

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200226063

UDC_____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

**基于 MALDI-TOF 质谱和非探针式
实时 PCR 的基因分型研究**

**Development of Genotyping Methods Based on
MALDI-TOF Mass spectrometry and Non-probe
Real-time PCR**

郑 薇 薇

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: 2005 年 6 月 20 日

论文答辩日期: 2005 年 7 月 16 日

学位授予日期: 2005 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2005 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

目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
第一部分 基于 MALDI-TOF-MS 的基因分型研究	6
第一章 MALDI-TOF-MS 基因分型原理	9
第一节 引言	9
第二节 MALDI-TOF-MS 基因分型原理	10
参考文献	15
第二章 基于 MALDI-TOF-MS 的基因分型研究	22
第一节 引言	22
第二节 材料与方法	23
第三节 结果	28
§ 3.1 K-ras 基因第 12 位密码子单位点基因分型	28
§ 3.2 K-ras 基因第 12 位密码子双位点同步基因分型	30
第四节 讨论	30
参考文献	32
第三章 基于 MALDI-TOF-MS 的多重基因分型研究	35
第一节 引言	35
第二节 材料与方法	37
第三节 结果	42
§ 3.1 扩增引物的设计	42
§ 3.2 延伸引物比例的优化	42
§ 3.3 对临床血液提取标本进行基因分型	44
第四节 讨论	48
参考文献	49
第二部分 基于实时 PCR 的基因分型研究	54
第一章 ARMS 实时 PCR 基因分型特异性的研究	57
第一节 引言	57
第二节 材料与方法	59
第三节 结果	62

§ 3.1 PCR 扩增产物和引物二聚体熔解曲线分析	62
§ 3.2 ARMS 实时 PCR 反应体系优化结果	63
§ 3.3 ARMS 实时 PCR 基因分型	65
第四节 讨论	66
参考文献	68
第二章 实时 PCR 熔解曲线基因分型研究	74
第一节 引言	74
第二节 材料和方法	76
第三节 结果	79
§ 3.1 实时 PCR 熔解曲线基因分型方法建立	79
§ 3.2 临床标本 APC 基因突变检测	80
第四节 讨论	81
参考文献	83
附录 1 MALDI-TOF-MS 基因分型法检测 β-地中海贫血症临床标本 结果	85
附录 2 双重实时 PCR 快速检测霍乱弧菌和副溶血弧菌	92
第一节 引言	92
第二节 材料和方法	93
第三节 结果	96
§ 3.1 样品模板 DNA 提取	96
§ 3.2 霍乱弧菌改良分子信标体系检测结果	96
§ 3.3 副溶血弧菌改良分子信标体系的检测结果	97
§ 3.4 改良分子信标-双重实时 PCR 检测体系的建立和应用	99
第四节 讨论	99
参考文献	100
附录 3 英文缩写索引	102
硕士期间发表交流论文	104
致谢	105

CONTENTS

Abstract(In Chinese)	1
Abstract(In English)	3
Part I Development and application of MALDI-TOF -MS based multiplex genotyping	6
Chapter I Principle of MALDI-TOF-MS based genotyping	9
Section I Introduction	9
Section II Principle of MALDI-TOF-MS based genotyping	10
References.....	15
Chapter II Development of MALDI-TOF-MS based genotyping	22
Section I Introduction	22
Section II Materials and Methods	23
Section III Results	28
§3.1 MALDI-TOF-MS based Mono-genotyping of codon 12 of K-ras gene.....	28
§3.2 MALDI-TOF-MS based Dual-genotyping of codon 12 of K-ras gene.....	30
Section IV Discussion	30
References.....	32
Chapter III Development of MALDI-TOF-MS based multiplex genotyping	35
Section I Introduction	35
Section II Materials and Methods	37
Section III Results	42

§3.1 Design of amplification primers for β -globin gene.....	42
§3.2 Optimization of the proportion of five extension primers	42
§3.3 MALDI-TOF-MS base multiplex genotyping of clinical blood samples	44
Section IV Discussion	48
References	49
Part II Non-probe real-time PCR genotyping	54
Chapter I Specificity evaluation of ARMS primer- based real-time PCR genotyping	57
Section I Introduction	57
Section II Materials and Methods	59
Section III Results	62
§3.1 Melting curve analysis of PCR products and primer-dimers .	62
§3.2 Optimization of ARMS real-time PCR genotyping reaction system	63
§3.3 ARMS primer-based real-time PCR genotyping	65
Section IV Discussion	66
References	68
Chapter II Melting curve analysis based real-time PCR genotyping	74
Section I Introduction	74
Section II Materials and Methods	76
Section III Results	79
§3.1 Development of melting curve analysis based real-time PCR genotyping	79
§3.2 Melting curve analysis based ral-time PCR genotyping of APC gene in clinical samples.....	80

