

实时聚合酶链反应熔解曲线分析检测 APC 基因突变

郑薇薇 刘忠臣 李庆阁

【摘要】 目的 建立一种准确、方便、价廉、适合临床的 APC 基因突变检测方法。方法 采用 SYBR Green 为实时聚合酶链反应 (PCR) 指示剂, 首先从基因组 DNA 中扩增包含突变位点的靶基因 (270 bp), 并通过熔解曲线分析确定产物; 再以上述片段为模板扩增特定长度的小片段 (40/35 bp), 以 0.5°C/step 的速率, 获得从 65°C 到 99°C 的熔解曲线以检测 APC₁₃₀₉ 位 5 bp 缺失突变。结果 临床标本检测结果表明: 18 例结肠肿瘤患者石蜡组织标本中检出 APC₁₃₀₉ 位 5 bp 缺失突变 7 例, 20 例正常人外周血标本检测结果均为阴性。结论 实时 PCR 熔解曲线法设计简单, 操作简便, 结果可靠, 可望应用于临床 APC 基因突变检测, 并可推荐用于其他基因突变的检测。

【关键词】 聚合酶链反应; 基因; APC; 结肠直肠癌

Detection of APC mutation by real time polymerase chain reaction and melting curve analysis

ZHENG Weiwei, LIU Zhong-chen, LI Qing-ge. * Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering of the Ministry of Education, Department of Biological Sciences, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Corresponding author: LI Qing-ge (Email: qgl@xmu.edu.cn)

【Abstract】 Objective To establish a simple, reliable and low cost approach for clinical detection of APC mutation. **Methods** Using SYBR Green as the real time polymerase chain reaction (PCR) product indicator, a DNA fragment of 270 bp targeting APC₁₃₀₉ mutation (5 bp deletion) was amplified from the sample DNA. A short fragment (40/35 bp) was then amplified from the 270 bp PCR product followed by melting curve analysis from 65°C to 99°C at 0.5°C/step. **Results** A total of 18 paraffin-embedded tumor samples were analyzed, of which 7 were tested positive for the mutation and 11 were negative. No mutation was detected in any of the 20 normal peripheral blood samples. **Conclusions** Real time PCR melting curve analysis can be used for routine APC mutation detection. The simple design, low cost and high reliability should allow similar applications to the analysis of a variety of other gene mutations.

【Key words】 Polymerase chain reaction; Gene; APC; Colorectal neoplasms

腺瘤性结肠息肉病 (adenomatous polyposis coli APC) 易感基因突变是结直肠癌变的早期分子事件^[1,2], 在正常黏膜组织向癌组织转化过程中起关键作用。它不仅参与家族性结肠腺瘤息肉病的形成, 还与散发性结直肠肿瘤的发生密切相关。APC 基因最常见的突变是位于第 15 外显子的 1309 位密码子的突变^[3]。目前检测该突变的方法较多, 主要有聚合酶链反应-单链构象多态性分析^[4]、蛋白截断测试^[5]、变性梯度凝胶电泳^[5]以及直接测序分析^[3]

等。但这些方法步骤繁琐, 不适用于大量临床样本检测。基质辅助激光解析飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析法^[6], 虽然可以实现高通量检测, 但仪器昂贵, 限制了临床应用。基于荧光嵌入剂的熔解曲线分析^[7]检测基因突变的原理是根据不同长度或不同 GC 含量的 DNA 片段熔点 (T_m) 的差异, 在聚合酶链反应 (PCR) 扩增产物的熔解曲线上呈现出不同的峰型, 基因突变同样可能导致 PCR 扩增产物熔点变化, 也就是熔解曲线的差异。我们采用 DNA 嵌入荧光染料 SYBR Green 为实时 PCR 荧光指示剂, 在 PCR 完成后进行熔解曲线分析, 以建立一种简便、可靠、价格低廉的 APC 基因突变的检测方法。

材料和方法

1. DNA 模板: 建立方法所用人工模板, 系采用

通信作者: 李庆阁 (Email: qgl@xmu.edu.cn)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170834); 福建省自然科学基金重点项目 (C0220001)

作者单位: 361005 厦门大学生命科学学院生物医学科学系, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 (郑薇薇、李庆阁); 厦门市中山医院 (刘忠臣)

PCR引物重叠延伸法构建的 APC_1309野生型和突变型 DNA 模板, 模板序列经测序验证。临床标本包括 18例经病理证实为结直肠癌的石蜡组织标本和 20例正常人外周血标本, 均由厦门市中山医院提供。石蜡组织标本 DNA 的提取采用 DNA easy Tissue Kit (Qiagen 公司), 外周血标本 DNA 的提取采用 QIAamp Blood Kit (Qiagen 公司), 按说明书操作。

