



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101251511 B

(45) 授权公告日 2012.06.06

(21) 申请号 200810085030.1

期), 449 — 455.

(22) 申请日 2008.03.14

审查员 海岩冰

(73) 专利权人 毅新兴业(北京)科技有限公司  
地址 100080 北京市海淀区苏州街18号长  
远天地大厦C座2单元901

(72) 发明人 赵洪斌 马庆伟 于中连 吕芳  
吕萍萍

(51) Int. Cl.

G01N 27/64(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

(56) 对比文件

WO 9905319 A9, 1999.06.17, 全文.

EP 1740719 A1, 2007.01.10, 全文.

CN 101072882 A, 2007.11.14, 全文.

CN 101068934 A, 2007.11.07, 全文.

杨何义等. 生物质谱作为 SNP 分型检测方法的研究. 《质谱学报》. 2003, 第 24 卷 (第 4

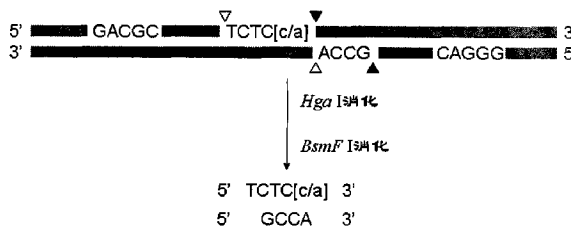
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种利用限制性内切酶双酶切检测 SNP 的方法

(57) 摘要

本发明提供一种联合特殊限制性内切酶和质谱法方法来检测单核苷酸多态性的新方法。本发明要点在于参与 PCR 反应的正反引物含两种特殊限制性内切酶位点的识别位点, 并且该识别位点与酶切位点位置是不同的。通过对 PCR 产物进行两次限制性内切酶消化, 产生含 SNP 位点的单链核苷酸片段, 并通过纯化、点靶等步骤, 制备可直接用于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测的样本。与现有方法相比, 本发明具有存在耗时短、成本低、分辨率高、操作简便的优点。



1. 一种联合限制性酶切法和质谱法以检测单核苷酸多态性的方法,包括以下步骤:

(1) 确定 SNP 位置:针对待检核酸序列可能存在的 SNP,确定 SNP 在待检序列中的位置;

(2) 设计正向引物:根据 SNP 的位置,设计正向引物,其中正向引物 3' 端位于 SNP 位点 5' 端上游 1-47bp 处,正向引物 5' 端含有一种特殊限制性内切酶的识别位点,而在待检核酸序列中,所述的特殊限制性内切酶的酶切位点位于识别位点 3' 端下游 1-25bp 处,并位于 SNP 的 5' 端上游 1-25bp 的范围内,其中,所述的位置范围取决于具体的限制性内切酶;

(3) 设计反向引物:根据 SNP 的位置,设计反向引物,其中反向引物位于另一条核酸互补链上的 SNP 位点 5' 端上游 1-47bp 处,反向引物 5' 端含有另一种特殊限制性内切酶的识别位点,而在待检核酸序列中,所述的特殊限制性内切酶的酶切位点位于识别位点 3' 端下游 1-25bp 处,并位于 SNP 的 5' 上游端 1-4bp 的范围内,其中,所述的位置范围取决于具体的限制性内切酶;

(4) PCR 扩增:通过 PCR 扩增,获得包含两个特殊限制性内切酶的识别位点、两个酶切位点、SNP 位点的双链扩增产物,其中 SNP 位点位于正向引物限制性内切酶酶切位点和反向引物限制性内切酶酶切位点之间;

(5) 限制性内切反应:使用所述的两种特殊限制性内切酶分别进行两次限制性内切反应,获得两条包含 SNP 位点的单链短片段;

(6) 质谱检测:将包含 SNP 的单链短片段进行质谱检测,通过与野生型单链短片段的分子量进行比较,确定 SNP 的基因型。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 (5) 中,可以同时进行两次限制性内切反应。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中如果所述的两种特殊限制性内切酶是同一种特殊限制性内切酶,则只需进行一次限制性内切反应。

4. 权利要求 2 或 3 所述的方法,其中所述的特殊限制性内切酶选自 Bsm I、Bsr I、Ear I、Sap I、BspQ I、Bsa I、BsmA I、BsmB I、BsrD I、BstF5 I、Bts I、BtsC I、Bbs I、Alw I、Bcc I、Ple I、Fau I、BfuA I、BspM I、Aat II、Bmr I、Mly I、SfaNI、Hga I、BciV I、HpyA V、MnI I、Hph I、Mbo II、Bbv I、BspCN I、Fok I、BseRI、BsmF I、BtgZ I、Eci I、BceA I、Bpm I、BpuE I、Bsg I、Acu I、Mme I、NmeAIII 或 EcoP15 I。

5. 权利要求 4 所述的方法,其中在进行质谱检测之前,还包括对酶切产物进行纯化处理,以减少对最终检测结果的干扰,提高分辨率。

6. 权利要求 5 所述的方法,其中纯化方法包括树脂纯化。

7. 权利要求 5 所述的方法,其中所述的质谱检测包括:将基质与纯化后的酶切产物点到质谱仪所用的检测靶上,供下一步的质谱检测,基质的具体配方和与用量视样品浓度、样品用量、环境条件、机器状态而定。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述的质谱检测是利用高分辨率的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测酶切片段的分子量。

