

ARMS 实时 PCR 基因分型特异性的研究

郑薇薇¹, 梁基选², 李庆阁^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院 生物医学系, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

2. 厦门大学医学院 抗癌研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 以原癌基因 *K-ras* 基因 12 位密码子的 4 种基因型(野生型为 GGT, 突变型为 AGT、TGT、CGT) 质粒 DNA 为研究模型, 采用 SYBR Green 为实时 PCR 指示剂, 进行 ARMS 实时 PCR 基因分型特异性的研究. 结果表明: 在和模板匹配的 ARMS 引物 3 端附近引入故意错配碱基, 将 ARMS 引物浓度稀释 10 倍, 并对传统三步 PCR 循环进行改良, 即根据目的产物和引物二聚体的熔点差异, 在传统延伸步骤之后增加一步恒温 80 °C 检测荧光步骤, 可消除引物二聚体的影响, 使 ARMS 引物的特异性增强, 得到清晰的基因分型结果. 实验表明这种基于 SYBR Green 的 ARMS 实时 PCR 基因分型方法, 无需合成探针, 实验设计简单, 是一种快速、简便、经济、特异性好的基因分型方法, 可推广用于其他基因的分型, 并可望成为应用于临床的基因诊断技术之一.

关键词: 实时 PCR; ARMS; 基因分型

中图分类号: Q 52

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005) Sup-0135-05

人类基因组计划的完成, 加速了疾病相关基因的结构和功能研究, 其中对 SNP(Single Nucleotide Polymorphism, 单核苷酸多态性)^[1]、致病基因^[2,3]、病原体亚型以及耐药基因等^[4]的基因分型研究具有重要意义. 目前主要的基因分型方法有 PCR-RFLP(Restricted Fragment Length Polymorphism, 限制性片断长度多态性), PCR-SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism, 单链构象多态性), HA(Heteroduplex Analysis, 异源双链分析), 以及 DNA 测序等; 但以上这些方法普遍存在操作繁琐, 检测时间过长等缺点. 近年来, 出现了许多高通量的分型技术, 如变性高效液相色谱(DHPLC)^[5], 生物质谱^[6], 基因芯片等; 然而这些方法都涉及后 PCR 操作, 而且仪器昂贵, 限制了其临床应用. 本研究以 *K-ras* 基因 12 位密码子的 4 种基因型(野生型为 GGT, 突变型为 AGT、TGT、CGT) 为研究模型, 采用 SYBR Green 为实时 PCR 指示剂, 主要从 ARMS 引物的设计, 引物浓度的选择, PCR 反应体系及条件的优化(对传统 PCR 三步法进行改良) 等方面进行 ARMS 实时 PCR 基因分型的特异性研究, 希望在此基础上发展一种快速、简便、经济、准确的适合临床应用的基因分型方法.

1 材料与方法

1.1 材料

DNA 模板: *K-ras* 基因野生型质粒 DNA 模板(12 位密码子为 GGT, 简称 GGT 模板, 以下同) 直接以正常人基因组 DNA 为模板构建, 12 位密码子突变型质粒(分别为 AGT、TGT、CGT) 采用引物重叠延伸法构建. 所有构建的质粒 DNA 模板序列均经测序确认.

主要仪器和试剂: Rotor Gene 3000 实时荧光 PCR 仪(Corbett Research, Australia). Taq 酶、dNTP 等购自大连宝生物工程有限公司, SYBR Green 购自厦门百维信生物有限公司.

引物: 根据已公布的 *K-ras* 基因的 1 号外显子的序列设计特异的 ARMS 上游引物和一条公共的下游引物(序列如表 1 所示), 所有引物由上海生工生物工程有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增产物和引物二聚体熔解曲线分析

PCR 体系总体积 200 μ L, 含 20 μ L 10 \times buffer, 50 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 10U Taq 酶, 2.0 μ L SYBR Green (1:10 000 稀释), 0.4 μ mol/L 下游引物(表 1 中 P6). 将上述组分混匀后, 分装两大管, 每管体积 100 μ L, 分别加入表 1 中的 P1、P2 引物各 0.4 μ mol/L. 然后每大管再分装 5 小管, 每小管最终体积 25 μ L, 使每条引物分别对 4 种质粒 DNA 模板(约 0.5 ng) 和水(作为阴性对照) 进行 PCR 扩增与

收稿日期: 2005-02-28

基金项目: 国家自然科学基金(30170834) 和福建省自然科学基金重点项目(C0220002) 资助

作者简介: 郑薇薇(1980-), 女, 硕士研究生.

