

# 双链探针同步荧光技术快速筛查 C282Y 点突变

张永有,李庆阁,栾国彦,梁基选

(厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,厦门 361005)

**摘要:**以荧光染料 Fam 和 Joe 分别标记野生型和突变型双链探针作为均相检测探针,以构建的 DNA 模板作为研究模型,采用固定波长差同步荧光分析法对 PCR 反应产物进行终点检测。通过对 HFE 基因 C282Y 点突变的检测,并以限制性内切核酸酶 Rsa I 证实,该方法是一种廉价、快速、可靠的筛查遗传性血色病基因 C282Y 突变的方法,该法可扩展到各种基因的突变检测。

**关键词:**遗传性血色病;双链探针;同步荧光;基因突变筛查

中图分类号:Q3-3

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)01-0009-05

## Screening C282Y Mutation with Double-Stranded Probes Using Synchronous Fluorometry

ZHANG Yong-You, LI Qing-Ge, LUAN Guo-Yan, LIANG Ji-Xuan

(The Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering of The Ministry of Education,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract:** We described in the paper a new high-throughput screening method for Cys282Tyr mutation in hereditary haemochromatosis with double-stranded probe using synchronous fluorometry. The probe for wild type was labeled with Fam, the probe for mutant type was labeled with Joe. After PCR, reaction tubes were transferred to a spectrofluorometer, where synchronous spectra were scanned in a constant-wavelength mode. The genotype could be obtained through the appearance of the fluorescence peaks corresponding to each probe. The results were totally in agreement with restriction endonuclease analysis. Considering the simplicity, low cost and specificity, this approach could be generally applied to detect varieties of gene mutations.

**Key words:** haemochromatosis; double-stranded probe; synchronous fluorometry; mutation screening

遗传性血色病 (hereditary haemochromatosis, HH) 系 HLA 相关性遗传疾病, 病因在于基因突变引起一种主要组织相容复合物 (MHC) I 型样蛋白分子异常表达, 造成胃肠黏膜过量吸收铁, 引起铁过量沉积于肝、心、胰腺等脏器的实质细胞, 最终导致受累器官的组织细胞坏死、损伤、纤维化和功能异常。早期治疗可使肝和心脏等器官损害逆转, 并在数月或几年内消除体内铁过量沉积, 使 5~10 年生存率

达 70% 左右。但若治疗过晚或治疗不彻底, 患者往往会死于心肌病变、肝硬化、糖尿病和原发性肝癌<sup>[1]</sup>。因此, 建立针对 HH 的早期筛查技术对 HH 的防治具有重要意义。

HH 的候选基因为 HFE<sup>[2]</sup> (haemochromatosis gene, HFE), HFE 基因主要可发生两种错义突变: Cys282Tyr 和 His63Asp, 其中 83% 的典型遗传性血色病表型为 Cys282Tyr 突变纯合子, 4% 的患者

收稿日期: 2002-03-27; 修回日期: 2002-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170834) 资助

作者简介: 张永有 (1978-), 男, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物分子生物学

通讯作者: 李庆阁 (1966-), 男, 副研究员, 研究方向: 发光分子诊断。Tel: 0592-2187363; E-mail: qgli@xmu.edu.cn

为混合性杂合子,筛查 Cys282Tys 突变是目前检测 HFE 的主要手段。已经报道的检测方法有限制性内切核酸酶分析方法<sup>[2]</sup>、单链构象多态性分析<sup>[3]</sup>、寡核苷酸连接酶分析<sup>[4]</sup>、位点特异性 PCR (ARMS-PCR)<sup>[5]</sup>及位点特异性寡核苷酸杂交法<sup>[6]</sup>等。这些方法需要电泳等烦琐的后处理过程,操作复杂,不适于大量筛查。新近发展起来的实时荧光 PCR 技术<sup>[7]</sup>,操作简便。鉴于所用的 Taqman 探针特异性较差,在探针上引入了 MGB(小沟结合物),虽使探针特异性提高,但探针的设计难度和合成成本大大增加,加上实时荧光 PCR 仪器昂贵,限制了其广泛应用。最近我们提出了一种新型的荧光探针——双链探针<sup>[8]</sup>。双链探针设计简单、成本低廉,特异性可通过改变两条寡核苷酸相差的碱基数进行灵活控制。我们采用双链探针技术,设计了识别突变型和野生型的特异双链探针,分别标记不同颜色的荧光基团,采用终点测定方式,在常规扩增仪上完成 PCR 后,在荧光光度计进行同步荧光扫描,一次扫描即可判断基因型,为 HH 的高通量筛查提供了简便可靠的手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 DNA 模板