## 一种利用限制性内切酶双酶切检测 SNP 的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及到基因组学和分子生物学中有机生物分子特别是核酸分子的质谱分析,具体是提供一种联合限制性酶切法和质谱法以检测单核苷酸多态性的方法,更具体地说,提供一种在基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 中对基因组单核苷酸多态性进行检测的方法。

### [0002] 技术背景

[0003] 人类的遗传信息储存在基因组中,2002 年国际合作项目人类基因组计划的最终完成,绘制出了人类基因组结构的精细图,为相关研究提供了参考序列。人类基因组序列共由 30 亿个位点组成,研究表明,任意两个人之间的基因组差异在 0.1% 左右,即大约 300 万个位点的差异。这些差异极有可能是造成两个人之间个体差异的遗传因素。发现这些位点,可广泛地应用于遗传标记的研究、评估个体遗传关系、评估物种进化等研究领域。

[0004] 在人类基因组中,约 90% 的差异是以单个核苷酸的形式体现出来的,这样的差异位点被称作单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。SNP 具有两个显著的特点:一是数目众多,据估计人类基因组中的 SNP 数目约在 1100 万左右,目前国际数据库 dbSNP 中已收录来源于人类基因组的 SNP 达 1083 万,其中经过确认的为 644 万 (截至 2007 年 8 月 22 日),如此大量的 SNP 方便了研究这选择合适的位点进行研究,也使得绝大多数基因组区域在 SNP 效力的覆盖范围内;另外一个特点是 SNP 位点大多数为双态,即在一个位点上仅有两种表现形式 (基因型),这样很容易就能设计出高通量自动化的检测方法。正因为这两个特点,使得 SNP 位点越来越受到研究者的青睐,被誉为是继限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 和短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 之后的第三代分子标记物。人类基因组计划完成前后,基因组学研究的重点逐渐转向 SNP 领域,因此,SNP 在遗传标记学、生物群体遗传学、生物分类学、遗传育种学、物种或人类进化学、法科学、药物基因组学等领域都有重要的应用。

[0005] 例如,SNP 的丰富性和双等位基因特性使作物或家畜遗传作图更加精细,使得育种工作者能够更精确的进行标记辅助选择 (MAS) 和标记辅助导入 (MAI),降低或消除了目的基因之外的遗传背景对这些技术带来的不良影响,同时也给品种资源和品种纯度鉴定带来崭新局面。姜运良等人通过对 3 种“双肌臀”猪品种的肌肉生长抑制基因 3 个不同位点进行分析,获得肉质提高的新品种。Monna 等人利用 SNP 标记技术成功地将水稻半矮秆基因 sd-1 图位克隆,Shen 等人构建了水稻全基因组 SNP 数据库,并成功地筛选多个水稻功能基因。

[0006] 例如,不同个体中存在的 SNP 差异,成为了法科学中身份鉴别的有力工具。Gabirel 等人对 105 个样本的线粒体 HVI/HVII 区域的 SNP 进行分析,并用途分析了实际案例中毛发和骨骼等检材,证明了该方法用于法医检案是可行的。李莉、李成涛等人对人 HLA-DR 基因的 SNP 进行检验,在应用于亲子关系鉴定的 25 个案例中,成功率达到 96%。

[0007] 为了抢占市场,各大生物学公司都推出了自己的 SNP 检测方法。其中质谱仪被认为是很有发展前途的仪器,尤其是基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS)。

基于 MALDI-TOF MS, 开发了一些 SNP 检测方法, 如美国 Sequenom 公司的 hME 和 iPLEX 方法, 德国 Bruker 公司的 GOOD assay 方法, 韩国 GeneMatrix 公司的 RFMP 方法。这些方法的原理是设计一条与待检测 SNP 位点上游的基因组序列匹配的寡核苷酸探针, 根据 SNP 位点的基因型差异, 探针将在待检测 SNP 位点处连接上不同的脱氧核苷酸。其中, 组成 DNA 片段的四种脱氧核苷酸的分子量分别是: dAMP 313.21Da, dCMP 289.19Da, dGMP 329.21Da, dTMP 304.20Da。不同脱氧核苷酸之间是存在分子量差异的, 其中差异最小的是 dAMP 与 dTMP 之间的 9.01Da, 差异最大的是 dCMP 与 dGMP 之间的 40.02Da, 通过质谱仪能检测到这种差异, 从而将分子量不同的探针区分开来。质谱仪的检测效果与探针的分子量相关, 探针片段越短, 分子量越小, 区分效果越明显: 例如, 在图 1 中, A 图标示的两个峰, 对应的两个寡核苷酸片段为 5'-ACGT-3' 和 5'-ACGA-3', 分子量分别为 1174.699 和 1183.770Da, 相差 9.071Da, B 图标示的两个峰, 对应的两个寡核苷酸片段为 5'-ACGTACGT-3' 和 5'-ACGTACGA-3', 分子量分别为 2410.628 和 2419.821Da, 相差 9.193Da, C 图标示的两个峰, 对应的两个寡核苷酸片段为 5'-ACGTACGTACGT-3' 和 5'-ACGTACGTACGA-3', 分子量分别为 3645.917 和 3654.736Da, 相差 8.819Da, 同样相差 9Da 左右, 但如图所示, A 图中两个峰之间的差异最明显, B 图次之, C 图中两个峰之间的差异相对不明显, 也就是说, 分子量越小, 质谱仪的区分效果越明显, 即分辨率越高。为了提高质谱仪的分辨率, 对 SNP 位点进行检测倾向于检测分子量较小的寡核苷酸片段, 如 RFMP 方法通过对含 SNP 位点的 PCR 产物进行限制性酶切, 产生 2000 ~ 4000Da 左右的寡核苷酸片段进行检测, 而 GOOD assay 方法通过磷酸二酯酶 (Phosphodiesterase, PDE) 将含 SNP 位点的寡核苷酸片段切割成 1000 ~ 2000Da 左右的小片段进行检测。

