

# 利用 LightCycler® 480 系统

## 进行高性能熔解曲线分析的新方法

Michael Hoffmann\*, Jochen Hurlbaeus, Christian Weilke

罗氏诊断科学部, 匹兹堡, 德国

\*联系作者: michael.hoffmann@roche.com

罗氏诊断应用科学部的 LightCycler® 系列实时荧光定量 PCR 系统为基因的突变研究提供了一个快速、准确和多样化的检测平台。LightCycler® 系统的创新设计使其具备了进行高性能熔解曲线分析所必须的良好温度均一和卓越的光学特性。LightCycler® 系列最新的 LightCycler® 480 高通量实时荧光定量 PCR 系统更是目前模块 PCR 仪中唯一的具有高分辨率熔解曲线分析功能 (High Resolution Melting, HRM), 可应用于以发现新的突变位点为目标的高分辨率扩增子扫描这一最新研究领域。

### 基于熔解曲线分析的基因变异检测

熔解曲线分析作为一种成熟的研究方法, 可用于扩增子的特性研究 (例如微生物鉴定, 检测突变, 以及单核苷酸多态位点的检测 SNPs)<sup>[1]</sup>。其中 SNP 研究的目的在于发现一个给定 SNP 位点上等位基因中变异; 或是在不明确等位置基因的情况下, 鉴定出未知 SNP 位点的多态位置。凭借模块化的设计概念, 上述两种 SNP 研究方法在这一系统上都是可以轻松实现; 此外 LightCycler® 480 系统广泛的检测模式和便捷数据分析也使得研究变得更加灵活和适用。

纯合子和杂合子样本可以通过使用一种饱和型 DNA 结合染料轻松区分开来, 并显示出清晰的熔解

曲线图谱; 而且即使在有高浓度染料存在的情况下, 也不干扰和妨碍扩增反应的进行 (图 1, 3)<sup>[2]</sup>。对于已知的 SNP 位点, 可采用序列特异性探针针对不同等位基因或含有等位基因的 SNP 位点包含区域的不同的结合力来区分 (图 2)。

熔解曲线原始数据一般用荧光值对温度变化来展示, 使用高分辨率染料的熔解曲线无论是从数据的分辨率, 还是温度范围都要比较使用标记探针的更高 (图 1a, 2a)。为了使分析更方便, 通常采用荧光值对温度的负一阶导数来显示不同熔解温度下的峰值 (图 1b, 2b)。根据熔解曲线峰的数目、位置或综合这两个因素可以区分野生型、纯合突变型以及杂合突变型。利用高分辨率的染料, 熔解峰间的差别是可以被检测到的, 但其区别还未大到能区分纯合子之间的差别 (图 1b), 利用序列特异性探针可以进行更可靠的区分。LightCycler® 480 系统的基因分型软件则可以采用序列特异性探针来进一步确定 SNP 等位基因。

### 发现新的序列变异

从理论上讲由于与潜在多态位点相邻的序列未知, 所以使用序列特异性的探针无法对扩增子进行扫描以发现未知的突变。而现在, 新一代的 DNA 染料的使用

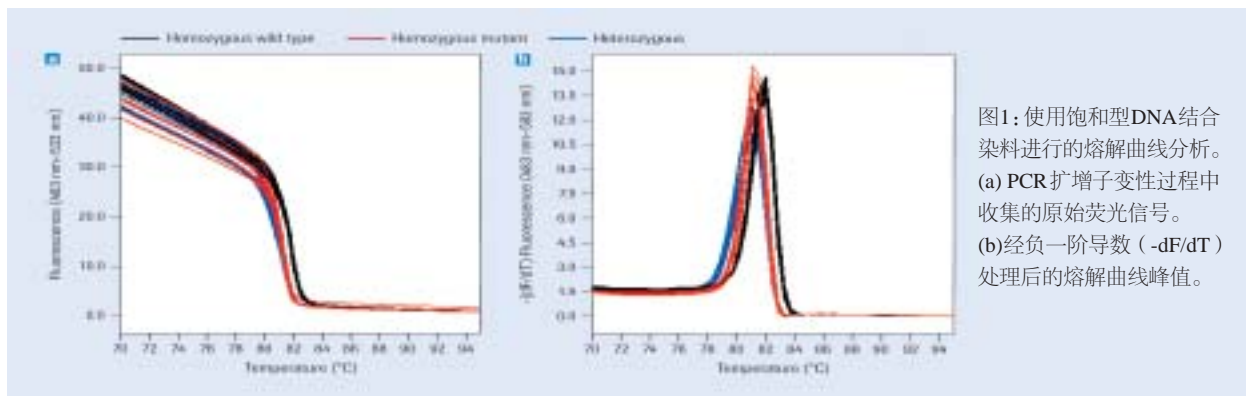
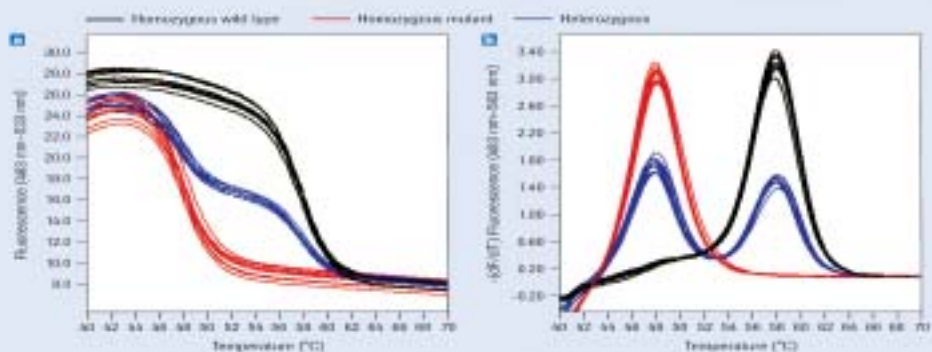