*通讯作者: 0592-2187363, qgli@xmu.edu.cn

表 1 ARMS 引物列表
Tab. 1 ARMS primers

名称	编号	核苷酸序列
AGT	P1	5- <u>ACTTGTGGTA</u> GTTGGA GCTA-3
AGT(<i>n</i> -3)	P2	5- <u>ACTTGTGGTA</u> GTTGGACCTA-3
TGT(<i>n</i> -3)	P3	5- <u>ACTTGTGGTA</u> GTTGGACCTT-3
CGT(<i>n</i> -3)	P4	5- <u>ACTTGTGGTA</u> GTTGGACCTC-3
GGT(<i>n</i> -3)	P5	5- <u>ACTTGTGGTA</u> GTTGGACCTG-3
Antisense	P6	5-GTTGGA TCATATTCGTCCAC-3

注:下划线表示故意引入的错配碱基;P1~P2:用于扩增 AGT 模板的 ARMS 上游引物;P3~P5 为分别扩增 TGT、CGT、GGT 模板的 ARMS 上游引物;P6 为公共的下游引物。

结果分析. 反应条件:94 预变性 2 min;94 变性 15 s,55 退火 20 s,72 延伸 20 s,扩增 40 个循环;在每一循环的退火温度时收集荧光信号. PCR 反应后,按 0.5 /step 的升温速率从 65 递增至 99 进行熔解曲线分析.

1.2.2 ARMS 实时 PCR 反应体系及条件优化

ARMS 引物筛选及 PCR 反应步骤改良:PCR 体系组成同 1.2.1. 反应条件:94 预变性 2 min;94 变性 15 s,55 退火 20 s,72 延伸 20 s,80 恒温 5 s,扩增 40 个循环;在每一循环的 80 时收集荧光信号.

ARMS 引物浓度的优化:将 P2 引物(0.4 μmol/L)分别稀释 10 倍、20 倍后,再进行实时荧光 PCR 分型. 反应体系其他成分及反应条件同上.

1.2.3 ARMS 实时 PCR 基因分型

PCR 体系总体积 400 μL,含 40 μL 10 ×buffer,50 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTPs,20U Taq 酶,4.0 μL SYBR Green (1:10 000 稀释),0.4 μmol/L 下游引物(表 1 中 P6). 将上述组分混匀后,分装 4 大管,每管体积 100 μL,分别加入表 1 中的 P2、P3、P4、P5 引物各 0.04 μmol/L. 然后每大管再分装 5 小管,每小管最终体积 25 μL,使每条引物分别对 4 种质粒 DNA 模板(约 0.5 ng)和水(作为阴性对照)进行 PCR 扩增与结果分析. 反应条件:94 预变性 2 min;94 变性 15 s,55 退火 20 s,72 延伸 20 s,80 恒温 5 s,扩增 40 个循环;在每一循环的 80 时收集荧光信号.

2 结果

2.1 PCR 扩增产物和引物二聚体熔解曲线分析

在进行 PCR 扩增后,对产物进行熔解曲线分析,结果如图 1 所示,引物 P1 和 P2 的熔点大约在 77 ~

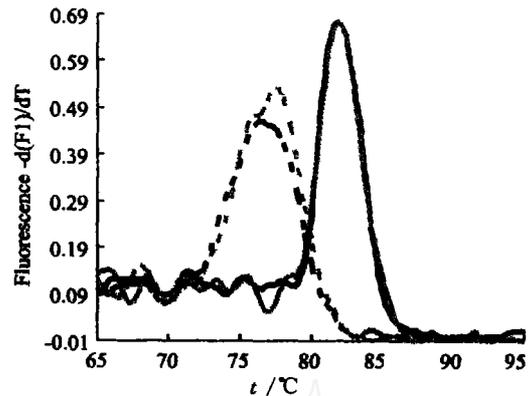


图 1 PCR 扩增产物及引物二聚体的熔解曲线分析
黑色虚线: P1 引物二聚体;黑色实线: P1 引物对 AGT 模板扩增产物;灰色虚线: P2 引物二聚体;灰色实线: P2 引物对 AGT 模板扩增产物