[0008] 然而, 国外公司利用质谱仪对 SNP 位点进行检测的方法, 在实际应用中存在不少缺陷:

[0009] (1) Sequenom 公司的 hME、iPLEX 两种方法采用的是两步 PCR, 即第一次 PCR 放大待检测 SNP 位点的拷贝数, 第二次 PCR 对待检测的 SNP 位点进行检测, 在两次 PCR 之间, 还要使用虾碱性磷酸酶 (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) 除去第一次 PCR 反应体系中剩余的 dNTP, 这样就造成总检测时间的延长, 以及单个检测成本的增加; 此外, 这两种方法没有对含 SNP 位点的寡核苷酸片段进行切割, 检测范围在 4000 ~ 9000Da 之间, 因而分辨率不高;

[0010] (2) GOOD assay 方法也采用了两步 PCR, 而且, 为了提高分辨率, 采用磷酸二酯酶切割含 SNP 位点的寡核苷酸片段, 提高了成本, 延长了时间, 不利于快速检测;

[0011] (3) RFMP 方法只有一步 PCR, 但是同 GOOD assay 方法 (1000 ~ 2000Da) 相比, 产生待检测片段过长 (2000 ~ 4000Da), 相应的, 分辨率不如 GOOD assay 方法。

[0012] 因此, 基于 MALDI-TOF MS, 目前需要开发一种分辨率高、准确、成本低、快速的方法来检测基因组中 SNP 位点。

## 发明内容

[0013] 本发明是在针对以往基于 MALDI-TOF MS 检测基因组 SNP 位点的方法存在的前期处理速度慢或检测分辨率不够高等问题提出的相应的解决方案。

[0014] 本发明原理在于: 利用酶切位点位于识别位点下游的一类特殊限制性内切酶的独

特性,通过将识别位点引入用于扩增 SNP 位点的正向和/或反向引物的 5'端,扩增得到包含两个特殊限制性内切酶的识别位点、两个酶切位点、SNP 位点的双链扩增产物,其中 SNP 位点位于正向引物限制性内切酶酶切位点和反向引物限制性内切酶酶切位点之间。然后对产物分别进行两次特殊限制性内切酶得到两条包含 SNP 位点的单链短片段,从而实现只经过一次 PCR 即获得适于用质谱仪 (MALDI-TOF MS) 检测 SNP 的探针短片段。

[0015] 因此,本发明方案包括确定 SNP 位置、设计正向引物、设计反向引物、PCR 扩增、两次限制性内切酶消化、质谱检测等步骤。

[0016] 在一个具体实施方案中,本发明的步骤如下:

[0017] (1) 确定 SNP 位置:针对待检核酸序列可能存在的 SNP,确定 SNP 在待检序列中的位置;

[0018] (2) 设计正向引物:根据 SNP 的位置,设计正向引物,其中正向引物 3'端位于 SNP 位点 5'端上游 1-47bp 处,正向引物 5'端含有一种特殊限制性内切酶的识别位点,而在待检核酸序列中,所述的特殊限制性内切酶的酶切位点位于识别位点 3'端下游 1-25bp 处(优选 1-10bp,更优选 1-8bp,最优选 1-4bp),并位于 SNP 的 5'端上游 1-25bp 的范围内(优选 1-10bp,更优选 1-8bp,最优选 1-4bp)。其中,所述的位置范围取决于具体的限制性内切酶。例如,BsmFI 在正向引物中,酶切位点位于识别位点 3'端下游 10bp;HgaI 在正向引物中,酶切位点位于识别位点 3'端下游 5bp;MlyI 在正向引物中,酶切位点位于识别位点 3'端下游 5bp;

[0019] (3) 设计反向引物:根据 SNP 的位置,设计反向引物,其中反向引物位于另一条核酸链上的 SNP 位点 5'端上游 1-47bp 处,反向引物 5'端含有另一种特殊限制性内切酶的识别位点,而在待检核酸序列中,所述的特殊限制性内切酶的酶切位点位于识别位点 3'端下游 1-25bp 处(优选 1-10bp,更优选 1-8bp,最优选 1-4bp),并位于 SNP 的 5'上游端 1-25bp 的范围内(优选 1-10bp,更优选 1-8bp,最优选 1-4bp)。其中,所述的位置范围取决于具体的限制性内切酶。例如,BsmFI 在反向引物中,酶切位点位于识别位点 3'端下游 10bp;HgaI 在反向引物中,酶切位点位于识别位点 3'端下游 10bp;MlyI 在反向引物中,酶切位点位于识别位点 3'端下游 5bp;

