

比较单管和双管SYBR Green 荧光定量PCR方法在端粒长度 测量中的应用

王淑一, 裘振亚

杭州艾迪康医学检验中心有限公司, 浙江 杭州

收稿日期: 2022年1月18日; 录用日期: 2022年3月25日; 发布日期: 2022年4月2日

摘 要

目的: 探讨单色多重定量PCR方法在人类端粒长度测量中的临床应用价值。方法: 我们设计了针对端粒基因多次重复序列的能产生固定长度产物的引物, 同时设计能扩增单拷贝基因的引物作为内参; 两对引物在同一管中进行SYBR green QPCR反应, 数据进行分析获得端粒相对长度。结果: 1) 两对引物在单管中反应没有改变单独反应时的扩增效率和溶解温度; 2) 同一样本在单管内和双管内反应T/S的差异很大; 3)通过对同一样本进行10次重复发现, 单管的值很均一, 而双管的值相差很大, CV%分别是15.25%和53%。结论: 我们的结果提示, 单色单管方法准确性和重复性都大大优于单色双管, 能够准确测量端粒的相对长度, 有利于在生物医疗研究领域中的应用。

关键词

端粒长度, 单色单管荧光定量PCR, 单色双管荧光定量PCR

Comparison of the Applications of SYBR Green Single Tube and Two Tubes Fluorescent Quantitative PCR Method in Measuring the Length of Telomere

Shuyi Wang, Zhenya Qiu

Hangzhou Adicon Clinical Laboratories, Ltd., Hangzhou Zhejiang

Received: Jan. 18th, 2022; accepted: Mar. 25th, 2022; published: Apr. 2nd, 2022

Abstract

Objective: To investigate the clinical value of the monochrome multiplex quantitative PCR method in measuring the length of the human telomere. **Methods:** We designed primers targeting the multiple repeating sequences producing fixed-length products in the gene encoding telomere. Primers were also designed to amplify single-copied genes which served as the internal control. The two primers were loaded into the same tube for the SYBR green QPCR, and data were analyzed to get the information of the relative length of the telomere. **Results:** 1) The amplification efficiency and the melting temperature were not changed in reactions with two pairs of primers in the single tube versus two separate tubes; 2) There was a significant difference in the T/S of the same samples with reactions occurring in single or separate tubes; 3) After repeating the test 10 times of the same sample, we found that the results from single tube were stable while there were big variations for the results obtained for reactions in two separate tubes (the CV% are 15.25%, 53%, respectively). **Conclusions:** Our results indicate that the accuracy and reproducibility of monochrome single tube reactions in measuring the relative length of telomeres are significantly better than those of monochrome two tubes reactions. These data are helpful for the use of the qPCR in biomedicine.

Keywords

The Length of Telomere, Monochrome Single Tube Fluorescent Quantitative PCR, Monochrome Two Tubes Fluorescent Quantitative PCR

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

在生物医疗研究领域经常需要测量端粒长度[1] [2] [3]。由于在疾病机理研究、用药需求以及健康人群中,对端粒长度和端粒酶活性检测的需求越来越多[1] [2] [3],我们认为需要开发一种可提高准确性、提高通量及降低成本的方法,为提高检测服务精准度。到目前为止,有多种方法可以测量端粒长度,如 Q-FISH、STELA、TeSLA 和传统的 Southern 印迹法等均可测量端粒的末端限制性片段(Terminal Restriction Fragment: TRF) [4] [5],但这些方法都是低通量且繁琐、耗时耗力。荧光定量 PCR 方法,即单色双管定量 PCR 方法可检测端粒相对平均长度,这种方法省时、操作简单,而且是小样本量检测,通量高。然而,这种方法也有缺陷,主要是端粒和内参在不同管中反应,从而产生加样误差和不同反应孔的差异[2]。为了减少人为产生的误差,在此我们比较在单管内同时检测端粒和内参是否会减少这种差异,从而提高检测的准确性。

