

论著·临床研究

微滴数字 PCR 检测含有目的基因的 PUC57 质粒问题分析*

杨德平¹, 刘维薇^{2,3,Δ}

(1. 上海健康医学院附属周浦医院检验科, 上海 201318; 2. 上海市同济大学附属第十人民医院检验科, 上海 200072; 3. 上海市皮肤病医院检验科, 上海 200070)

摘要:目的 探讨微滴数字聚合酶链反应(ddPCR)检测含有目的基因的 PUC57 质粒过程中出现的问题及解决方法。方法 用 ECOR I 酶 37 °C 孵育含有目的基因的 PUC57 质粒 2 h 和 4 h, 然后 65 °C 孵育 20 min, 灭活 ECOR I 酶。用伯乐 QX200™ 微滴式数字 PCR 分别检测 PUC57 质粒和经 ECOR I 酶酶切后的 PUC57 质粒, 同时对酶切后的 PUC57 质粒分多天进行检测, 对检测结果进行比较。结果 含有目的基因的 PUC57 质粒经 ECOR I 酶酶切 2 h 和 4 h 后的检测值与质粒理论值之间差异无统计学意义($t = -0.192, -0.403, P > 0.05$), 同时酶切与没有酶切的 PUC57 质粒检测值之间差异有统计学意义($Z = -4.194, P < 0.05$)。酶切后的检测值与 PUC57 质粒理论值相符合。酶切后的 PUC57 质粒随着放置时间的延长, 检测值逐渐降低。结论 用伯乐 QX200™ 微滴式数字 PCR 检测含有目的基因的 PUC57 质粒时要先酶切再检测, 酶切时间只需 2 h 即可将质粒酶切完全, 同时酶切的 PUC57 质粒要尽快检测。

关键词:微滴数字聚合酶链反应; PUC57 质粒; 酶切

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.06.004

中图法分类号: R734.2

文章编号: 1673-4130(2019)06-0653-04

文献标识码: A

Analysis of the problem of detecting PUC57 plasmid containing target gene by droplet digital PCR*

YANG Deping¹, LIU Weiwei^{2,3,Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai University of Medicine and Health Sciences Affiliated Zhoupu Hospital, Shanghai 201318, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Skin Disease Hospital, Shanghai 200070, China)

Abstract: Objective To explore the problems and solutions in the detection of PUC57 plasmid containing the target gene by droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR). **Methods** PUC57 plasmid containing the target gene was incubated with ECOR I enzyme at 37 °C for two hours and four hours, then incubated with 20 min at 65 °C to inactivate ECOR I enzyme. The PUC57 plasmid and PUC57 plasmid after ECOR I enzyme digestion were detected by using QX200™ Droplet Digital PCR (Bio-Rad), respectively, and the PUC57 plasmids were detected for many days after the enzyme digestion, and the results were compared. **Results** The PUC57 plasmid containing target gene had no statistically significant difference between the detection value of two hours and four hours after enzyme digestion and the theoretical value of plasmid ($t = -0.192, -0.403, P > 0.05$). Meanwhile, there was a statistical difference ($Z = -4.194, P < 0.05$) between the detection of PUC57 plasmid after ECOR I enzyme digestion and the detection without enzyme digestion. The value of enzyme digestion was consistent with the theoretical value of PUC57 plasmid. The PUC57 plasmid decreased gradually with the prolongation of the time after enzyme digestion. **Conclusion** When the PUC57 plasmid containing the target gene is detected by QX200™ Droplet Digital PCR (Bio-Rad), the enzyme digestion is first and then tested. The enzyme digestion time is only two hours, and the plasmid can be cut completely, and the PUC57 plasmid which is cut by enzyme should be detected as soon as possible.

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81370067, 81572061); 上海市新优青人才计划(XYQ2013095); 上海申康医院发展中心辅助科室能力建设(项目 SHDC22014006)。

作者简介: 杨德平, 男, 主管技师, 主要从事临床分子诊断学研究。 Δ 通信作者, E-mail: huashanvivan@126.com。

本文引用格式: 杨德平, 刘维薇. 微滴数字 PCR 检测含有目的基因的 PUC57 质粒问题分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(6): 653-656.