C282Y 突变型及 C282Y 杂合型的 DNA 模板由本实验室构建保存。HL-60 细胞 DNA 由厦门大学微生物实验室赠送。5 人份的头发标本由本实验室志愿者提供。

#### 1.1.2 试剂

Rsa I 限制性内切酶、pUC19-Msp I (Hap II) Marker、Taq DNA 聚合酶及 DNA 扩增试剂购自上海生工生物工程公司;引物及探针由上海申友生物有限公司合成;Triton X-100、NP-40、Tween-20 及蛋白酶 K 购自 Promega 公司;头发标本 DNA 模板提取液为 70mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 含 2mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1% Triton X-100、0.45% NP-40 及 0.45% Tween-20 和 0.2 mg/mL 蛋白酶 K(蛋白酶 K 配制成 10 mg/mL 的母液,使用前加入)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物、双链探针及合成的靶序列

参照 Feder 等<sup>[2]</sup>设计引物 P1 和 P2 扩增 HFE 基因外显子 4 上含有 C282Y 位点的一段 390 bp 的片段。

野生型双链探针由 P3 + P4 构成,突变型双链探针由 P5 + P6 构成。将双链探针的两条链均用 TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解成 50 μmol/L 的溶液后,等体积混合。在 PTC-100<sup>TM</sup> PCR 仪上,94 变性 2 min,52 复性 5 min,然后自然冷却至室温,即制成双链探针溶液。

表 1 引物、探针及靶序列

Table 1 SNP primers, probe sequences and synthetic target oligonucleotides

| 名称   | 编号  | 核苷酸序列   |
|------|-----|---|
| 反向引物 | P1  | 5' - CTCAGGCACTCTCTCAACC - 3'                                     |
| 正向引物 | P2  | 5' - TGGCAA GGGTAAACA GATCC - 3'                                  |
| 野生型  | P3  | 5' - Fam - AGATATACGTGCCAGGTGGAG - PO <sub>4</sub> - 3'           |
| 双链探针 | P4  | 5' - CCACCTGGCAGTATATCT - 3' - Dabeyl                             |
| 突变型  | P5  | 5' - Joe - AGATATACGT <u>Δ</u> CCAAGGTGGAG - PO <sub>4</sub> - 3' |
| 双链探针 | P6  | 5' - CCACCTGGTACGATATATCT - 3' - Dabeyl                           |
| 野生型  | P7  | 5' - CTCCACCTGGCAGTATATCT - 3'                                    |
| 靶序列  | P8  | 5' - AGATATACGTGCCAGGTGGAG - 3'                                   |
| 突变型  | P9  | 5' - CTCCACCTGGTACGATATATCT - 3'                                  |
| 靶序列  | P10 | 5' - AGATATACGT <u>Δ</u> CCAAGGTGGAG - 3'                         |

注:下划线表示碱基为突变位点。

#### 1.2.2 杂交变温曲线分析

为考察双链探针可否用于区分 C282Y 单碱基突变,我们对合成的野生型和突变型寡核苷酸靶序列(单链或双链)进行杂交变温曲线分析。在 50 μL 反应液(10 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0) 含 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 中加入 1 μmol/L 探针和 2.5 μmol/L 靶序列。反应程序为:94 1 min 后,37 个循环(每个循环 94 变性 30 s,复性温度依循环数从 72 降至 35),利用 Rotorgene-2000 实时荧光 PCR 记录退火时的荧光强度。

#### 1.2.3 PCR 反应

50 μL PCR 反应液中含 10 ×buffer 5 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5 μL,dNTPs 200 μmol/L,双链探针各 100 nmol/L(注:用于酶切分析的 PCR 反应不加探针),2 U Taq 酶,DNA 模板 1 μL(约 100 ng/μL)(其中人发标本 DNA 模板的制备参见文献<sup>[9]</sup>),反应条件:94 变性 5 min,循环周期为 94 30s,54 45 s,72 30 s,40 个循环。

