



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107529556 A
(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201710505922.1

(22)申请日 2017.06.28

(71)申请人 云健康基因科技(上海)有限公司
地址 201401 上海市奉贤区望园路1698弄8
幢

(72)发明人 陆军 金安娜

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)

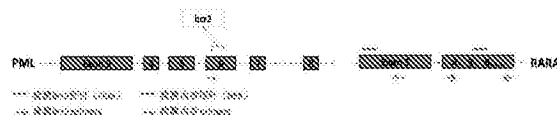
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种采用ddPCR鉴定PML-RAR α 融合基因中
Bcr2亚型的方法

(57)摘要

本发明公开了一种采用ddPCR鉴定PML-RAR α 融合基因中Bcr2亚型的方法,该方法包括提取血液中的RNA并进行QC评估,还包括RNA反转录cDNA并进行QC评估。本发明ddPCR检测PML-RARA融合bcr2亚型可达0.01%的丰度,远超RT-PCR的0.1%,重复性好,无假阳性;在低AF(0.01%)的情况下,建议样本投入量增加,或重复多个平行操作。由于该技术的高灵敏度,因此可应用于疾病的早期确诊、动态监测和防治复发。本发明针对常见的Bcr2型,设计检测fusion探针,引物针对fusion两侧序列进行扩增;将RARA基因作为内参,设计Ref探针,引物仅扩增RARA基因。



1. 一种采用ddPCR鉴定PML-RAR α 融合基因中Brc2亚型的方法,其特征在于:

一、该方法包括提取血液中的RNA并进行QC评估,具体操作过程如下:

(1) 提取RNA,将血浆分装在1.5ml EP管中,每管分装300 μ l;

(2) 使用天根试剂盒中自带的细胞裂解液CL,加入750 μ l至血液中,上下颠倒混匀,静置1min;10000rpm离心1min;弃上清,留沉淀;再加入700 μ l CL至血液中,同等条件下离心,弃上清,留沉淀;

(3) 加入150 μ l buffer PKD,吹打混匀;然后加入10 μ l蛋白酶K,吹打混匀;勿配置mix,需单独依次加入;

(4) 样本于恒温仪56 $^{\circ}$ C、转速350rpm、15min后迅速置于冰上3min;

(5) 13400rpm离心15min,转移上清160 μ l至1.5ml EP管中;

(6) 将上清置于恒温仪上80 $^{\circ}$ C 孵育15min,13400rpm快速离心30s;

(7) 加入320 μ l buffer RLT,吹打混匀,再加入1000 μ l 96~100%乙醇,涡旋混匀;

(8) 每次转移700 μ l样本至RNeasy MinElute离心柱中,13400rpm离心15s,弃滤液,重复本步骤直到将所有样本过柱完毕;

(9) 加350 μ l buffer FRN到离心柱,13400rpm离心15s,弃滤液;

(10) 配mix:10 μ l DNaseI和70 μ l buffer RDD,吹打混匀,将其加到离心柱中的膜上,置于室温20~30 $^{\circ}$ C温度下15min;

(11) 加500 μ l buffer FRN至离心柱,13400 rpm离心15s,保留滤液;换一个新的2ml收集管,将滤液重新加入到离心柱,13400rpm离心15s,弃滤液;

(12) 加入500 μ l buffer RPE至离心柱,13400rpm离心15s,弃滤液,重复一次;

(13) 将离心柱置于新的2ml收集管中,管盖打开,13400rpm离心5min;

(14) 将离心柱置于新的1.5ml EP管中,加入25 μ l RNase-free water至离心柱中央的滤膜上,闭合管盖,室温15~25 $^{\circ}$ C温度下静置1min;13400rpm 离心1min;

(15) 提取的RNA立即进行反转录或冻存于-80 $^{\circ}$ C;

(16) RNA QC评估:使用Nanodrop对RNA进行定量并参考A260/280数据,或者使用labchip /2100进行RNA质量评估,评估RIN值;

