

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200326073

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

置换探针实时PCR检测微生物耐药突变

Detection of Drug-Resistant Pathogens
with Displacing Probes-Based Real-Time PCR

温 慧 欣

指导教师姓名: 李庆阁 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2006年6月29日

论文答辩时间: 2006年8月13日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 杨丰 研究员

评 阅 人: _____

2006年8月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
前言.....	5
第一章 荧光置换探针实时 PCR 单管检测拉米夫定多位点耐药突变	11
第一节 引 言	11
第二节 材料与方 法	13
第三节 结 果	17
§3.1 基因组 DNA 模板的提取与定量.....	17
§3.2 拉米夫定抗 HBV 耐药突变荧光置换探针实时 PCR 体系的原理.....	18
§3.3 荧光置换探针实时 PCR 体系的优化.....	19
§3.4 荧光置换探针实时 PCR 体系的灵敏度实验.....	21
§3.5 荧光置换探针实时 PCR 的杂合比例实验.....	22
§3.6 实时 PCR 检测 50 份已知为突变型的血清标本.....	23
§3.7 实时 PCR 检测 36 份 HBEAG 阳性的未经过拉米夫定治疗的临床标本.....	24
第四节 讨 论	25
参考文献	27
第二章 荧光置换探针实时 PCR 检测结核杆菌耐利福平突变	35
第一节 引 言	35
第二节 材 料和方 法	36
第三节 结 果与分 析	40
§3.1 痰标本中结核分枝杆菌基因组 DNA 的提取与定量.....	40
§3.2 利福平抗结核分枝杆菌耐药突变荧光置换探针实时 PCR 体系的原理.....	41
§3.3 荧光置换探针的特异性考察——变温杂交反应.....	41
§3.4 荧光置换探针实时 PCR 体系的灵敏度实验.....	42
§3.5 荧光置换探针实时 PCR 体系的特异性实验.....	42
§3.6 荧光置换探针实时 PCR 体系检测 123 份痰标本.....	43
第三节 讨 论	44
参考文献	46

第三章 荧光置换探针多重实时 PCR 检测结核杆菌三种耐药突变 .50

第一节 引言	50
第二节 材料和方法	52
第三节 结果与分析	57
§3.1 构建三种一线药物最常见的耐药突变位点的突变质粒	57
§3.2 荧光置换探针实时 PCR 检测耐药的原理	57
§3.3 荧光置换探针实时 PCR 的特异性实验	58
§3.4 荧光置换探针多重 PCR 联合检测三种药物的耐药突变	60
§3.5 荧光置换探针多重 PCR 体系灵敏度考察	61
§3.6 荧光置换探针多重 PCR 体系实时检测 8 份培养标本	62
§3.7 荧光置换探针多重 PCR 体系实时检测 118 份痰标本	63
§3.8 利用 ARMS 引物验证 118 份痰标本的耐药突变	64
第四节 讨论	65
参考文献	66

厦门大学博硕士学位论文摘要

CONTENTS

Abstract (In Chinese)	1
Abstract (In English)	3
Introduction	5
Chapter I Real-time PCR detection of multiple lamivudine-resistance mutations in a single tube with displacing probes	11
Section I Introduction	11
Section II Materials and Methods	13
Section III Results	17
§3.1 Extraction and quantification of HBV DNA.....	17
§3.2 Principle of real-time PCR detecting lamivudine resistance mutations.....	18
§3.3 Optimization of real-time PCR detection for different alleles	19
§3.4 Detection sensitivity test	21
§3.5 Selectivity level and its dependence on the whole genomic concentration	22
§3.6 Detection of 50 lamivudine-resistance serum samples	23
§3.7 Detection of 36 HBeAg-positive serum samples	24
Section IV Discussion	25
References	27
Chapter II Real-time PCR detection of rifampin resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in a single tube with displacing probes	35
Section I Introduction	35
Section II Materials and Methods	36
Section III Results	40
§3.1 Extraction and quantification of genomic DNA in sputum samples.....	40
§3.2 Principle of real-time PCR detecting rifampin resistance mutations	41
§3.3 Thermal denaturation analysis for displacing probes.....	41
§3.4 Detection sensitivity test	42
§3.5 Detection specificity test	42
§3.6 Detection of 123 sputum samples	43
Section IV Discussion	44
References	46