[0020] (4) PCR 扩增:通过 PCR 扩增,获得包含两个特殊限制性内切酶的识别位点、两个酶切位点、SNP 位点的双链扩增产物,其中 SNP 位点位于正向引物限制性内切酶酶切位点和反向引物限制性内切酶酶切位点之间;其中具体的 PCR 反应体系,即含 SNP 位点的 DNA 模板、本发明的特殊引物、dNTPs、耐热保真聚合酶、缓冲液、Mg<sup>2+</sup>、无菌的去离子水等各种试剂的体积,都与常规 PCR 反应一致,而反应温度条件和反应时间根据引物 T<sub>m</sub> 值和反应片段大小而定;

[0021] (5) 限制性内切反应:PCR 反应完成后使用所述的两种特殊限制性内切酶分别将反应产物直接进行两次彻底的限制性酶切反应,酶切反应条件根据具体使用的限制性内切酶而定。其中使用所述的特殊限制性内切酶进行限制性内切反应,获得两条包含 SNP 位点的单链短片段。

[0022] (6) 质谱检测:将包含 SNP 的单链短片段进行质谱检测,通过与野生型单链短片段的分子量进行比较,确定 SNP 的基因型。

[0023] 在另一个具体实施方案中,所述的特殊限制性内切酶包括但不限于 BsmI、BsrI、

EarI、SapI、BspQI、BsaI、BsmAI、BsmBI、BsrDI、BstF5I、BtsI、BtsCI、BbsI、AlwI、BccI、PleI、FauI、BfuAI、BspMI、AatII、BmrI、MlyI、SfaNI、HgaI、BciVI、HpyAV、MnlI、HphI、MboII、BbvI、BspCNI、FokI、BseRI、BsmFI、BtgZI、EciI、BceAI、BpmI、BpuEI、BsgI、AcuI、MmeI、NmeAIII、EcoP15I。这些限制性内切酶的识别位点与酶切位点不在同一个地方；以 HgaI 为例，该限制性内切酶的酶切位点在识别序列 3' 端之后的 5 个核苷酸处；酶切位点可以产生平末端，如 MlyI，也可以产生粘性末端重合，如 HgaI。识别序列在正向和反向引物中的具体位置，视实际操作中所使用的限制性内切酶而定，并使酶切后 SNP 位点位于酶切位点的下游。例如，BsmFI 在正向和反向引物中，识别位点都位于酶切位点 5' 端上游 10bp；HgaI 在正向引物中，识别位点都位于酶切位点 5' 端上游 5bp，但在反向引物中，则为 10bp；MlyI 在正向和反向引物中，识别位点位于酶切位点 5' 端上游 5bp。

[0024] 在另一个具体实施方案中，PCR 反应完成后反应产物直接进行彻底的限制性酶切反应，酶切反应条件根据具体使用的限制性内切酶而定。若正向和反向引物中分别引入了不同限制性内切酶的识别序列，酶切反应将分两次进行，第一次使用一种限制性内切酶识别其中一条引物中的识别序列，并对 PCR 产物进行酶切反应，第二次是用另一种限制性内切酶识别另一条引物中的识别序列，并对第一次酶切反应的产物进行二次酶切。若正向和反向引物中含有同一个限制性内切酶的识别序列，则只需进行一次酶切反应，限制性内切酶分别识别正向和反向引物中的识别序列，在两个识别序列对应的酶切位点同时对 PCR 产物进行切割。

[0025] 在另一个具体实施方案中，在进行质谱检测之前，还包括对酶切产物进行纯化处理，以减少对最终检测结果的干扰，提高分辨率。未经纯化的产物进行质谱检测，将出现含有钠离子 ( $\text{Na}^+$ )、钾离子 ( $\text{K}^+$ ) 等各种阳离子的质谱峰，这些阳离子质谱峰与不含阳离子的主质谱峰相差数十个 Da (钠离子 :23Da, 钾离子 :39Da)，很容易造成误判。而纯化后的产物，阳离子峰的比例将大大降低，甚至检测不到，从而提高检测的准确性。以树脂纯化法为例，在酶切产物中加入适量树脂，然后用微量移液器吹打均匀，来回颠倒 eppendorf 管使充分混匀，上下颠倒 15 分钟。1600rpm 离心 3 分钟，然后取上清液进行下一步操作。

[0026] 在另一个具体实施方案中，所述的质谱检测包括：将基质与纯化后的酶切产物点到质谱仪所用的检测靶上，供下一步的质谱检测，基质的具体配方和与用量视样品浓度、样品用量、环境条件、机器状态而定。例如，所述的质谱检测是利用高分辨率的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 检测酶切片段的分子量，由于单个 SNP 的分子量变化在 9 个或 9 个 Da 以上，而高分辨率的质谱仪能很好的区分单个碱基的差异，因此通过与野生型短片段分子量的比较，可确定所检测 SNP 在特定个体中的基因型。离心后的上清液可用于质谱仪检测。先在样品靶上点 0.5ul 基质，基质组成为柠檬酸铵 (Ammoniumcitrate) 1.6g/L, 3-羟基吡啶羧酸 (3-hydroxypicolinic acid, 3-HPA) 6g/L, 以 1 : 1 的乙腈-水混合溶解，待基质在自然状态下结晶后，在结晶后的基质上点 1ul 样品 (即离心上清液)，自然状态下结晶。然后进行 MALDI-TOF MS 分析，获得酶切产物的质谱图，经质谱检测测得酶切产物分子量根据实验推测的产物分子量相对确定相应的 SNP 类型，实现 SNP 检测。