2. 材料与方法

2.1. 一般资料

参加本次研究的志愿者共 22 例,均签署知情同意书,年龄在 50 ± 2 岁。

2.2. 实验方法

2.2.1. 标本的采集

抽取 22 位病人静脉血,置无菌 EDTA 抗凝管中,颠倒抗凝管使全血和抗凝剂充分混匀。

2.2.2. 全血基因组 DNA 的提取

取 200 μL 全血, 按照血液提取试剂盒进行基因组 DNA 提取(天根 DP348), 提取好的 DNA 用 NanoDrop 2000 (美国 Thermo)测定浓度和纯度, 基因组 DNA 保存于 -20°C 备用。

2.2.3. 单色单管 SYBR Green 荧光定量 PCR 方法建立

1) 引物设计: 用 Primer5 软件, 根据端粒的序列(参考 NCBI 的 NG_009265)设计端粒引物, 并由通用公司合成引物如下: T-F:ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT; T-R:TGTTAGG TATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA。作为内参的单拷贝基因(参考 NCBI 的白蛋白序列 NG_009291)的引物设计, 为了提高产物的溶解温度, F 和 R 共设计了 50 个 GC 夹钳结构, 具体引物序列如下: S-F: CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGaaatgctgcacagaatccttg; S-R:GCCCCGCCCCGCGCG CCGTCCCGCCGgaaaagcatgctgcctgtt [2]; 2) 标准品设置: 标准品 DNA 最高浓度 210 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 按 1:3 倍比稀释成 210、70、23.33、7.78、2.59 $\text{ng}/\mu\text{L}$; 3) 荧光定量 PCR 反应体系: 反应总体积为 20 μL , 包括 1 \times SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO 公司) 10 μL , DNA (样本和标准品) 2 μL , 端粒引物 T-F、T-R 终浓度均为 400 nmol/L ; 单拷贝基因引物 al-F、al-R 终浓度均为 400 nmol/L 。反应在同一块 96 孔板上进行, 标准品和待测样本均设置 3 复孔。另外设置以相同体积的超纯水作为 DNA 的阴性对照, 亦为 3 个复孔。在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞)上检测。4) 反应条件为 I: 95°C 15 min; II: 94°C 15 s, 49°C 15 S, 2 个循环; III: 94°C 15 S, 62°C 10 S, 74°C 32 s (获取端粒信号), 84°C 10 S, 88°C 32 s (获取内参基因信号), 32 个循环。反应结束后建立熔解曲线。

2.2.4. 双管法 SYBR Green 荧光定量 PCR 方法建立

1) 引物: 应用单管法的引物, 包括 T-F, T-R 和 S-F, S-R; 2) 标准品设置: 标准品 DNA 最高浓度 210 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 按 1:3 倍比稀释成 210、70、23.33、7.78、2.59 $\text{ng}/\mu\text{L}$; 3) 荧光定量 PCR 反应体系: 端粒管反应总体积为 20 μL , 包括 1 \times SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO 公司) 10 μL , DNA (样本和标准品) 2 μL , 端粒引物 T-F、T-R 终浓度均为 400 nmol/L ; 内参管反应总体积为 20 μL , 包括 1 \times SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO 公司) 10 μL , DNA (样本和标准品) 2 μL , 单拷贝基因引物 S-F、S-R 终浓度均为 400 nmol/L 。反应在同一块 96 孔板上进行, 标准品和待测样本均设置 3 复孔。另外设置以相同体积的超纯水作为 DNA 的阴性对照, 亦为 3 个复孔。在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞)上检测。4) 反应条件为 I: 95°C 1 min; II: 95°C 15 s, 60°C 40 S, 40 个循环。反应结束后建立熔解曲线。