Fig. 1 Melting curve analysis of PCR products and primer dimers

78 左右,而 AGT 模板扩增目的产物的熔点在 83 . 根据两者熔点的差别,对传统三步法 PCR 进行改良,即在传统延伸步骤之后再增加一步恒温 80 采集荧光信号,可以消除引物二聚体对基因分型的影响,可望增加 ARMS 引物基因分型的特异性.

2.2 ARMS 实时 PCR 反应体系优化结果

ARMS 引物筛选及 PCR 循环改良结果:用于扩增 AGT 模板的两条 ARMS 引物 P1 和 P2,其中 P1 是和模板序列完全互补的引物,而 P2 是在距离 3 端的第(*n*-3)位点引入故意的错配 G 以 C 取代的引物. 传统三步法 PCR 基因分型结果如图 2(A)和 2(B)所示,虽然目的产物 AGT 模板的荧光信号都是最先升起来的,但是采用 P1 引物时,GGT 模板的错配延伸明显,而采用 P2 引物时,引物二聚体影响很大,均对 AGT 模板的分型造成困难. 对 PCR 循环进行改良后,即在传统延伸步骤之后再增加一步恒温 80 采集荧光信号,结果如图 2(C)和图 2(D)所示,引物二聚体对基因分型的影响基本消除,尤其是采用 P2 引物和改良四步法 PCR 结合后,目的产物 AGT 模板和其他的产物的荧光信号可以很清晰的区分,基因分型特异性大大增加.

ARMS 引物浓度优化结果:将引物浓度稀释 10、20 倍后的结果表明,若稀释倍数太低(图 3A 所示),对基因分型的结果改善不明显;若稀释倍数太高(图 3C 所示),则造成目的产物扩增效率太低,不利于基因分型. 总的来说本研究中所采用的 P2 引物稀释 10 倍时可得特异性较好的分型结果(图 3B 所示).