2 包含突变位点的靶基因的扩增: PCR 体系总体积 25 μ l 含 2 μ l 10 \times buffer, 50 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U Taq 酶, 0.2 μ l SYBR Green (1:10 000 稀释, 厦门百维信公司), 上游引物: 5'-AGTTCATTATCATCTTTGTCATCAGC-3', 下游引物: 5'-ACTTTTGGAGGGAGATTTCGC-3' (上海生工生物技术公司合成) 各 0.4 μ mol/L, DNA 模板 5 μ l (约 100 ng/ μ l)。将上述组分混匀后, 于 Rotorgene 3000 实时 PCR 仪 (Corbett Research 公司) 进行 PCR 扩增与结果分析。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 扩增 35 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 1.0 $^{\circ}$ C/step 的温度上升速率从 65 $^{\circ}$ C 递增至 99 $^{\circ}$ C 进行熔解曲线分析, 确定靶基因扩增成功后再进行下一步实验。

3. 实时 PCR 熔解曲线分析检测 APC 基因突变: PCR 体系总体积为 22 μ l 含 2 μ l 10 \times buffer, 50 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U Taq 酶, 0.2 μ l SYBR Green (1:10 000 稀释), 熔解曲线分析上游引物 5'-CCTGCAAATAGC-3' 和下游引物 5'-CTAGTTCCAATC-3' 各 0.4 μ mol/L, 上轮 PCR 产物的稀释液 2 μ l (1:1000), 将上述成分混匀。于实时 PCR 仪上进行扩增并收集荧光信号。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 52 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 扩增 35 个循环。PCR 反应后, 按 0.5 $^{\circ}$ C/step 的温度上升速率从 65 $^{\circ}$ C 递增至 99 $^{\circ}$ C 进行熔解曲线分析, 进行突变检测。

结 果

1 实时 PCR 熔解曲线分析检测 APC 基因突变方法建立: 首先以本实验室自行构建的野生型和突变型 DNA 模板, 两者等量混合视为杂合型模板, 建立实时 PCR 熔解曲线, 分析检测 APC 基因突变检测方法。结果如图 1 所示, 3 种类型的模板均呈现良好的峰型, 且峰值差异明显, 通过峰值位置可辨别模板类型, 实现 APC 基因突变的检测。

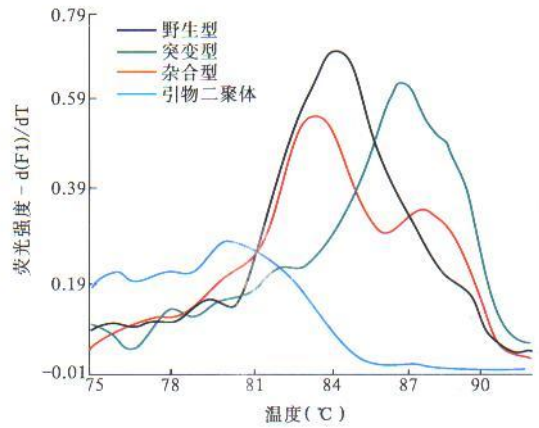
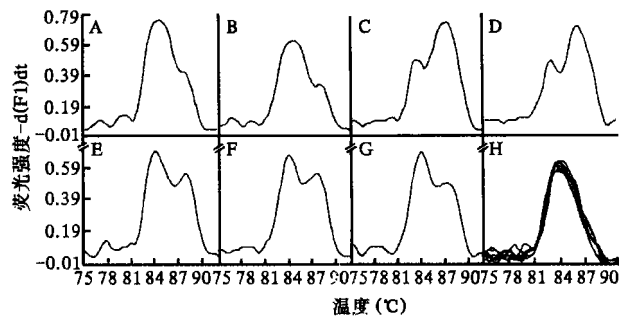


图 1 实时 PCR 熔解曲线法检测 APC 基因突变

2. 临床标本 APC 基因突变检测: 共检测 18 份结直肠肿瘤石蜡组织标本, 结果检测出 APC_1309 位 5 bp 缺失突变 7 份, 其余 11 份未检出 (图 2)。此外, 检测 20 份正常人外周血标本, 结果全部呈阴性。阳性标本结果经测序验证, 无假阳性。



A-G APC_1309 位 5 bp 缺失突变阳性标本; H: 阴性标本

图 2 实时 PCR 熔解曲线法检测 18 份结直肠肿瘤患者石蜡组织标本 APC 基因突变

讨 论

APC 基因位于染色体 5q21, 是一个重要的抑癌基因, 它的突变发生在结直肠癌的早期, 因此检测 APC 基因突变对结直肠癌的早期诊断意义重大。我们建立的熔解曲线分析法系采用 SYBR Green 作为荧光指示剂, 无需探针, 具有简便、快速、价廉且可靠的特点, 比电泳操作具有明显优势。

采用 SYBR Green 的熔解曲线分析可以确证特异产物。SYBR Green 是一种 DNA 嵌入型染料, 可以和包括引物二聚体在内的所有双链 DNA 结合, 因此不具备特异性。然而每种扩增产物的熔解曲线都依赖于它的 GC 含量和链的长度, 特异的扩增产物的熔解温度是特定的, 因此可以根据产物的熔解曲线将特异产物和引物二聚体区分开来。当 DNA

