

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071151983

UDC _____

厦门大学

硕士学位论文

一种新型拷贝数变异检测技术应用于
染色体非整倍体的快速诊断

Rapid Diagnosis of Chromosomal Aneuploidy Using a Novel
Copy Number Variation Detection Technology

王小波

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: 2010年6月

论文答辩时间: 2010年7月

学位授予日期: 2010年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010年7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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

中文摘要	1
英文摘要	3
第一章 基因拷贝数变异及染色体非整倍体变异的检测现状	5
第一节 基因拷贝数变异概述及检测现状	5
§ 1.1 基因拷贝数变异概况	5
§ 1.2 基因拷贝数变异检测现状	6
第二节 染色体非整倍体概述及检测现状	10
§ 2.1 染色体非整倍体概述	10
§ 2.2 染色体非整倍体检测现状	12
§ 2.2.1 细胞生物学诊断方法	14
§ 2.2.2 分子细胞生物学和分子生物学诊断方法	14
第三节 本论文研究内容	17
第二章 LDR-qPCR 技术的原理、设计及体系的建立	19
第一节 引言	19
第二节 材料与方法	19
第三节 实验原理和探针设计	23
§ 3.1 LDR-qPCR 技术原理	23
§ 3.2 扩增引物、杂交探针、荧光检测探针的设计与合成	23
第四节 常见染色体非整体检测体系的实验设计和优化	29
§ 4.1 杂交连接反应体系的建立和优化	31
§ 4.1.1 杂交连接探针用量及杂交时间的考察	31
§ 4.1.2 连接酶的选择	33
§ 4.1.3 杂交连接反应程序的考察和优化	35
§ 4.2 实时荧光 PCR 体系的优化	38
§ 4.2.1 镁离子浓度的考察	38
§ 4.2.2 通用引物用量的考察	39
§ 4.2.3 荧光检测探针用量的优化	40
§ 4.2.4 各通道效率的考察	41

§ 4.3 影响拷贝数检测结果稳定性的三个关键因素的考察	43
§ 4.3.1 针对目标基因（或染色体）采用杂交连接探针对数的考察 ...	43
§ 4.3.2 基因组 DNA 用量的考察	44
§ 4.3.3 采用富集程序对检测结果的影响	45
第五节 讨 论	47
第三章 LDR-qPCR 技术的临床应用评估	50
第一节 引 言	50
第二节 材料与方 法	51
第三节 实验结果与分析	54
§ 3.1 LDR-qPCR 技术应用于常见染色体非整倍体临床标本的初步检测	54
§ 3.2 LDR-qPCR 技术应用于常见染色体非整倍体检测的病例对照实验	55
§ 3.3 LDR-qPCR 技术应用于常见染色体非整倍体产前诊断的双盲检测	58
§ 3.4 LDR-qPCR 技术应用于染色体非整倍体检测的掺入实验	59
第四节 讨 论	61
参考文献	64
发表交流论文	73
致 谢	74

CONTENTS

Abstract (In Chinese)	1
Abstract (In English)	3
Chapter I Introduction of gene copy number variation and chromosomal aneuploidy	5
Section I Background of copy number variation & copy number variation Detection	5
§ 1.1 Background of copy number variation.....	5
§ 1.2 Background of copy number variation detection.....	6
Section II Background of aneuploidy & aneuploidy Detection	10
§ 2.1 Background of aneuploidy.....	10
§ 2.2 Background of aneuploidy detection.....	12
§ 2.2.1 Cytogenetic method.....	14
§ 2.2.2 Molecular cytogenetic methods and molecular methods.....	14
Section III Research contents of this dissertation	17
Chapter II Principle, design and system establishment of LDR-qPCR technology	19
Section I Introduction	19
Section II Materials and Methods	19
Section III Experimental principle and probe design	23
§ 3.1 Principle of LDR-qPCR	23
§ 3.2 Design of primers, hybridization probes and detection probes.....	23
Section IV Experimental design and optimization of chromosomal aneuploidy detection system	29
§ 4.1 Establishment and optimization of hybridization and ligation reaction system.....	31
§ 4.1.1 Hybridization probes dosage and hybridization time	31
§ 4.1.2 Selection of ligase	33

