DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.013
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1729-03

论著

胶体金标记/银染信号放大法在寡核苷酸芯片检测人HCM突变中的应用

朱前勇[1,2],李 志[1],陶生策[2],王 栋[2],焦文仓[3],史常旭[1],梁志清[1] ([1]第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038;[2]生物芯片北京国家工程研究中心,北京 100084;[3]第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 验证胶体金标记/银染信号放大法在寡核苷酸芯片检测人肥厚型心肌病(HCM)基因突变中对单碱基错配的灵敏性和特异性。方法 不对称PCR扩增、生物素标记待检测的人β-肌凝蛋白重链基因片断,与构建的低密度HCM寡核苷酸芯片杂交,胶体金标记/银染放大法检测7种HCM恶性突变位点,观察胶体金标记/银染信号放大法对单碱基错配形式的判别率。结果 胶体金标记/银染信号放大法在寡核苷酸芯片中的单硝基突变的平均判别率为16.2,可以鉴别所有的单碱基错配和三碱基缺失。结论 胶体金标记/银染信号放大法代替荧光标记法用于寡核苷酸芯片靶标分子的标记和结果检测,可以区分所有的单碱基错配形式,实现了芯片杂交结果的普通光学显微镜检测,提高了DNA芯片的实用性。

关键词:寡核苷酸芯片;突变检测;胶体金标记/银染放大;原发性肥厚型心肌病
中图法分类号:R446; R446.9; R542.2 文献标识码:A

Detection of known mutations in hypertrophic cardiomyopathy using oligonucleotide microarrays with nanogold particles/silver-stained targets

ZHU Qian-yong[1], LI Zhi[1], TAO Sheng-ce[2], WANG Dong[2], JIAO Wen-cang, SHI Chang-xu[1], LIANG Zhi-qing[1]([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 100080, China)

Abstract: Objective To identify 7 known hypertrophic cardiomyopathy-related mutations in a low-density oligonucleotide microarrays assisted by nanogold particle/silver labelling. Methods The hybridized targets, amplified from 11 plasmids containing wild type or mutation sequences of MYH7 and genomic DNA of a healthy person, were prepared by single-step biotin labeled asymmetric PCR. The signal generated by this method resulted from the precipitation of silver onto nanogold particles was bound to streptavidin. The latter was used for detecting biotinylated targets. Results A total of 6 single base substitutions and a trinucleotide deletion could be identified unambiguously, and the average discrimination ratio (Q_{mut}) for artificial heterozygous samples was as high as 16.2. Conclusion The sensitivity of this method by microscopy is comparable to detection in fluorescence using a confocal scanner. This method is less expensive and versatile.

Key words: microarray; mutation detection; nanogold particle/silver, hypertrophic cardiomyopathy

原发性肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)是导致猝死的常见病因,位于β-肌凝蛋白重链基因(β-mysosin heavy chain, MYH7)的恶性突变占HCM患者的30%~35%,其主要形式是单碱基替代,少数是序列插入或者缺失[1]。用等位基因特异的寡核苷酸芯片(oligo-chip)杂交检测其基因突变,具有高通量和自动化的优势,已渐为人所瞩目[2]。但基因芯片荧光标记法的高昂成本却成为其获得广泛应用的瓶颈。本研究将免疫组织化学中常用的胶体金标记/银染信号放大法和链酶亲合素生物素系统结合,利用人工构建的突变质粒初步验证反应条件后,最终用于寡核苷酸芯片检测MYH7基因突变位点,尝试代替荧光标记法,为寡核苷酸芯片的推广应用建立良好的基础。

1 材料与方法

1.1 寡核苷酸的合成

针对检测MYH7中的7个突变位点所需的点设计、合成所需的点样探针,构建克隆的PCR引物利用Primer 5.0设计。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100201)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100201)
作者简介:朱前勇(1971-),女,河南省平顶山市,博士研究生,主治医师,主要从事产前基因诊断方面的研究,原工作单位:济南军区152医院妇产科。电话:(023)65398457
通信作者:梁志清,电话:(023)68754409
收稿日期:2004-03-28;修回日期:2003-05-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 突变型克隆和野生型克隆的构建及测序