模板浓度很低时,其循环阈值(即 Ct值,表示 PCR 循环过程中,每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数)和引物二聚体的 Ct值非常接近,在这种情况下,不能直接判断是否扩增成功,但通过熔解曲线分析,我们可以区分目的产物和引物二聚体。为保证检测的特异性,本实验设计采用两轮 PCR。第一轮扩增产物是一个较长的 PCR 片段,第二轮扩增则以第一轮 PCR 产物为模板并进行熔解曲线分析。这样做的好处是,所有标本无论提取 DNA 量的多少、质量如何,经过首轮扩增,产物量趋于一致,使下一轮实时 PCR 熔解曲线分析的重现性得到保证。

在实时 PCR 熔解曲线分析中,扩增产物的 GC 含量和链的长度对熔解曲线有决定性影响。APC_1309 缺失突变扩增产物差异为 5 bp 为获得清晰的分辨,引物的设计必须尽量使野生型和突变型的 PCR 产物之间的 Tm 值相差 2℃ 以上^[7]。虽然难以准确预测扩增产物的实际熔点,但很显然,产物过长必将掩盖由突变引起的熔点差异;产物过短则可能与引物二聚体无法区分。我们对不同长度产物的考察结果也证实了上述猜测。

阳性标本的熔解曲线峰型不尽一致,但均为双峰,与野生型的单峰区分明显。我们认为,双峰实际上代表了野生型和突变型两种扩增产物,二者相对高低反映了二者量的差异。以图 2 中 (B) 和 (C) 为例,(B) 中的低熔点峰(野生产物峰)高出高熔点峰(突变产物峰)许多,(C) 则相反。这是因为肿瘤标本中不可避免地混杂有正常细胞,肯定存在野生产物峰;另一方面,仅仅检出只有野生产物峰,也可能是突变产物峰太低所致,并无法排除突变的存在。至于本法检出突变的灵敏度如何,尚有待进一步研究。不过需要指出的是,实时 PCR 熔解曲线分析目前也确实停留在基因分型水平^[8,9]。

总之,我们成功建立了实时 PCR 熔解曲线分析检测 APC_1309 位 5 bp 的缺失突变的方法。该方法总需时约 8 h(不包括标本提取),由于可对 96 个标本同时进行操作,平均每个标本检测仅需 5 min。采用 SYBR Green 荧光染料实现了实时监测,缩短了检测时间,简化了实验步骤,且不需要设计合成探针,在费用上相当于在两个普通 PCR 费用的基础增加 SYBR Green 荧光染料的费用,而荧光染料在本实验中稀释 10 000 倍应用,耗费低。实时 PCR 熔解曲线分析方法可望用于临床 APC 基因突变的快速检测,且可扩展应用于其他基因突变的检测。

参 考 文 献

- 1 Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-237.
- 2 Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 1994; 54: 5523-5526.
- 3 袁平, 孙孟红, 张锦生, 等. 结直肠粘膜隐窝异常病灶 K-ras APC 基因突变的研究. *中华病理学杂志*, 2001; 30: 35-38.
- 4 Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 589-600.
- 5 van der Luijt RB, Khan PM, Vasen HE, et al. Molecular analysis of the APC gene in 105 Dutch kindreds with familial adenomatous polyposis: 67 germline mutations identified by DGGE, PTT, and southern analysis. *Hum Mutat* 1997; 9: 7-16.
- 6 Bonk T, Humeny A, Sutter C, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis (FAP): genotyping of adenomatous polyposis coli (APC) alleles by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Biochem* 2002; 35: 87-92.
- 7 Ririe KM, Rasmussen RP, Witwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-160.
- 8 Yeh SH, Tsai CY, Kao JH, et al. Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting curve analysis. *J Hepatol* 2004; 41: 659-666.
- 9 Fujigaki H, Takemura M, Takahashi K, et al. Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis with SYBR Green. *Ann Clin Biochem* 2004; 41(Pt 2): 130-132.

(收稿日期: 2005-01-24)

(本文编辑: 常秀青)

· 消息 ·

天津市第四中心医院 天津市耳鼻咽喉头颈外科医院 招聘启事

该院始建于 1930 年,是一所历史悠久的大型综合性三级甲等医院,设置病床 880 张,拥有核磁共振、血管造影、16 排螺旋 CT、ECT、数字胃肠、直线加速器、彩超、全自动生化仪等大型医疗设备。

因业务发展需要,现面向全国诚聘病理科专业人才。要求:(1)硕士以上学位;(2)中级以上职称;(3)有 5 年以上三

级甲等医院病理诊断工作经验;(4)身体健康,45 岁以下。有意者请将个人简历、毕业证、学位证、专业技术资格证、执业医师资格证、身份证的复印件以及近期大一寸免冠彩色照片一张寄至天津市河北区中山路 1 号天津市第四中心医院人力资源部,邮编: 300140 联系人: 何宝珠;联系电话: 022-26181627。