

学校编码: 10384  
学 号: 200126053

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
硕 士 学 位 论 文

实时 PCR 基因分型研究

Development of Real-time PCR Genotyping

程 金 平

指导教师姓名: 李庆阁 研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2004 年 6 月 4 日

论文答辩时间: 2004 年 6 月 29 日

学位授予日期: 2004 年 月 日

答辩委员会主席: 杨丰 研究员

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2004 年 6 月 22 日

## 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）：程金平

2004年6月24日

## 目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
第一部分 新型荧光双链置换探针实时PCR基因分型研究	6
第一章 新型荧光双链置换探针的实时 PCR 基因分型	11
第一节 引言	11
第二节 材料与方法	13
第三节 结果	25
§ 3.1 荧光双链置换探针实时 PCR 基因分型的原理	25
§ 3.2 $\beta$ -地中海贫血中国地区常见 5 种突变的构建	27
§ 3.3 基因组 DNA 模板的提取	30
§ 3.4 荧光双链置换探针实时 PCR 的灵敏度实验	31
§ 3.5 荧光双链置换探针实时 PCR 的特异性实验	33
§ 3.6 实时 PCR 检测 62 份已知基因型的临床标本	36
§ 3.7 实时 PCR 随机筛查厦门地区 32 份临床标本	38
§ 3.8 实时 PCR 双盲检测 116 份临床标本	40
§ 3.9 15 个家系产前诊断标本的实时 PCR 基因分型	42
§ 3.10 荧光双链置换探针的设计	44
第四节 讨论	51
参考文献	56
第二章 荧光双链置换探针多重实时 PCR 基因分型	67
第一节 引言	67
第二节 材料与方法	69
第三节 结果	73
§ 3.1 特异性考察-变温杂交反应	73
§ 3.2 特异性考察-实时 PCR 基因分型	75
§ 3.3 多重实时 PCR	76
§ 3.4 多重实时 PCR 基因分型	78
§ 3.5 缓慢退火实时 PCR 单管检测四重突变	79
第四节 讨论	80
参考文献	83

<b>第三章 荧光双链置换探针实时 PCR 测定 DNA 池的等位基因频率</b> .....	87
<b>第一节 引言</b> .....	87
<b>第二节 材料与方法</b> .....	88
<b>第三节 结果</b> .....	90
§ 3.1 双链置换探针实时 PCR 检测基因突变.....	90
§ 3.2 双链置换探针实时 PCR 检测浓度梯度模板.....	91
§ 3.3 双链置换探针实时 PCR 测定等位基因频率.....	91
§ 3.4 等位基因频率测定的误差分析.....	93
<b>第四节 讨论</b> .....	95
<b>参考文献</b> .....	97
<b>第二部分 新型硫化修饰引物结合高保真 DNA 聚合酶的实时 PCR 基因分型</b> .....	99
<b>第一节 引言</b> .....	99
<b>第二节 材料与方法</b> .....	102
<b>第三节 结果</b> .....	108
§ 3.1 等位基因特异引物实时 PCR 基因分型.....	108
§ 3.2 3' 末端碱基硫代磷酸化修饰的寡核苷酸对核酸外切酶的耐受性研究.....	110
§ 3.3 3' 末端碱基硫代磷酸化修饰的等位基因特异引物实时 PCR 基因分型.....	116
§ 3.4 3' 末端碱基硫代磷酸化修饰的引物核酸外切酶消化后用于实时 PCR 基因分型.....	119
§ 3.5 3' 末端两个碱基硫代磷酸化修饰的荧光双链引物用于实时 PCR 基因分型.....	120
<b>第四节 讨论</b> .....	122
<b>参考文献</b> .....	124
<b>附录：发表交流论文</b> .....	129
<b>致谢</b> .....	130

