

在 LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 平台上

使用高分辨率熔解曲线分析法对胞苷脱氨酶基因进行基因扫描

Alexandre Evrard, Caroline Raynal, Jean-Christophe Boyer, Lionel Le Gallic, and Serge Lumbroso

Institut de Genomique Fonctionnelle, Departement d' Oncologie Moleculaire et Cellulaire, Montpellier, France,

Laboratoire de Biochimie, Hopital Caremeau, CHU Nimes, France

联系作者:alexandre.evrard@univ-montpl.fr

简介

该研究旨在筛查肿瘤样本中胞苷脱氨酶 (CDA) 基因的序列突变。CDA 在肿瘤、肝脏的分解代谢以及吉西他滨 (gemcitabine) 失活化过程中起着重要作用, 吉西他滨是一种用于化疗方法治疗固化肿瘤的的核苷类似物。近期的研究发现 CDA 基因具有高度多态性, 具体表现为非洲和高加索美国人个体间存在各种各样的单碱基多态性 (SNPs) 以及插入和缺失序列的现象。遗传突变也许能解释肿瘤的吉西他滨处理产生的治疗和毒性效应的个体间差异。我们采用基于高分辨率融解曲线 (High Resolution Melting curves, HRM) 的 PCR 后处理—基因扫描方法, 对 CDA 的序列突变进行研究。该方法通过独特的熔解曲线形状类型揭示序列的突变, 突破了常规测序方法受到样本中含有其它不规则序列信息影响的限制。LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统是整合了 PCR 和高分辨率熔解能力的多孔板系统, 包括一套优化的预混试剂和分析软件。我们测试了 LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统, 并将之与 LightScanner 仪器 (Idaho Techn.) 进行了比较。

材料和方法

含有一种饱和性 HRM 染料的 LightCycler® 480 高分

辨率熔解试剂 (LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Mix) 按照包装盒中说明书的步骤使用。取 9 μ l PCR 混合液加入至 96 孔板的各孔位中, 再取 20 ng/ μ l 的各 DNA 样本 (46 种个体样本) 1 μ l 加入至各相应孔位中, MgCl₂ 终浓度为 3 mM, 各引物的终浓度为 0.5 μ M。PCR 程序采用 touchdown 形式, 即退火温度从 70°C 降至 60°C。高分辨率熔解曲线数据通过每摄氏度 25 次信号采集的速率获得 (Figure 1)。荧光数据通过 normalization、temperature-shifting 以及 difference plotting 三个步骤生成, 然后通过 LightCycler® 480 Gene Scanning 软件的自动分组功能进行分析。接着对发现存在序列突变的各扩增子进行 DNA 测序。

结果

对 CDA 基因片段分析的大体情况如 Figure 2。高分辨率熔解分析显示 46 个样本中 22 个是杂合子, 存在序列的变化, 该序列变化位于外显子 1 中的 173 bp 基因片段内 (Figure 3)。测序结果显示一个对应于导致 Lys27Gln 突变的已知 SNP 位点。所有其它样本均为野生型的序列, 通过高分辨率熔解曲线分析方法所得的数据与测序结果 100% 相符。当研究一个更长的扩增片段

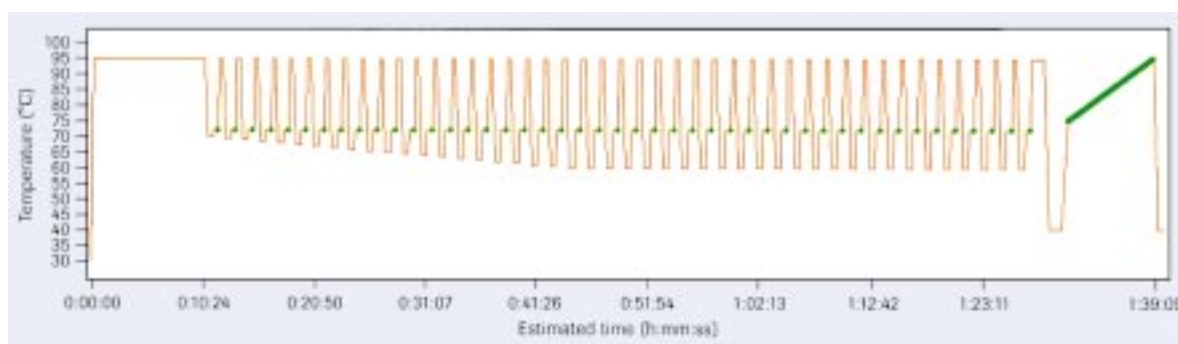


Figure 1: Overview of the PCR and high-resolution melting analysis temperature profiles used. This standard touchdown PCR Protocol was suitable for all amplifications performed in the study.