Chapter III Multiple real-time PCR Detection of Three Drug-Resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in a Single Tube with Displacing Probes	50
Section I Introduction	50
Section II Materials and Methods.....	52
Section III Results	57
§3.1 Construction of 3 drug-resistance mutations plasmids	57
§3.2 Principle of real-time PCR detecting drug resistance	57
§3.3 Detection specificity test of single probe	58
§3.4 Multiple real-time PCR detection of multi-drug-resistance	60
§3.5 Detection sensitivity test of multiple real-time PCR.....	61
§3.6 Multiple real-time PCR detection of eight isolates of <i>M. tuberculosis</i>	62
§3.7 Detection of 118 sputum samples	63
§3.8 ARMS analysis.....	64
Section IV Discussion	65
Reference	66

摘要

本论文应用荧光置换探针技术,以乙型肝炎病毒在拉米夫定治疗过程中产生的耐药突变和多重耐药结核分枝杆菌为研究对象,考察荧光置换探针用于低 GC 含量和高 GC 含量突变基因的多位点检测情况,建立了可应用于多突变位点病原微生物检测的多色均相荧光 PCR 系统。

快速有效的检测乙型肝炎病毒抗拉米夫定耐药突变,对于临床诊断和治疗具有重要的意义。本论文建立了于单管实时 PCR 实验中同时检测血清标本中存在的多个拉米夫定耐药突变的体系。应用 4 对标记了不同荧光基团的碱基特异性置换探针,通过单个实时 PCR 反应就能判断标本中包含了以下任何一种 HBV DNA: 野生型, rtM204 突变型, 野生和 rtM204 突变混合型, rtM204 突变和 rtL180 突变混合型, 野生、rtM204 突变和 rtL180 突变混合型。我们考察了检测体系的灵敏度、特异性和检测杂合比例的能力,并应用该体系完成了 50 份已知包含拉米夫定耐药突变的 HBV 血清标本和 36 份 HBeAg 阳性的 HBV 血清标本的检测。检测结果表明,和 DNA 测序结果相比,该体系表现出更高的灵敏度和更强的检测杂合比例的能力。该方法可以检测出低至 $10^2 \sim 10^3$ copies/mL 的 HBV,并且可以检测出在大量的野生型 DNA 中的 5% 的突变型 DNA。应用这种高通量的检测体系能够对抗拉米夫定 HBV 进行更早的诊断。

目前临床上用于检测结核分枝杆菌对抗菌药物的敏感性的方法,因为受到细菌生长速度的限制,一般需要数周的时间,不利于临床诊断和治疗。针对 4 种治疗结核的一线药物,在确定结核分枝杆菌存在的前提下,本论文建立了两个检测结核分枝杆菌耐药突变的体系:

一是针对结核分枝杆菌抗利福平耐药突变中最常见的 RNA 聚合酶基因 (*rpoB*) 突变,建立了在单管 PCR 反应中实时检测 *rpoB* 核心位点发生的所有突变的体系。在结核分枝杆菌耐利福平分离株中,95% 的突变发生在 *rpoB*507 位至 533 位 27 个氨基酸密码子 (81bp) 组成的区域内。应用 4 对标记了不同荧光基团的碱基特异性置换探针,覆盖 *rpoB* 81bp 的大部分区域,一旦所检测的区域发生了突变就会造成相应探针的荧光信号的消失,从而达到检测突变的目的。结果

表明,该体系可以检测出低至 5 个拷贝的结核分枝杆菌,并且具有很高的特异性。应用该体系完成了 9 份已知基因型的结核分枝杆菌培养标本和 123 份痰标本的检测。痰标本中 101 份为野生型,5 份 526 位点发生突变,16 份 531 位点发生突变,1 份 526 和 531 位点同时突变。所有检测结果均通过 DNA 测序验证。

二是建立了同时检测三种一线药物的结核分枝杆菌耐药突变的荧光 PCR 检测方法。将荧光双链置换探针、实时 PCR 和多重 PCR 相结合,针对三种一线药物链霉素、异烟肼和乙胺丁醇中最常见的并且都是由于点突变而导致的耐药突变位点进行检测。应用该体系检测了 9 份已知基因型的结核分枝杆菌培养标本和 118 份痰标本,其中 93 份痰标本未发生突变,8 份痰标本发生耐链霉素突变,6 份痰标本发生耐异烟肼突变,1 份痰标本发生耐乙胺丁醇突变,2 份痰标本发生同时耐链霉素和异烟肼的突变,8 份痰标本发生同时耐链霉素、异烟肼和乙胺丁醇的突变,所有检测结果均通过 ARMS 体系进行验证。

