

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 32620121150542

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

厦门市 P53 基因、MDM2 基因多态性与原发性肝细胞癌遗传易感性的
关联研究

The association study between the polymorphisms in P53
and MDM2 and the genetic susceptibility of primary
hepatocellular carcinoma among Xiamen population

潘欢欢

指导教师姓名: 牛建军 教授

专 业 名 称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 张军 教授

评 阅 人: _____

2015 年 4 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(厦门市疾病预防控制中心)课题(组)的研究成果,获得(厦门市科技局社会发展项目)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门市疾病预防控制中心微生物)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): 潘欢欢

2015 年 5 月 20 日

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）：潘欢欢

2015 年 5 月 20 日

摘要

目的

探讨厦门市 P53 基因 rs1042522 位点、MDM2 基因 rs2279744 位点的单核苷酸多态性 (SNP) 与原发性肝细胞癌 (HCC) 遗传易感性的关系, 为筛检肝癌高危人群, 以及进行肝癌一、二级预防提供参考依据。

方法

采用病例-对照研究设计, 抽样调查在 2011 年 1 月至 2014 年 10 月间厦门市综合性三甲医院就诊的肝癌患者和健康对照者。病例组纳入标准: 根据 HCC 诊断依据在调查期间被首次确诊为 HCC、年龄 ≥ 18 岁、现住址与调查地属同一区(县)级范围、无任何其他肿瘤史的患者。排除标准: 患有 HCC 以外的肿瘤, 患有自身免疫性肝炎或中毒性肝炎, 拒绝调查或由于病危状态而无法接受调查者。对照组纳入标准: 均无肿瘤病史, 与病例组患者非亲属关系, 与病例组患者年龄相差不超过 3 岁, 性别和地区(在厦门市居住 10 年以上)等方面匹配。排除标准: 患有肝脏疾病及既往肿瘤病史者。病例组 275 例, 对照组 340 例。采集晨起空腹静脉血 5 ml, 进行血细胞分离及基因分型。采用 χ^2 检验和 t 检验比较病例组、对照组的基本情况, 采用 logistic 回归模型分析 P53 基因 rs1042522 位点、MDM2 基因 rs2279744 位点的基因型、等位基因分别与 HCC 遗传易感性的关系。

结果

(1) 单因素分析结果显示, HCC 患者的吸烟 (48.00%)、被动吸烟 (84.73%)、乙肝家族史 (25.09%)、HBsAg 阳性 (+) (72.00%) 比例均显著高于健康对照组, HCC 患者的饮茶 (45.45%) 比例显著低于健康对照组, 上述差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组研究对象在饮酒史、糖尿病史、高血压病史和癌症家族史等方面比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

(2) 多因素 logistic 回归分析结果显示, 被动吸烟、有乙肝家族史和 HBsAg 阳性人群的肝癌发病风险相对较高, 被动吸烟人群发病风险是无被动吸烟人群的 2.74 倍, 有乙肝家族史人群的肝癌发病风险是无乙肝家族史人群的 2.42 倍, HBsAg 阳性人群的肝癌发病风险是 HBsAg 阴性人群的 15.44 倍。饮茶是肝癌发病的保护因素, 习惯饮茶人群的肝癌发病风险显著低于无饮茶习惯的人群。

(3) P53 基因 rs1042522 位点多态性与肝癌发病风险之间存在统计学关联 (C/G: 校正 OR=1.81, 95%CI: 1.14~2.88; C/C: 校正 OR=3.42, 95%CI: 2.06~5.67; C/G+C/C: 校正 OR=2.32, 95%CI: 1.51~3.57)。研究对象按照 HBsAg 感染情况分层后发现, 在 HBsAg 阳性者中, 病例组的 C/C 基因型的携带比例显著高于对照组, 携带 C/C 基因型可能增加人群的肝癌发病风险。基因-环境联合作用显示, 基因型 C/G+ C/C 对肝癌发病风险的影响, 和吸烟史、被动吸烟、饮茶史、乙肝家族史、HBsAg 感染情况等 5 项环境暴露因素之间存在联合作用, 校正 OR (95%CI) 分别为 2.08 (1.04~4.17)、5.56 (2.07~14.97)、0.35 (0.16~0.79)、5.13 (2.29~11.49)、29.88 (14.66~60.90)。

