

应用液滴数字 PCR 技术检测 rs6983267 三种多态性位点*

沈阳丽 孙 浩 蔡文臣 张品正 王旭莹 尚雨寒 石 璐 辛倩倩 郭志义**

(华北理工大学医学实验研究中心, 唐山 063000)

摘要 核苷酸的多态性检测在临床以及基础生命科学研究中占据着重要地位。目前基于 PCR 的探针法应用最为广泛。由于在核苷酸上微小差异, 探针的设计往往带有交叉活性反应, 这阻碍了 qPCR 方法的推广。数字 PCR(dPCR)是近年来已成功实现商业化的基于单分子分析的核酸检测技术。通过对条件的优化, dPCR 可以消除探针的交叉活性, 不过目前商业化的 dPCR 一般只有 2 个通道, 对于同时检测 3 个多态性需要更加细致的优化。本研究以 rs6983267 位点的 CCAT2 基因 3 种多态性检测为例, 利用探针的交叉活性反应检测其 3 个多态性位点。检测涉及到 3 个探针: 2 个针对多态性位点, 另 1 个位于多态性位点外侧作为参照探针。结果表明, 成功地区分了 3 个包含多态性位点基因片段的簇。在本研究中交叉活性反应可以为 dPCR 留出白空间, 利于多样品的检测。

关键词 数字 PCR, 核酸多态性, 交叉活性探针, rs6983267

学科分类号 Q7, R3

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0190

核酸的多态性在生物医学领域占有重要地位, 这些包括等位基因的多态性以及转录出可能的 RNA^[1]。核酸多态性的检测一般有 qPCR、基因芯片以及 DNA 测序等等。数字 PCR(digital PCR, dPCR)已经实现了商业化, 其与传统的实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)不同, 采取的是终点法, 实现了真正的绝对定量^[2]; 同时, 具有更灵敏以及更好的重复性^[3-7]。近年来, dPCR 越来越多地应用在基础研究以及临床检测中^[8]。对于核酸多态性的检测会涉及到单核苷酸差异的探针, 由于序列相似度高、交叉活性明显, 而传统的 qPCR 无法克服这种非特异的探针。我们曾经报道利用探针的交叉活性反应提高 dPCR 定量的方法, 本文利用探针的交叉活性反应来实现多位点的检测。

尽管 dPCR 具有多种优势, 然而与传统的 qPCR 多达 5 个通道相比, 现行的 dPCR 最多只有 2 个通道, 这受限于制造成本以及数据处理算法的复杂性。由于现行的 dPCR 只有 2 个通道, 它无法

同 qPCR 一样实现多个位点的同时检测。rs6983267 核酸多态性位点位于人类染色体 8q24 区, 具有三核苷酸多态性, 据报道这些多态性在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用^[1,9]。本研究以 rs6983267 核酸多态性位点为例, 以 dPCR 方法实现其三多态性的检测。

1 材料与方法

1.1 材料

KM12C 细胞由本室保存。针对 rs6983267 的 TaqMan® 探针由上海基康生物技术有限公司合成, 序列信息见表 1。共有 3 个探针分别针对 GT 位点的 G-probe 与 T-probe 以及参照探针 R-probe。探针

* 国家自然科学基金(31050010), 教育部归国留学基金([2015] No.311), 河北省归国留学人员择优资助项目(C201400358)和华北理工大学大学生创新创业计划(X2015052, X2016121)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0315-8816237, E-mail: guozhiyi@ncst.edu.cn

收稿日期: 2018-07-09, 接受日期: 2018-08-21

Table 1 The sequences of primers and probes

NAME	Sequence(5'→3')	T _m /(°C)	GC/%
Forward primer	AGAGGGACGAATAAACTC	52.7	44.4
Reverse primer	CCCTTTGATTCAGAGAAAG	53.8	42.1
G-probe	AGCAGATGAAAGGCACTGAGAA	62.2	45.5
T-probe	CTCAGCAGATGAAAGTCACTGAGAA	63.6	44.0
R-probe	TAGCCAGAGTTAATACCCTCATCG	61.7	45.8

位置以及实验设计见图 1. 猝灭基团均为 BHQ1. PCR 反应模板通过细胞基因组 DNA 或逆转录产物扩增获得, 引物分别为: 上游引物, CCCTGGTC-AAATTGCTTAACCT; 下游引物, CTTCTACAGGCCCAAACA. dPCR 试剂以及耗材为 Bio-rad 产品. qPCR 以及普通试剂分别为大连宝生物以及天根公司产品. 微滴式数字 PCR 仪(ddPCR, droplet digital PCR) QX-200 为 Bio-Rad 公司产品, 普通 PCR 仪为伯乐公司 T100.