#### 1.2.4 PCR 产物的酶切检测

在 30 μL 未加双链探针 PCR 反应产物中,加入 10 ×酶切缓冲液 1 μL,10 U/μL 的限制酶 1 μL,37 45min,50 45min,用 3% 的琼脂糖凝胶电泳

分析结果。

### 1.2.5 PCR 反应产物的同步荧光法检测

取 50  $\mu$ L 的 PCR 反应产物,用 45  $\mu$ L 微量液池在 Cary Eclipse 荧光分光光度计上进行固定波长差同步荧光扫描,波长差为 15 nm,狭缝为 5 nm,电压 400 V,扫描波长范围 450 nm ~ 600 nm。

## 2 结 果

### 2.1 双链探针的杂交变温曲线

从图 1 的杂交变温曲线图中可以看出所设计的双链探针能够很好地区分 C282Y 单碱基突变,特别是在 PCR 复性温度附近范围内。

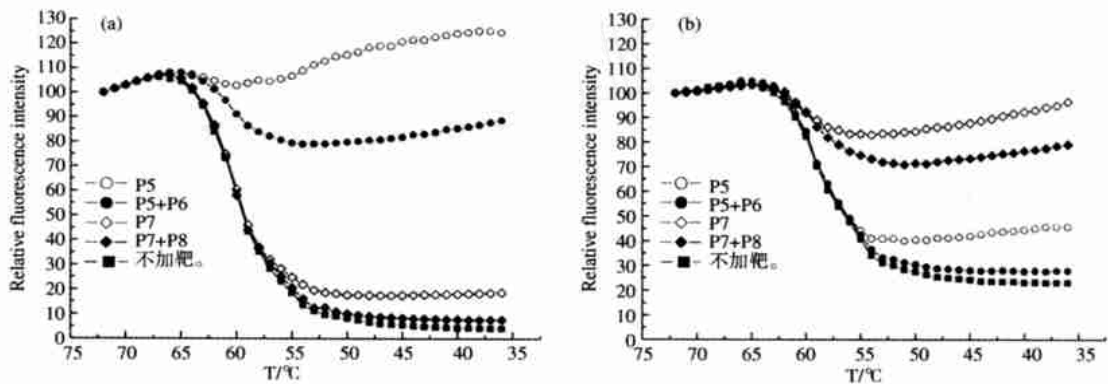


图 1 双链探针与不同靶序列的杂交变温曲线

(a) 野生型探针; (b) 突变型探针。

Fig. 1 The hybridization denaturation curves of double-stranded probes in the presence of different targets

(a) wild-type probe; (b) mutant-type probe.

### 2.2 DNA 模板的酶切鉴定

野生型模板的 PCR 反应产物为 390 bp, 含有一个 *Rsa* I 突变位点, 经 *Rsa* I 消化后产生两个片段: 250 bp 和 140 bp 两个片段; 突变型模板的 PCR 反

应产物同为 390 bp 由于突变位点上产生一个新的 *Rsa* I 的识别位点, 经 *Rsa* I 消化后, 产生 250 bp、111 bp 和 29bp 3 个片段。酶切结果如图 2(a) 所示, 与预期结果一致。