(4) MDM2 基因 rs2279744 位点多态性与肝癌发病风险之间存在统计学关联 (G/T: 校正 OR=1.94, 95%CI: 1.21~3.12; G/G: 校正 OR=2.63, 95%CI: 1.58~4.39; G/T+G/G: 校正 OR=2.19, 95%CI: 1.41~3.42), 携带 G/T 或 G/G 基因型可能增加人群的肝癌发病风险。按 HBsAg 感染情况分层后发现, 在 HBsAg 阳性者中, 病例组的 G/G 基因型的携带比例显著高于对照组。基因-环境联合作用显示, 基因型 G/T+G/G 对肝癌发病风险的影响, 和吸烟史、被动吸烟、饮茶史、乙肝家族史、HBsAg 感染情况等 5 项环境暴露因素之间存在联合作用, 校正 OR(95%CI) 分别为 3.06 (1.42~6.57)、4.00 (1.44~11.11)、0.35 (0.16~0.79)、5.13 (2.29~11.49)、32.98 (15.64~69.52)。

(5) P53 基因 rs1042522 位点多态性和 MDM2 基因 rs2279744 位点多态性的联合作用结果显示, P53 基因的合并基因型 C/G+C/C 和 MDM2 基因的合并基因型 G/T+G/G 之间存在的联合作用 (校正 OR=4.59, 95%CI: 1.77~11.90)。

结论

P53 基因 rs1042522 位点多态性、MDM2 基因 rs2279744 位点多态性与肝癌

易感性存在关联，P53 基因的 C 等位基因、MDM2 基因的 G 等位基因会增加肝癌的发病风险，并与吸烟史、被动吸烟、饮茶史、乙肝家族史、HBsAg 感染情况等 5 项环境暴露因素之间存在联合作用。P53 基因的合并基因型 C/G+C/C 和 MDM2 基因的合并基因型 G/T+G/G 之间存在联合作用。

关键词

P53 基因 MDM2 基因 多态性 单核苷酸 肝细胞癌

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

Objective

To study the association study between the polymorphisms in P53 and MDM2 and the genetic susceptibility of primary hepatocellular carcinoma among Xiamen population. To screen high-risk populations and provide references to the prevention of HCC.

Methods

All study objects were recruited from the general Third Class A Level hospitals of Amoy from January 2011 to October 2014. They were surveyed in case-control study. Inclusion criteria for Cases: (1). HCC cases were newly diagnosed with primary hepatocellular carcinoma; (2). Older than 18 years of age; (3). They resided in the Xiamen city; (4). Confirmation that without any other cancer. Exclusion criteria for Cases: (1). Diagnosed with other cancer than HCC; (2). Patients with autoimmune hepatitis or toxic hepatitis. (3). Denial for investigation or in critical condition. Inclusion criteria for Controls: (1). No cancer history. (2) they are not relatives of cases (3) gender and age was matched with case (± 3 years). (4). Recruited from the health population who accepting medical examination from same hospital. (5). They resided in the Xiamen city. Exclusion criteria for Controls: (1). Liver diseases. (2). Cancer history. This study consisted of 275 HCC patients and 340 controls, 5ml morning fasting venous blood of all subjects were obtained to isolate cells and distribute genotype. The differences in general information between cases and controls were tested by χ^2 test and t-test. The association between SNP rs17401966, SNP rs2279744 and the risk of developing HCC were assessed by using the logistic regression.

Results

(1) Univariate analysis shows The proportion of case group are higher than these of control group in the personal smoking (48.00%) ,passive smoking (84.73%) ,family history of hepatitis B (25.09%) , HBsAg positive (72.00%) .Drinking tea rate in control group is higher than it in case group. It shows no statistical significance in the history of drinking, diabetes, hypertension, cancers.

(2) Multiple logistic analysis show that passive smoking, family history of hepatitis B , HBsAg positive are risk factors of HCC. Passive smoking significantly increased risk is 2.74. Family history of hepatitis B is 2.42. HBsAg positive is 15.44. Drinking tea is a protect factor, which can decrease the risk of HCC.