Section IV Discussion	81
References	83
Appendix I Results of MALDI-TOF-MS based genotyping of β-globin gene	85
Appendix II Dual real-time PCR detection of V. cholera and V.parahaemolyticus	92
Section I Introduction	92
Section II Materials and Methods	93
Section III Results	96
§3.1 DNA extraction	96
§3.2 Detection of V. cholera by modified molecular beacon based real-time PCR	97
§3.3 Detection of V. parahaemolyticus by modified molecular beacon based real-time PCR	99
§3.4 Development and application of a dual detection of V. cholera and V. parahaemolyticus by modified molecular beacon based real-time PCR method	99
Section IV Discussion	99
References	100
Appendix III English abbreviation index	102
Publications	104
Acknowledgment	105

摘要

本论文围绕两种类型的基因分型方法展开研究。包括基于基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 结合引物延伸反应的多重基因分型方法, 以及基于非探针式实时 PCR 的 ARMS 基因分型方法和熔解曲线基因分型方法。

第一部分, 建立了一种基于 MALDI-TOF-MS 结合引物延伸反应的多重基因分型方法。首先以自行构建的 K-ras 基因 12 位密码子第二位点四种基因型的质粒 DNA 为模板, 经目的片断扩增, 去磷酸化, 再用一条未经修饰的普通引物, 在 dATP、ddTTP、ddCTP 和 ddGTP 混和物存在的体系中进行引物延伸反应, 最后用 MALDI-TOF-MS 检测引物延伸产物荷比 (m/z) 得到质谱图, 根据质谱图中各个峰的峰值进行基因分型研究, 初步建立了基于 MALDI-TOF-MS 结合引物延伸反应进行基因分型的方法。在此基础上, 设计两条不同长度的延伸引物, 实现同时对 K-ras 基因 12 位密码子的双重基因分型。最后, 以 β -地中海贫血中国地区常见的 5 种突变为研究对象, 设计五条相应的延伸引物, 在同一管中对这 5 个位点进行检测。应用该方法对 95 份已知基因型的 β -地中海贫血临床标本进行检测, 结果准确率 100%。与传统的基因分型技术相比, 该方法具有设计简单、通量高、结果准确、灵敏度高等特点, 适合大规模的人群筛查研究。

第二部分, 采用 SYBR Green I 为实时 PCR 指示剂, 分别对基于 ARMS 的基因分型方法和熔解曲线基因分型方法进行研究。首先, 以原癌基因 K-ras 基因 12 位密码子的四种基因型质粒 DNA 为研究模型, 进行 ARMS 实时 PCR 基因分型特异性的研究。结果表明: 在

和模板匹配的 ARMS 引物 3' 端附近引入故意错配碱基, 将 ARMS 引物浓度稀释 10 倍, 并对传统三步 PCR 循环进行改良, 即根据目的产物和引物二聚体的熔点差异, 在传统延伸步骤之后增加一步恒温 80℃ 检测荧光步骤, 可消除引物二聚体的影响, 使 ARMS 引物的特异性增强, 得到准确的基因分型结果。另一种基于实时 PCR 的是熔解曲线基因分型方法, 首先从基因组 DNA 中扩增包含突变位点的 APC 靶基因 (270bp) 片断, 并通过熔解曲线分析确定产物; 再以上述片断为模板扩增特定长度的小片段 (40/35bp), 以 0.5℃/step 的速率, 获得从 65℃ 到 99℃ 的熔解曲线以检测 APC_1309 位 5bp 缺失突变。临床标本检测结果表明: 18 例结直肠癌患者石蜡组织标本中检出 APC_1309 位 5bp 缺失突变 7 例, 20 例正常人外周血标本检测结果均为阴性。

实验表明以上两种基于 SYBR Green I 的实时 PCR 基因分型方法, 无需合成探针, 实验设计简单, 操作简便, 结果可靠, 是快速、简便、经济、适合临床基因分型方法。

关键词: 基因分型; MALDI-TOF-MS; 实时 PCR

ABSTRACT

This dissertation consists of two parts. The first part is the development of multiplex genotyping method based on matrix-assisted laser ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) coupled with primer extension reaction. The second part is the development of non-probe real-time PCR genotyping methods using ARMS primers and melting curve analysis.

In the first part, multiplex genotyping based on MALDI-TOF-MS coupled with primer extension reaction was developed. Using the K-ras plasmid DNA as the templates, specific DNA fragments containing the target site(s) were first amplified. After amplicon dephosphorylation, a single primer without any modification was used to indicate the primer extension reaction in the presence of dATP, ddTTP, ddCTP and ddGTP mixture, the products were then analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry. From the peak value in the mass spectra the genotypes were analyzed. An improved design was then tested using two primers in a single tube to accomplish the dual-genotyping of K-ras gene. The results obtained showed that both design could give correct and unambiguous genotyping.

