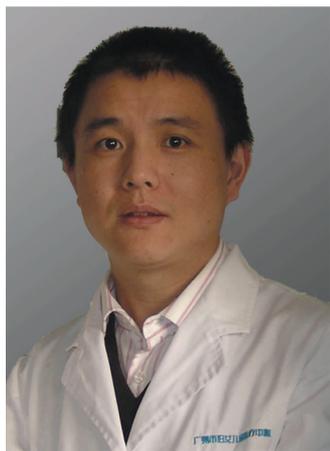


# 高分辨率熔解曲线分析:一种新的用于遗传病基因突变筛查的技术

李东至

(广州市妇女儿童医疗中心 产前诊断中心,广东 广州 510623)



李东至,1971 年生,妇产科博士,主任医师,硕士研究生导师。2000 年毕业于上海第二医科大学。现在广州市妇女儿童医疗中心(广州市妇婴医院)产前诊断中心。研究方向为遗传疾病的分子诊断及产前诊断。负责遗传咨询、产前诊断手术取材以及遗传疾病的分子诊断及相关基础研究。获省科技进步二等奖 1 次,市科技进步一等奖 1 次,在国外杂志发表论文 40 余篇。

目前,DNA 碱基变异如突变或单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的检测方法有 2 种:一是针对特定的位点合成序列特异性探针,如 Taqman 探针法、位点特异寡核苷酸分析、反向斑点杂交及基因芯片等,用于检测已知突变;二是以核酸的物理性质为基础的检测方法,如变性-高效液相层析、单链构象多态性、变性梯度凝胶电泳、温度梯度凝胶电泳及构象敏感凝胶电泳等,此类方法可用作突变筛查,但无法明确突变性质。这 2 种方法在应用上有其局限性,如成本高、操作繁琐、耗时、以及相对低通量。DNA 测序是突变/SNP 检测的金标准,但不适于大规模突变筛查和流行病学研究。2002 年犹他大学和爱德华科技公司合作开发出突变/SNP 检测分析的一项新技术—高分辨率熔解曲线分析(high resolution melting, HRM)<sup>[1]</sup>。这种技术不受突变碱基位点与类型的限制,可同时对扩增片段进行未知突变扫描和已知突变的基因分型。因其操作简便、快速、高通量、低成本和真正实现了闭管操作而受到普遍的关注,成为近年来兴起的一种高通量突变扫描和基因分型技术。

## 1 HRM 原理

通过 PCR 反应扩增出目的基因的双链 DNA 片段,向反应产物中加入荧光染料,这种染料只结合双链 DNA 而不结合单链 DNA。然后通过加热物理变性,在升温的过程中 DNA 双链会逐渐打开,这样结合的荧光染料会越来越来少。如果相机连续动态拍摄解链过程,并将接收到的逐渐减弱的荧光信号通过计算机软件转换成一条曲线,这条曲线就是熔解曲线。当 PCR 扩增片段存在突变/SNP 时,扩增产物经过变性-陡然复性形成异源双链,异源双链中突变/SNP 位点因不匹配使双链 DNA 在升温过程中提前解开,从而与正常样本熔解曲线区分开来。实际上,由单个碱基改变引起的解链温度差异可能不到 1℃。因此,HRM 需要精密度高的检测仪器,要求具有很高的温度分辨率。当仪器的温度分辨率达到 0.02~0.3℃/s 时,所绘制的曲线称为高分辨熔解曲线。目前使用的是饱和染料,如 LC Green、LC Green Plus、SYTO 9 和 Eva Green,这类染料有着更强的 DNA 结合能力和更低的 PCR 抑制作用,在配制 PCR 反应液时就可加入,反应完毕后直接送入 HRM 仪进行分析,省略了 PCR 反应后的开盖处理步骤,真正实现了闭管操作。

## 2 HRM 技术优点

2.1 操作简便 在 PCR 反应前加入一种饱和荧光染料,PCR 反应后将 PCR 板转放在高分辨率熔解分析仪器中即可。

2.2 快速、高通量 普通 PCR 反应一般只需 2 小时,熔解分析使用 HR-1 仪器每个样品检测仅需 1~2 分钟;若使用 LightScanner 熔解分析仪,5 分钟内可以得到 96 孔 PCR 板中的全部样品的检测结果。

2.3 低成本 比普通 PCR 反应仅多加一种饱和荧光染料,一般情况下每个样品成本大约 2 元人民币。

2.4 闭管操作 PCR 扩增后直接进行 HRM 分析,不需要对 PCR 产物进行处理,减少污染机会。

## 3 HRM 的应用

HRM 的分辨率高,其敏感度和特异度均优于现有的其他突变扫描方法,适用于检测单碱基突变、小片段插入或缺失。有研究显示应用质粒来验证 HRM 检测单个碱基杂合突变,发现当 PCR 产物小于 400 bp 时,敏感度和特异度均为 100%;PCR 产物长度在 400~1000 bp 时,敏感度和特异度分别为 96.1% 和 99.4%<sup>[2]</sup>。HRM 技术现被广泛应用于突变扫描、基因分型、序列匹配、物种鉴定等。