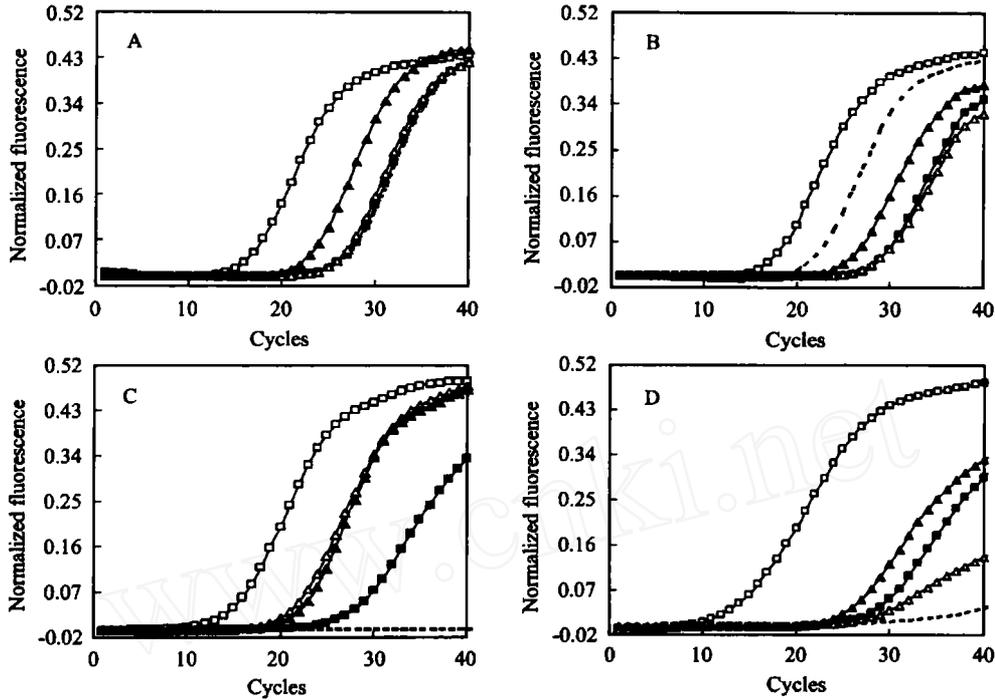


图 2 ARMS 实时 PCR 基因分型引物筛选及 PCR 循环改良

A、B 图分别采用 P1、P2 引物和传统三步法 PCR(55 采集荧光信号)进行 ARMS 实时 PCR 基因分型; C、D 图分别采用 P1、P2 引物和改良四步法 PCR(80 采集荧光信号)进行 ARMS 实时 PCR 基因分型; - : AGT 模板, - : TGT 模板, Δ - Δ CGT 模板, - : GGT 模板, ----- 引物二聚体

Fig. 2 Selection of primers and optimization of PCR cycles for ARMS real-time PCR genotyping

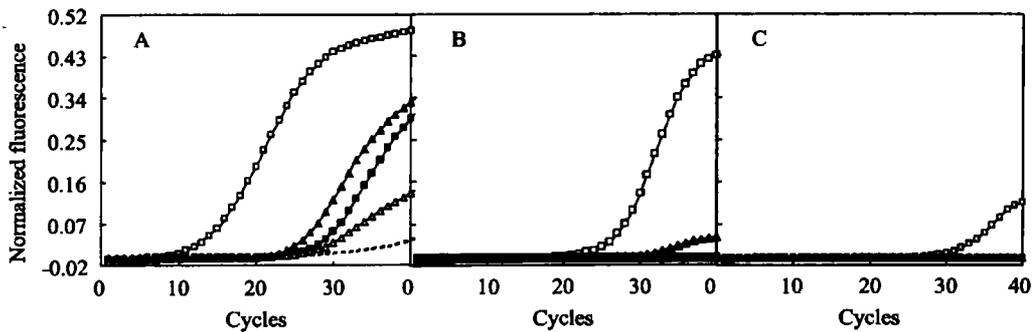


图 3 ARMS 实时 PCR 基因分型引物浓度优化

A、B、C 图分别采用 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.04 $\mu\text{mol/L}$ 、0.02 $\mu\text{mol/L}$ 的 P2 引物进行 ARMS 实时 PCR 基因分型; - : AGT 模板, - : TGT 模板, Δ - Δ CGT 模板, - : GGT 模板, ----- 引物二聚体

Fig. 3 Optimization of the concentration of ARMS primers

2.3 ARMS 实时 PCR 基因分型

经过上述对 ARMS 实时 PCR 基因分型特异性的探讨后, 采用在距离 3 端的第 $(n-3)$ 位点引入故意错配碱基的 ARMS 引物, 并将该引物浓度稀释 10 倍 (0.04 $\mu\text{mol/L}$), 结合改良的四步法 PCR 进行基因分型研究. 结果如图 3 所示, 4 种基因型均可以得到很好的区分, 错配模板和引物二聚体的影响都降到最低, 基本不影响基因分型结果的判定.

3 讨论

扩增受阻突变体系 (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) 也称作等位基因特异性扩增法 (Allele-specific amplification, ASA) 或等位基因特异性 PCR (Allele-specific PCR, ASPCR), 其基本的原理^[7]都是 3 端错配原则 (3-mismatch principle): 在进行扩增反应时, 若 3 端碱基对形成错配, 链延伸反应就会因 3', 5-磷酸二酯键形成的障碍而受阻, 因此, 只