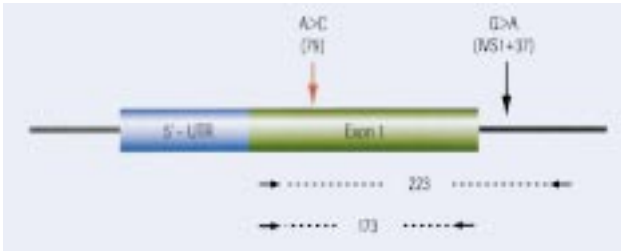


Figure 2: Location of PCR primers and variable positions in the investigated CDA gene.

Figure 3: High-resolution melting analysis of a 173 bp fragment derived from the human CDA gene.

Wild-type samples are shown in blue, heterozygote mutants (SNP A to C at position+79) in red.

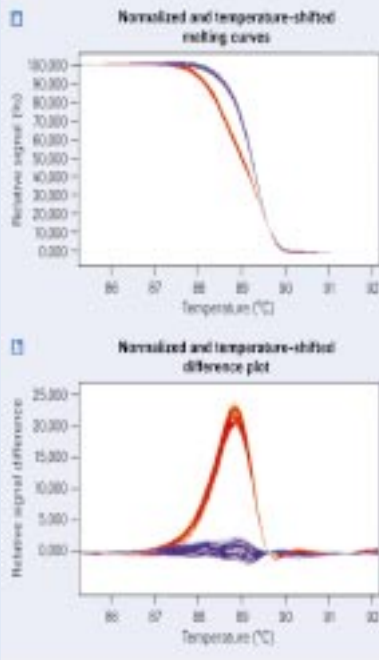
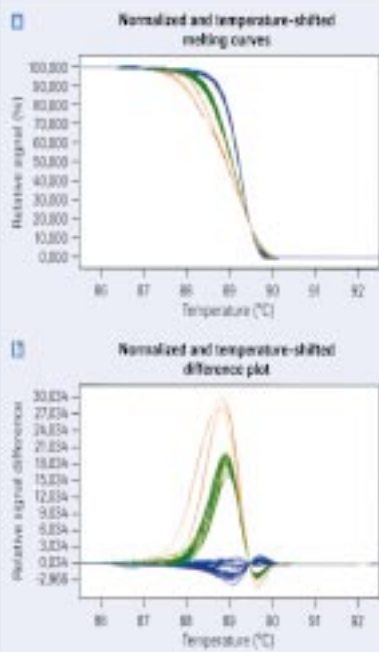


Figure 4: High-resolution melting analysis of a 223 bp fragment reveals additional variation. The presence of an additional intronic variation in two samples led to an additional intronic variation in two samples (shown in red, two replicates per sample) identified by the LightCycler® 480 Gene Scanning Module.

The presence of an additional intronic variation in two samples led to an additional intronic variation in two samples (shown in red, two replicates per sample) identified by the LightCycler® 480 Gene Scanning Module.



时,有两个样本的高分辨率熔解曲线分析结果中显示存在另一种突变 (Figure 4 中绿色曲线)。测序结果确认了这两个样本是双 SNP 杂合子 (A79C 和 IVS1+37G>A)。根据 A79C 突变的样本所得到的分析图谱差异很容易区分该类突变。

结论

LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统 HRM 基因扫描功能的灵敏度和特异性与之前更普遍使用的扫描方法 (如 dHPLC) 进行了比较,其优势在于结果获得更快,操作更方便。同样也与 LightScanner 平台比较了其性能,LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统将 PCR 与 HRM 平台完美整合,可实现对扩增效率和到达平台期进行在线控制。相对于 LightScanner,LightCycler® 480 无需在反应板上加石蜡油。就我们而言,LightCycler® 480 的基因扫描软件使用非常方便,100% 检测到杂合子。当在软件中选择默认设置,通过优化的灵敏度和特异性设置选项,该方法可以识别出 PCR 产物 (我们的实验中最长达 622 bp) 中杂合子的单碱基突变。野生型和突变型纯合子的区分高度依赖于不同的靶特异性因素,包括扩增子的长度和 GC 含量。研究人员向所有样本中人为加入少量野生型 DNA,然后与未加野生型 DNA 的同组样本进行比较,以获得更准确的结果。我们发现当 DNA 的起始量尽可能标准化,基因扫描功能所得到的实验结果是最好的;但由于血样的来源多种多样,以致于 DNA 的质量不同,DNA 起始量的标准化很难做到。Roche 所提供的熔解程序适用于绝大多数实验,LightCycler® 480 高分辨率熔解试剂由于其所有成份 (包括 HRM 染料) 都在一个包装管中,所以使用非常方便。独立包装的 MgCl₂ 使我们可以在 PCR 程序优化完以后,从一既定的 MgCl₂ 浓度进行程序优化。

总体而言,实验的结果显示,LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统提供了一个整合了基于高分辨率熔解曲线分析方法扫描基因片段中突变序列的全新的解决方案。

参考文献:

1. BIOCHMICA 2007 1:17-19
2. Mercie C et al.(2007) Pharmacogenet Genomics, in press

产品名称	包装规格	序列号
LightCycler® 480 Gene Scanning Software	1 software package	04 980 336 001
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	500 reactions	04 909 631 001