§ 4.1.3 Reaction program	35
§ 4.2 Optimization of real-time PCR system	38
§ 4.2.1 Concentration of Mg ²⁺	38
§ 4.2.2 Dosage of universal primers.....	39
§ 4.2.3 Dosage of detection probes	40
§ 4.2.4 Evaluation of efficiencies in each channel.....	41
§ 4.3 Evaluation of three key factors affecting the stability of copy number detection result.....	43
§ 4.3.1 Hybridization probes pair	43
§ 4.3.2 Dosage of genomic DNA.....	44
§ 4.3.3 Adoption of enrichment program.....	45
Section V Discussions	47
Chapter III Clinical evaluation of LDR-qPCR system	50
Section I Introduction	50
Section II Materials and Methods	51
Section III Experimental results and analysis	54
§ 3.1 Primary detection of clinical aneuploidy samples by LDR-qPCR.....	54
§ 3.2 Case-control study of common chromosomal aneuploidy detection by LDR-qPCR.....	55
§ 3.3 Double-blind test of common chromosomal aneuploidy detection by LDR-qPCR.....	58
§ 3.4 Spike-in experiment of chromosomal aneuploidy detection by LDR-qPCR.....	59
Section IV Discussions	61
References	64
Publications	73
Acknowledgement	74

摘 要

拷贝数变异是近年来发现的新一代遗传标记,其蕴含巨大的信息需要我们去探索和挖掘,但缺乏简便实用的检测技术;染色体非整倍体是临床遗传诊断研究中最重要的一类目标疾病,其发病率高、病症严重且无有效的治疗手段,缺乏快速、准确、简便的诊断方法。本论文旨在开发一种新型的拷贝数变异检测技术,并以染色体非整倍体为对象展开系统研究。

第一章,综述拷贝数变异的发现与相关研究的发展过程,并介绍现有检测方法及其各自的优缺点;综述染色体非整倍体的相关背景、并介绍其传统诊断方法和新颖的分子生物学诊断技术及其各自的优缺点。最后,我们提出了探索一种新型的拷贝数检测技术(连接检测反应依赖的实时定量 PCR 技术, LDR-qPCR)及选择染色体非整倍体为对象展开考察的研究思路。

第二章,首先从 LDR-qPCR 技术的实验原理和设计展开,深入解析实验方案和设计原则,其次是针对临床上常见的染色体非整倍体设计对应的 LDR-qPCR 多重检测体系,对其多个反应条件进行考察、优化并最终建立标准的检测体系,最后,评价了三个关键的实验因素对染色体非整倍体检测体系的稳定性和分辨能力的影响。

第三章,为了进一步评估已建立的检测体系在染色体非整倍体检测应用中的潜力和价值,我们进行了两个阶段的临床标本检测,第一阶段为病例-对照实验,第二阶段为双盲检测实验。结果均显示该体系具有很好的临床灵敏度和特异性,具备较高的临床应用价值。

本论文提出了连接检测反应依赖的实时定量 PCR 技术,通过染色体非整倍体检测体系的建立展开了细致的考察,最终的临床评估表明该技术具有快速、准确、简单、实用等特性,有望在拷贝数变异检测领域和染色体非整倍体临床诊断中得到广泛应用。

关键词: 拷贝数变异; 染色体非整倍体; 连接检测反应依赖的实时定量 PCR

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

Copy number variations (CNVs) recently found are a new generation of genetic markers, containing enormous information desired to explore and mine, but with status quo that there is few simple and practical detection method with high resolution; Chromosomal aneuploidy is a most important class of target-disease in clinical genetic diagnosis. It has high incidence with severe symptom, no effective treatment and few fast, accurate, and convenient diagnosis method. The paper aims to develop a novel CNVs detection technology, and to take chromosomal aneuploidy as object for systematic study.