二、该方法还包括RNA反转录cDNA并进行QC评估,具体操作过程如下:

(1) RNA反转录cDNA,反转录引物与模板RNA结合:待PCR程序结束后,放置于冰上,不少于1 min;HELA作为control只需投入1 μ l,即10ng即可;

(2) 准备RT反应混合液及进行RT孵育:将7 μ l mix加入至上一步的13 μ l中,吹打混匀,反应总体积20 μ l,在PCR上进行反转录反应,反应完成后存放至-20 $^{\circ}$ C保存;

(3) cDNA QC评估:采用试剂盒自带的HELA control primer,进行PCR反应,跑胶验证条带,质控反转录反应的完成情况。

一种采用ddPCR鉴定PML-RAR α 融合基因中Brc2亚型的方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因鉴定方法技术领域,具体的说是涉及一种采用ddPCR鉴定 PML-RAR α 融合基因中Brc2亚型的方法。

背景技术

[0002] PML-RAR α 融合基因由t(15:17)(q22;q21)易位形成,常见于急性早幼粒细胞白血病(APL)。RAR α 和PML的fusion具有以下特征:RAR α 基因断裂位点位于第二内含子;而PML基因有三个区域参与了t(15:17)易位,即内含子6(Brc1,约占55%)、外显子6(brc2,约占5%)、内含子3(brc3,约占40%)。PML-RAR α 融合基因根据断裂位点的位置可分为三种亚型:如图1所示,长型(L型、Brc1)、变异型(V型、brc2)和短型(S型、brc3)。目前白血病的治疗较有效,其病人生存期得到了延长,但后期跟进发现数年内复发率较高,可能因为目前采用RT-PCR检测技术其检测灵敏度仅为0.1%。基于该检测技术的局限性,本项目采用更加高灵敏的ddPCR方法进行检测,旨在对临床具有指导意义,其灵敏度可达0.01%。

发明内容

[0003] 本发明为了克服现有技术存在的不足,提供一种具有高灵敏度的采用ddPCR 鉴定 PML-RAR α 融合基因中Brc2亚型的方法。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种采用ddPCR鉴定PML-RAR α 融合基因中Brc2亚型的方法,该方法包括提取血液中的RNA并进行QC评估,具体操作过程如下:(1)提取RNA:将血浆分装在1.5ml EP管中,每管分装300 μ l;(2)使用天根试剂盒中自带的细胞裂解液CL,加入750 μ l至血液中,上下颠倒混匀,静置1min;10000rpm离心1min;弃上清,留沉淀;再加入700 μ l CL 至血液中,同等条件下离心,弃上清,留沉淀;(3)加入150 μ l buffer PKD,吹打混匀;然后加入10 μ l蛋白酶K,吹打混匀;勿配置mix,需单独依次加入;(4)样本于恒温仪56 $^{\circ}$ C、转速350rpm、15min后迅速置于冰上3min;(5) 13400rpm离心15min,转移上清160 μ l至1.5ml EP管中;(6)将上清置于恒温仪上80 $^{\circ}$ C孵育15min,13400rpm快速离心30s;(7)加入320 μ l buffer RLT,吹打混匀,再加入1000 μ l 96~100%乙醇,涡旋混匀;(8)每次转移700 μ l样本至RNeasy MinElute离心柱中,13400rpm离心15s,弃滤液,重复本步骤直到将所有样本过柱完毕;(9)加350 μ l buffer FRN到离心柱,13400rpm离心 15s,弃滤液;(10)配mix:10 μ l DNaseI和70 μ l buffer RDD,吹打混匀,将其加到离心柱中的膜上,置于室温20~30 $^{\circ}$ C温度下15min;(11)加500 μ l buffer FRN至离心柱,13400rpm离心15s,保留滤液;换一个新的2ml收集管,将滤液重新加入到离心柱,13400rpm离心15s,弃滤液;(12)加入500 μ l buffer RPE至离心柱,13400rpm离心15s,弃滤液,重复一次;(13)将离心柱置于新的2ml收集管中,管盖打开,13400rpm离心5min;(14)将离心柱置于新的1.5ml EP管中,加入25 μ l RNase-free water至离心柱中央的滤膜上,闭合管盖,室温15~25 $^{\circ}$ C温度下静置1min;13400rpm离心1min;(15)提取的RNA立即进行反转录或冻存于-80 $^{\circ}$ C;(16)RNA QC评估:使用Nanodrop对RNA进行定量并参考A260/280数据,或者使用labchip/2100进行RNA质量评估,评估RIN值;