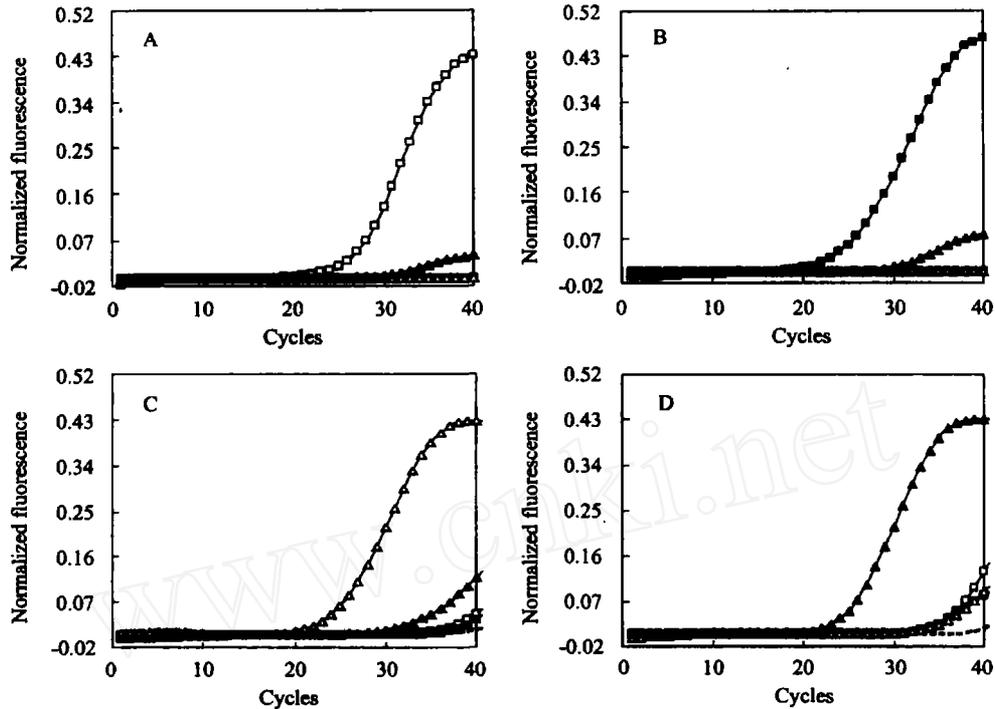


图 4 ARMS 实时 PCR 基因分型

A、B、C、D 图分别采用 P2、P3、P4、P5 引物进行 ARMS 实时 PCR 基因分型; - : AGT 模板, - TGT 模板, Δ -
 Δ CGT 模板, - GGT 模板, ----- 引物二聚体

Fig. 4 ARMS real-time PCR genotyping

有模板链是特定的等位基因时,才会检测出特异的扩增产物。一直以来将 PCR 和 ARMS 方法结合,扩增后采用电泳方法检测仍是分型的主要手段,但很显然,繁琐的实验操作和 PCR 产物污染等问题限制了该方法的应用。实时荧光 PCR 的出现,给人们带来实现实时检测的希望。近来有报道:在 ARMS 的反应体系中,引物上标记 2 个不同荧光素,通过对产物荧光分析进行基因分型,此法称为双荧光扩增受阻突变系统(double fluorescent-amplification refractory mutation system, dF-ARMS)^[8];还有在 ARMS 的反应体系中,加入一个 ResonSense 探针^[4]进行实时基因分型;以及采用各种其他类型荧光探针^[9]等方法都是以实时荧光 PCR 为基础的基因分型方法。但无论是标记荧光素还是采用荧光探针,在一定程度上增加了实验设计的难度和实验成本,也就限制了其临床的应用。本研究采用序列特异的 ARMS 引物进行扩增,以 SYBR Green 荧光染料为实时 PCR 指示剂,并在传统三步法 PCR 的基础上,根据产物和引物二聚体之间熔点的差异,增加一步 80 °C 恒温 5 s 进行荧光采集,实际上并没有抑制引物二聚体的生成,而是在检测时将其信号掩盖,消除引物二聚体的影响。其原理与报道的 ARMS 引物结合 ResonSense^[4]探针进行实时 PCR 基因分型相同,所以一定程度上可取代探针。