Key words: droplet digital polymerase chain reaction; PUC57 plasmid; enzyme digestion

近年来,微滴数字聚合酶链反应(ddPCR)作为新一代 PCR,具有高灵敏度、高精密度和高准确度,使它在检测体细胞稀有等位基因突变或低浓度的 DNA 样本时比传统的实时荧光定量 PCR(qPCR)更加可靠和适用^[1]。它使用绝对定量取代标准曲线,已作为一种替代方法广泛用于临床和医学研究^[2-4]。该方法依赖于对传统 PCR 反应有限的稀释和泊松统计^[2,5]。在有限的稀释后,大多数反应不包含或仅包含一个靶分子,并且每个反应是独立的测试。通过泊松统计计算出有荧光信号的比值,最后得出样本中的绝对模板量^[6-7]。PUC57 质粒是大肠杆菌载体含有 2 710 bp。本实验利用 ddPCR 检测含有目的基因的 PUC57 质粒,对检测过程中出现的酶切、酶切孵育时间和酶切后放置天数的的问题进行了探讨,为同行提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 根据 GenBank 中乙肝病毒 DNA(HBV DNA)的序列,经过序列比对分析,针对 HBV DNA 保守区设计引物和探针,用引物扩增的那段目的基因片段(95 bp)构建 PUC57 质粒,质粒的构建由上海生工生物工程有限公司完成。质粒含有 2 806 bp,质粒的浓度为 237 ng/ μ L,通过换算为 7.82×10^{10} copies/ μ L。为获得线性 DNA 模板,用 ECOR I 酶对 PUC57 质粒进行酶切。酶切好的质粒放在 2~8 °C 冰箱保存待用。

1.2 仪器与试剂 ECOR I 酶、 $10 \times$ ECOR I buffer 购自上海生工生物工程有限公司,ddPCR 试剂及其耗材购自美国 Bio-Rad 公司。QX200™ 微滴生成仪、PX1™ PCR 板封口机、QX100™ PCR 仪、QX200™ 微滴读取仪购自美国 Bio-Rad 公司。DH100-2 恒温金属浴购自杭州瑞诚仪器有限公司。

1.3 引物与探针 通过序列比对分析,针对 HBV DNA 保守区设计的引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成,5'→3'引物探针序列为 F: TAG ACC ACC AAA TGC CCC TA; R: GAG GCG AGG GAG TTC TTC TT; 探针: FAM-ACT GTT GTT AGA CGA CGA GGC AGG TCC-BHQ1。

1.4 酶切 将含有目的基因的 PUC57 质粒与 ECOR I 试剂按比例进行混合,放入 37 °C 恒温金属浴中孵育,为了使酶切后的质粒通过 ddPCR 检测后所得值与质粒理论值相符,研究者用了 2 个孵育时间,一份混合物孵育 2 h,另一份混合物孵育 4 h,在孵育的时间到达后,每份混合物再 65 °C 孵育 20 min,灭活 ECOR I 酶,酶切总体积为 20 μ L(包括 ECOR I 1 μ L、 $10 \times$ buffer 2 μ L、PUC57 质粒 4 μ L、ddH₂O 13

μ L)。酶切得到的线性 DNA 模板再用 ddH₂O 稀释成 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 copies/ μ L,稀释的模板用于 ddPCR 检测。最后比较两个孵育时间后,酶切混合物经过 ddPCR 检测所得值与质粒理论值差异有无统计学意义。

1.5 ddPCR 检测 按照仪器操作指南,反应体系为 20 μ L,其中 ddPCR Supermix 10 μ L,上下游引物(900 nmol/L)各 1 μ L,探针(250 nmol/L)0.3 μ L,质粒 4 μ L,ddH₂O 3.7 μ L。使用 QX200™ 微滴生成仪生成微滴,然后用 PX1™ PCR 板封口机热封 96 孔板,最后使用 QX100™ PCR 仪对含有目的基因的 PUC57 质粒进行扩增,反应条件为:95 °C 10 min;94 °C 30 s,57 °C 60 s,35 个循环;98 °C 10 min;4 °C 保存。扩增结束后将 96 孔板放入 QX200™ 微滴读取仪中对扩增产物进行分析,检测到荧光信号的被记为阳性反应,没有检测到荧光的被记为阴性反应。最后通过 QuantaSoft 分析软件计算出质粒的绝对浓度。