**CONTENTS**

<b>Abstract ( In Chinese )</b> .....	1
<b>Abstract ( In English )</b> .....	3
<b>Part I Development and application of real-time PCR genotyping using displacing probes</b> .....	6
<b>Chapter I Real-time PCR genotyping using displacing probes</b> .....	11
<b>Section I Introduction</b> .....	11
<b>Section II Materials and Methods</b> .....	13
<b>Section III Results</b> .....	25
§ 3.1 Principle of real-time PCR genotyping using displacing probes .....	25
§ 3.2 Construction of five mutations.....	27
§ 3.3 Extraction of human genomic DNA.....	30
§ 3.4 Sensitivity of displacing probes in real-time PCR.....	31
§ 3.5 Specificity of displacing probes in real-time PCR genotyping.....	33
§ 3.6 Real-time PCR genotyping of 62 human DNA samples of known genotypes using displacing probes.....	36
§ 3.7 Random screening of 32 random clinical samples with real-time PCR genotyping using displacing probes.....	38
§ 3.8 Double-blind analysis of 116 patient samples with real-time PCR genotyping using displacing probes.....	40
§ 3.9 Prenatal diagnosis of 45 patient samples of 15 families with real-time PCR genotyping using displacing probes.....	42
§ 3.10 Design of displacing probes.....	44
<b>Section IV Discussion</b> .....	51
<b>References</b> .....	56

<b>Chapter II Multiple Real-time PCR genotyping of multiple mutations using displacing probes.....</b>	<b>67</b>
<b>Section I Introduction.....</b>	<b>67</b>
<b>Section II Materials and Methods.....</b>	<b>69</b>
<b>Section III Results.....</b>	<b>73</b>
§ 3.1 Specificity evaluation of displacing probes with denaturation analysis.....	73
§ 3.2 Specificity evaluation of displacing probes in real-time PCR.....	75
§ 3.3 Multiple real-time PCR for multiple mutation detection.....	76
§ 3.4 Multiple real-time PCR detection of mutations using displacing probes.....	78
§ 3.5 Simultaneous detection of four mutations using slow annealing PCR.....	79
<b>Section IV Discussion.....</b>	<b>80</b>
<b>References.....</b>	<b>83</b>
<b>Chapter III Determination of allele frequency of pooled DNA by displacing probe-based real time PCR.....</b>	<b>87</b>
<b>Section I Introduction.....</b>	<b>87</b>
<b>Section II Materials and Methods.....</b>	<b>88</b>
<b>Section III Results.....</b>	<b>90</b>
§ 3.1 Mutation detection with real-time PCR using displacing probes.....	90
§ 3.2 Determination of the sensitivity of the assay with displacing probes.....	91
§ 3.3 Allele frequencies determination with displacing probe-based real-time PCR.....	92
§ 3.4 Error analysis of the assay.....	93

<b>Section IV Discussion.....</b>	<b>95</b>
<b>References.....</b>	<b>97</b>
<b>Part II Development of real-time PCR genotyping using phosphorothioate modified allele specific primer with proofreading DNA polymerase.....</b>	
<b>Section I Introduction.....</b>	<b>99</b>
<b>Section II Materials and Methods.....</b>	<b>101</b>
<b>Section III Results.....</b>	<b>108</b>
§ 3.1 Real-time PCR genotyping using allele specific primers with SYBR Green I.....	108
§ 3.2 Inhibition of exonuclease activity of phosphorothioate modified primers.....	110
§ 3.3 Real-time PCR genotyping using phosphorothioate modified primers with proofreading DNA polymerase.....	116
§ 3.4 Real-time PCR genotyping using T4 DNA polymerase digested and purified phosphorothioate modified primers with proofreading DNA polymerase.....	119
§ 3.5 Real-time PCR genotyping using phosphorothioate modified double-stranded allele specific primers with proofreading DNA polymerase.....	120
<b>Section IV Discussion.....</b>	<b>122</b>
<b>References.....</b>	<b>124</b>
<b>Appendix: Publications.....</b>	<b>129</b>
<b>Acknowledgment.....</b>	<b>130</b>

## 摘 要

本论文围绕实时 PCR 基因分型的探针基因分型和引物基因分型两个关键技术展开了研究，研究工作主要包括新型荧光双链置换探针实时 PCR 基因分型技术的研究，以及新型硫代磷酸化修饰的引物结合高保真 DNA 聚合酶的等位基因特异扩增的基因分型技术的研究。