ARMS 实时 PCR 基因分型特异性的另一关键就是 ARMS 引物本身的特异性。在所有的碱基对中 G:T 错配相对容易^[10],如图 2(A)所示,AGT 模板(匹配型)和 GGT 模板(错配型)扩增的 C_t 值只相差 7~8,难以区分基因型。为增加引物的特异性,设计在 ARMS 引物 3 端($n-3$)位引入一个故意的错配碱基,但该错配碱基的引入使得形成大量引物二聚体,图 2(B)所示。对传统 PCR 循环进行改良后,可增加 ARMS 引物的特异性,消除引物二聚体的影响,增加其分型的能力,如图 2(D)所示。此外,ARMS 引物的特异性与反应体系密切相关,因此,对反应体系进行优化是十分必要的。除了常规的 Mg^{2+} 浓度和退火温度的优化外,本研究对引物浓度对分型特异性的影响进行考察,结果表明:对引物浓度进行稀释可以增加 ARMS 引物的特异性,但是与此同时产物的扩增效率会降低。如图 3 所示,未稀释引物扩增 C_t 值为 10,将引物稀释 10 倍后 C_t 值为 20,稀释 20 倍后 C_t 值为 30。所以必须找到一个平衡点,选择最佳的反应条件可以取得令人满意的分型效果,如图 4 所示,在本实验进行优化后的 PCR 反应条件下, *K-ras* 基因的 4 种基因型得到了很好的区分。

本研究对基于 SYBR Green 的 ARMS 实时 PCR 基因分型方法的特异性进行探讨,结果表明,经

优化后的这种基于 SYBR Green 结合改良四步法 PCR 的 ARMS 实时 PCR 基因分型方法,无需合成探针,设计简单,是一种快速、简便、经济、准确的基因分型方法,可推广用于其他基因的分型,并可望成为可用于临床的基因诊断技术之一。

参考文献:

- [1] Brightwell G, Wycherley R, Waghorn A. SNP genotyping using a simple and rapid single-tube modification of ARMS illustrated by analysis of 6 SNPs in a population of males with FRAXA repeat expansions[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16:297 - 305.
- [2] Simon J C, Frank M S, Jill W, et al. Comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification [J]. *Clinical Chemistry*, 2000, 46:1 929 - 1 938.
- [3] Donatella M, Maria T P, Patrizia C, et al. Identification of G6PD Mediterranean mutation by amplification refractory mutation system[J]. *Clinica Chimica Acta.*, 2002, 321:43 - 47.
- [4] Parvinder P, Patricia C, Chong-Gee T, et al. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR[J]. *Journal of Hepatology*, 2004, 40:986 - 992.
- [5] Hany E, Yoshihiro O, Martin R J, et al. A high-throughput denaturing high-performance liquid chromatography method for the identification of variant alleles associated with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 306:63 - 73.
- [6] Timothy J G, Lloyd M S. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Tibtech*, 2000, (18):77 - 84.
- [7] Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17:2 503 - 2 512.
- [8] Maher C, Crowley D, Cullen C, et al. Double fluorescent-amplification refractory mutation detection (dF-ARMS) of the factor V Leiden and prothrombin mutations [J]. *Thromb. Haemost.*, 1999, 81:76 - 80.
- [9] Cheng J, Zhang Y, Li Q. Real-time PCR genotyping using displacing probes [J]. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32 (7): E61.
- [10] Cotton R G H. Detection of single base changes in nucleic acids [J]. *Biochem. J.*, 1989, 263:1 - 10.

Study on the Specificity of ARMS Real-time PCR Genotyping

ZHENG Wei-wei¹, LIANG Ji-xuan², LI Qing-ge^{1*}

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Department of Biomedical Sciences, School of Life Sciences,

2. Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A kind of Plasmids containing four different genotypes in codon 12 of *K-ras* gene (which wild type is GGT and mutants are AGT, TGT, CGT, respectively) was used as model to study the specificity of ARMS primers-based real-time PCR genotyping. Based on the melting temperature difference between the primer dimmer and the amplicon, a four-step PCR protocol that could eliminate primer dimmer interference was established, where the fluorescence was measured at the fourth step of 80. The results showed that using ARMS primers harboring additional mismatch at ($n-3$) position could further greatly increase the specificity of the genotyping. ARMS real-time PCR genotyping proved to be a rapid, simple, cost effective, and reliable genotyping method. It could be applicable to genotyping of a variety of genes and had the potential to apply in clinical diagnosis.

Key words: real-time PCR; ARMS; genotype