1.2 方法

1.2.1 G 型、T 型以及 D 型 CCAT2 基因片段的获得

将传代第二天的 KM12C 细胞, 提取基因组 DNA 或 RNA, 以基因组或逆转录产物应用 PCR 方法扩增获得. 与 T 载体连接, 测序验证后备用. 以确认后的 T 载体连接产物为模板, 通过 PCR 扩增获得 G 型、T 型以及 D 型(删切, deletion)CCAT2 基因片段. PCR 反应条件为: 94°C 3 min, 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 循环 25 次.

模板的加入量: 以 qPCR 检测, 选择在 C_q 值为 25~27 范围内的浓度作为 ddPCR 的检测模板.

1.2.1 ddPCR 分析

将引物、探针、DNA 模板、ddPCR supermix 配制成 20 μl 反应液, 加入到 DG8 容器中间一排的 8 个孔内, 在 DG8 容器的最底下一排 8 个孔内分别加入 70 μl DG 油, 盖上密封垫. 制备微滴: 将样品轻轻地平稳放入微滴生成器中, 在 2.5 min 内使每个 20 μl 反应液形成微滴. PCR 扩增: 将微滴转移到 96 孔 PCR 板上, 同时用预热好的 PX1 热封仪封膜, 于 PCR 仪上进行扩增. 反应条件: 95°C 10 min; 94°C 30 s, 60°C 60 s, 循环 40 次; 98°C 10 min; 4°C 保存. 检测微滴: 将 96 孔板放入微滴分析仪中, 打开软件, 对 96 孔板中的样品信

息进行设置, 完成后进行运行, 之后仪器将顺序吸取每个样品的微滴并随载液流逐一通过双色检测器.

2 结果与分析

2.1 基于非交叉活性反应的核酸多态性检测

为了区分三核苷酸多态性, 实验设计了 3 个探针, 2 种标记(图 1). 基于图 1a 的实验设计, 参照探针(R-probe)与 G 探针(G-probe)标记相同. 在只有 G 与 T 模板的情况下(图 2a), T 位于 XY 轴交叉位置; G 位于 X 轴, 说明 G 探针对 T 模板具有交叉活性反应. 由于是双探针, G 的荧光值约 5 500 左右(点群中间位置估计数值). 在加入 D 模板后(图 2b), D- 点群出现, 位于 G- 点群与本底点群之间(图 2b), 荧光值约为 G- 点群的 1/2.

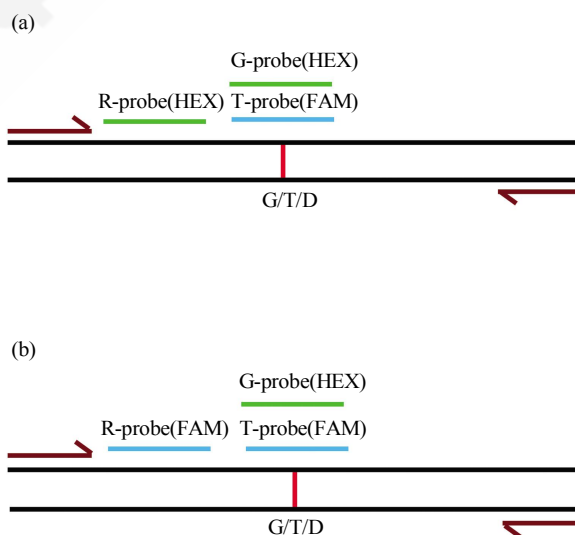


Fig. 1 The strategies of probe design to discriminate the three allelic clusters

(a) A schematic is given for the primer and probe hybridization arrangements to show reference probe labelling of Figure 2. (b) A schematic is given for the primer and probe hybridization arrangements to show reference probe labelling of Figure 3.