[0027] 本发明与传统 PCR 检测或常规质谱分析检测 SNP 相比，具有下列意想不到的优点：

- [0028] (1) 常规 PCR 必须扩大含 SNPs 位点的片段,即必须进行两次 PCR,因此需要很大的模板量。而本发明仅进行一次 PCR,可针对微量的 SNP 结果进行检测,因此简化了检测过程;
- [0029] (2) 本发明所用引物和条件按常规方法进行,具有较高地通用性;
- [0030] (3) 本发明的 PCR 过程无需高保真酶,在消化(酶切)过程中也无需虾碱性磷酸酶,降低的酶成本;
- [0031] (4) 本发明减去了单碱基延伸这一步骤,限制性内切酶的用量也降低,从而降低检测成本约 30 ~ 50% 左右;
- [0032] (5) 酶切过程中可只进行一次内切反应,能在保持原有的检测准确度的基础上,有效的节约检测时间 1 小时左右;
- [0033] (6) 本发明产生的用于质谱仪检测的 DNA 片段,可以在 10 个 bp 以下(分子量低于 4000Da),分辨率较高;
- [0034] (7) 对于一个 SNP 位点,本发明可以产生两条 DNA 片段,它们的分子量不一样,可以相互印证检测的准确性;
- [0035] (8) 对于多个位置比较靠近的 SNP 位点,传统的方法检测起来比较困难,本发明产生的 DNA 片段上可以携带多个 SNP 位点,因此提高了检测效率;
- [0036] (9) 对于多个位置相对分散的 SNP 位点,传统的方法要进行二次多重 PCR,由于某些引物之间存在干扰,因此有些位点不能同时参与 PCR,而使用本发明只需进行一次多重 PCR,引物之间的干扰相对较少,可以更方便的选择 SNP 位点同时进行检测;

#### 附图说明

[0037] 图 1 分别是具有相同 SNP(T/A) 的不同长度的序列分子量与质谱仪分辨率关系的示意图。其中,图例 A 是 5bp 长度(5' -ACGT-3' 和 5' -ACGA-3') 的分子量质谱检测差异,图例 B 是 8bp 长度(5' -ACGTACGT-3' 和 5' -ACGTACGA-3') 的分子量质谱检测差异,图例 C 是 12bp 长度(5' -ACGTACGTACGT-3' 和 5' -ACGTACGTACGA-3') 的分子量质谱检测差异。

[0038] 图 2 是实施本发明的完整实验流程图。

[0039] 图 3 是限制性内切酶 HgaI 和限制性内切酶 BsmFI 的两次酶切原理图。其中,字母 GACGC 为限制性内切酶 HgaI 的识别序列,字母 GGGAC 为限制性内切酶 BsmFI 的识别序列,空心三角形为限制性内切酶 HgaI 的酶切位点,实心三角形为限制性内切酶 BsmFI 的酶切位点,方括号内小写字母为 SNP 位点及其基因型。经过两次酶内切后,获得两条包含 SNP 位点但不互补的单链短片段。

[0040] 图 4 是根据本发明的方法,使用限制性内切酶 HgaI 和 BsmFI 所得到的阴性对照 A、待测样品 B、待测样品 C 的质谱检测结果。

#### 具体实施方式

[0041] 现在仅用参考下面非限制性的实施例的方式进一步描述本发明。但是应当理解,下面的实施例仅仅是作为例证的,不应以任何方式当作对上述本发明总体的限制。除非有其它说明,本发明的实施例使用本领域中的传统分子生物学、细胞生物学、PCR 扩增和突变技术等等。这些技术是技术人员熟知的,并在文献中有详细解释。参见,例如,

[0042] Sambrook and Russell "Molecular Cloning :A Laboratory Manual" (2001);

[0043] Cloning :A Practical Approach, " Volumes I and II (D.N.Glover, ed., 1985) " ;

[0044] T.A Brown "Genome" BIOS Scientific Publishers Limited ;

[0045] PY Kwok Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. (2001), 235-58.

[0046] 实施例 1 :设计扩增乙肝病毒 P 基因 669 位 SNP 的引物

[0047] 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是严重的世界性卫生问题, 每年约有近百万人死于乙肝病毒感染引起的各类疾病。但是对于已经确诊的乙肝病人而言, 不同个体中的乙肝病毒基因组存在多种 SNP 突变, 导致相同疾病的病人对同一药物产生耐药性。如果对乙肝病人体内的 SNP 标记进行研究, 揭示了人群中不同个体对相同药物的敏感性差异的根本原因, 将有助于研究者筛选更合适的药物。

[0048] 其中, 乙肝病毒基因组编码的 P 基因 (NCBI Gene ID :944565) 上第 669 位核苷酸发生 C → A 突变, 使编码氨基酸由亮氨酸变为蛋氨酸 (L180M), 从而产生对抗病毒药物拉米夫定 (lamivudine, LAM) 的耐药性。