用 QuikChange™ Site-directed Mutagenesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA)试剂盒构建11个含有部分β-肌凝蛋白重链基因序列的克隆并测序确认,其中4个为野生型,7个为突变型(6种单碱基替换和1种三碱基缺失)。

1.3 生物素不对称PCR

分别以质粒和人基因组DNA作为PCR模板,体系组成(50 μl):1× PCR buffer, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 U *Taq* DNA聚合酶(Takara,大连,中国),60 μmol/L Biotin-11-dUTP, 0.5 μmol/L上游引物,0.02 μmol/L下游引物。PE9600 PCR仪中运行如下程序:96 ℃ 3 min;96 ℃ 30 s,61 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,40个循环;72 ℃延伸10 min。

1.4 寡核苷酸芯片的构建

将点样探针溶于50% DMSO水溶液配成终浓度为10 μmol/L的工作液。点样仪PixSys5500将其点样到醛基玻片表面,样品点直径150 μmol/L,相邻样品点的中心距离300 μmol/L。每一种点样探针在同一个方阵中重复点样4次。芯片上点样有常规质控对照及阴性对照。

1.5 芯片杂交和清洗

配制杂交体系:6× SSC(终浓度),0.1% SDS(终浓度)及未经任何纯化的生物素不对称PCR产物1.5 μl。96 ℃变性3 min,将杂交液加至芯片点阵区域,42 ℃杂交2 h。0.1% SDS,2× SSC室温振荡洗涤15 min。超纯水室温振荡清洗2 min,离心甩干。

1.6 胶体金标记和银染信号放大

采用Nanoprobes公司的胶体金及其配套的银染信号放大系统,胶体金为链霉亲和素包被的1.4 nm胶体金颗粒(Nanogold™-Streptavidin, NS),银染试剂为LI Silver,操作流程:以含1% BSA的1× PBS稀释NS,取50 μl稀释液加到芯片点阵区域,室温避光15 min,1× PBS(含0.1% BSA及0.1% Tween-20)室温下清洗3次。混合等体积的LI Silver的起始液和增强液后,取50 μl立即加至点阵区域,避光室温作用10 min。将芯片浸入去离子水中终止反应同时清洗玻片,离心甩干。

1.7 芯片扫描和数据分析

用Leica透射显微镜镜检,CCD镜头配合图像采集卡获取图像。用灰度分析软件(ATT, Namur, Belgium)进行数据提取和分析。每一个数据都来自4个重复方阵的平均值,误差线为标准误差。

2 结果

本实验采用判别率Q_{sns}(discrimination ratio)来衡量生物芯片对错配碱基对的判别能力:

$$\text{判别率}=\frac{\text{正确配对探针相对灰度信号强度}}{\text{错配捕获探针相对灰度信号强度}}$$

当$Q_{sns}\geqslant 2$时,表明能够将错配碱基对同正确配对的碱基对分辨开。当寡核苷酸芯片同基因组DNA杂交时,杂交液中的靶标分子往往为杂合子,即两个等位基因中只有1个基因有突变,所以PCR产物中野生型和突变型DNA片断各占50%,这样固定在芯片表面的野生型探针和突变型探针都能同PCR产物杂交,这时寡核苷酸芯片对突变位点判别率的计算采用Q_{mut}表示[3],计算公式如下:

$$Q_{mut}=\frac{MT^{P}/WT^{P}}{MT^{C}/WT^{C}}$$

MT和WT分别表示含有突变位点(MT)和野生型序列(WT)的探针的相对灰度信号强度,P和C分别表示待检测DNA样品(P)和纯合野生型的DNA样品(C)。

质粒PCR产物与芯片杂交的结果:验证杂交模板为单一野生型或突变型质粒DNA PCR产物同寡核苷酸芯片杂交的结果。11个质粒的单一PCR产物同芯片杂交的结果:最低的Q_{sns}值为2.5,是质粒402的PCR产物同芯片的杂交结果,此时碱基错配为T/G;最高的Q_{sns}值为76.6,是质粒304的PCR产物同芯片的杂交结果,此时碱基错配为C/T;平均Q_{sns}值为18.2。