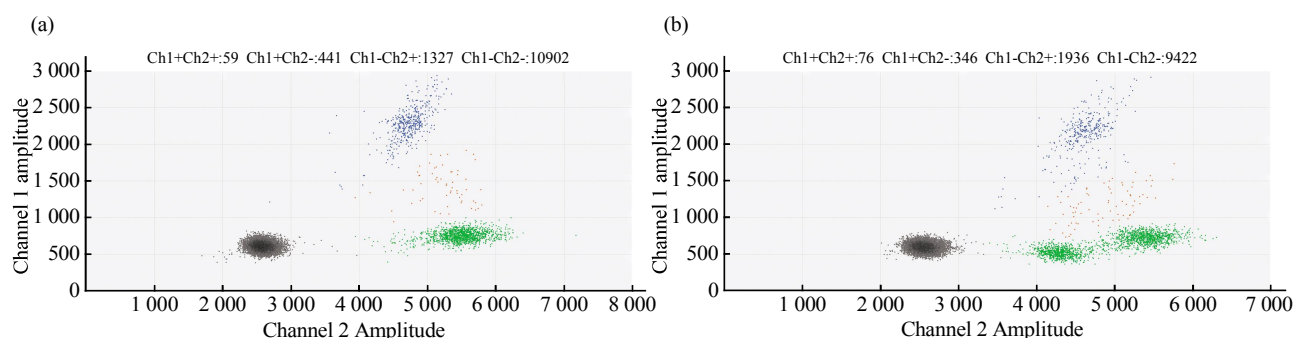


Fig. 2 The tri-allelic polymorphism detection based on the probe with no cross-reactivity

(a) G and T cluster distribution. (b) HEX-positive clusters (D-cluster) are shown by adding more template. The experiment design is shown in Figure 1a.

2.2 基于交叉活性反应的核酸多态性检测

为了区分三核苷酸多态性, 实验设计了 3 个探针(图 1). 基于图 1b 的实验设计, 参照探针(R-probe)与 T 探针(T-probe)标记相同. 在只有 G 与 T 模板的情况下, 只加入了 GT 探针, T 点群位于 XY 轴交叉位置, 结果与图 2a 相似(图 3a); 说明 G 探针对 T 模板具有交叉活性反应. 在加入参

照探针(R 探针)后, 由于是双探针的荧光信号叠加, T 点群位置向上移动, 但仍然保持相对于 X 轴的偏移(shift); G 点群由于 R 探针的存在, 具有了双色荧光(图 3b, c). 随着 D 模板的加入, D 点群出现在 Y 轴上(蓝色, 图 3c, d). 为方便展示数据, T 点群用红色箭头指示. 由于白空间的增加, 可以看出, 3 种点群清晰可辨(图 3c).