[0005] 该方法还包括RNA反转录cDNA并进行QC评估,具体操作过程如下:

[0006] (1) RNA反转录cDNA,反转录引物与模板RNA结合,待PCR程序结束后,放置于冰上,不少于1min;HELA作为control只需投入1ul,即10ng即可。

[0007]

Component	Volume	PCR program
50 μ M random hexamers	1 μ L	65 $^{\circ}$ C 5 min (热盖 105 $^{\circ}$ C)
10 mM dNTP mix (10 mM each)	1 μ L	
Template RNA (1 μ g total RNA)	up to 11 μ L	
DEPC-treated or nuclease-free water	to 13 μ L	

[0008] (2) 准备RT反应混合液及进行RT孵育:将7ul mix加入至上一步的13ul 中,吹打混匀,反应总体积20ul,在PCR上进行反转录反应,反应完成后存放至-20 $^{\circ}$ C保存。

Component	Volume	PCR program
5 \times SSIV Buffer	4 μ L	23 $^{\circ}$ C 10 min 52.5 $^{\circ}$ C 10 min 80 $^{\circ}$ C 10 min (热盖 105 $^{\circ}$ C)
100 mM DTT	1 μ L	
Ribonuclease Inhibitor	1 μ L	
SuperScript TM IV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L)	1 μ L	

[0010] (3) cDNA QC评估:采用试剂盒自带的HELA control primer,进行PCR反应,跑胶验证条带,质控反转录反应的完成情况。

Component	Volume	PCR program
5 \times KAPA HiFi Buffer	10 μ L	98 $^{\circ}$ C 45 s (98 $^{\circ}$ C 15 s 60 $^{\circ}$ C 30 s 72 $^{\circ}$ C 30 s) 40 cycle 72 $^{\circ}$ C 2 min 4 $^{\circ}$ C hold (热盖 105 $^{\circ}$ C)
10mM dNTP Mix(10 mM each)	1 μ L	
Control sense primer(10 μ M)	1 μ L	
Control antisense primer(10 μ M)	1 μ L	
cDNA (HELA)	2 μ L	
KAPA HiFi	1 μ L	
H2O	24 μ L	
TOTAL	50 μ L	

[0012] ddPCR体系:

Component	Volume per Reaction	Final Concentration
2 \times ddPCR supermix for probes	10 μ L	1 \times
20 \times target primer/probe mix (FAM)	1 μ L	900 nM primers/250 nM probe
20 \times reference primer/probe mix (HEX)	1 μ L	900 nM primers/250 nM probe
DNA template and RNase/DNase-free water	8 μ L	50 fg to 100 ng
Total volume	20 μ L	**

[0014] ddPCR程序:

Cycling Step	Temperature, °C	Time	Ramp Rate	Number of Cycles
Enzyme activation	95	10 min	2°C/sec	1
Denaturation	94	30 sec		40
Annealing/extension	55	1 min		
Enzyme deactivation	98	10 min		1
Hold (optional)	4	Infinite	1°C/sec	1

[0016] *Use a heated lid set to 105°C and set the sample volume to 40µl.