1.6 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行。所有拷贝数进行 Log₁₀ 转换,正态分布资料两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。偏态分布资料采用 Mann-Whitney *U* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ddPCR 检测酶切孵育 2 h 与 4 h 后的 PUC57 质粒结果比较 酶切孵育 2 h 后检测结果经 Log₁₀ 转换后分别为 0.146、1.531、2.486、3.475 copies/ μ L,酶切孵育 4 h 后检测结果经 Log₁₀ 转换后分别为 0.663、1.556、2.643、3.623 copies/ μ L,检测结果见图 1。两个酶切孵育 2 h 与 4 h 后,ddPCR 检测结果孵育时间后,酶切混合物经过 ddPCR 检测所得值与质粒理论值差异均无统计学意义($t = -0.192$ 、 -0.403 , $P > 0.05$)。

2.2 ddPCR 检测酶切与没有酶切的 PUC57 质粒 没有酶切的 PUC57 质粒检测结果经 Log₁₀ 转换后均值分别为 0.362、0、0.851、0.398、0.857、2.174 copies/ μ L,酶切的 PUC57 质粒检测结果经 Log₁₀ 转换后均值分别为 0.568、1.656、2.672、3.637、4.681、5.332 copies/ μ L,检测结果见图 2。酶切组与没有酶切组之间差异有统计学意义($Z = -4.194$, $P < 0.05$),酶切组与理论值之间差异无统计学意义($t = -0.2$, $P > 0.05$)。

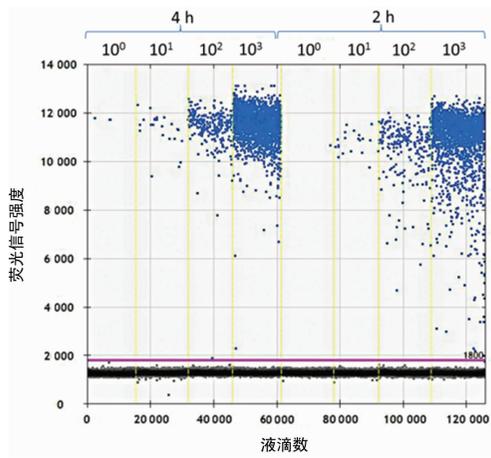
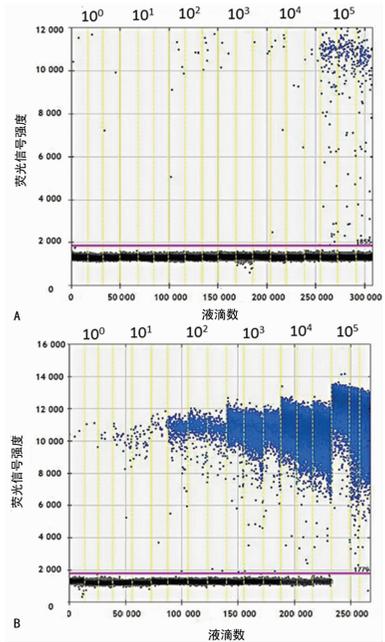