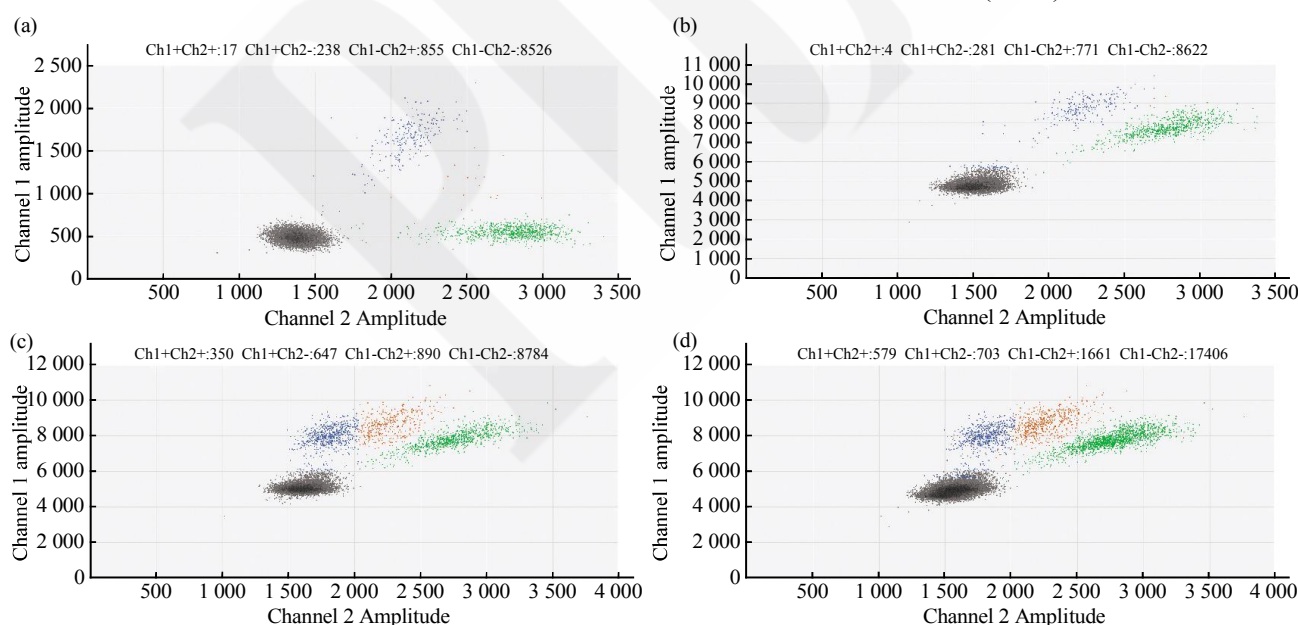


Fig. 3 The tri-allelic polymorphism detection based on the probe with cross-reactivity

(a) The angel shift (blue) caused by cross-reactivity probe give white space in y-axis. Actually, due to cross-reactivity of G-probe, the T-clusters which is both FAM and HEX positive should be orange instead of blue. The blue color is changed manually for calculation. (b) Adding reference probe could not change the angel shift (c) D-cluster is shown. (d) Merge (b) and (c). The experiment design is shown in Figure 1b.

3 讨 论

核酸多态性与许多重大生命现象相关, 其检测

一直是生物医学的重要内容. 在核酸检测中, 探针的非特异扩增一直是核酸检测需要解决的问题. 本研究报道了一种利用核酸探针交叉活性反应来检测

核酸多态性的方法。

核酸多态性是指核酸的特定位点具有多种基因型, 在群体中称之为多态性。核酸多态性曾在基因测序中作为一个重要的参照物。研究表明, 核酸多态性与多种疾病相关联。全基因组关联分析就是基因多态性与疾病的关联研究, 其主要研究对象就是单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。有报道, rs6983267 位点的多态性与前列腺癌、结肠癌等相关^[9]。进一步的研究发现此位点可以转录出一段非编码 RNA, 命名为 CCAT2。研究发现 rs6983267 位点以及转录产物共有 3 种常见的多态性, 均具有生物学意义^[1, 9]。研究表明 rs6983267 位点 G 是前列腺癌以及结肠癌的危险因子^[10], 而在糖尿病结合结肠癌的研究中, T 位点为危险因子^[11]。最近的研究^[9]以及我们的结果(未发表)发现第三种即删切形式的转录产物在肿瘤转移过程中发挥着重要作用。

应用实时荧光定量 PCR 对核酸多态性的检测是目前最常用的方法^[12], Thermo 公司(原 Invitrogen 公司)拥有设计完善的针对迄今为止发现的单核苷酸多态性的探针。由于序列近似度高, 探针设计常是 qPCR 检测核酸多态性的难点, 对于其他方法, 如芯片法, 是一样的。在实践中发展出了许多增强核酸特异性的方法, 如包括小沟结合物 MGB(minor groove binder)、LNA(locked nucleic acids)等的加入, 以及分子信标等等, 但在现实中探针的交叉扩增活性(cross-reactivity)仍然广泛存在^[13]。我们的研究表明, Thermo 公司设计的针对 rs6983267 的核酸探针具有交叉活性反应^[13]。因此, 核酸特异性的检测包括单核苷酸多态性, 都是基于与对照实验的比较, 并且必须大样本数据才有效(qPCR 方法要求至少样本数大于 20)。然而, 在生物医学中常常会遇到对某个个体的核酸多态性分型的确定(定性)甚至定量, 依照传统的 qPCR 或芯片方法无法实现。

与 qPCR 的定量原理不同, dPCR 方法是基于对核酸无限稀释的单分子检测技术^[14], 进而利用泊松分布计算核酸的含量^[2-3]。这样 dPCR 具有了区别于 qPCR 的独有优势, 即可以通过区分荧光值来检测核酸^[15-19]。dPCR 的不足是现行的商业化产品最多只有 2 个通道, 无法实现多样本的同时检测。有报道利用 dPCR 实现多样本检测的技术, 但涉及到精密调节探针以及引物的浓度^[15]。因此, 在双通道产品条件下实现多样本的同时检测是 dPCR 的应用