两种检测结核分枝杆菌耐药突变的体系均具有极高的灵敏度和特异性,测定突变位点数目较现有技术有所提高,并且操作简便,检测快速,有望形成适合临床应用的筛查技术。该体系的建立,十分有利于结核病的早期诊断和指导医生用药。

关键词: 置换探针; 实时 PCR; 耐药突变

Abstract

This dissertation consists of three parts for describing the application of the displacing probes to detecting the mutations in hepatitis B virus (HBV) and *Mycobacterium tuberculosis*.

The first part describes the establishment of a single-tube, real-time PCR assay for simultaneous detection of multiple lamivudine-resistance mutations in sera samples. Effective detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) is extremely important for clinical diagnosis and treatment. By using four allele-specific displacing probes labeled with different fluorophores, a single real-time PCR reaction can tell whether a sample contains any of the following HBV DNA alleles: wild-type, rtM204 mutant, mixtures of wild-type and rtM204 mutant, mixtures of rtM204 and rtL180 mutant, mixtures of wild-type, rtM204 mutant and rtL180 mutant. The assay was evaluated with 50 HBV mutation(s)-containing samples and 36 HBeAg-positive samples. The results of the real-time PCR assay were consistent with the DNA sequencing, but at a much higher sensitivity for detecting a mixture of quasispecies. As low as $10^2 \sim 10^3$ copies/ml HBV of all four alleles in pure population and as little as 5% mutant DNA in the presence of wild-type DNA can be detected. Application of this high throughput assay should enable early diagnosis and better treatment of lamivudine-resistant HBV.

The second part reports a sensitive single-tube PCR assay that takes less than 3 h and reliably identifies rifampin-resistant *M. tuberculosis* in DNA extracted directly from sputum. Current clinical assays for determining antibiotic susceptibility in *M. tuberculosis* require several weeks to be completed due to the slow growth of the bacilli. Ninety-five percent of mutations associated with rifampin resistance occur in an 81-bp core region of the bacterial RNA polymerase gene, *rpoB*. All mutations that occur within this region result in rifampin resistance. Four different displacing probes are used in the same reaction, each perfectly complementary to a different target

sequence within the *rpoB* gene of rifampin-susceptible bacilli and each labeled with a differently colored fluorophore. Together, their target sequences encompass the mostly region of interests. The generation of all four fluorescent colors during PCR amplification indicates that rifampin-susceptible *M. tuberculosis* is present. The presence of any mutation in the core region prevents the binding of one of the displacing probes, resulting in the absence of one of the four fluorescent colors. Totally 123 sputum samples infected with tuberculosis was tested. We detected 22 mutation-containing, and the results were consistent with the DNA sequencing. The use of this rapid assay should enable early detection and treatment of drug-resistant tuberculosis in clinical settings.

The third part evaluates the feasibility of displacing probes to detect streptomycin-, isoniazid- and ethambutol-related resistance mutations in DNA extracts from sputum samples. We studied three genes: *rpsL*, *katG* and *embB*, which are associated with streptomycin, isoniazid and ethambutol resistance, respectively. Among 118 sputum samples with tuberculosis, we detected in 8 samples to be streptomycin-resistant, 6 samples isoniazid-resistant, 1 sample ethambutol-resistant, 2 samples to be mixture of streptomycin- and isoniazid- resistant, and 8 samples to be mixture of streptomycin-, isoniazid- and ethambutol- resistant. The results of the real-time PCR assay were consistent with the ARMS assay. This assay is more rapid and sensitive compared with classic methods. Our method can be used for high-throughout screening for the mutations of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: Displacing probes; Real-time PCR; Drug-resistance mutation

前 言

因临床过度使用抗菌素和抗病毒药物，耐药微生物逐年增加，使得一些临床常见的感染性疾病成为难治性疾病，甚至一些耐药菌在医院内或局部区域内造成流行^[1-3]。耐药菌的危害已遍及全球，耐药性问题成为世界性的新的研究热点。

§ 1 耐药现状

§ 1.1 细菌耐药性^[4-7]