2.3. 分析方法

本研究采用 SPSS17.0 软件的 one way ANOVA 得到均值, 方差和差异系数。端粒的相对长度是由 T/S 值决定的, $T/S = \text{端粒信号}(T)/\text{内参单拷贝基因信号}(S)$, T/S 相对值是和端粒的平均长度成正比的, 从而决定端粒的相对长度。

3. 结果

3.1. 单色单管和双管法 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测端粒相对长度的标准曲线

两种方法分别对标准 DNA 样品(210 $\text{ng}/\mu\text{L}$)按 1:3 稀释成 210、70、23.33、7.78、2.59 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 5 个点进行检测, 结果见表 1:

从表上可以看出, 把两对引物放入同一管中检测并没有影响扩增效率以及标准曲线的线性关系。

Table 1. Comparison of the parameters for standard curves between two methods**表 1.** 两种方法标准曲线的参数比较

	单色单管	单色双管
SLOPE (斜率)	-3.063	-3.318
R ² (直线相关系数)	0.991	0.999
扩增效率($10^{(-1/SLOPE)} - 1$)	1.120	1.002

3.2. 单色单管和双管法 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测端粒相对长度的溶解曲线

溶解曲线见图 1, A 单色双管的 T 峰, 由于端粒和内参在不同的管中反应, 所以不能同时出现 T 和 S, 从图可以看出双管 T 峰在 80°C 左右; B 单色单管由于 T 和 S 在同一管里反应, 所以溶解曲线出现两个峰, T 峰还是在 80°C 左右, 峰形单一正常没有杂峰, 说明两对引物放在一管反应没有改变端粒引物的特异性, T 峰在同样的温度溶解并峰形单一无杂峰。