瓶颈。

与传统 qPCR 不同, 基于单分子的 dPCR 技术可以区分微小的荧光值的差异。对于 dPCR, 探针的交叉活性反应可以成为优势, 我们曾报道利用探针交叉活性反应来改善 ddPCR(droplet digital PCR)的定量^[13]。在本研究中我们设计了针对 rs6983267 的探针, 结果表明, 与 Thermo 公司的产品相比, 我们的探针特异性相对更强^[13]。更为重要的是, 我们设计的探针具有不同程度的探针特异性: T 探针的特异性要好于 G 探针, 即 T 探针只针对 T 模板有阳性反应, 而 G 探针对 G 与 T 模板都有反应(图 2, 3)。探针的特异性程度有差异, 这样也方便了研究探针交叉活性反应的有无对 ddPCR 实验的影响。

本研究设计了 3 个探针(图 1)。基于图 1a 的实验设计, 由于参照探针(R-probe)与 G 探针(G-probe)标记相同。这样, 理论上 G 模板的阳性点群出现双倍荧光值, 而 D 点群由于只与 R-probe 结合, 所以荧光值为 1 倍(图 2b)。这样实现了基于荧光差异的核酸检测; 这也是传统的增加 dPCR 多样品检测的通用方法: 依靠荧光信号的叠加倍增。然而, 传统的通用方法有两个弊端: a. 空间是有限的, 单纯的倍增信号是不现实的, 特别是对多态性的检测; b. ddPCR 普遍存在着“rain”现象^[9], 这与实验反应优化程度以及终点法策略有关, 因此在现有条件下是无法克服的。“rain”的出现影响了核酸的定量与定性。图 2a 显示在本底荧光点群与 G 点群之间出现了连续的“rain”, 这可能会遮盖含量过低的 D 点群。图 1b 展示了另外一种策略, 参照探针(R-probe)与 T 探针(T-probe)标记相同。这样 D 点群就出现在 Y 轴上; 而由于 G-probe 的交叉活性反应, T 点群出现了偏位移(shift), 这样其产生的“rain”并不影响 D 点群, 而且由于偏位移的出现, 也为 D 点群留下了白空间(white space)。

由于偏位移的存在, 为多样品的检测留出了白空间, 这就有效解决了在二维空间多样品同时检测的点群展示问题。这样探针普遍存在的交叉活性反应的缺点在这里可以被利用为“优点”; 我们曾报道利用探针非特异性活性改善 dPCR 定量的思路^[13]。利用探针的交叉活性反应给出的白空间, 可以改善数字 PCR 的数据展示。由图 3 可以看出, 尽管我们探针的 FAM 荧光值低(远低于 Thermo 公司产品^[13]), 但得益于偏位移给出的白空间, 从而

D 点群得以展示(图 3c, d). 这也提示, 利用不同公司的探针标记可能会获得更大的检测容量. 清晰的点群也是双通道 ddPCR 定量的必要条件.

综上, 本研究利用探针的交叉活性反应实现了多样品的同时检测, 相对于信号倍增的方法, 利用探针交叉活性反应更有利于多样品的同时检测, 本研究结果为 ddPCR 的多样品检测应用提供了实验数据.