自从 1935 年第一个磺胺类药物百浪多息应用于临床和 1941 年青霉素问世后，抗菌药物得以迅速发展。目前，经常应用于临床的有 10 余类近 200 个品种。抗菌药物使人类在对付病原微生物引起的各种感染中取得了一系列辉煌成绩，治愈并挽救了无数患者的生命。然而，随着抗菌药物的广泛使用，细菌对抗菌药物产生耐药性的问题也日益突出，严重地影响临床疗效和病人安全。耐药菌产生之快、传播之迅速、耐药率之高引起世界性关注。它不仅使药物疗效减弱，还会使药物失去疗效，导致病人死亡率升高。治疗超强、多重耐药菌引起的感染已成为一个全球性的医学临床和兽医临床所面临的难题。

细菌的耐药性是指细菌对抗生素表现出的抵抗特性，有天然耐药性（或固有耐药性）和获得性耐药性之分。天然耐药性是指细菌对某种抗菌药物表现出的先天性不敏感，由细菌自身生物学特性（如结构、代谢机制）所决定。目前所说的严重危害人、畜健康的细菌耐药性是指获得性耐药，即细菌对某些抗菌药物由本来的敏感状态自发转变为耐受状态的特性，这种转变与细菌本身生物学特性没有必然的联系，而是受环境中药物选择性压力的作用所致，这种对药物的抗性是后天获得的。

§ 1.2 病毒耐药性

抗病毒药物的应用可以降低病毒的体内复制水平，增加机体的免疫反应能力，并且可以明显延长某些目前无法治愈的病毒感染性疾病，如艾滋病患者的生存期。但是，随着抗病毒药物的广泛应用，病毒耐药的情况也越来越严重。

病毒出现耐药非常迅速，第一个抗人类免疫缺陷病毒（HIV）的药物齐多夫定（AZT）1987 年被美国 FDA 批准上市，1989 年就分离到 HIV 耐药变异株。

1995 年上市的拉米夫定（3TC）1996 年在临床应用中首次发现乙型肝炎病毒（HBV）耐药株的存在^[8]。据报道，拉米夫定使用 3~6 个月就开始出现 HBV 耐药株，持续使用 2 年 38~66% 的患者会检出耐药株^[9]。病毒耐药相当普遍，不仅 HIV、HBV 有耐药现象，其他常见的人类病毒如单纯疱疹病毒（HSV）、水痘-带状疱疹病毒（VZV）、巨细胞病毒（CMV）也不断有耐药株出现的报道^[10,11]。同一种病毒对化学结构类型或作用机制不同的药物都会产生耐药性，有些耐药株甚至同时对几类药物耐药。

§ 2 耐药机制

微生物如何从敏感转变为耐药的？这是一个颇受人们关注的问题。近几十年来，各国学者对微生物耐药机制进行了深入的研究。微生物耐药性的形成，是涉及诸多因素的复杂过程，有微生物本身固有的因素，更多的则是抗菌素和抗病毒药物的广泛使用，使微生物在强大的药物选择压力下，后天逐步形成了能够稳定遗传的耐药特性。一个微生物可以同时具有多种耐药机制，对一种药物的耐药性也可以由不同的耐药机制产生，这涉及到生化、遗传两方面的很多环节。

§ 2.1 细菌的耐药机制^[4, 12, 13]

细菌耐药性的生化机制归纳起来主要有 5 种：1、药物作用靶点的改变；2、改变细菌胞膜对抗生素的通透性；3、细菌主动外排系统；4、产生使抗生素失去活性的酶；5、旁路代谢。

细菌耐药性的遗传机制：天然或固有耐药性主要是由于位于该细菌染色体上的耐药基因造成的，并且代代相传，具有典型的种属特异性。获得性耐药的遗传机制有以下两方面：1、自发性基因突变。由于药物环境的作用或其它刺激，导致细菌与药物作用的靶点、或与药物通透性相关的编码基因发生突变，使药物作用靶位的蛋白结构发生改变，如青霉素结合蛋白、旋转酶等。药物进入菌体后，由于不能识别这些靶位，进而影响细菌的正常繁殖并发挥对细菌的杀伤作用而产生耐药。这种控制作用靶点的基因发生改变多为点突变，即基因内核苷酸发生改变，从而使蛋白质的多肽链中的氨基酸发生变化。2、耐药基因的掺入，也就是细菌获得与耐药性相关的新基因。为防御抗生素的破坏，细菌常常从附近其它细菌细胞摄取耐药基因。其获得的方式有耐药质粒的传递和转座子对耐药基因的转座。长期在药物环境下获得生存的菌株（自发突变）产生耐药基因后转变为耐药