[0049] 对于该 SNP 位点的质谱检测, 我们设计如下实验 :

[0050] 首先根据乙肝病毒基因组的序列 (NCBI 登录号 :NC\_003977), 设计以下 PCR 引物 :

[0051] 正向引物为 GGGCCTCAGTgacgcCCGTTTC, 反向引物为 CAAATGGCACTgggacAGTAACTGAGC, 两条引物中的小写字母 gacgc 和 gggac 分别为限制性内切酶 HgaI 和 BsmFI 的识别序列, 该组引物的 PCR 产物的限制性内切原理如图 3 所示。

[0052] 实施例 2 :扩增包含乙肝病毒 P 基因的 669 位 SNP 片段

[0053] PCR 反应片段大小为 55 个核苷酸, 含 10 个核苷酸的限制性内切酶识别序列。PCR 反应体系为 :10ul 体系, 其中乙肝病毒基因组 DNA 1.5ul (初始浓度 10ng/ul)、正向引物和反向引物各 1ul (初始浓度 5pmol/ul)、dNTPs 0.8ul (初始浓度各 2.5mM)、缓冲液 1ul (初始浓度 1x, 含 Mg<sup>2+</sup>)、HS Taq 酶 0.05ul (初始浓度 5U/ul)、无菌的去离子水 4.65ul ;PCR 反应的循环参数为 :95℃ 5min, 然后 95℃ 20s、56℃ 20s、72℃ 20s 循环 30 次, 之后 72℃ 7min。PCR 反应后, 乙肝病毒基因组 DNA 中带有 SNP 位点的那段核苷酸序列的拷贝数得到放大。反应完成后的 PCR 产物可在 4℃ 冷藏保存数天, 也可在 -20℃ 冷冻保存数月, 也可立即直接用于后续的酶切反应。

[0054] 实施例 3 :对扩增产物进行特殊限制性内切酶消化

[0055] PCR 反应后经相应的限制性内切酶进行彻底的限制性内切反应, 其中如果选用其他限制性内切酶, 其反应体系和反应参数因选择的限制性内切酶不同而略有不同。

[0056] 第一次酶切为 20ul 体系, 其中 PCR 产物 10ul、酶缓冲液 2ul (初始浓度 10x)、HgaI 酶 1ul (初始浓度 2U/ul)、无菌的去离子水 7ul ;酶切反应参数为 :37℃ 40min, 65℃ 20min ;第二次酶切为 30ul 体系, 其中第一次酶切产物 20ul、酶缓冲液 3ul (初始浓度 10x)、BsmFI 酶 1.5ul (初始浓度 2U/ul)、无菌的去离子水 5.5ul ;酶切反应参数为 :65℃ 40min, 95℃ 20min, 冰水浴 20min。

[0057] 经过对应限制性内切酶的消化, PCR 产物将被切割成多个 DNA 片段, 其中有两条 10bp 以下的单链 DNA 片段, 这两条单链 DNA 片段全部或部分携带 SNP 位点 (方括号内的小写字母所示)。

[0058] 两条单链 DNA 片段分别是 5' -TCTC[c/a]-3' 和 5' -GCCA-3' ;它们长度不一致, 分



别为 5bp 和 4bp,也不互补配对,而且仅有一条携有 SNP 位点;

[0059] 反应完成后的酶切产物可在 4℃ 冷藏保存数天,也可在 -20℃ 冷冻保存数月,也可立即直接用于后续的纯化反应。

[0060] 实施例 4:纯化酶切产物

[0061] 在两步酶切后的产物中加入 3mg 树脂,用微量移液器吹打均匀,来回颠倒 eppendorf 管使充分混匀,上下颠倒 15 分钟。经过本步反应,树脂将充分与反应体系中的阳离子结合,而使反应体系脱盐。反应完成后的纯化产物可在 4℃ 冷藏保存数天,也可在 -20℃ 冷冻保存数月,也可 1600rpm 离心 3 分钟后取出上清液直接用于后续的质谱检测。

[0062] 实施例 5:基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 检测 SNP

[0063] 先在样品靶上点 1ul 基质,待基质在自然状态下结晶后,在结晶后的基质上点 1ul 离心上清液,自然状态下结晶。然后进行 MALDI-TOF MS 分析,获得酶切产物的质谱图。基质组成为:柠檬酸铵 (Ammonium citrate)1.6g/L,3-羟基吡啶羧酸 (3-hydroxypicolinic acid,3-HPA)6g/L,以 1:1 的乙腈-水混合溶解,避光室温保存;或者直接进行 MALDI-TOF MS 分析,获得酶切产物的质谱图 4。

[0064] 结果判定标准如下:

[0065] 如没发生耐药突变,酶切产物应为 5'-TCTCC-3' 和 5'-GCCA-3',分子量分别为 1413.92 和 1158.75,若发生耐药突变,酶切产物应为 5'-TCTCA-3' 和 5'-GCCA-3',分子量分别为 1437.94 和 1158.75;对照质谱图就可以得知是否发生耐药突变,即如果质谱图中出现的分子量为 1413.92 和 1158.75,表示没有发生突变,如果质谱图中出现的分子量为 1437.94 和 1158.75,则表示发生突变,而若 3 个分子量都在质谱图中表示,则表明没有发生耐药突变的野生株和发生耐药突变的乙肝病毒株在患者体内共同存在。