第一部分，提出了新型荧光双链置换探针实时 PCR 基因分型的新技术，以  $\beta$ -地中海贫血中国地区常见的 5 种突变为研究对象，建立了新型荧光双链置换探针实时 PCR 基因分型的检测体系，系统考察了新型荧光双链置换探针检测的灵敏度和特异性、以及影响探针灵敏度和特异性的关键因素；提出了新型荧光双链置换探针用于实时 PCR 基因分型的设计规则；针对 SNP 点突变的基因分型，设计了一条兼并碱基的负链取代野生型和突变型探针的两条负链。应用建立的  $\beta$ -地中海贫血中国地区常见的 5 种突变的检测体系，完成了已知基因型的 62 份临床标本、随机筛查的 32 份临床标本、双盲对照检测的 116 份临床标本、产前诊断的 15 个家系的 45 份临床标本，共计 255 份临床标本的基因分型，结果准确率 100%。在此基础上，为了适应大规模人群筛查的需要，建立了新型荧光双链置换探针多重实时 PCR 多重突变同步检测的检测体系，以及缓慢退火实时 PCR 单管检测四重突变的检测体系。应用新型双链置换探针实时 PCR 技术，建立了测定 DNA 池的等位基因频率的新型高通量检测体系。与传统的基因分型技术相比，新型荧光双链置换探针实时 PCR 基因分型技术具有设计简便、特异性强、灵敏度高等优点，应用于实时 PCR 的均相检测体系，还具有简便、



快速、可靠、实用、高通量等优点，适合碱基替换、插入、缺失等各种基因突变检测。

第二部分，提出了新型硫代磷酸化修饰的引物结合高保真 DNA 聚合酶的等位基因特异扩增的实时 PCR 基因分型技术。首先考察了普通的 ARMS 引物应用 SYBR Green I 荧光染料的实时 PCR 基因分型情况，接着系统考察了硫代磷酸化修饰引物 3' 端不同位置的碱基后，引物对核酸外切酶的耐受作用，以及其分别结合高保真 DNA 聚合酶的实时 PCR 基因分型效果。在此基础上，建立了新型硫代磷酸化修饰的荧光双链引物结合高保真 DNA 聚合酶的等位基因特异扩增的基因分型体系，进行等位基因特异扩增的同时实现基因分型。

**关键词：**双链置换探针；硫化修饰引物；

实时 PCR 基因分型

**ABSTRACT**

This dissertation consists of two parts. The first part is the development of a new real-time PCR genotyping approach using displacing probes, the second part is the development of another new real-time PCR genotyping method using phosphorothioate-modified allele specific primers with proofreading DNA polymerase.

In the first part, a new real-time PCR genotyping approach using displacing probes was developed. Displacing probes are composed of two complementary oligonucleotides with different length. The longer positive strand is labeled with a fluorophore at the 5'-end and the shorter negative strand is labeled with a quencher at the 3'-terminus, so that the fluorophore and the quencher groups are in close contact in the duplex probe. Thus, in the absence of a target, the probe is non-fluorescent due to the contact-quenching effect between the fluorophore and the quencher. In the presence of a target, the negative strand can be displaced and the fluorophore becomes fluorescent. Such displacing probes are readily capable of discriminating between targets that differ by only a single nucleotide. The specificity of displacing probes could be simply assessed through denaturation analysis before genotyping was implemented and the probes designed with maximal specificity also showed the greatest detection sensitivity. The ease in design, the simple single-dye labeling chemistry, and the capability to adopt degenerated negative strands for point mutation genotyping make the displacing probes both cost-effective and easy in use.

In chapter one, the feasibility of this method was first tested by detecting the five different types of mutation in the human  $\beta$ -globin

gene with constructed plasmid templates. The robustness of this approach was then validated by simultaneous genotyping of the five different types of mutation with 255 clinical samples of humane genomic DNA. Sixty-two human genomic DNA samples with nine known genotypes were accurately detected, 32 random clinical samples were successfully screened, 116 DNA samples were all correctly genotyped in a double-blind analysis, and 45 clinical samples of 15 Chinese families for the prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia were all exactly genotyped.

