HKaa/-\alpha^{3.7}$)主要是由于传统方法不能将其与 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ 基因型进行区分。该体系简便快速、易于使用且分型结果准确,适用于 α -地中海贫血高发地区的携带者筛查、产前诊断。

关键词: 基因变异; 多色探针熔解曲线技术; 非综合征性耳聋; α -地中海贫血

ABSTRACT

As a novel homogeneous real-time PCR, multicolor melting curve analysis is cost-effective, easy-to-use, accurate, high specificity and sensitivity, therefore it is widely applied in the detection of genetic diseases, tumor and microbiology. However, it is mainly focus on the detection of point mutation, it has not been used to detect the large deletions in the long GC-rich amplicon. To address the issue, the flexibility and applicability of multicolor melting curve analysis were further studied in this paper by detection of different types of gene variation.

In chapter one, we firstly introduced the relationship between gene mutation and human disease and the development of the methods for gene mutation detection. Then, we systematically introduced the method based probe melting curve analysis, including its development, characteristics and its suitable fluorescent probes. Finally, we put forward the purpose, contents and significance of this study.

In chapter two, to study the possibility of detecting multiple genes simultaneously and the ability of detecting heteroplasmic mutations by using multicolor melting curve analysis, the MMCA assay contained four PCR reactions was established to simultaneously genotype the 20 common nonsyndromic hearing loss-related mutations of four prevalent causative genes in Chinese population. Then we systematically evaluated both analytical and clinical performance of the MMCA assay by plasmid DNA templates and 294 clinical samples previously genotyped by Sanger sequencing. The MMCA assay had a reproducibility of 100%, could detect gDNA of different genotype as low as 100 pg per reaction, and had an overall accuracy of 100% when compared with Sanger sequencing.

In chapter three, 132 saliva samples provided by Zhongshan Hospital of Xiamen were used to detect for 20 mutations of four causative genes in order to investigate the incidence of nonsyndromic hearing loss and hot-spot mutations in Xiamen area, as well as the importance and significance of deafness gene detection. The results

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库