图1: 使用饱和型DNA结合染料进行的熔解曲线分析。(a) PCR 扩增子变性过程中收集的原始荧光信号。(b)经负一阶导数 (-dF/dT) 处理后的熔解曲线峰值。

图2: 使用标记探针检测已知的SNP位点。(a)在含有覆盖多态位点的探针存在的情况下,收集的PCR扩增子变性过程中原始荧光信号。(b)经负一阶导数(-dF/dT)处理后的峰值。靶序列与探针间的不匹配性会导致较低的熔解温度。



用配合 LightCycler<sup>®</sup> 480 系统基因扫描试剂和软件可用以获得到高分辨率的熔解曲线数据。在这样的分析中双倍体中的未知序列变异在杂合子样本中变得很明显,因为相对于来源于纯合子(野生或突变的)样本而言他们具有更加明显不同的熔解曲线形状。LightCycler<sup>®</sup> 480 系统具有高效的温度控制以及光学元件,这使得它成为第一个可应用于上述分析的模块式荧光定量 PCR 系统<sup>[3]</sup>。创新的 LightCycler<sup>®</sup> 480 基因扫描软件通过对数据的标准化(见图 3a 和图 1a 的对比)和温度移动曲线(图 3b)分析出不同的差异。通过分析不同样本间荧光变化可以轻松分别鉴定出其野生型和杂合子型样本(图 3c)。目前该种分析方法已经可以在最新的 LightCycler<sup>®</sup> 480 系统中实现。

### SNP 筛查以及其分析方法

熔解曲线分析是以强大的 PCR 后的生物物理测量为基础,因而比那些单纯靠扩增过程本身得到的信息而产生的突变检测方法具有更多的优势。只需要极少的序列数据信息就可以设计出基因分型检测实验方案,单个反应中可以得到更多的信息,而不需要等位基因特异性的引物或探针,因为同样的染料可用于所有的等位基

因。使用高分辨率染料进行熔解曲线分析比传统的方法比如 dHPLC 更为便捷和具有很高的通量,在不测序或者测序之前进行的扩增子扫描就可以提前发现新的突变位点信息。

### 总结

LightCycler<sup>®</sup> 480 系统提供灵活多样化的发现和分析基因突变平台。凭借其高效的温度控制系统和优秀的光学元件,使得它成为目前唯一一款利用高效熔解曲线分析可进行突变扫描的模块式实时荧光定量 PCR 系统<sup>[3]</sup>。目前罗氏诊断应用科学部针对基因组研究中的基因分型和基因扫描,已经在 LightCycler<sup>®</sup> 480 系统上开发了专门的软件分析模块和优化的即用型的反应混合液等,为研究工作者提供了一套完整的解决方案。

### 参考文献:

1. Von Ahsen N(2005) Clin Chem 51:1761-1762
2. Herrmann MG *et al.* (2006) Clin Chem 52:494-503
3. Dujos V *et al.* In: Tefvik D (ed) Real-Time PCR. Taylor and Francis, Abingdon(2006)

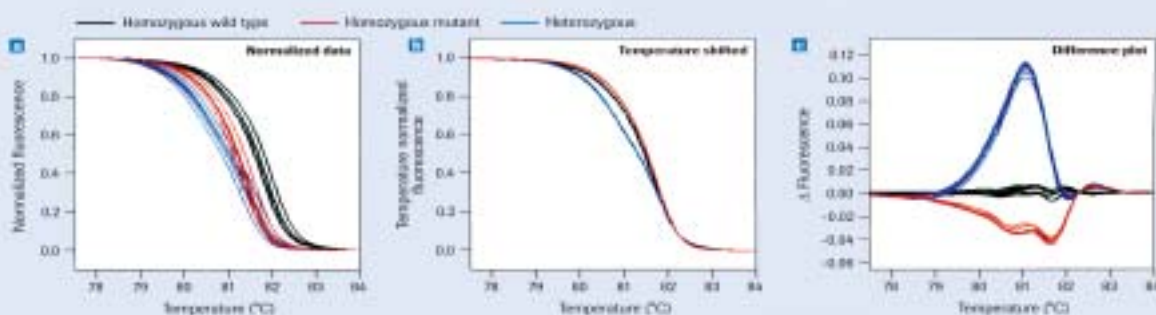


图3: 使用饱和型 DNA 染料进行的高分辨率熔解曲线分析,检测异源突变。(a)图 1a 的数据经荧光信号的归一化处理。(b)图 (a)中的数据经温度座标平移处理(所有曲线调整到同一温度背景)。(c)不同样本和野生型间的荧光差异。