图1 酶切 2 h 与 4 h 的 PUC57 质粒 ddPCR 检测结果

2.3 ddPCR 检测放置不同天数的酶切 PUC57 质粒

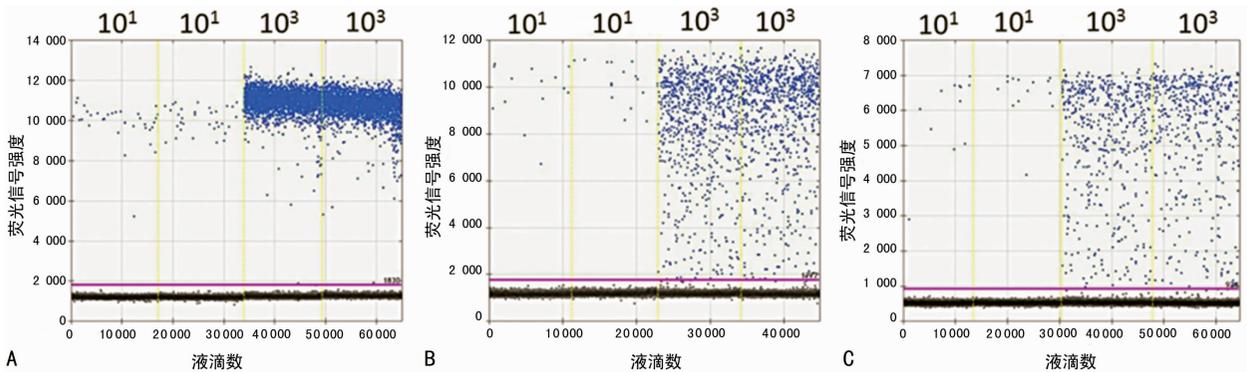
选用酶切 PUC57 质粒的 10^1 和 10^3 copies/ μ L 的稀释度,用 ddPCR 分别检测刚酶切的、放置在 2~8 °C 冷藏 2 周和 4 周的 PUC57 质粒,每个稀释度各检测 2 次,刚酶切的 PUC57 质粒的 10^1 稀释度的检测结果均值是 47 copies/ μ L, 10^3 稀释度的检测结果均值是 4 520 copies/ μ L。2 周后的检测结果分别是 30 和 1 738 copies/ μ L。4 周后的检测结果分别是 20 和 660 copies/ μ L。从检测结果可以看出随着酶切 PUC57 质

粒放置天数的增加,高低浓度的质粒检测值在逐渐降低。见图 3。



注:酶切与没有酶切的 PUC57 质粒分别用 ddH₂O 稀释成 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 copies/ μ L,每个稀释度用 ddPCR 检测 3 次;A 为没有酶切的 PUC57 质粒组;B 为酶切的 PUC57 质粒组

图2 酶切与没有酶切的 PUC57 质粒 ddPCR 检测结果



注:A 为刚酶切检测结果;B 为酶切后放置 2 周检测结果;C 为酶切后放置 4 周检测结果

图3 放置不同天数的酶切 PUC57 质粒 ddPCR 检测结果

3 讨论

ddPCR 由于它是不依赖于外部校准曲线或参考,能敏感的和特异的检测核酸,同时相比 qPCR,它对 PCR 抑制剂低敏感^[8],已成为一种新的分子检测技术^[9-10]。这项技术是稀有事件检测或拷贝数变异估计等需要精确定量应用的理想工具^[11]。因此,ddPCR 的应用越来越广泛,在癌症检测,核酸定量上应用越来越多^[12-13]。ddPCR 正在迅速取代 qPCR 作为独立的 DNA 定量分析的一种有效方法^[14]。本研究对 HBV DNA 的一段保守区域设计引物和探针,同时对这段保守区域构建质粒,再利用 ddPCR 检测含有 HBV DNA 目的基因的 PUC57 质粒。

本文在用 ddPCR 检测 PUC57 质粒前先用 ECOR I 酶对构建好的 PUC57 质粒进行酶切,在酶切过程中用了两个孵育时间,一个是孵育 2 h,另一个是孵育 4 h。研究结果显示,利用 ddPCR 分别检测酶切 2 h 和 4 h 的 PUC57 质粒,结果与质粒理论值进行比较,差异无统计学意义($t = -0.192$ 、 -0.403 , $P > 0.05$)。说明 ECOR I 酶在孵育 2 h 后就可以把 PUC57 质粒完全切开,能保证酶切后质粒通过 ddPCR 的检测结果和质粒的理论值一致,从而也保证了接下去的 ddPCR 性能验证实验顺利进行。所以没必要担心酶切时间不足,质粒酶切不完全而影响实验结果,这与文献报道的时间相符^[15]。

