

检测线粒体 DNA SNPs 的快速测定法^{*} ——引物延伸—飞行时间质谱法

许传超¹, 蔡贵庆¹, 伍新尧¹, 邓慧敏²,
赵 方¹, 童大跃¹, 李建金¹

(1. 中山大学中山医学院法医学系, 广东 广州 510080;
2. 中山大学测试中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 用 PCR 扩增出人类 mtDNA HVI 区 443 bp 片段作为模板, 以 nt 16 093 位点特异的引物进行引物延伸反应。产物经纯化后利用 MALDI-TOF 质谱技术进行检测, 从而建立起引物延伸—飞行时间质谱法快速检测 SNPs 的技术, 并用该法对人类 mtDNA HVI 区 SNPs 位点 nt 16 093 的 T/C 多态性进行频率调查。结果为广州地区汉族人群的 mtDNA HVI 区多态位点 nt 16 093 T 型的频率为 89.6%, C 型的频率为 10.4%。并且发现 3 例异质性。

关键词: 飞行时间质谱; 引物延伸; SNPs; 异质性; 线粒体 DNA

中图分类号: Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-0090-03

单核苷酸多态性 (单核苷酸多态性, SNPs) 是目前各种遗传病及遗传相关疾病研究、遗传学、人类学、法医学等领域中广泛使用的重要遗传标记。人类线粒体 DNA HVI 区多态性的分析在研究人类进化、迁移及法医个人认定等方面有着重要意义。因此, 如何能够快速、准确、高通量地检测 SNPs 成为这项研究的关键。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 是近年来应用在生物大分子检测领域的一种新技术^[1], 已经成为蛋白质及多肽分子的重要检测工具。同时, 国外正兴起利用该技术的高精确度和灵敏度来进行基因组 SNPs 的分析检测^[2,3]。但国内尚未见有这方面的研究报道。本研究初步建立起“引物延伸 (PEX) —MALDI-TOF MS”检测方法, 并对广州地区人群中人类线粒体 DNA (mtDNA) HV I 区第 16 093 位碱基的多态性进行了频率调查, 初步证明这项技术检测 SNPs 的可靠性和高效性, 为今后建立系统的 mtDNA 多态性质谱分析系统奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 样本 广州地区无关个体血液样本 100 份, 取自本实验室日常检案的检材。

1.1.2 仪器和试剂 OmniFLEX™ MALDI-TOF 质谱仪 (Bruker Daltonics, 德国); 基体 3 羟基吡啶酸 (3 HPA) 和扩增产物 *genopure ds*、*oligo* 磁珠纯化试剂盒由 Bruker Daltonics 提供; mtDNA HV I 区 443 bp 片段扩增引物序列为^[4]:

上游 (引物 1) mtDNA

L 5' CACCATTAGCACCCAAAGCT 3';

下游 (引物 2) mtDNA

H 5' TGATTTCACGGAGGATGGTG 3',

上海博亚公司合成;

mtDNA 16 093 位点特异的 PEX 引物 (引物 3) 序列为:

H 5' CTGGCAGTAATGTACGA 3'

由上海生工公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 总 DNA 提取 用 0.2 mol/L NaOH 碱裂解法提取。取 30 μL 全血于 0.5 mL 小管中, 加 500 μL 水混匀, 室温 1~2 min。8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清。加入 20 μL 0.2 mol/L NaOH 溶液, 混匀后 30 °C 孵育 5 min。加入 180 μL 0.04 mmol/L Tris HCl (pH 3.0) 溶液, 混匀, 8 000 r/min 离心 7 min, 上清液即含总 DNA, 作为 PCR 反应的模板。

1.2.2 mtDNA HV I 区 443 bp 片段扩增 参考文献^[4]。

1.2.3 PCR 产物纯化 用 *genopure ds* 磁珠纯化系

* 收稿日期: 2002-12-19

基金项目: 中山医科大学“211 工程”基金资助项目 (1999)

作者简介: 许传超 (1972 年生) 男, 博士研究生; 通讯联系人: 伍新尧; E-mail: xyaow@gzsums.edu.cn

统纯化。去除残留的引物及 dNTPs 等。最后将纯化产物溶解于 20 μL 溶解缓冲液中。此溶液作为下步 PEX 反应的模板。

1.2.4 mtDNA nt 16 093 位点特异 PEX 反应 在 10 μL 反应体系中含：上一步的模板 0.5 μL（约 DNA 50 ng），Thermosequenase™（TS，Amersham）1 u（30 min，74 ℃将 10 nmol 底物转成不溶解酸的酶活性定为 1 u），TS 缓冲液 1 μL，引物 3 2.5 μmol/L，ddATP（Amersham）200 μmol/L，dGTP200 μmol/L。循环参数为：95 ℃ 2 min，94 ℃ 20 s，50 ℃ 30 s，72 ℃ 15 s，共 45 个循环。72 ℃ 1 min。