[0066] 检测结果如下:

[0067] 其中,样品 A 为阴性对照样本,样品 B 和样品 C 为待测样本。

[0068] (1) 对于阴性对照样本 A,由于其为没有发生耐药突变的病毒株,因此酶切产物应为 5'-TCTCC-3' 和 5'-GCCA-3',而实际质谱检测的分子量为 1413.815 和 1158.559,与预期的分子量 (1413.92 和 1158.75) 仅偏差 0.2Da 不到,这属于可以接受的误差范围。因此,证实样品 A 为阴性对照样本 (参见图 4A)。

[0069] (2) 对于样品 B,实际质谱检测分子量为 1437.825 和 1158.727,这与预期的阳性结果的分子量 (1437.94 和 1158.75) 仅偏差 0.2Da 不到 (属于可以接受的误差范围),因此证实样品 B 具有 SNP 突变,其酶切产物应为 5'-TCTCA-3' 和 5'-GCCA-3' (参见图 4B);

[0070] (3) 对于样品 C,实际质谱检测分子量为 1413.525、1437.641 和 1158.536Da,这与预期的阴性分子量 (1413.92 和 1158.75) 以及阳性分子量 (1437.94) 分别相差 0.2Da 不到 (属于可以接受的误差范围),因此证实样品 C 为发生耐药突变的病毒株与未发生耐药突变的病毒株 (参见图 4C)。