In chapter one, the discovery and the development of related research of CNVs, existing detection methods and their respective advantages and disadvantages were reviewed. We also have summarized relevant background of chromosomal aneuploidy, its traditional diagnosis methods and novel molecular diagnosis techniques and their respective advantages and disadvantages. Finally, we proposed a novel copy number detection technology (ligation detection reaction-based real-time quantitative PCR, LDR-qPCR) and select chromosomal aneuploidy as study object.

In chapter two, principle and design of LDR-qPCR, deep analysis of experimental strategy and design principle were firstly introduced. Then we designed a multiplex system based on LDR-qPCR for common chromosomal aneuploidy detection. Finally, several conditions were optimized for achieving optimal detection system, and the influence of some key factors on stability and resolution of the system were examined.

In chapter three, we successfully detected all clinical samples for two tests, a case-control study and a double-blind test, which suggests our assay present high clinical sensitivity and specificity and may provide an alternative for clinical diagnosis of chromosomal aneuploidy.

Herein we developed a novel detection method, namely ligation detection reaction-based real-time quantitative PCR, for CNVs analysis, and designed a detection system for accurate molecular diagnosis of common chromosomal aneuploidy as a representative application. Clinical evaluation result showed LDR-qPCR is a fast, accurate, simple and practical technique, thus it would be expected to offer extensive application in CNVs detection and clinical chromosomal aneuploidy diagnosis field.

Keywords: Copy number variations; Chromosomal aneuploidy; Ligation detection reaction-based real-time quantitative PCR

第一章 基因拷贝数变异及染色体非整倍体变异的检测现状

基因拷贝数变异概述及检测现状

§ 1.1 基因拷贝数变异概况

遗传与变异,是生物界不断发生的普遍现象,也是物种形成和生物进化的基础。人类的遗传变异有多种方式,从基因水平看,遗传物质的变异包括基因突变和基因重组,其中基因突变是产生个体差异性的根本来源;从细胞遗传学水平看,遗传物质的变异主要包括染色体数目的变异和染色体结构的变异。这些变异均会产生较显著的遗传学效应,导致变异个体的表型发生严重改变甚至使变异个体死亡。

近年来,随着基因测序技术和计算机技术的快速发展和完善,研究者们在DNA水平上发现了越来越多的遗传变异。这些变异包括各种短串联重复序列(Short tandem repeats, STRs),单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs),以及小片段的插入、缺失、重复、倒位、易位等。短串联重复序列又称为微卫星DNA,其特征是重复单位为2-6bp,重复次数10~60多次,400bp以下的基因片段。主要是在DNA复制过程中滑动,或复制和修复时滑动链与互补链碱基错配,导致一个或几个重复单位的缺失或插入产生的。单核苷酸多态性主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性。SNPs在人类基因组中广泛存在,平均每300个碱基对中就有1个,估计其总数可达1000万个甚至更多。由于以上所述变异在基因组中分布普遍而且密度较高,因此,研究者们普遍认为这类变异是基因组中最主要的变异,是导致个体间表型差异及各种遗传性疾病及疾病易感性的主要原因(1,2)。

随着 DNA 芯片技术的逐步发展,最近一些研究发现,在人类和其他哺乳动物中,许多 DNA 片段(长度从 kb 到 Mb)都存在亚微观范围内的拷贝数变化(3),这些基因组 DNA 中大于 1kb 的片段发生缺失或者重复的现象称为拷贝数变异(Copy number variations, CNVs)或拷贝数多态性(Copy number polymorphisms, CNPs)。Redon 等将一个 1kb 或更长的、与参照基因组不同的拷贝数的 DNA 片段定义为一个 CNV(4)。保守估计至少 10%的人类基因组序列存在这样的现象(5,6)。

尽管已发现的人类基因组中 CNVs 的个数远远低于 SNPs 的个数,但是,它们覆盖的基因组长度至少达到 150Mb,这是目前任何一种遗传物质都无法比拟的。在此之前,一般认为 SNPs 是最普遍最重要的遗传标记。但研究证实 CNVs 包含的信息量至少是 SNPs 的 3 倍且已有报道证明其在个体差异、人类疾病相关性和药物应答中均起重要作用(7-9),所以,作为第四代遗传标记的 CNVs 蕴含巨大的未知空间需要我们去探索,这也使 CNVs 的发现、检测和全基因组关联分析等成为目前医学遗传学研究的热点。