本研究利用 ddPCR 对酶切和没有酶切的 PUC57 质粒进行检测,对检测结果进行比较,发现没有酶切的 PUC57 质粒 ddPCR 几乎没有检测出来,而酶切的 PUC57 质粒检测结果很好,两者相比,差异有统计学意义($Z = -4.194, P < 0.05$)。酶切的 PUC57 质粒检测结果与 PUC57 质粒理论值相比,差异无统计学意义($t = -0.2, P > 0.05$)。究其原因,可能没有酶切的 PUC57 质粒是环状容易形成超螺旋结构,在高温变性时双链 DNA 不容易打开,在低温退火时引物和探针不能结合到模板链上,从而影响了扩增效率。另一方面,可能是 ddPCR 自身原因导致。伯乐 QX200™ 微滴式数字 PCR 是将 20 μ L 的反应体系通过微滴发生器产生 20 000 个油包水的微滴,每个微滴只有 1 nL。没有酶切的 PUC57 质粒含有 2 806 bp,体积相对比较大,可能不容易形成微滴,从而降低了检测结果。而酶切过的 PUC57 质粒只有 95 bp 的目的基因片段,体积小容易形成微滴,所以检测结果与 PUC57 质粒理论值相符。

同时,本研究还对放置了不同时间的酶切 PUC57 质粒进行检测。研究结果显示,放置了 2 周和 4 周的酶切 PUC57 质粒相比刚刚酶切的 PUC57 质粒,其检测值在逐渐降低,说明酶切的 PUC57 质粒随着放置时间的延长,可能线性 DNA 模板又还原成环状的模板,从而降低了扩增效率,该假设有待进一步实验证明。例如对放置了 2 周和 4 周的酶切 PUC57 质粒进行核酸电泳,看在 2 806 bp 位置有没有条带出现,如果有说明线性 DNA 模板已还原成环状的模板,如果没有就要分析其他原因,如 95 bp 的线性 DNA 片段自身发生了降解,具体原因还有待进一步分析。

4 结 论

ddPCR 是一种灵敏和准确的新型核酸定量方法,特别是在检测低拷贝载量。在科研工作中经常会用 ddPCR 检测质粒,本研究得出的结论是利用 ddPCR 检测含有目的基因的 PUC57 质粒时要先进行酶切再检测,酶切时间只需 2 h 即可将质粒酶切完全,同时酶切的 PUC57 质粒不宜放置过久,要尽快检测。

参考文献

[1] WHALE A S, HUGGETT J F, COWEN S, et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(11): 82.

[2] HINDSON B J, NESS K D, MASQUELIER D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22): 8604-8610.

[3] OXNARD G R, PAWELETZ C P, KUANG Y, et al. Non-invasive detection of response and resistance in EGFR-

mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(6): 1698-1705.

- [4] PERSAUD D, GAY H, ZIEMNIAK C, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(19): 1828-1835.
- [5] SHEN F, SUN B, KREUTZ J E, et al. Multiplexed quantification of nucleic acids with large dynamic range using multivolume digital RT-PCR on a rotational slipchip tested with HIV and hepatitis C viral load [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(44): 17705-17712.
- [6] MIOTKE L, LAU B T, RUMMA R T, et al. High sensitivity detection and quantification of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(5): 2618-2624.
- [7] BECK J, BIERAU S, BALZER S, et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury [J]. *Clin Chem*, 2013, 59(12): 1732-1741.
- [8] HINDSON C M, CHEVILLET J R, BRIGGS H A, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 1003-1005.
- [9] KISELINOVA M, PASTERNAK A O, DE SPIEGELAE W, et al. Comparison of droplet digital PCR and semi-nested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85999.
- [10] HAYDEN R T, GU Z, INGERSOLL J, et al. Comparison of droplet digital PCR to Real-Time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(2): 540-546.
- [11] DIEHL F, DIAZLA J R. Digital quantification of mutant DNA in cancer patients [J]. *Curr Opin Oncol*, 2007, 19(1): 36-42.
- [12] YUNG T K, CHAN K C, MOK T S, et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(6): 2076-2084.
- [13] STRAIN M C, LADA S M, LUONG T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR [J]. *Plos One*, 2013, 8(4): e55943.
- [14] BOSMAN K J, NIJHUIS M, VAN HAM P M, et al. Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(2): 13811.
- [15] TANG H, CAI Q C, LI H, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantification of hepatitis B virus DNA [J]. *Bio Biochem*, 2016, 80(11): 2159-2164.