

图 3 使用凝胶电泳、溴化乙锭/UV 盒检测寡核苷酸产物的若干常用 PCR 法

A) 限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-RFLP) ; B) 异源双链 PCR 法; C) 扩增阻滞突变系统 (ARMS-PCR) 。

图片基于参考文献4)、5)、6)

## ■ 分析条件和样品

模拟 PCR 后生成寡核苷酸的情景。本案例基于囊性纤维化的等位基因实施。与囊性纤维化发生基因突变的 CFTR 基因序列相对应的以下合成寡核苷酸样品购自默克生命科学：ATCTTTGGTGT（野生型 / 正常 CFTR 基因）；ATTGGTGT（Phe508del CFTR 突变基因）。柠檬酸铵二碱、Dowex 离子交换树脂及 3- 羟基吡啶甲酸（3-HPA）也购自默克生命科学。使用 UHQ- 水制备 100 μM 寡核苷酸样品。使用 70:30 的乙腈 / 水制备 5 mg/mL 的柠檬酸铵盐，用其制备 3-HPA 基质（45 mg/mL）。

在正离子模式下测定时，使用 Dowex 阳离子交换树脂对样品进行脱盐。在负离子模式下测定时，未实施脱盐。样品与基质按照 1:2 混合，然后点在靶板上。

使用脱盐及未脱盐样品，分别在正负离子模式下，利用 MALDI-8030 实施 MALDI 分析。

## ■ 结果 - 囊性纤维化的基因型判断（合成寡核苷酸）

图 4 为囊性纤维化不同基因型的寡核苷酸负离子模式检测质谱图：A) 受试者从父母双方都继承了正常 CFTR 基因（野生型）；B) 受试者从父母双方都继承了突变型 Phe508del CFTR 基因（纯合子）；C) 受试者遗传了 1 个正常 CFTR 基因和 1 个 Phe508del CFTR 突变基因（杂合子）。

如下所示，计算  $[M-H]^-$  平均的精确  $m/z$  值：

- 正常 CFTR 基因  
ATCTTTGGTGT： $m/z$  3656.43
- Phe508del CFTR 突变基因  
ATTGGTGT： $m/z$  2758.85