§ 1.2 基因拷贝数变异检测现状

已经发展了很多方法来研究基因拷贝数变异, DNA 生物芯片可能是其中最为有效的。目前, CNVs 发现的主要方法是比较基因组杂交(Comparative genomic hybridization, CGH)技术,它是由荧光原位杂交技术结合消减杂交技术衍生的,仅需少量 DNA 即可在整个基因组水平研究 DNA 拷贝数差异。将待测基因组 DNA 和参照基因组 DNA 分别用不同颜色的荧光进行标记,然后按一定的比例将二者混合杂交,最终通过荧光显微镜检测获取相关的基因位点及其拷贝数信息。此技术与芯片技术结合后衍生的芯片比较基因组杂交技术(Array-CGH)在基因拷贝数变异研究中具有极大的推动作用。SNP 芯片是另一种研究拷贝数变异的检测技术,区别于 Array-CGH 的是, SNP 芯片不需要同时使用两个样本的 DNA 和探针进行杂交,只需单独进行杂交即可,它可通过比较测试样本的信号强度和其他个体的强度确定每个位点的相对基因拷贝数。因以上两项技术主要应用于全基因组水平,对于发现探索新的 CNVs 位点至关重要,但应用于具体的候选基因位点拷贝数检

测及验证时,就显得大材小用,另外,它们还存在灵敏度差,分辨率低等缺点。

PCR技术(10)是现代分子生物学和生物工程技术的灵魂,其已经发展为遗传与分子分析的根本性基石。基于PCR技术的检测方法也以其快速简便、廉价易用等优势引起研究者的广泛关注。实时定量PCR(Real-time quantitative PCR, qPCR)是指通过实时监测PCR过程(监测扩增效率)达到精确定量起始模板拷贝数的技术,该方法是一种较适用于CNVs的检测技术(11-15)。它的基本原理是分别针对待检测基因上的序列和对照基因序列设计两对引物和标记不同荧光基团的检测探针。通过对扩增后两个探针信号指示的Ct值(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)进行比较从而判断目标基因拷贝数。此方法分析灵敏度较高,简单快速,但也存在一些缺点,由于不同引物扩增效率不可能完全相同并且多条引物和检测探针在反应中会相互影响,因此表现在Ct值上的实验误差较大,且有文献报道实时定量PCR技术检测拷贝数的分辨极限是两倍的差异(如1拷贝与2拷贝的差异)(16)。以发生基因重复为例,某一基因发生重复后的拷贝数是正常状态拷贝数的1.5倍,理论上Ct值仅变化0.585,这样微小的差异对实时定量PCR实验条件要求较苛刻,且对实验误差极为敏感,从而使得检测数据波动性较大,准确性不高。

2002年以来,一种新的多重扩增技术(多重探针连接再扩增技术, Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)(17)以其较高的检测通量和准确性赢得了分子检测领域的青睐,它的基本原理是针对目标基因的序列设计相应的寡核苷酸杂交探针对。每对杂交探针分为上游杂交探针和下游杂交探针,分别杂交于DNA上相邻的部位。当杂交探针与基因组DNA经约16小时左右的充分杂交后,通过连接酶的连接反应即可将上游探针和下游探针连接形成一条可供扩增的完整的杂交探针。这样就将基因的拷贝数等比例转化为可供扩增的杂交探针的数目。所有的上游探针都含有相同的扩增引物结合位点,下游探针亦然,这样就可实现在PCR阶段用一对引物等效率扩增多种不同的杂交探针,大大增加了PCR反应的重数。每种下游探针上还带有一段长度不等的填充序列,这样就使得每种连接后的杂交探针具有不同的长度(一般在100nt至500nt之间),扩增后长度各异的PCR产物经过毛细管电泳分析,在图谱上通过不同产物峰的相对面积比(或峰高比)即可判断目标基因拷贝数目。该方法的核心内容是间接的杂交探针多重扩增,

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