(2) It shows statistical significance in the relationship between SNP rs1042522 and susceptibility to HCC (C/G: aOR=1.81, 95%CI: 1.14~2.88; C/C: aOR=3.42, 95%CI: 2.06~5.67; C/G+ C/C: aOR=2.32, 95%CI: 1.51~3.57) . After stratified analysis of HBsAg, in HBsAg positive group,the rate of C/C genotype in case group is more than it in control group, C/C genotype may increase the risk of HCC.In genotype-environment interaction, there is interaction between C/G+G/G genotype and personal smoking, passive smoking, drinking rea and family history of hepatitis B, HBsAg,aOR (95%CI) is respectively 2.08 (1.04~4.17) ,5.56 (2.07~14.97) ,0.35 (0.16~0.79) ,5.13 (2.29~11.49) ,29.88 (14.66~60.90) .

(3) It shows statistical significance in the relationship between SNP rs2279744 and susceptibility to HCC (G/T: aOR=1.94, 95%CI: 1.21~3.12; G/G: aOR=2.63, 95%CI: 1.58~4.39; G/T+G/G: aOR=2.19, 95%CI: 1.41~3.42) , G/T+G/G genotype may increase the risk of HCC.After stratified analysis of HBsAg, in HBsAg positive group, the rate of G/G genotype in case group is more than it in control group. In genotype-environment interaction, there is interaction between G/T+G/G genotype and personal smoking, passive smoking, drinking rea and family history of hepatitis B, HBsAg,aOR (95%CI) is respectively3.06 (1.42~6.57) ,4.00 (1.44~11.11) ,0.35 (0.16~0.79) ,5.13 (2.29~11.49) ,32.98 (15.64~69.52) .

(4) The association study between MDM2 gene and P53 gene shows there is

interaction between C/G+G/G genotype at the P53 gene and G/T+G/G genotype at the MDM2 gene (aOR=4.59, 95%CI: 1.77~11.90)。

Conclusion

These findings demonstrate that there is statistical significance in the relationship between the polymorphisms in P53 and MDM2 and the genetic susceptibility of primary hepatocellular carcinoma. C allele in P53 gene, G allele in MDM2 gene may increase the risk of HCC. They have a relationship with personal smoking, passive smoking, drinking tea, family history of hepatitis B and HBsAg positive. There is interaction between C/G+G/G genotype at the P53 gene and G/T+G/G genotype at the MDM2 gene.

Key Words

P53 gene; MDM2 gene; Polymorphism; single nucleotide; Liver Neoplasm

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	IV
第一章 绪论.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究对象.....	3
1.3 流行病学调查.....	3
1.4 实验室操作.....	4
1.5 研究方法.....	8
第二章 结果与分析.....	9
2.1 一般人口学特征分析.....	9
2.2 环境暴露因素分布.....	9
2.3 P53 基因 rs1042522 位点多态性与肝癌遗传易感性关系.....	12
2.4 MDM2 基因 rs2279744 位点多态性与肝癌遗传易感性关系.....	15
2.5 rs1042522 和 rs2279744 基因多态性的联合作用.....	18
第三章 讨论.....	19
第四章 结论.....	24
附 录.....	25
参考文献.....	31
综 述.....	35
攻读硕士学位期间发表的论文.....	48
致 谢.....	49

Table of Contents

Chinese Abstract.....	I
English Abstract.....	IV
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Research Background and Purpose.....	1
1.2 Research Object.....	3
1.3 Epidemiological Investigation.....	3
1.4 Laboratory Operation.....	4
1.5 Research Methods.....	8
Chapter 2 Results and Analysis.....	9
2.1 Analysis of Demographic Characteristics.....	9
2.2 Distribution of Environmental Exposure Factors.....	9
2.3 Relationship of SNP rs1042522 and Genetic Susceptibility to HCC...12	
2.4 Relationship of SNP rs2279744 and Genetic Susceptibility to HCC...15	
2.5 Interaction of SNP rs1042522 and rs2279744.....	18
Chapter 3 Discussion.....	19
Chapter 4 Conclusion.....	24
Appendix.....	25
Reference.....	31
Summarize.....	35
Published Papers during the Master's Degree.....	48
Acknowledgments.....	49