人工杂合子同芯片杂交结果:将野生型和突变型质粒的PCR产物混合模拟杂交液中靶标分子为杂合子的情况,验证寡核苷酸芯片对人工杂合子的碱基错配的判别能力(Q_{mut})。结果如图1所示,最低Q_{mut}值为3.6,基因突变形式为C突变为G,与芯片杂交的碱基错配形式为GG;最高的Q_{mut}值为41.6,基因突变形式为C突变为A,此时碱基错配为AG;Q_{mut}的平均值为16.2。

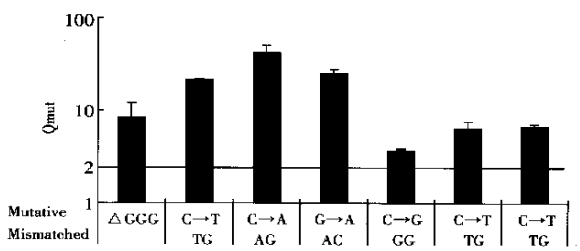


图1 人工杂合子同芯片杂交结果

Fig 1 Result of hybridization of synthesized heterozygotes and microarrays

基因组DNA的PCR产物同芯片杂交结果:健康人基因组DNA的PCR产物同寡核苷酸芯片杂交。结果如图2所示。最低的Q_{sns}值为3.5,是PCR产物300-2同芯片的杂交结果,此时碱基错配为T/G;最高的Q_{sns}值为29.6,是PCR产物500同芯片的杂交结果,碱基错配为A/C;所有Q_{sns}的平均值为11.5。

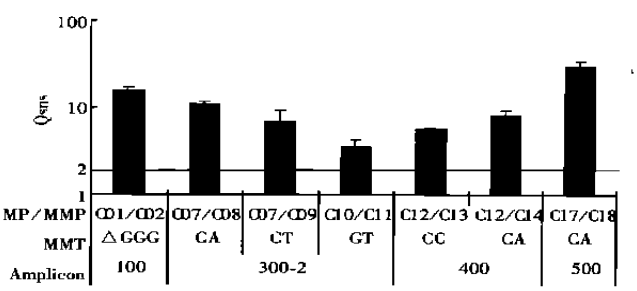


图2 基因组DNA的PCR产物与芯片杂交结果

Fig 2 Result of hybridization of PCR products of genomic DNA and olionucleotide microarrays

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

基因突变导致的遗传病已经成为人类健康的最大威胁之一, 临床迫切需要一种适于高通量筛查的突变检测方法, 寡核苷酸芯片是目前最具前景的基因突变检测方法之一, 但它采用的荧光标记法的高昂成本却限制了其在科研和临床的广泛应用[4]。因此, 人们希望找到一种新的标记材料克服荧光标记的缺点。近来, 免疫组织化学中的常用方法—胶体金标记/银染信号放大法因其价格低廉、灵敏度高、操作简单在核酸标记方面已被证明具有较高的实用价值[3], 胶体金在 DNA 芯片的检测已有相关报道[5]。通常是将目标分子标记上巯基, 因胶体金颗粒的表面包围着一层结合力比较弱的带电配体如柠檬酸, 这些配体分子很容易被结合力强的巯基基团所取代, 因而可以将胶体金连接上目标核酸, 然后将标记的目标分子与芯片上的探针杂交实现对其的检测。这种方法操作繁琐, 且每次杂交均需标记特异的靶标分子, 不具备通用性[6]。

本研究将探针固定于芯片的表面, 生物素标记的靶标分子与探针杂交, 胶体金通过 SA 与杂交上的目标分子相连接, 加上银染试剂后离子银被胶体金催化还原而显示出信号的标记方法, 用于 HCM 7 种恶性突变位点的检测, 整个操作过程相对简单, 只需一步生物素不对称 PCR(从基因组 DNA 中扩增用于杂交的靶标分子)和芯片杂交, 杂交后进行金标、银染即可完成。这种方法对这 7 种突变的平均判别率(Q_{mut})为 16.2, 远远高于判定一个突变所需的 Q_{mut} 为 2 的阈值。实验结果显示当 11 个质粒的 PCR 产物同寡核苷酸芯片杂交时, 所有 8 种单碱基错配形式都能被清晰地判别开, 三碱基插入和三碱基缺失突变也能被特异判别。这表明, 这种胶体金标记/银染信号放大技术同寡核苷酸芯片结合后, 能够胜任任何单核苷酸替代突变的检测。本实验结果为 HCM 或者其他遗传病恶性突变位点的大规模检测和筛选奠定了基础。