1.2.5 PEX 产物纯化 用 genopure oligo 磁珠纯化系统纯化。最后将纯化产物溶解于 4.5 μL 溶解缓冲液中待测。

1.3 样本分析

在 scout 100 样品靶（10×10）上，每个样品点上点基质溶液（饱和 3 HPA、10 mmol/L 柠檬酸氢二氨、φ=30%乙腈（ACN））0.5 μL。室温晾干。再将待测样品溶液 1 μL 点于每个样品点干燥的基体表面，室温晾干。将靶装入 MALDI TOF 质谱仪中，采用阳离子模式、PIE 线形工作模式进行信号采集；采用相对分子质量为 6 920 的 23 mer 寡核苷酸片段为标准品进行外部校正。

1.4 数据处理

收集的原始数据用 XMASS 5.0 软件进行分析处理。

2 结 果

对广州地区 100 例无关个体的血液样本进行 mtDNA nt 16093 的检测结果：该位点为 T 者 95 例，占 89.6%（图 1C）；为 C 者 11 例，占 10.4%（图 1B）。对于异质性样本（图 1A），统计两种基因型时均计数在内。

3 讨 论

MALDI TOF 质谱技术是 Karas 等^[1]首先报道使用的。该技术在检测生物大分子时具有非常高的检测灵敏度和精确度，可区分开两条长度相同，只有一个碱基不同的寡核苷酸片段。但是，MALDI-TOFMS 技术在检测较长的 DNA 链时有一些限制^[3]。因此，利用 MALDI TOF 质谱技术进行 DNA 分析时需要通过实验设计来对小的 DNA 片段进行检测。

引物延伸法（primer extension，PEX），也叫微测序法，是为检测 SNPs 而设计的分析技术。如 Bray，Sun 等^[2,3,6]研究。其基本原理如图 2 所示，

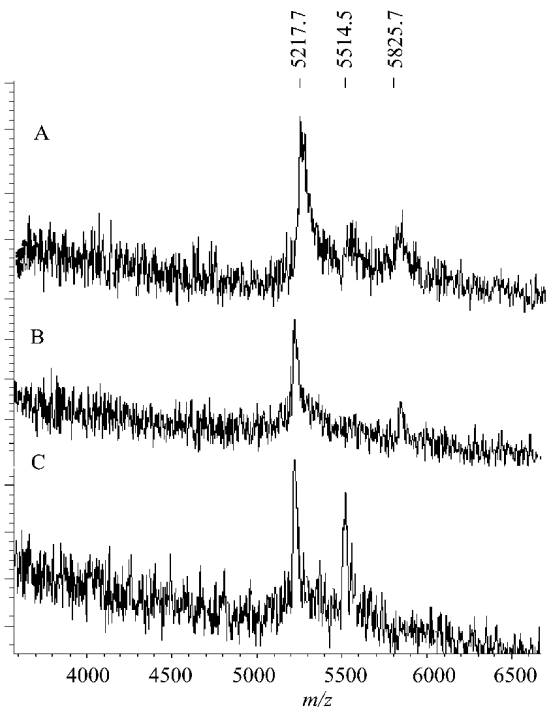


图 1 线粒体 DNA SNP 位点 16 093 nt 的 MALDI-TOF-MS/PEX 质谱图

Fig 1 MALDI-TOF spectra of type T, C and T/C heteroplasmy of human mtDNA 16 093 nt

A: T/C 异质性; B: 基因型为 C; C: 基因型为 T

针对待测 SNPs 位点设计其特异引物，当待测位点为不同的碱基时，引物将分别延长 1 或 2 个碱基。通过 MALDI TOF MS，这样的不同相对分子质量的分子很容易就形成 2 个峰而区分开来，如图 1 所示。