In chapter three, a multiplex genotyping based on MALDI-TOF-MS in a single tube was developed. The feasibility of this method was tested by detecting the five most common causative mutations in β -thalassemia among Chinese population. A slow annealing PCR was adopted to amplify a 1.3kb amplicon including the five mutations.

Five primers of different length were used for multiplex genotyping. The robustness of this approach was validated by using ninety-five clinical human genomic DNA samples of known genotypes and all of them were accurately detected.

Compared to conventional genotyping methods, MALDI-TOF-MS coupled with primer extension method is more accurate, reliable and has the distinct advantage in high-throughput. It is likely to become an alternative approach for large scale screening for genetics diseases.

In the second part, Using SYBR Green I as the real-time PCR indicator, ARMS primers-based genotyping and melting curve analysis-based real-time PCR genotyping were respectively developed. Plasmids containing four different genotypes in *K-ras* codon 12 (wild type is GGT and the mutant is AGT, TGT, CGT, respectively) were used as model to study the specificity of ARMS primers. Based on the melting temperature difference between the primer dimer and the amplicon, a four-step PCR protocol that could eliminate primer dimer interference was established, where the fluorescence was measured at the forth step at 80°C. The results showed that using ARMS primers harboring additional mismatch at the third base near the 3'-terminal, combined with lower concentration (0.02μmol/L) could further increase the specificity of the genotyping and give unambiguous genotyping results.

Another real-time PCR genotyping method is based on melting curve analysis. Also using SYBR Green I as the real-time PCR

indicator, a target DNA fragment of 270bp containing the APC mutation site was first amplified from the sample DNA. Then a short fragment (40/35bp) was amplified from the 270bp PCR product, followed by melting curve analysis from 65°C to 99°C at 0.5°C/step. The 5bp deletion of APC_1309 mutation was analyzed. Totally 18 paraffin-embedded tissues were analyzed, among them 7 were detected to be mutation positive, and the other 11 were negative. No mutation was detected in 20 normal peripheral blood samples.

Non-probe real-time genotyping methods using SYBR Green I established here are easy to design, simple to manipulate, amenable to automation and cost effective. These approaches could be applicable to a variety of other genes, and had great potential in clinical use.

Keywords: Genotyping; MALDI-TOF-MS; Real-time PCR

第一部分 基于 MALDI-TOF-MS 的基因分型研究

引 言

人类基因组计划 (Human Genome Project, HGP) 实施以来, 在包括中国在内的20个研究课题组的共同努力下, 于2000年6月宣告人类基因组草图绘制成功。现有的研究表明, 人类基因组约含有3万至4万个蛋白质编码基因。作为一个十分稳定却又存在各种变异的体系, 任何两个人类个体的基因组中有99.99%的序列是完全相同的, 只有0.01%的不同 (即基因组的多态性), 然而正是这微小的差异决定了人类遗传的多样性^[1]。

基因组的多态性, 反映了物种形成、选择、迁移、重组合交配体系等的进化历程, 奠定了丰富多彩的生物界, 是生物多样性的基础。DNA多态性最简单最多见的形式就是发生在基因组中的单个核苷酸的多态性, 即单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), 指在一个群体中的一条染色体的某一个位点上有不同的核苷酸组成, 是广泛分布于人类全基因组中稳定的多态位点。任何一个群体中频率不低于1%的SNP位点大约有1000万个, 占总的SNP位点的90%。单核苷酸多态性在人类基因中广泛存在, 是重要的遗传标志之一^[2:3]。SNP最大程度地代表了不同个体之间的遗传差异, 因而成为研究复杂疾病、药物敏感性及人类进化的重要标记。

在人类基因组计划后, 一项多国科研人员参与的基因组项目单倍型图谱 (Haplotype Map, Hap Map) 于2002年10月29日正式启动。该项目是人类基因组计划的延伸, 其主要目的是利用现有

的信息绘制人类疾病相关图谱，这样就可以更加精确和有效地治疗疾病。因为很多普通疾病都与10万种可能存在的单倍型中的一部分相关，且任何一种发病率在5%以上的疾病都可以通过“单倍型图谱”的方法发现。该项目不仅有助于基因的鉴别和定位，同时通过建立序列变异与表型、序列变异与疾病（如各种心血管病及癌症）风险之间的关系，可以对人类进化、种群多样性及复杂疾病的诊断和治疗产生巨大的促进作用^[4;5]。此外，该项目不但要找出基因与疾病的相关性，还将找出那些与个体对药物不同反应性相关的基因，这样在治疗时就能避免药物的不良反应。从本质上说，Hap Map项目是一个很好的捷径，大大缩短了研究大量复杂疾病的时间。