参 考 文 献

- [1] Redis R S, Sieuwerts A M, Look M P, *et al.* CCAT2, a novel long non-coding RNA in breast cancer: expression study and clinical correlations. *Oncotarget*, 2013, **4**(10): 1748–1762
- [2] Chohade R, Pettapiece-Phillips R, Salmena L, *et al.* Reduced BRCA1 transcript levels in freshly isolated blood leukocytes from BRCA1 mutation carriers is mutation specific. *Breast Cancer Res*, 2016, **18**(1): 87
- [3] 郭升超, 黄斐, 赵瀛, 等. 利用多重数字 PCR 检测 KRAS 相关突变. *复旦学报(医学版)*, 2016, **43**(06): 697–703
Wu S C, Huang P, Zhao Y, *et al.* *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2016, **43**(06): 697–703
- [4] Marx V. PCR: paths to sensitivity. *Nat Methods*, 2014 Feb 27, **11**(3): 241–245
- [5] Qiu M, Xu Y, Yang X, *et al.* CCAT2 is a lung adenocarcinoma-specific long non-coding RNA and pro-motes invasion of non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*, 2014, **35**(6): 5375–5380
- [6] Cai Y, He J, Zhang D. Long noncoding RNA CCAT2 promotes breast tumor growth by regulating the Wnt signaling pathway. *Oncotargets Ther*, 2015, **8**: 2657–2664
- [7] Cui X, Cao L, Huang Y, *et al.* *In vitro* diagnosis of DNA methylation biomarkers with digital PCR in breast tumors. *Analyst*, 2018, **143**(13): 3011–3020
- [8] Cao L, Cui X, Hu J, *et al.* Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosens Bioelectron*, 2017, **15**(90): 459–474
- [9] Redis R S, Vela L E, Lu W, *et al.* Allele-specific reprogramming of cancer metabolism by the long non-coding RNA CCAT2. *Mol Cell*, 2016, **61**(4): 520–534
- [10] Pomerantz M M, Ahmadiyeh N, Jia L, *et al.* The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer. *Nat Genet*, 2009, **41**(8): 882–884
- [11] Ishimaru S, Mimori K, Yamamoto K, *et al.* Increased risk for CRC in diabetic patients with the nonrisk allele of SNPs at 8q24. *Ann Surg Oncol*, 2012, **19**(9): 2853–2858
- [12] Martínez-Montero S, Deleavey G F, Martín-Pintado N, *et al.* Locked 2'-Deoxy-2', 4'-difluororibo modified nucleic acids: thermal stability, structural studies, and siRNA activity. *ACS Chem Biol*, 2015, **10**(9): 2016–2023
- [13] 蔡文臣, 沈阳丽, 孟晨雪, 等. 基于具有交叉反应活性探针的痕量核酸定量. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, **33**(07): 736–742
Cai W C, Shen Y L, Meng C X, *et al.* *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, **33**(07): 736–742
- [14] Streets A M, Huang Y. Microfluidics for biological measurements with single-molecule resolution. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, **25**: 69–77
- [15] Whale A S, Huggett J F, Tzonev S. Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomol Detect Quantif*, 2016, **10**: 15–23
- [16] Yang W, Shelton D N, Berman J R, *et al.* Droplet Digital™ PCR: multiplex detection of KRAS mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal cancer samples. *BioTechniques*, 2015, **58**(5): 205–206
- [17] Oxnard G R, Paweletz C P, Kuang Y, *et al.* Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res*, 2014, **20**(6): 1698–1705
- [18] Findlay S D, Vincent K M, Berman J R, *et al.* A digital PCR-based method for efficient and highly specific screening of genome edited cells. *Plos One*, 2016, **11**(4): e0153901
- [19] Jacobs B K M, Goetghebuer E, Vandesompele J, *et al.* Model-based classification for digital PCR: your umbrella for rain. *Anal Chem*, 2017, **89**(8): 4461–4467

Assessment of Quality of Tri-allelic Polymorphism Compassing rs6983267 Based on Droplet Digital PCR Taking Advantage of Probe Cross-reactivity*

SHEN Yang-Li, SUN Hao, CAI Wen-Chen, ZHANG Pin-Zheng, WANG Xu-Ying,
SHANG Yu-Han, SHI Lu, XIN Qian-Qian, GUO Zhi-Yi**

(Medical Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

Abstract The detection of nuclear acid polymorphism has an important role in basic research and clinical application. The popular methods are PCR based on probe. Probe with cross-reactivity limits the application of traditional real-time quantitative PCR to quantitate allelic transcripts. Digital (d)PCR may overcome cross-reactivity defects, but available dPCR machines lack discrete optical channels, which limits the detection of more than two molecules. Colon cancer associated transcript 2 (CCAT2) is a non-coding transcript, encompassing rs6983267 SNP site. Here, we report a method based on two channels droplet digital PCR to quantitate three CCAT2 polymorphisms in one reaction. We designed a pair of primers and three hydrolysis probes including a reference and two competing probes. We successfully discriminated between the three CCAT2 transcript clusters. We took advantage of the cross-reactivity to provide a white space for more visible distinct clusters, although innate rain was detected. Labelling the reference probe with cross-reactivity probe resulted in more distinct clusters than the probe without cross-reactivity.

Key words digital PCR, nucleotide acid polymorphism, cross-reactivity probe, rs6983267

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0190

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31050010), The Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry([2015]No.311), Selected Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars by Hebei Government(C201400358) and NCST Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (X2015052, X2016121).

**Corresponding author.

Tel: 86-315-8816237, E-mail: guozhiyi@ncst.edu.cn

Received: July 9, 2018 Accepted: August 21, 2018