所有寡核苷酸均以良好的质量精度进行了检测。

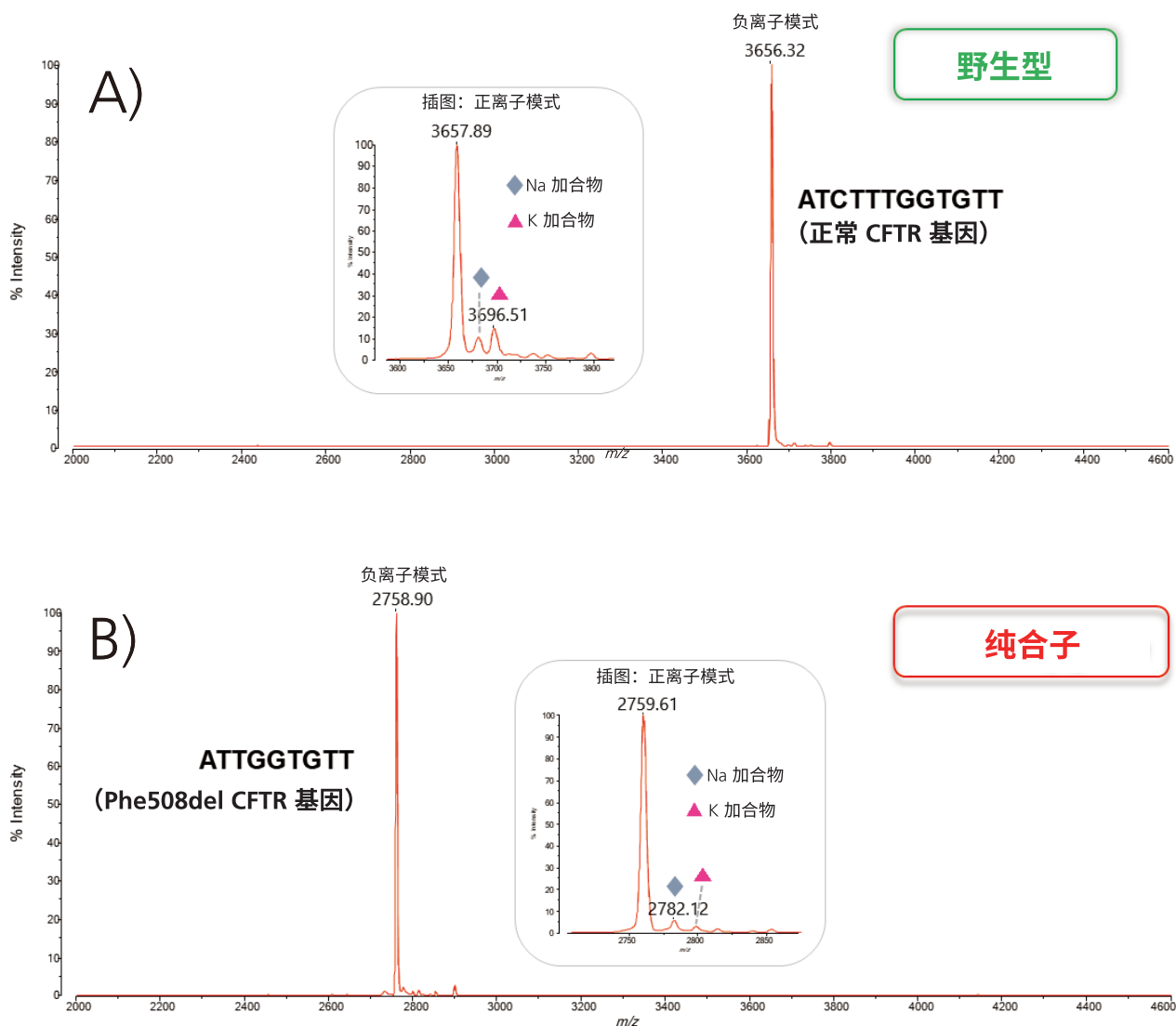


图 4（接下页）代表囊性纤维化 3 种不同基因型的寡核苷酸负离子模式质谱图  
 A) 仅正常 CFTR 基因（野生型）；B) 仅 Phe508 del CFTR 突变基因（纯合子）

\*插图所示为正离子模式分析下所得的寡核苷酸质谱峰。

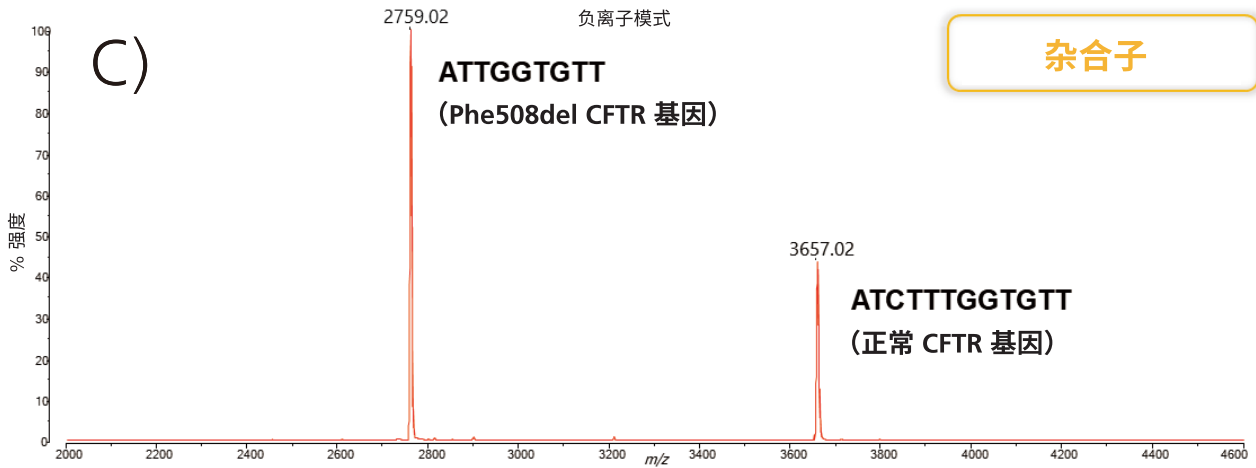


图 4 (接上页) 代表囊性纤维化3种不同基因型的寡核苷酸负离子模式质谱图  
C) 1 个正常 CFTR 基因和 1 个Phe508del CFTR 突变基因组成的杂合子 (疾病携带者)

图 4A 及图 4B 的插图显示了正离子模式分析下得到的寡核苷酸谱峰。可以观察到，即使进行了脱盐（阳离子交换），在正离子模式下仍会检测出少量的钠及钾加合物。相反，在负离子模式下得到的质谱图则更干净，不含盐加合物，因此无需脱盐。

此外，从图 4A~C 的显著质谱信号可以看出，使用 MALDI-TOF MS 可以良好地进行寡核苷酸检测。本试验所用装置的性能可实现正常 CFTR 寡核苷酸与杂合子中 Phe508del CFTR 突变寡核苷酸的分离（图 4C），因此可根据野生型、纯合子及杂合子的 3 种产物结果轻松判断所有基因型。

## 结论

本应用表明双极性 MALDI-8030 具有轻松检测合成寡核苷酸并进行质量分辨的能力。

我们证明了负离子模式检测的优点，在寡核苷酸分析中无需样品脱盐的纯化步骤，同时仍然具有良好的信号灵敏度。

与凝胶电泳相比，整个分析工作流程简单且快速。因此，这项技术可以用于 PCR 扩增后的实验室教学中训练学生，也可以在更常规的实验室中进行基因分型。

## 参考文献

- 1) Hakkak, Atieh Mehdizadeh, et al. "Analysis of CFTR gene mutations in children with cystic fibrosis, first report from North-East of Iran." *Iranian journal of basic medical sciences* 16.8 (2013): 917.
- 2) Ferrie, Richard M., et al. "Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene." *American journal of human genetics* 51.2 (1992): 251.
- 3) Frenescu, Lucian, et al. "The study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in a group of patients from Romania." *Journal of Cystic Fibrosis* 7.5 (2008): 423-428.
- 4) "Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)". *Ncbi.nlm.nih.gov*, 2021, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>. Accessed 7 Jan 2021.
- 5) Srinivasan, Srilakshmi, and Jyotsna Batra. "Single Nucleotide Polymorphism Typing." (2019): 432-440.
- 6) Peng, Bao-yu, et al. "A novel and quick PCR-based method to genotype mice with a leptin receptor mutation (db/db mice)." *Acta Pharmacologica Sinica* 39.1 (2018): 117- 123.

岛津应用云



Nexera、Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2022年2月