第一章 绪论

1.1 研究背景

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球范围内常见肿瘤之一, 其恶性程度高、预后差, 死亡率位居世界肿瘤死亡第 2 位^[1]。HCC 分布具有明显的地域性差异, 从全球范围来看, 中国、日本、东南亚及撒哈拉以南非洲等国家和地区发病率较高。其中, 中国 HCC 形势较为严峻, 其发病率、死亡率均居全球首位。2012 年, 我国 HCC 新发病例约 394770 例, 占全球的 50.41%; 死亡病例约为 383203 例, 占全球的 51.40%; 发病率和死亡率分别为 29.0/10 万和 28.1/10 万, 在我国恶性肿瘤的发病率、死亡率中分别位居第三位和第二位^[2]。

厦门是我国 3 大 HCC 高发区之一, 发病率高出全国平均水平的 1 倍多^[3]。目前认为, HCC 属于多因素复杂性疾病, 其发生、发展是病毒因素、环境因素和机体遗传因素共同调控的多阶段复杂过程^[4,5]。

单核苷酸多态性 (SNP), 指在基因组上某个特定的核苷酸通过置换、缺失、插入等变化而发生变异, 形成的序列差异^[6]。SNP 有望取代限制性片段长度多态性 (RFLP) 和微卫星多态性, 成为第三代分子标记, 因为他广泛分布在染色体组中, 使人们有机会发现与许多疾病相关的基因组突变, 有些 SNP 因为与某些疾病基因相邻, 所以提供了重要的标记位点; 有些 SNP 会影响蛋白质的结构和表达, 有助于探讨疾病的基因机制; SNP 相对于重复序列来说更加稳定, 它的突变在进化史上只发生一次; SNP 基因分型检测系统的研究发展非常迅速, 越来越高效率, 高产出, 成本也在持续降低, 为遗传学的 SNP 研究提供了强有力的支持^[7]。目前 SNP 广泛被应用于疾病病因研究 (包括各种类型的肿瘤)、药物敏感或耐受的相关性研究等。

单核苷酸多态性 (SNP) 作为第三代遗传标记, 充分反映了个体间的遗传差异, 决定了个体对疾病的易感性, 正成为肝癌遗传易感性研究的重要工具。

为了探索 SNP 与肝癌之间的关系, 研究者们对上百个候选基因进行了相关的研究。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 具有细胞毒性、抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等生物学功能, 是机体免疫系统在发挥免疫作用时重要的

细胞因子之一，研究发现肝癌患者体内 TNF- α 水平显著高于健康人群，TNF- α 可能增加了患肝癌的易感性^[8]。近年来研究表明，TNF- α 基因启动子区 SNP 可影响 TNF- α 表达，TNF- α 基因启动子区-308 位点 G/A 单核苷酸多态性可影响 TNF- α 表达，TNF- α -308 位点 G 被 A 替换后，TNF- α 转录效率增加，TNF- α -308AA 为肝癌的风险基因型^[9,10]。

干扰素- γ (interferon,IFN- γ) 参与免疫应答机制的调节和启动，具有协同抗病毒效应，IFN- γ 基因 SNP 可通过改变转录因子结合位点而影响自身的表达，有研究发现，IFN- γ -847 A/A 基因型可能与机体外周血 IFN- γ 含量减少有关，而 IFN- γ 含量减少可致使细胞免疫反应减弱，机体不能有效清除 HBV 病毒，使得病毒感染持续存在，病毒的活跃复制长期刺激肝脏是造成肝硬化和肝癌的重要原因^[11]。