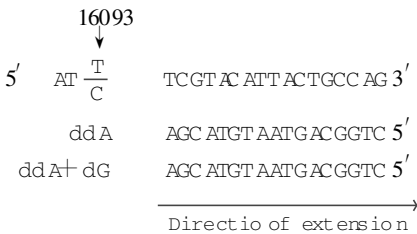


图 2 引物延伸反应原理

Fig 2 Principle of PEX

近年来，在许多方面的研究中，SNPs 受到广泛的关注。在人类学、法医学等领域的研究中，经常会遇到骨骼、毛发等无法用 STR 分型来分析的特殊检材，确定其 mtDNA 单倍型（即 mtDNA SNPs）就成了惟一的 DNA 分析途径。目前的分析手段主要是测序。但是测序有着耗时、成本高、检测过程复杂而且灵敏度不高等不足，因此有待开发新的快速、准确、灵敏的检测手段。本研究利用 MALDI-TOF MS 检测技术在 1 d 内快速检测 100 例样本

mtDNA 中的一个 SNPs 位点 nt 16 093 (呈 T/C 二态) 的两种基因型频率, 并发现了 3 例异质性样本。异质性是指同一个体中同时存在着两种及以上的 mtDNA 拷贝。这对 mtDNA 单倍型的确定造成了困难, 特别是在用测序分析时, 含量低的单倍型信号往往被含量占优势单倍型的信号所掩盖而造成异质性的漏检。本实验中, 3 例异质性样本同时出现 2 个峰 (图 1A), 很容易辨别。可见本实验所采用的 MALDI-TOF 质谱技术对异质性有较高的检测灵敏度和准确性。今后需进一步系统地比较质谱技术与测序及其它技术如 DHPLC 等在异质性检测方面的优劣。

总之, 从本实验的结果看, MALDI-TOF 质谱技术在检测 SNPs 时有着灵敏度高、准确性高、检测速度快等优点。本实验中, 检测一个样品点只需几分钟。如果配合机械手自动点样, 软件自动收集检测信号和自动数据分析, 此技术进行 SNPs 筛查每天可检测数千个样本^[2,3,6]。随着对这项技术的完善^[7], 利用它进行 SNPs 及点突变等涉及单个碱基差异的分析将有着广阔的应用前景。

参考文献:

[1] KARAS M, HILLENKAMP F. Laser desorption ionization of

proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons[J] . Anal Chem, 1988, 60: 2299—2303.
[2] BRAY M S, BOERWIMKLE E, DORIS P A. Highthrough-put multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise[J] . Hum Mutat, 2001, 17(4): 296—304.
[3] SUN X Y, DING H, HUNG K, et al. A new MALDI-TOF based mini-sequencing assay for genotyping of SNPs[J] . Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E68.
[4] 庾蕾, 曹露媚, 刘秋玲, 等. 广州地区汉族人群线粒体 DNA HV1 区多态性研究[J] . 中国法医学杂志, 2002, 17(2): 100—102.
[5] GRIFFIN T J, SMITH L M. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry[J] . Trends Biotechnol, 2000, 18(2): 77—84.
[6] FEI Z, SMITH L M. Analysis of single nucleotide polymorphisms by primer extension and matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry[J] . Rapid Commun Mass Spectrum, 2000; 14(11): 950—959.
[7] SHAHGHOLI M, GARCIA B A, CHIU N H, et al. Sugar additives for MALDI matrices improve signal allowing the smallest nucleotide change (A:T) in a DNA sequence to be resolved[J] . Nucleic Acids Res, 2001, 29(19): E91.

Fast Detection of SNPs of Human mtDNA
Using Primer Extension (PEX) -MALDI-TOF MS

XU Chuan chao¹, CAI Gui qing¹, WU Xin yao¹, DENG Hui min²,
ZHAO Fang¹, TONG Da yue¹, LI Jian jin¹

(1. Department of Forensic Science, Zhongshan Medical College, Sun Yat sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Instrumental Analysis & Research Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275; China)

Abstract: To set up the “primer extension MALDI-TOF MS” method for fast detection of SNPs and investigate the frequency of the SNPs site nt 16 093 of human mtDNA (L strand) , a 443 bp fragment of human mtDNA HV I region was amplified and purified as the template of the following primer extension reaction (PEX) . For PEX, a primer was synthesized that its 3' end annealing just upstream of the nt 16 093 SNPs site. The primer will extend one or two nucleotide (s) depending on the genotype of the nt 16 093 site during the PEX. The products were analyzed by MALDI-TOF MS. Among the Han population in Guangdong, the nt 16 093 sites of human mtDNA HV I region have two genotype: T/C. The frequency of type T was 89. 6% and that of type C was 10. 4%. Furthermore, three individuals were detected with heteroplasmy. Therefore, PEX MALDI-TOF MS is worthy of application in fast detection of genomic SNPs.

Key words: matrix assist laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); SNPs; mtDNA; PEX; heteroplasmy