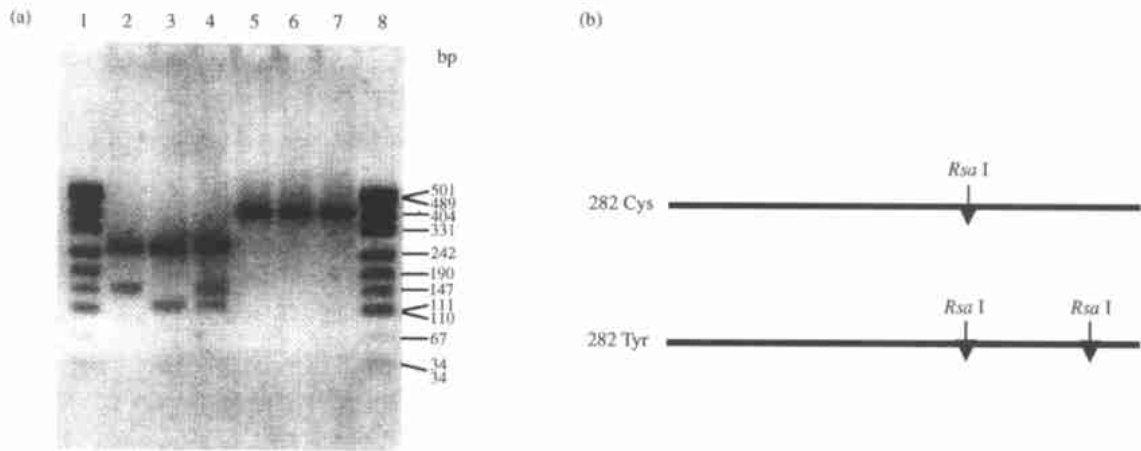


图 2 PCR 产物及其限制酶 *Rsa* I 酶切电泳分析(a)和 C282Y 突变限制酶 *Rsa* I 分析原理图(b)

1 和 8: pUC19-*Msp* I (*Hap* II) 标准(bp); 2: 野生型酶切产物; 3: 突变型酶切产物; 4: 杂合型酶切产物; 5~7: 相应的未酶切 PCR 产物。

Fig. 2 HH C282Y mutation detection by PCR-RFLP analysis (a)

and the schematic drawing of HH C282Y mutation analysis based on PCR-RFLP (b)

Lane 1 and 8: pUC19-*Msp* I (*Hap* II) Marker (bp); 2: Homozygous wild-type digested by *Rsa* I; 3: Homozygous mutant-type digested with *Rsa* I; 4: Heterozygous mutant-type digested with *Rsa* I; lane 5 ~ 8, corresponding PCR products with no *Rsa* I digestion.

### 2.3 同步荧光法检测 C282Y 突变

用经限制酶鉴定后的野生型、突变型及杂合型模板进行 PCR,产物用固定波长差同步荧光扫描分析,结果如图 3(a)。图中 Fam 标记的探针指示野生型(波长位置 501 nm),Joe 指示突变型(波长位置

530 nm),根据两者组成的光谱图判断基因型。我们对构建的模板、人发 DNA 标本及 HL-60 细胞 DNA 各 5 份样品进行了检测,结果与限制酶分析方法一致(图 3(b))。

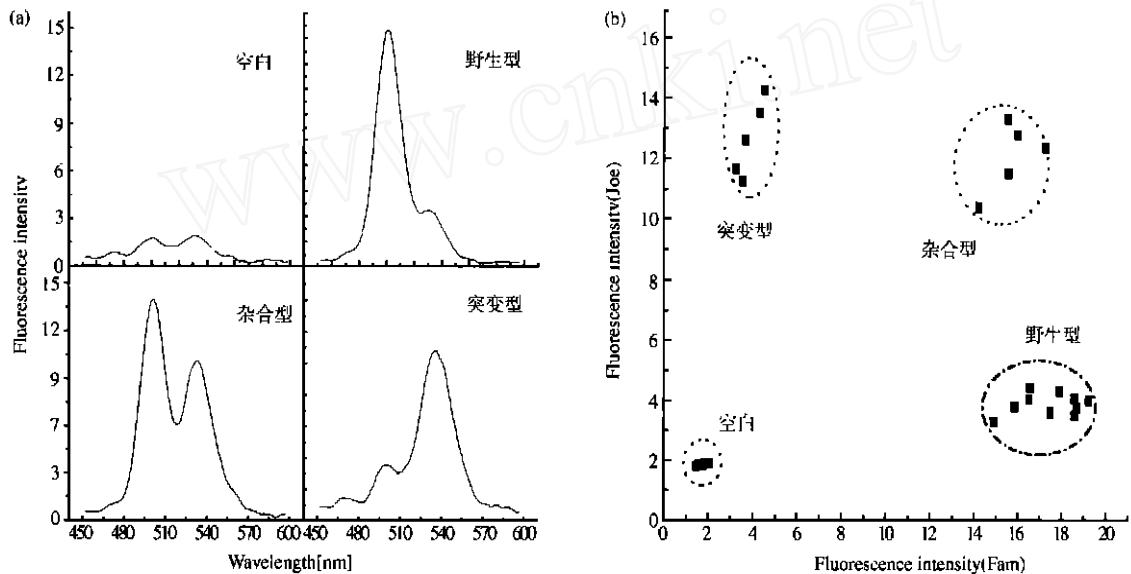


图 3 PCR 产物同步荧光法分析(a)及同步荧光法基因型(b)

样品包括 5 份 HL-60 细胞、5 份突变型模板、5 份杂合型模板、5 份野生型模板、5 份人发标本和 5 份阴性对照。

Fig. 3 Synchronous fluorometry analysis. (a) and spectral genotyping with synchronous fluorometry (b)

Samples include five homozygous mutants, five heterozygous, five hair samples (homozygous wide-types) and five negative controls.