本次研究拟选择 P53 基因 rs1042522 位点多态性和 MDM2 基因 rs2279744 位点多态性来进行研究，探索其与肝癌遗传易感性的关联。

P53 基因是一种重要的抑癌基因，可诱导细胞生长阻滞，细胞凋亡，细胞分化以及 DNA 修复，参与维持细胞基因组的稳定性，调节 DNA 损伤反应，促进细胞老化^[12]。MDM2 是 P53 调控网络中的下游的靶基因，它作为 P53 的负性调节因子，参与细胞的生长抑制、细胞周期的调控和细胞的凋亡过程^[13]。MDM2 蛋白还可以作为 G 蛋白耦联受体介导的细胞外信号分子，调节细胞周期和凋亡；能够与抑癌基因-视网膜神经胶质瘤基因产物 (Rb) 的 C 端结合，促进其降解，调节其活性，从而阻止细胞进入 G1 期；可以增强 E2F1 的功能，促进细胞周期进入 S 期，正性调控者细胞周期，从而促进细胞增殖，抑制细胞凋亡；MDM2 编码一种锌指蛋白可抑制肿瘤抑制基因 P53 介导的转录活性，通过 P53 途径和非 P53 依赖途径等方式调节细胞的增殖和凋亡，参与肿瘤的发生发展过程^[14,15]。

目前有关 P53 基因 rs1042522 位点多态性和 MDM2 基因 rs2279744 位点多态性与肝癌易感性研究相关结论不一致，研究对象多为西方人群，以东方人群为基础的研究较少，并且缺乏以乙肝病毒感染情况为背景的研究，缺乏基因与基因、基因与环境之间的联合作用分析。本文拟通过开展病例对照研究，探讨厦门人群中 P53 基因 rs1042522 位点多态性、MDM2 基因 rs2279744 位点多态性、环境暴露因素对肝癌遗传易感性的关系，并进一步探讨基因-环境、基因-基因联合作用

对肝癌发病风险的影响。

1.2 研究对象

本研究采用病例对照研究方式开展研究，对象包括 275 例肝癌病例和 340 例非肿瘤健康对照，全部 615 例研究对象均来自于我国肝癌高发区域——厦门。

275 例 HCC 患者为 2011 年 1 月至 2014 年 10 月期间厦门市综合性三甲医院住院行手术治疗的肝癌新发病例，所有 HCC 患者均经过组织病理学确诊为肝细胞癌。病例组纳入标准：调查期间根据 HCC 诊断依据被首次确诊为 HCC、 ≥ 18 岁、现住址与调查地属同一区（县）级范围（厦门地区居住 10 年以上）、无任何其他肿瘤史的患者。排除标准：患有 HCC 以外的肿瘤，患有自身免疫性肝炎或中毒性肝炎，拒绝调查或由于病危状态而无法接受调查者。

对照组纳入标准：均无肿瘤病史，与病例组患者非血缘关系，与病例组患者年龄相差不超过 3 岁，性别和地区（厦门地区居住 10 年以上）等方面匹配。排除标准：患有肝脏疾病及既往肿瘤病史者。

依据《原发性肝癌诊疗规范（2011 年版）》^[16]，HCC 诊断依据为：病理组织学检查阳性；和（或）肝脏影像学检查阳性，以及甲胎蛋白检测 ≥ 400 ng/ml。本研究通过了厦门市 CDC 伦理委员会审核[批号：XJK/LLSC（2013）004]。所有调查对象均签署了知情同意书。

1.3 流行病学调查

流行病学调查采用统一的《厦门市居民健康调查表》问卷，经研究对象知情同意后，由统一培训合格的调查员在保密情况下，一对一、面对面访谈进行，收集每位研究对象的详细人口学资料以及相关环境危险因素暴露资料。

调查问卷中按 WHO 标准定义吸烟和饮酒史，研究对象一生中连续或累积吸烟 6 个月或以上者视为有吸烟史；被动吸烟是指不吸烟者一周中有一天以上每天吸入吸烟者呼出的烟雾长于十五分钟；每周饮酒至少一次持续 6 个月或以上者视为有饮酒史；研究对象每周至少饮茶一杯，持续六个月以上视为有饮茶史。研究设计和组织人员每月对调查问卷进行收集和审核，审核问卷的完整性和逻辑性。

问卷填写完整，无逻辑错误为审核通过。审核未通过的问卷返回，由调查员进行补充调查，直至审核通过。

1.4 实验室操作

1.4.1 血样采集和细胞分离

由研究对象所在医院负责采样，华大基因负责检测，样本收集过程按照国家人类基因组研究伦理学准则进行。采用江苏康健医疗器械有限公司生产的真空抗凝（EDTA）采血管分别采集所有调查对象晨起空腹静脉血 5 ml，2 500×g 离心 10 min，分离血浆和血细胞，分装于 3 ml 冻存管，在 DNA 提取前置于-78 °C 冻存，待检。