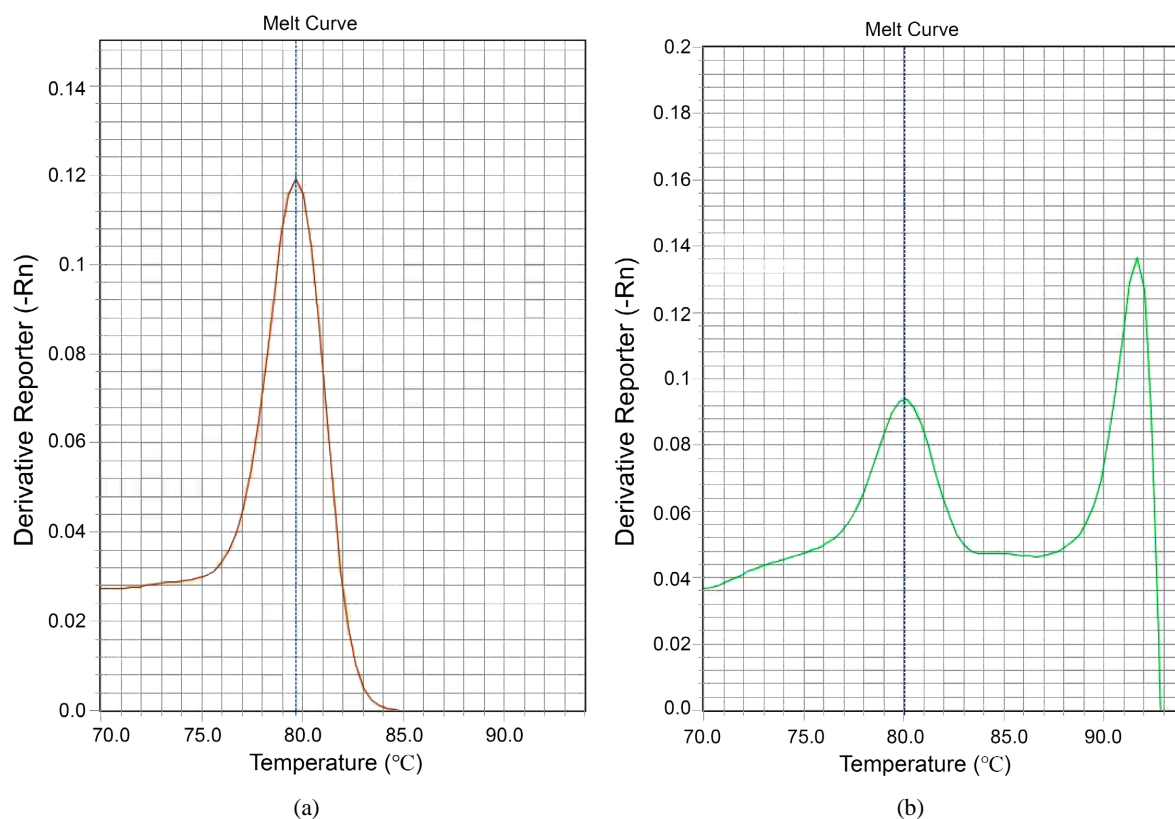


Figure 1. (a) Telomere dissociation curve of reactions in two separate tubes; (b) Telomere dissociation curve of reactions in single tube

图 1. (a) 双管法的端粒溶解曲线; (b) 单管法的端粒扩增溶解曲线

3.3. 单色单管和双管法 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测 22 例样本的端粒相对长度情况

比较了两种方法的标准曲线和溶解曲线都没有差异的情况下, 用这两种方法检测了 22 例样本, 每个样本每种方法都平行检测 3 次, 通过计算得到每个样本的 T 平均拷贝数和 S 平均拷贝数, 两种方法得到的 T/S 值进行比较 $P < 0.05$, T/S 结果分布见图 2, 从图直观可见两种方法检测同一样本的结果差异很大。

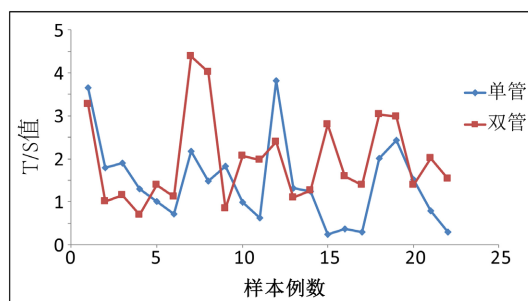


Figure 2. Distribution of T/S values of 22 samples detected with two methods

图 2. 两种方法检测 22 例样本的 T/S 值的分布情况

3.4. 单色单管和双管 SYBR Green 荧光定量 PCR 法检测样本的重复性比较

为了确定两种方法对同一样本检测的差异,我们对同一样本分别用两种方法检测 10 次,看看哪种方法的重复性更好,结果见表 2。

Table 2. Comparison of the reproducibility between the two methods

表 2. 两种方法重复性比较

重复次数	单管 T/S	双管 T/S
1	0.488739	0.582212
2	0.600981	1.17264
3	0.430101	1.595541
4	0.534647	1.497936
5	0.480686	1.505065
6	0.577541	0.788893
7	0.628224	1.347831
8	0.401768	1.6099
9	0.459544	3.492232
10	0.601653	1.20622
均值	0.520388	1.479847
SD	0.079373	0.785338
CV%	15.25%	53%

两种方法 10 次检测同一样本的 T/S 值的平均值进行比较发现, $P < 0.05$, 即不同方法得到的结果差异很大, 并且从表上的 CV% 值看, 单管法重复性好, 而双管法重复性很差。重复性高, 说明检测结果准确, 可靠。

4. 讨论

单管法实时荧光定量 PCR 测定端粒长度, 将端粒引物和内参引物置于同一个 PCR 管中扩增, 利用端粒和内参在扩增时 T_m 值的不同, 可以在同一反应中, 不同的温度情况下分别收集端粒荧光信号和内参荧光信号, 从而能同时得到 T 和 S 值[1] [2]。