## 3 讨 论

固定波长差同步荧光扫描法是“终点式”测定方法,即在 PCR 完成后,移至荧光光度计上扫描检测。由于检测步骤在室温完成,要求探针必须在室温时能够区分野生与突变靶。从杂交变温曲线图可以看出,设计的双链探针能很好地区分 C282Y 单碱基的突变,具有很高的特异性。但在低温时,双链探针特异性有所下降,这与所设计的双链探针的长短两条链相差 2bp 有关。因为双链探针的特异性与其长短两条链相差的碱基数有关,碱基数相差越多,特异性越低<sup>[8]</sup>。如果将长短两条链设计成相差 1bp 或等长,相信特异性会越高。从同步荧光法分析结果图还可以看出,由于所选用的两种标记染料(Fam 和 Joe)的荧光光谱有一定的重叠,造成其同步荧光也有一定的干扰。选择适当的标记染料这种干扰完全可以消除。从分型结果看,上述两种情况并不影响

分型结果判断。

采用终点而非实时测定方式的考虑是,实时检测能提供准确的定量信息,而基因分型仅需定性判断即可。对终点测定的要求是能够对两种以上的荧光物质快速检测,采用同步荧光可以很好地满足这一要求。同步荧光的优点是使光谱简化和特征化,可有效减少共存组分的干扰,特别适用于多组分同时测定<sup>[10]</sup>。我们采用的固定波长同步荧光扫描技术是同步荧光技术中最简单的一种,常规荧光分光光度计一般都具备该功能。实际上,同步荧光分析法还有多种扫描技术,即使严重重叠的光谱也可以进行有效的分离<sup>[11]</sup>。由于分布在从近紫外、可见到近红外的各个波段的荧光标记染料都已商业化,标记染料选择十分方便。我们预期配合各类同步技术,有望进一步增加测定对象,实现对多个突变的同时检测。

双链探针同步荧光分析技术适用于已知突变位点的检测和基因分型,而不适用于未知突变的检测,

使用该方法应特别注意探针的特异性以及标记荧光染料的选择。探针的特异性除与探针序列本身有关外,也与双链探针两条链的长度差有关,两者相差越小,特异性越高。另外选择的荧光染料的相对荧光效率应尽可能一致,以保证荧光强度尽可能接近。另外,荧光染料的同步荧光光谱应尽可能分开以减少荧光的重叠干扰。本文的结果表明,采用一般的 PCR 仪器和荧光测量仪器,即可建立一种快速的基因突变检测技术。利用双链探针的单碱基识别能力和同步荧光测定技术,有望建立一种高通量的基因分析新技术。