[0071] 因此,根据检测结果,揭示了样本 A、B 以及样本 C 个体对相同药物的敏感性差异的根本原因,这有助于研究者筛选更合适的药物。

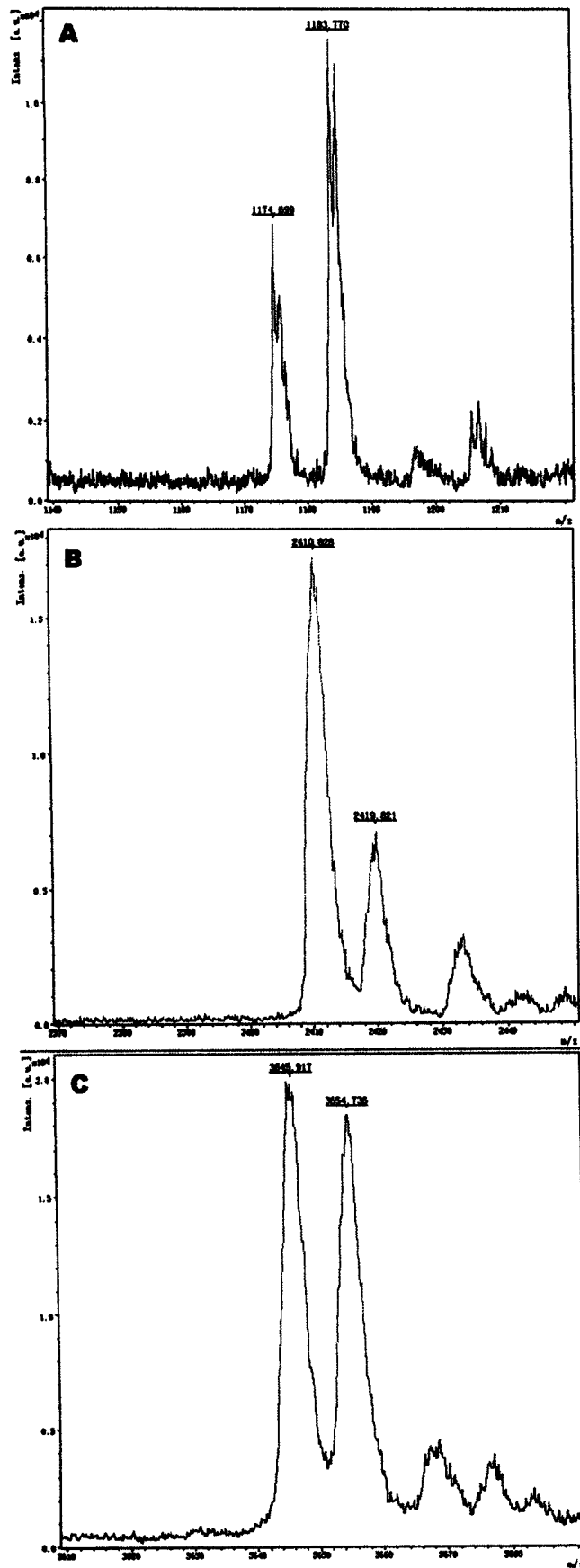


图 1

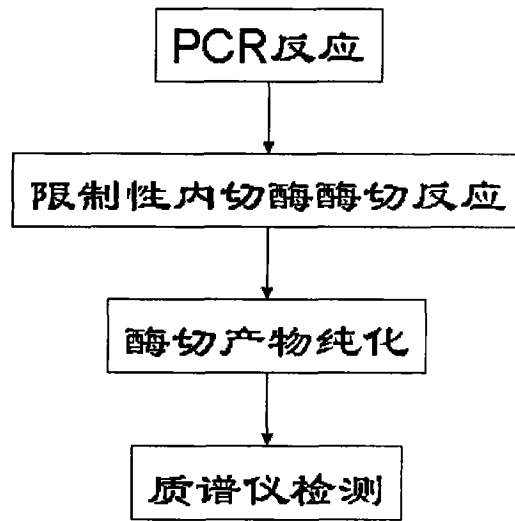


图 2

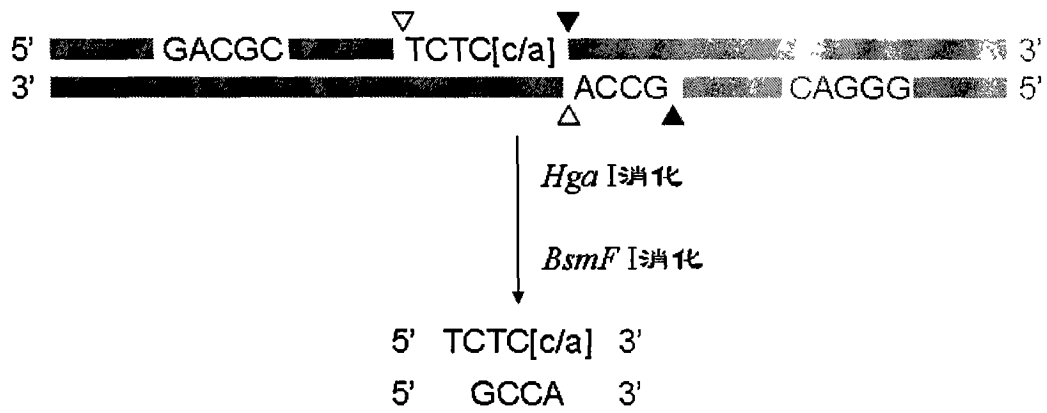


图 3

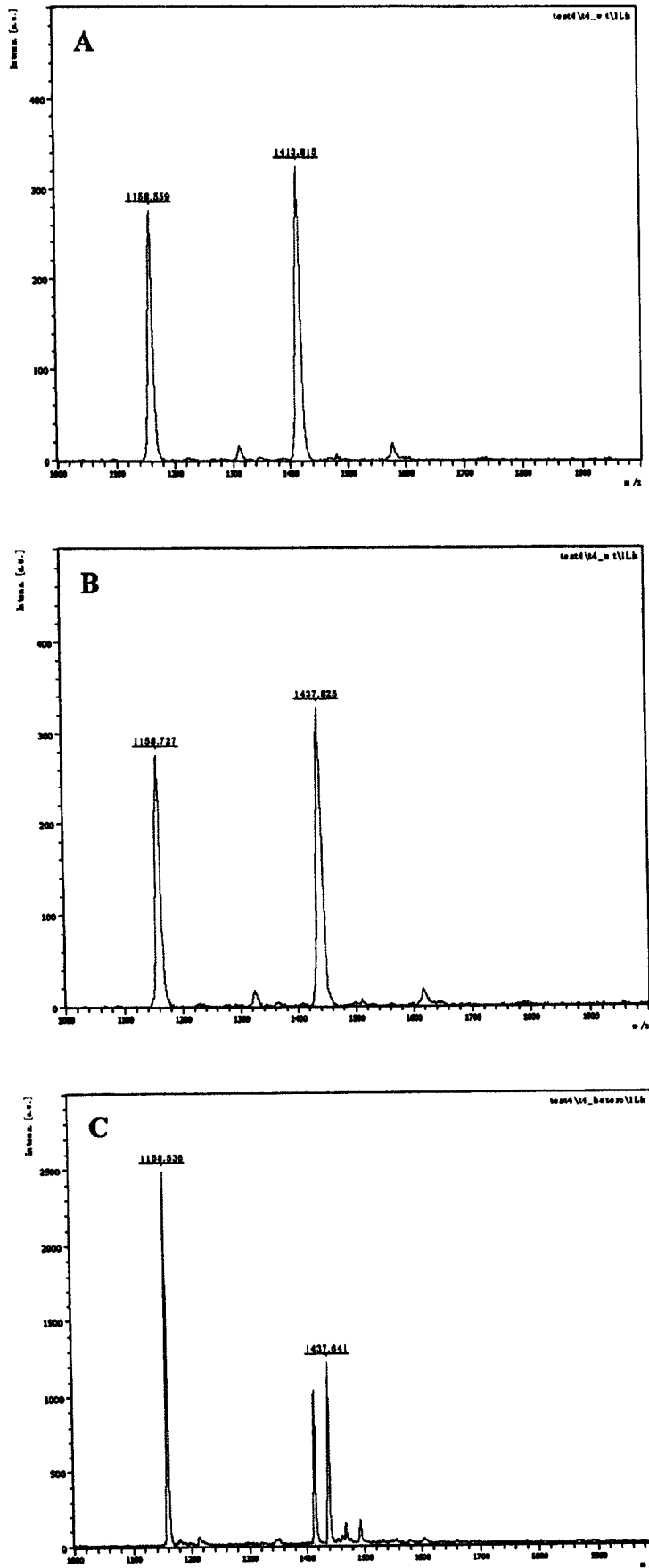


图 4