该方法与传统多重 PCR 不同的是两个目标基因的扩增并不是同时进行。即理论上, 当两个目标序列在同一扩增体系中, 合成所需温度有很大差异时, 在同一个 qPCR 系统中可以分别收集来自两个具有非常不同拷贝数的成对核酸目标产物的信号。在低拷贝的目标序列的信号仍处于基线时, 高拷贝的目标序列荧光信号可以较早收集到信号。本方法通过引物设计, 端粒首先扩增并在 74℃ 收集信号。由于端粒的拷贝数比单拷贝基因高, 此时单拷贝基因的荧光值仍在基线水平以下, 因此 74℃ 收集到的信号仅代表端粒。温度继续升高到 85℃, 此时端粒产物已完全解链, 聚合酶只用于单拷贝基因的扩增, 因此此时收集的荧光信号仅代表单拷贝基因产物的信号[2]。

单管和双管方法比较, 消除了加样误差和批内误差对结果产生的影响, 同时试剂和模板用量以及时间均减少了一半, 节约了经济成本和时间成本; 进一步提高了 QPCR 端粒长度测量的准确性和通量, 降低了成本。通过对两种方法的对比分析, 单管法获得的 T/S 结果在独立运行中具有更高的可重复性, 对端粒长度测定以及端粒疾病相关的药物研究都具有重要参考价值[6] [7] [8]。另外, 这种方法可以很容易地适用于许多自然发生在不同拷贝数的 DNA 模板的研究, 例如 mtDNA 与单拷贝基因, rDNA 与单拷贝基因, Alu-DNA 与单拷贝基因。类似地, 在反转录成 cDNA 之后, 具有非常不同拷贝数的成对 RNA 物种可以通过这种方法进行量化[7] [8]。

参考文献

- [1] Cawthon, R.M. (2002) Telomere Measurement by Quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, **30**, 45-47. <https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e47>
- [2] Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S. and Myers, R.M. (1989) Attachment of a 40-Base-Pair G + C-Rich Sequence (GC-Clamp) to Genomic DNA Fragments by the Polymerase Chain Reaction Results in Improved Detection of Single-Base Changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 232-236. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.232>
- [3] Eastwood, J.R., Mulder, E., Verhulst, S. and Peters, A. (2018) Increasing the Accuracy and Precision of Relative Telomere Length Estimates by RT qPCR. *Molecular Ecology Resources*, **18**, 68-78. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12711>
- [4] Eisenberg, D.T., Kuzawa, C.W. and Hayes, M.G. (2015) Improving qPCR Telomere Length Assays: Controlling for Well Position Effects Increases Statistical Power. *American Journal of Human Biology*, **27**, 570-575. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22690>
- [5] Joo, E.J., Ahn, Y.M., Park, M. and Kim, S.A. (2021) Significant Shortening of Leukocyte Telomere Length in Korean Patients with Bipolar Disorder I. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, **19**, 559-563. <https://doi.org/10.9758/cpn.2021.19.3.559>
- [6] Li, Y., Sundquist, K., Wang, X., *et al.* (2021) Association of Mitochondrial DNA Copy Number and Telomere Length with Prevalent and Incident Cancer and Cancer Mortality in Women: A Prospective Swedish Population-Based Study. *Cancers (Basel)*, **13**, 3842. <https://doi.org/10.3390/cancers13153842>
- [7] Behrens, Y.L., Thomay, K., Hagedorn, M., *et al.* (2017) Comparison of Different Methods for Telomere Length Measurement in Whole Blood and Blood Cell Subsets: Recommendations for Telomere Length Measurement in Hematological Diseases. *Genes Chromosomes & Cancer*, **56**, 700-708. <https://doi.org/10.1002/gcc.22475>
- [8] Dahlgren, P.N., Bishop, K., Dey, S., Herbert, B.-S. and Tanaka, H. (2018) Development of a New Monochrome Multiplex qPCR Method for Relative Telomere Length Measurement in Cancer. *Neoplasia*, **20**, 425-431. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.02.007>