### 参考文献(References):

- [1] 徐克成,江石湖. 消化病现代治疗[M]. 南京:江苏科技出版社, 1993,349~354.
- [2] Feder J N, Gnirke A, Thomas W, *et al.* A novel MHC class Flike gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis[J]. *Nat Genet*, 1996, 13(4): 399~408.
- [3] Bosserhoff A K, Seegers S, Hellerbrand C, *et al.* Rapid genetic screening for haemochromatosis using automated SSCP-based capillary electrophoresis (SSCP-CE) [J]. *Biotechniques*, 1999, 26(6): 1106~1110.
- [4] Liang Q, Davis P A, Thompson B H, *et al.* High-performance liquid chromatography multiplex detection of two single nucleotide mutations associated with hereditary haemochromatosis [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 754(1): 265~270.
- [5] Baty D, Terron K A, Mechan D, *et al.* Development of a multiplex ARMS test for mutations in the HFE gene associated with hereditary haemochromatosis[J]. *J Clin Pathol*, 1998, 51(1): 73~74.
- [6] Willis G, Jennings B A, Goodman E, *et al.* A high prevalence of HLA-H 845A mutations in haemochromatosis patients and the normal population in eastern England [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 1997, 23(2): 288~291.
- [7] Walburger D K, Afonina I A, Wydro R. An improved real time PCR method for simultaneous detection of C282Y and H63D mutations in the HFE gene associated with hereditary haemochromatosis[J]. *Mutat Res*, 2001, 432(3~4): 69~78.
- [8] Li Q, Luan G, Guo Q, *et al.* A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(2): E5.
- [9] 林万明,杨瑞馥,黄尚志,等. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社, 1995, 454~456.
- [10] Lee L G, Livak K J, Mullah B, *et al.* Seven-color, homogeneous detection of six PCR products [J]. *Biotechniques*, 1999, 27(2): 342~349.
- [11] Li Y Q, Huang X Z, Xu J G, *et al.* Rapid simultaneous analysis of 1-naphthol and 2-naphthol in water samples by derivative variable-offset synchronous fluorescence spectroscopy [J]. *Talanta*, 1994, 41(5): 695~701.

## 2002 年中国主要生物学期刊的影响因子排名

[本刊讯] 2002 年 12 月,中国科技信息研究所公布了《2002 年版中国科技期刊引证报告》。根据对 1447 种统计源期刊 2001 年资料的统计,报告了各刊的影响因子、总被引频次、来源文献量等评价指标。现将主要生物学期刊的排名情况予以转载,供读者参考。

| 位次 | 期刊名称          | 影响因子  | 总被引频次 | 来源文献量 | 参考文献量 | 平均引文率 | 平均作者数 | 地区分布数 | 机构数 | 国际论文比 | 基金论文比 |
|----|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|
| 1  | 植物学报          | 0.865 | 1861  | 226   | 4757  | 21.05 | 4.40  | 18    | 56  | 0.08  | 0.88  |
| 2  | 生物化学与生物物理学报   | 0.860 | 623   | 128   | 2103  | 16.43 | 4.55  | 17    | 57  | 0.06  | 0.86  |
| 3  | 植物生态学报        | 0.791 | 826   | 117   | 2561  | 21.89 | 3.33  | 22    | 49  | 0.09  | 0.94  |
| 4  | 动物学报          | 0.690 | 727   | 121   | 2181  | 18.02 | 3.57  | 20    | 56  | 0.06  | 0.84  |
| 5  | 遗传学报          | 0.662 | 747   | 160   | 2655  | 16.59 | 5.24  | 22    | 52  | 0.04  | 0.96  |
| 6  | 植物生理学报        | 0.622 | 858   | 87    | 1821  | 20.93 | 3.59  | 17    | 34  | 0.07  | 0.93  |
| 7  | 生物多样性         | 0.564 | 264   | 69    | 1751  | 25.38 | 3.30  | 18    | 31  | 0.01  | 0.81  |
| 8  | 昆虫学报          | 0.492 | 565   | 96    | 1427  | 14.86 | 3.38  | 19    | 47  | 0.02  | 0.84  |
| 9  | 中国生物化学与分子生物学报 | 0.490 | 555   | 157   | 1958  | 12.47 | 4.98  | 20    | 80  | 0.05  | 0.81  |
| 10 | 生物工程学报        | 0.487 | 393   | 161   | 2220  | 13.79 | 4.16  | 19    | 64  | 0.04  | 0.71  |
| 11 | 动物学研究         | 0.448 | 338   | 95    | 2189  | 23.04 | 3.48  | 23    | 40  | 0.06  | 0.84  |
| 12 | 遗传            | 0.447 | 397   | 142   | 2496  | 17.58 | 4.08  | 26    | 94  | 0.04  | 0.73  |
| 13 | 微生物学报         | 0.443 | 470   | 133   | 1737  | 13.06 | 3.86  | 18    | 54  | 0.03  | 0.81  |
| 14 | 水生生物学报        | 0.441 | 481   | 109   | 1386  | 12.72 | 3.29  | 17    | 46  | 0.02  | 0.97  |
| 15 | 应用与环境生物学报     | 0.437 | 206   | 128   | 1742  | 13.61 | 3.97  | 23    | 70  | 0.03  | 0.79  |