1.4.2 HBsAg 检测

使用北京万泰生物药业股份有限公司制作的乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒（酶联免疫法）定性检测研究对象HBsAg感染情况，检测按照试剂盒说明书进行操作，并由经统一培训合格的厦门市疾病预防控制中心检验科人员进行操作。

1.4.3 SNP 基因分型

使用瑞士罗氏公司生产的全自动核酸分离纯化加样系统 DNA 分离试剂盒 I（MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I）从血细胞中提取 DNA，提取的基因组 DNA 置于 EPPENDORF 生产的带旋转帽的（screw-capped）管中，储存于-22 °C 环境下。所有样品通过由美国西昆诺姆公司生产的点样仪在点阵芯片分析系统（美国西昆诺姆公司）上成点排列，并通过飞行时间质谱（美国西昆诺姆公司）系统扫描，基因分型结果通过 MassArrayTyper 4.0 分析完成。基因分型过程中利用华大基因生产的超纯水（空白对照）和 5%样本进行质量控制。实验步骤操作如下所示：

1.4.3.1 引物设计及合成

1.4.3.1.1 基因序列的获取

- （1）确定 SNP 位点，以 SNP 位点为中心截取 100bp 以上长度的基因序列；
- （2）将得到的基因序列，复制到文本文件（.txt）中。

1.4.3.1.2 结合文献并采用 Assay Designer 3.1 软件进行引物设计:

(1) 在软件 SNP Group 栏中选择 Browse 按钮, 找到上述产生的 txt 文件;
(2) 在 Assay Design 栏中选择 SBE Mass Extend, 并在 SBE stop mix 栏中选择 iPlex, 在 M_uLtiplex Level 中按照实际情况选择不同的反应重数;(3) SNP capture, Extend primer design, MASS M_uLtiplexing 均选择默认参数;(4) 参数设定后, 点击 Run;(5) 在 txt 文件目录相应位置找到产生的引物序列文件。

1.4.3.2 引物稀释及注意事项

1.4.3.2.1 引物稀释

(1) 稀释单管扩增引物至终浓度 100 μ M, 加入去离子水混合后使得各引物浓度为 0.5 μ M;(2) 稀释单管延伸引物至终浓度 500 μ M, 加入引物混合后使得各引物浓度为 8 μ M、10 μ M、15 μ M;(3) 按照 DNA 合成产品使用说明计算该条引物分子量、质量数和摩尔数, 进而根据所需的浓度计算需加入去离子水的量。

1.4.3.2.2 注意事项

(1) 将粉末状引物高速离心数秒钟, 以免在开启时丢失;(2) 小心打开装引物的管子, 加入所需的去离子水;(3) 充分振荡、混匀;(4) 3000 转/分离心 3 分钟;(5) 取出部分使用液置于 4 $^{\circ}$ C 备用, 余下部分放入 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.3.3 Sequenom Mass Array 系统基因分型步骤

1.4.3.3.1 PCR 扩增反应

1、原理: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 用于扩增位于两段已知序列之间的 DNA 区域。每个 PCR 循环, 反应混合体系都在模板变性、引物退火和引物延伸三种不同温度下依序温育。该过程可使用一种可编程序的温度热循环仪而达到自动化。

2、步骤

(1) 按照 615 板配置相关试剂;(2) 已经标化至 10~20ng/ μ L 的样本, 1000g 离心 3 分钟备用;(3) 将各 PCR 组份溶解后置于冰上备用 (注意酶一定要保存在冰上, 防止在高温中长时间暴露而失活);(5) 将上述配好的试剂小心混匀后分在 12 孔的连排管中, 每孔加入混匀试剂 148 μ L;(6) 12 道移液器吸取混合试剂 4 μ L 加入到 615 孔板中, 其中 H11、H12、P11、P12 孔留作对照, 其孔中不加入引物, 只含其他组份;(7) 每板按照标记好的样本板加入相应的模板, 加入

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.