In chapter two, based on the above work, a multiple real-time PCR detection of mutations in a single-tube using displacing probes was then developed. A slow annealing PCR was used to amplify a 500 bp amplicon including four mutations, and real-time PCR simultaneous detection of four mutations in a single tube was achieved using four mutant displacing probes.

In chapter three, an accurate, yet inexpensive and high-throughput, method for determining the allele frequency of biallelic polymorphisms in pools of DNA samples was developed.

The combined merits of reliability, flexibility, and simplicity should make the method of real-time PCR genotyping using displacing probes suitable for routine clinical testing, large-scale genetic screening, large population-based epidemiology study, detecting meaningful polymorphic differences in candidate gene association studies, and genome-wide linkage disequilibrium scans.

In the second part, another new real-time PCR genotyping method using phosphorothioate-modified allele specific primers with

proofreading DNA polymerase was developed. Normal ARMS primers display misincorporation when used for real-time PCR genotyping with SYBR Green I. Primer stabilisation is a key requirement to enable the application of proofreading to allele specific primers genotyping. Introduction of one or more phosphorothioate linkages into the 3' terminus of the primer enhance the inhibition of exonuclease activity of T4 DNA polymerase. The allele specific primer with phosphorothioate modification of 3' terminus in the last nucleotide had a much stronger inhibition ability contrasted with the second nucleotide of the 3' terminus, and the phosphorothioate modification of last two nucleotides of the 3' terminus got the best result of the inhibition of exonuclease activity. Real-time PCR genotyping with proofreading DNA polymerase got similar results, phosphorothioate modification of last two nucleotides of the 3' terminus of the allele specific primers coupled with proofreading DNA polymerase could remarkably reduce misincorporation and enhance the amplification fidelity of PCR. A new real-time PCR genotyping method using double-stranded allele specific primers with phosphorothioate modification of last two nucleotides of the 3' terminus was then developed. These results suggest that the use of phosphorothioate-modified primers and proofreading DNA polymerase will offer a simple and cost-effective means to improve fidelity in a range of allele specific primers based genotyping assay formats.

**Keywords:** Displacing probes; Phosphorothioate modified primers;

Real-time PCR genotyping

## 第一部分 新型荧光双链置换探针实时 PCR

### 基因分型研究

#### 引言

1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构模型, 这一重大发现开创了分子生物学的黄金时代。1990 年 10 月启动的人类基因组计划开创了破译人类遗传信息的新时代。随着基因组学的兴起, 特别是人类基因组计划的实施, 各种模式生物 (如大鼠、小鼠、秀丽线虫、大肠杆菌、酵母、拟南芥和水稻) 全基因组测序也相继进行和完成。

人类基因组的序列图反映了基因组稳定的一面, 却未反映其变异多态的一面, 而正是这种基因组的多样性, 即序列排列的差异构成的个体与群体的差异, 形成了不同个体对疾病的不同易感性、对药物及环境等因素的不同反映的遗传学基础。任意两个个体之间的 DNA 序列差异约占基因组的 0.01%, 按人类基因组共有 30 亿对碱基计算, 将有 300 万核苷酸位点的不同, 就是基因组中这万分之一的差异, 决定了人类的遗传多样性<sup>[1]</sup>。只有从不同个体 DNA 序列的差异上阐明人类基因的多样性, 才能真正了解与疾病特别是多基因疾病有关的遗传机制, 同时深入了解人类起源、进化和迁徙过程中 DNA 序列的变化<sup>[2-4]</sup>。

自 2000 年 6 月人类基因组草图宣告绘成后, 人类基因组学领域于 2002 年 10 月 29 日正式启动了国际单倍型图谱计划。国际单倍型图谱计划是人类基因组计划的延伸, 是将人类基因组成果真正应用于医疗实际工作方面迈出的关键一步。单倍型图谱是人类

基因组的遗传整合图,是快速研究人类基因组单核苷酸多态性的有效途径。单倍型图谱将为人类疾病和遗传的关联分析,致病基因和致病因子的确定,药效、副作用和疾病风险的分析,人类起源、进化和迁徙过程中的 DNA 序列变化以及人类起源进化迁徙历史的研究等提供完整的人类基因组信息和有效的研究工具,必将极大地促进基因组多态性的研究<sup>[5,6]</sup>。