通过胶体金标记/银染信号放大实现了芯片杂交结果的普通光学显微镜检测, 减少了对复杂的荧光扫描设备的依赖, 避免了昂贵的荧光试剂的消耗, 提高了芯片的实用性。

必须指出的是, 本实验建立的胶体金标记/银染信号放大体系, 用于 DNA 芯片杂交结果检测是基于生物素和链霉亲和素之间的特异而高效的结合, 并非特异性的识别 DNA, 因此该体系的应用并不限于 DNA 芯片, 作为一种通用的标记和检测方式, 在抗体芯片, 蛋白质芯片以及多糖芯片等方面均可发挥重要作用。

参考文献:

[1] Marian A J, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(4): 655—670.

[2] Ahrendt S A, Halachmi S, Chow J T, *et al*. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(13): 7382—7387.

[3] Cao Y C, Jin R, Mirkin C A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection[J]. Science, 2002, 97(5586): 1536—1540.

[4] Waldmuller S, Freund P, Mauch S, *et al*. Low-density DNA microarrays are versatile tools to screen for known mutations in hypertrophic cardiomyopathy[J]. Hum Mutat, 2002, 19(5): 560—569.

[5] Alexandre I, Hamels S, Dufour S, *et al*. Colorimetric silver detection of DNA microarrays[J]. Anal Biochem, 2001, 295(1): 1—8.

[6] Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes[J]. Science, 2000, 289(5485): 1757—1760.

(编辑　刘洪娥)

(上接 1728 页)

关的临床症状和体征出现极少。本组 28 例中, 未有 1 例出现与之相关的临床表现。原因可能是一方面肺癌发生肾上腺转移时, 肺癌的临床症状已比较明显。个别病例其它部位的转移症状较重, 如颅内转移等, 而肾上腺转移的临床症状并不典型; 另一方面, 肾上腺转移瘤不具备肾上腺的分泌功能, 一般不会引起内分泌失调的症状。

肺癌肾上腺转移瘤在 CT 影像上很难与原发于其它组织器官的恶性肿瘤肾上腺转移及肾上腺本身的原发肿瘤相鉴别。肺癌肾上腺转移在 CT 上表现为大小不等的软组织块影, 密度均匀或不均匀, 可发生坏死或出血, 增强后呈明显不均匀强化, 对于临床及病理已经证实的肺癌患者, 如果发现双侧肾上腺块影, 则基本可确定为转移[3], 如果再合并其它部位的转移, 那么诊断更可靠; 如果仅出现单侧肾上腺块影, 转移瘤的诊断必须慎重, 首先, 应密切结合临床, 肺癌的诊断可靠性等; 其次, 应谨慎地排除肾上腺原发肿瘤的可能性, 必要时在 CT 引导下行穿刺活检[4]。

肺癌伴有肾上腺转移并不少见, 且往往伴有其它脏器的转移。因此, 对肺癌病人的临床分期不但要注意双肺及纵隔的情况, 更应该注意其它脏器有无转移, 这对临床制定治疗方案至关重要。因此, 对肺癌患者在制定治疗方案前应常规行颅脑、胸、腹等部位的 CT 检查, 根据情况酌情行增强扫描。

关键词: 肺癌; 肾上腺; 转移瘤; 螺旋 CT
中图法分类号: R734.202; R736.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 周康荣. 胸部颈面部 CT[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1996. 48.

[2] Sandler M A, Pearberg J L, Madrzo B L, *et al*. Computed tomographic evatuation of the adrenal gland in the preoperative assessment of brochogenic carcinoma[J]. Radiology, 1982, 145(3): 733—736.

[3] 周康荣. 螺旋 CT[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1998. 68.

[4] 张雪哲, 王廷昱, 李晨阳, 等. 肾上腺转移瘤的 CT 诊断(附 21 例报告)[J]. 中华放射学杂志, 1994, 28(12): 853—854.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net