本院实验室从 2009 年开始应用 HRM 技术,目前常规用于多种单基因病的突变筛查。 $\alpha$ -地中海贫血是我国南方人群的常见遗传病,当夫妇的一方  $\alpha$ -基因是东南亚缺失型(SEA)时,如果另一方携带点突变型  $\alpha$ -地中海贫血,则下一代有 1/4 机会生育非缺失型血红蛋白 H 病患儿。这种情况下需要产前诊断,因非缺失型血红蛋白 H 病患儿多需要输血治疗<sup>[3]</sup>。点突变型  $\alpha$ -地中海贫血在中国人群最常见为血红蛋白 Constant Spring (Hb CS) 和血红蛋白 Quong Sze (Hb QS),靠一般的地中海贫血筛查方法(血常规、血红蛋白分析)无法识别,确诊需要分子诊断<sup>[4]</sup>。既往使用反向点杂交技术或直接测序技术检测 Hb CS 和 Hb QS,现已被 HRM 技术替代,检测敏感性和特异性均为 100%<sup>[5,6]</sup>。由于这 2 种点突变只占人群的 0.3%,先经 HRM 扫描,只对熔解曲线阳性者进一步采用其他分子诊断方法证实,大

大减轻了 DNA 测序压力。

应用 HRM 检测的另外一种遗传病是致死性软骨发育不良 I 型(thanatophoric dysplasia type 1, TD 1)。TD 1 多在妊娠中晚期被产前超声检查发现,表现为长骨短小、肋骨短、胸廓狭窄等,多为新生基因突变所致。但 TD 1 至少需要与数十种骨骼系统发育异常的疾病相鉴别,它们在超声表现上有相似之处。TD 1 是由 FGFR3 基因突变引起,目前至少已发现 11 种突变类型,其中 p. R248C 突变最常见,经研究发现,中国人 TD 1 病例几乎都检测到 p. R248C 突变<sup>[7]</sup>。在 p. R248C 突变的检测上,以往应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)、限制性内切酶分析(RFLP)和直接测序等方法进行基因诊断。但这些突变检测方法存在操作繁琐、费用高、诊断周期长等缺点。应用 HRM 扫描检测 p. R248C 突变的敏感性和特异性均为 100%<sup>[8]</sup>。因此,对常规产前超声检查疑为 TD 1 的病例,临床上在产前取材排除染色体疾病的同时可行基因诊断,以便尽早明确诊断,协助临床处理。HRM 可用于 FGFR3 基因 p. R248C 突变的快速基因检测。

此外,还将 HRM 技术应用于其他遗传疾病如血友病、成骨发育不全等的突变扫描。这些致病基因往往包含数十个外显子,若采用常规 DNA 测序来检测基因突变,工作量和成本很大。先通过 HRM 突变扫描,针对异常的外显子进行测序确证,将达到事半功倍的效果。

## 4 HRM 缺点

4.1 对 PCR 反应、熔解仪器、荧光染料要求较高 由于双链 DNA 的熔解动力学受到很多因素的影响,比如 DNA 模板质量、镁离子含量、缓冲液组成等,所以 HRM 要求 DNA 样品由同一种方法提取,经纯化使 DNA 样品浓度一致。对引物及扩增片段要求高,常需反复实验,验证是否适用于 HRM。熔解仪器要求非常高的温度精密度和温度均一性。荧光染料不影响 PCR 反应且能饱和结合双链 DNA。

4.2 突变扫描不能精确区分扩增片段中的不同杂合突变 有时不同的杂合突变导致相似的熔解曲

线,需进一步经混样法区分,或小片段法、非标记探针法、Snapback 探针法进行基因分型提高分辨率。

4.3 PCR 扩增产物的长度受到限制 随着扩增片段的增加,其敏感性及特异性降低。

### 5 结论

HRM 是当前最好的一种高通量突变扫描和基因分型技术。如果操作得当,可以减少 95%~99% 的测序工作量。HRM 对 PCR 产物无损伤性,如果 HRM 鉴定样本(基因分型和序列匹配)失败,可使用原样本测序进一步鉴定,对结果无影响。可以设想,随着染料和仪器的更新,这项技术还将继续迅速发展,在医学领域发挥更多的作用。

#### 参考文献

[ 1 ] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen [J]. Clin Chem, 2003,49:853-860.

[ 2 ] Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-

nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis [J]. Clin Chem,2004,50:1748-1754.

[ 3 ] Li DZ, Liao C. A case of transfusion-dependent nondeletional Hb H disease undiagnosed during prenatal screening for thalassemia [J]. Prenatal Diagnosis,2008,28:165-166.

[ 4 ] Li DZ. Prenatal Control of Hemoglobin H Disease: is it Possible[J]? Pediatric Hematol Oncol, 2011, 28: 86-88.

[ 5 ] Li R, Liao C, Li D, et al. High-resolution melting analysis of the three common nondeletional  $\alpha$ -thalassemia mutations in the Chinese population: Hbs Constant Spring, Quong Sze and Westmead [J]. Hemoglobin, 2010,34:587-593.

[ 6 ] Liu YN, Li R, Li J, et al. Rapid identification of hemoglobin Quong Sze mutation using high-resolution melting analysis [J]. Int J Lab Hematol, 2011,33(3):5-6.

[ 7 ] Yang Y, Li DZ. FGFR3 gene mutations in Chinese cases of thanatophoric dysplasia type 1 [J]. Fetal Diagn Ther, 2009, 26:90-92.

[ 8 ] Liu YN, Li R, Li DZ. Genotyping of the C742T mutation of the FGFR3 gene causing type 1 thanatophoric dysplasia by high-resolution melting analysis [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011,24:186-188.

读者 · 作者 · 编者

### 《中国产前诊断杂志(电子版)》2011 年选题计划

1. 超声技术在产前诊断中的应用;
2. 胎儿医学实践与进展;
3. 出生缺陷的三级预防;
4. 无创性产前诊断技术。

# 欢迎来稿 欢迎订阅

地址:上海市长乐路 536 号中国产前诊断杂志编辑部(200040)  
 电话:021-54030916 网上投稿:CJPD2008@gmail.com