基因组中的多态性,也即 DNA 多态性,普遍存在于生物有机体中,它主要是指不同物种或同一物种不同个体间基因组序列的差异,包括基因编码区和非编码区序列的差异。DNA 多态性反映了物种形成、选择、迁移、重组和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 多态性最简单多见的形式就是发生在基因组中的单个核苷酸的多态性,也即单核苷酸多态性(SNPs)。它是人类可遗传的变异中最常见的一种,占有已知多态性的 90%以上。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<sup>[7,8]</sup>。单核苷酸多态性所表现的多态性只涉及到单个碱基的变异,这种变异可由单个碱基的转换(Transition)或颠换(Transversion)所引起,也可由碱基的插入或缺失所致,通常所说单核苷酸多态性是指前者。

DNA 多态性标记在疾病易感基因的定位、遗传病的分子诊断、新型针对个体用药的药物基因组研究与开发、法医研究的罪犯身份的鉴别、亲子鉴定、器官移植中供体和受体间的配对选择、物种进化的研究等研究与应用中具有重要意义<sup>[1]</sup>。DNA 多态性和疾病关联的遗传学研究为临床诊断和药物遗传学开辟了一个新的方向。已有研究显示基因点突变是导致大多数病原菌产生抗药性的主要原因;基因突变在导致肿瘤发生、发展过程中也起着重要作

用；许多导致基因功能异常的致病突变与疾病的关联关系的研究已经比较确定，如：地中海贫血、亨廷顿病、血友病等<sup>[1]</sup>。

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。

近十多年来，相继建立了多种检测 DNA 多态性的技术方法<sup>[9, 10]</sup>，使其广泛应用于基因定位与功能分析、生物进化、种群遗传，以及比较基因组学等研究领域。这些方法主要是基于 DNA 多态性产生的酶切位点的改变的基因酶谱（PCR-RFLP）分析技术<sup>[11, 12]</sup>，基于 DNA 多态性产生的单链构象多态性的 PCR-SSCP 分析技术<sup>[13, 14]</sup>，基于 DNA 多态性产生的异源双链的 DGGE<sup>[15-17]</sup>、HA<sup>[18]</sup>以及 DHPLC<sup>[19-22]</sup>等分析技术，基于寡核苷酸探针杂交的 ASO 斑点杂交技术<sup>[23-25]</sup>、RDB 反向点杂交<sup>[26, 27]</sup>、生物芯片<sup>[28-30]</sup>等分析技术，基于引物特异扩增的 ARMS-PCR<sup>[31-33]</sup>和 MOEA<sup>[34]</sup>等分析技术，基于引物特异延伸检测的 DHPLC<sup>[22, 35]</sup>和 MALDI-TOF-MS<sup>[36-38]</sup>分析技术，基于测序的 Sanger 测序<sup>[39, 40]</sup>、Minisequencing<sup>[41-44]</sup>以及 Pyrosequencing<sup>[45, 46]</sup>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，成为迅速发展的新技术平台<sup>[47, 48]</sup>。

作为最重要的均相检测技术，实时 PCR 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<sup>[49-51]</sup>。

实时PCR应用于DNA多态性的基因分型的关键技术是探针技术和引物技术<sup>[47, 48]</sup>。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Taq Man探针<sup>[52-54]</sup>、FRET探针<sup>[55-58]</sup>、分子信标探针<sup>[59-61]</sup>以及最近提出的新型荧光双链置换探针<sup>[62, 63]</sup>。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Taq Man探针很难达到基因分型要求的特异性，于是引进了MGB以增强特异性，但是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。目前还没有一种探针很好地满足实时PCR基因分型的需要。

新型荧光双链置换探针是一对（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，两条链长度可以相同也可以不同，两条寡核苷酸的3'端进行封闭，使其不能作为引物延伸。在其中的一条寡核苷酸上标记荧光供体，在另一条寡核苷酸上标记荧光受体或淬灭剂。并且探针序列与靶序列互补，可以发生杂交反应。新型荧光双链置换探针实时 PCR 基因分型是通过荧光双链置换探针识别模板 PCR 扩增产物来达到检测目的。



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库