菌，耐药菌在生长繁殖过程中，以质粒传递或转座子的形式不断将耐药基因传给其它菌株。

§ 2.2 病毒的耐药机制

目前，已知病毒耐药的发生机制是病毒的基因变异造成的，其中最常见的是编码病毒专有酶的基因发生变异。病毒的专有酶是指病毒基因组表达的与自身复制或性状表达直接相关的为病毒所特有的酶，如 HIV 的逆转录酶(HIVRT)，HBV 的 DNA 聚合酶，HSV 的胸苷激酶。目前开发核苷类抗病毒药物的靶点多是针对病毒的专有酶，或是针对病毒增殖的特点和它们与宿主细胞在代谢上的差异性^[14]。而病毒的基因变异使药物与靶酶或其他靶点的亲和力下降而造成酶抑作用或链终止作用的消除^[15]。这种变异是病毒自发突变的结果，在有些未使用药物治疗的感染者中也存在。在抗病毒药物的自然选择下，野生株被抑制，变异的耐药毒株逐渐累积成为优势毒株，导致耐药性的产生^[16]。Kobayashi S 等^[17]报道了在某些未用拉米夫定治疗的慢性 HBV 感染者体内也检出了 YMDD 变异毒株充分证明了这一观点。不同药物诱导选择同一种病毒专有酶基因的变异位点不一定相同。

§ 3 耐药基因的检测

微生物对药物产生耐药绝大多数都是由特定的耐药基因所决定的，因此，耐药基因的检测对耐药微生物的诊断具有确证性意义。20 世纪 80 年代以来，国外学者首先推出微生物耐药快速分子检测新技术，为患者能在第一时间明确诊断、合理治疗和疫情控制提供了有效手段^[18,19]，可用于：1、确证耐药微生物，特别是在耐药表型处于中介或不定时，检测耐药基因便十分必要。2、早期、快速检测微生物的耐药性，尤其适用于检测生长缓慢的病原微生物，如结核分枝杆菌。3、进行耐药微生物感染和播散的流行病学调查。4、发现和鉴定新的耐药微生物。

近二十年来，相继建立了多种检测 DNA 突变产生耐药的技术方法。这些方法主要有基于 DNA 突变产生的酶切位点的改变的基因酶谱 (PCR-RFLP) 分析技术^[20,21]，基于 DNA 突变产生的单链构象多态性的 PCR-SSCP 分析技术^[21-23]，基于 DNA 突变产生的异源双链的 HA^[24]以及 DHPLC^[25]等分析技术，基于寡核苷酸探针杂交的 ASO 斑点杂交技术^[26]、RDB 反向点杂交^[27, 28]、生物芯片^[29, 30]等分析技术，基于引物特异扩增的 ARMS-PCR^[31, 32]分析技术，基于引物特异延伸

检测的 MALDI-TOF-MS^[33] 分析技术，基于测序的 Sanger 测序^[34]、Minisequencing^[35,36]以及 Pyrosequencing^[37,38]序列分析等分析技术。由于大部分的分析技术都需要进行 PCR 的后处理操作，分析相对比较繁琐，而且 PCR 后处理操作容易带来扩增产物的污染而造成假阳性，成为制约大部分技术发展以及应用于临床诊断的最大障碍。均相检测技术由于需要很少的后处理步骤，成为各种迅速发展的新技术的平台^[39,40]。

实时聚合酶链式反应（Real-time Polymerase Chain Reaction, Real-time PCR）技术因其具有的高灵敏度、高特异性、高准确度和高通量的特点，已经在特定目的片段的定量分析和定性分析中发挥了重要的作用，广泛应用于临床的传染病病原体的检测、遗传病的产前诊断与婚前筛查、细菌的耐药检测、转基因商品检测等领域^[41-42]。