总的来说，只有阐明DNA序列的差异以及基因组的多态性，才能真正了解与疾病特别是多基因疾病有关的遗传机制；同时深入准确地了解人类起源、进化和迁徙过程中的DNA序列变化^[6-8]。

由于DNA多态性标记的研究具有重要意义，检测DNA多态性的技术也越来越重要。并且随着人类基因组计划的不断推进，鉴定并描述人类致病基因特征的步伐不断加快，致病基因的突变检测越来越广泛地应用于人类疾病的临床诊断及动植物遗传育种的分子标记辅助选择。人类遗传学及其临床应用更加依赖于快速的DNA多态性检测技术。

目前已有多种DNA多态性检测的技术^[9;10]，如基于DNA多态性产生的酶切位点的改变的聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析法（PCR-RFLP）^[11;12]，基于DNA多态性产生的聚合酶链式反应-单链构象多态分析技术（PCR-SSCP）^[13;14]基于DNA多态性产生的异源双链的DGGE^[15-17]、HA^[18]以及DHPLC^[19-22]等分析技术，基于寡核苷

酸探针杂交的ASO斑点杂交技术^[23-25]、RDB反向点杂交^[26;27]、生物芯片^[28;29]等分析技术, 基于引物特异扩增的MOEA^[25]等分析技术, 基于引物特异延伸检测的DHPLC^[22;30], 基于测序的Sanger测序^[31;32]、Minisequencing^[33-36]以及Pyrosequencing^[37;38]序列分析等分析技术。但是这些方法步骤繁琐, 耗时长, 通量低, 难以自动化, 大大限制了其在临床上的应用。

基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 结合引物延伸反应基因分型技术是一种新兴的基因分型的方法^[39-41], 已广泛应用到生物化学和分子遗传学的研究^[42-45]。它的优点在于准确度高, 灵敏度高、通量大, 自动化程度高; 已成为各种迅速发展新技术的平台, 目前国外已有诸多文献报道MALDI-TOF-MS在SNP分型方面的应用^[46-49]。

为建立基于MALDI-TOF-MS结合引物延伸反应进行多重基因分型的方法, 我们首先以K-ras基因12位密码子第二位点的四种基因型为模型, 考察了MALDI-TOF-MS结合引物延伸进行基因分型的可行性。在此基础上, 根据K-ras基因的序列设计两条不同长度的延伸引物, 同时对K-ras基因12位密码子的第一、二位点进行分型, 实现双重基因分型。最后, 以 β -地中海贫血症中国最常见的5种突变为研究对象, 设计针对不同位点的特异延伸引物, 建立基于MALDI-TOF-MS的五重基因分型方法。希望在此基础上发展一种准确度高、快速、高通量并可应用于临床普查的检测方法。

第一章 MALDI-TOF-MS 基因分型原理

第一节 引言

1906 年 J. J. Thomson 发明了质谱，起初只是作为无机化学研究中同位素的分析工具^[50]。40 年代后，该技术被广泛应用于有机化合物的分析并发展成为有机质谱。质谱技术的发展相当缓慢，主要是由于电离技术的制约，质谱方法无法对大分子的分子量进行准确、灵敏的测定。80 年代后期有机质谱获得突破性进展，1987 年 F. Hillenkamp 和 M. Karas 共同发明了基质辅助激光解吸电离 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)^[51]，1988 年 J. Fenn 发明了电喷雾电离 (Electron Spray Ionization, ESI)，大大提高了质谱的测定范围，从而开创了有机质谱分析研究生物大分子的新领域并派生生物质谱学。生物质谱显示了在高级性、难挥发和热不稳定性生物大分子分析（如蛋白质和核酸）上的巨大潜力，它们具有高灵敏度和高质量检测范围，使得在 pmol (10^{-12}) 甚至 fmol (10^{-15}) 的水平上准确地分析分子量高达几十万的生物大分子，从而使质谱技术真正走入了生命科学的研究领域。

随着 2000 年人类基因组计划的完成，生命科学进入了后基因组时代。后基因组研究中所必须的高通量、大规模筛选分析方法，又为生物质谱施展才华提供一个舞台。由于生物质谱具有高通量、灵敏、准确、可靠和易于自动化等特点，已广泛应用于生命科学研究的各个领域^[39;40;45;47]。MALDI-TOF-MS 方法检测核酸的优点在于：速度极快，核酸分子的离子化、分离及检测过程仅需几毫秒，结果可靠，对核酸分子的分离仅与其分子量和电荷有关，不受二级

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.

廈門大學博碩士論文