实时PCR应用于DNA突变的基因分型的关键技术是探针技术和引物技术。就探针技术而言，目前基于实时PCR的各种标记探针技术主要包括TaqMan探针^[44-46]、FRET探针^[47,48]、分子信标探针^[49,50]以及荧光置换探针^[51,52]。这些探针几乎都采用荧光淬灭原理或荧光共振能量转移来实现均相检测的指示作用。利用FRET的相邻探针采用熔点曲线法进行基因分型，需要在扩增完成后进行熔点分析，并不能实时进行判断。因此，目前人们关心更多的仍然是那些可以实时基因分型的几种探针。普通的TaqMan探针很难达到基因分型要求的特异性，于是引进了MGB到TaqMan探针上以增强特异性，但是这就增加了设计合成的难度以及成本的费用。分子信标应用于基因分型方面也需要复杂的设计和优化实验，没有特定的设计规则。本实验室开发的荧光置换探针可以很好地满足实时PCR基因分型的需要^[51]。

荧光置换探针是两条按照脱氧核糖核酸（DNA）碱基互补配对原则而反向互补的寡核苷酸。在其中的一条寡核苷酸的5'端标记荧光供体（也可称荧光基团），在另一条寡核苷酸的3'端标记荧光受体（也可称淬灭基团），同时两条寡核苷酸的3'端进行封闭（如磷酸化），使其不能作为引物延伸。根据荧光能量转移原理，当荧光置换探针在不与靶序列发生置换杂交时，荧光供体与荧光受体很靠近，二者可以发生荧光能量传递，荧光基团的荧光被淬灭，此时检测不到荧光；当荧光置换探针标记荧光供体的链和标记荧光受体的链分别与靶序列发生置换

杂交时，荧光供体与荧光受体由于探针两条链的分离而分开，荧光基团的荧光无法被淬灭基团淬灭，此时就可以检测到荧光信号。因此通过荧光信号的变化就可以知道荧光置换探针两条寡核苷酸链所处的状态。

当有靶序列与荧光置换探针互补时，可以发生置换杂交反应。在探针与靶序列进行置换杂交反应时，由于荧光置换探针自身两条链之间的互补配对，存在着与靶序列互补的竞争作用，因此荧光置换探针具有非常好的识别单碱基突变的能力，而且其特异性可以通过调节探针的长度和两条链相差的碱基数来实现。

基因分型的实现可以通过多对与相应基因型完全匹配的荧光置换探针来进行竞争置换杂交，同时这些荧光置换探针标记不同的荧光基团，杂交到特定基因型目的片段的荧光置换探针发出特定的荧光信号，于是就可以通过实时PCR过程中产生的荧光信号来判断检测标本的基因型。荧光置换探针检测插入、缺失、替换等各种基因突变具有很高的特异性和灵敏度，应用于实时PCR基因分型，可以大大缩短检测时间，提高检测的准确性。

Cheng^[52]等研究表明，采用荧光置换探针进行实时PCR基因分型具有以下几个优点：1、检测结果准确性高。检测结果的准确性主要依赖于探针识别突变的特异性。荧光置换探针由于自身两条链之间的完全互补配对，存在着与靶序列的竞争作用，因此不匹配的模板就很难和荧光置换探针发生置换杂交，从而保证了探针置换杂交检测的特异性。2、探针设计简单。针对各种等位基因的基因分型，可以设计相对应的几对荧光置换探针，分别标记不同的荧光基团，就可以实现多等位的基因分型。一般只需要将待检测位点放置在探针的中间或左右2-3个碱基；使探针负链的 T_m 值在55-65℃之间，正链可以比负链多1-2个碱基。用 T_m Utility计算负链的 T_m 值，以及探针正链与不匹配模板结合的 T_m 值；要求负链 T_m 值必须大于探针正链与不匹配模板结合的 T_m 值，二者差值越大，识别各种突变的特异性越高。3、快速、简便。实时PCR基因分型可以在反应的同时进行检测，没有PCR后处理等操作步骤，自动化程度高，通常在1-2小时的时间内就可以得到检测结果。结果判断简单易懂。4、探针适用性考察简单。设计合成的荧光置换探针可以在检测标本之前，用合成的寡核苷酸靶序列来研究置换探针识别的特异性，考察荧光置换探针的设计以及合成是否适用，如果不适用可以马上重新设计或者合成，而不用等到检测标本结果出来后才发现问题。这样既可以节省设计时

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.

厦门大学博硕士论文摘要库