[0017] 本发明的有益效果是：如图2所示，本发明检测的立意如下：本发明针对常见的Brc2型（约占5%），设计检测fusion探针（FAM），引物针对fusion两侧序列进行扩增；将RARA基因作为内参，设计Ref探针（HEX），引物仅扩增RARA基因。本发明采用ddPCR鉴定PML-RARα融合基因中Brc2亚型的方法的优点有：1、ddPCR检测PML-RARα融合ber2亚型可达0.01%的丰度，远超RT-PCR的0.1%，重复性好，无假阳性；2、在低AF（0.01%）的情况下，建议样本投入量增加，或重复多个平行操作。由于该技术的高灵敏度，因此可应用于疾病的早期确诊、动态监测和防治复发。

附图说明

- [0018] 图1是本发明PML-RARα构型图；
 [0019] 图2是本发明brc2构型图；
 [0020] 图3是本发明cDNA的QC结果图；
 [0021] 图4是本发明ddPCR的结果柱形图。

具体实施方式

[0022] 以下结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。

[0023] 一种采用ddPCR鉴定PML-RARα融合基因中Brc2亚型的方法，该方法包括提取血液中的RNA并进行QC评估，具体操作过程如下：

[0024] (1) 提取RNA，将血浆分装在1.5ml EP管中，每管分装300µl；

[0025] (2) 使用天根试剂盒中自带的细胞裂解液CL，加入750µl至血液中，上下颠倒混匀，静置1min；10000rpm离心1min；弃上清，留沉淀；再加入700µl CL至血液中，同等条件下离心，弃上清，留沉淀；

[0026] (3) 加入150µl buffer PKD，吹打混匀；然后加入10µl蛋白酶K，吹打混匀；勿配置mix，需单独依次加入；

[0027] (4) 样本于恒温仪56°C、转速350rpm、15min后迅速置于冰上3min；

[0028] (5) 13400rpm离心15min，转移上清160µl至1.5ml EP管中；

[0029] (6) 将上清置于恒温仪上80°C孵育15min，13400rpm快速离心30s；

[0030] (7) 加入320µl buffer RLT，吹打混匀，再加入1000µl 96~100%乙醇，涡旋混匀；

[0031] (8) 每次转移700µl样本至RNeasy MinElute离心柱中，13400rpm离心 15s，弃滤液，重复本步骤直到将所有样本过柱完毕；

- [0032] (9) 加350 μ l buffer FRN到离心柱,13400rpm离心15s,弃滤液;
- [0033] (10) 配mix:10 μ l DNaseI和70 μ l buffer RDD,吹打混匀,将其加到离心柱中的膜上,置于室温20~30 $^{\circ}$ C温度下15min;
- [0034] (11) 加500 μ l buffer FRN至离心柱,13400rpm离心15s,保留滤液;换一个新的2ml收集管,将滤液重新加入到离心柱,13400rpm离心15s,弃滤液;
- [0035] (12) 加入500 μ l buffer RPE至离心柱,13400rpm离心15s,弃滤液,重复一次;
- [0036] (13) 将离心柱置于新的2ml收集管中,管盖打开,13400rpm离心5min;
- [0037] (14) 将离心柱置于新的1.5ml EP管中,加入25 μ l RNase-free water 至离心柱中央的滤膜上,闭合管盖,室温15~25 $^{\circ}$ C温度下静置1min;13400rpm 离心1min;
- [0038] (15) 提取的RNA立即进行反转录或冻存于-80 $^{\circ}$ C;
- [0039] (16) RNA QC评估:使用Nanodrop对RNA进行定量并参考A260/280数据,或者使用labchip/2100进行RNA质量评估,评估RIN值。

[0040] 该方法还包括RNA反转录cDNA并进行QC评估,具体操作过程如下:

- [0041] (1) RNA反转录cDNA,反转录引物与模板RNA结合;待PCR程序结束后,放置于冰上,不少于1min;HELA作为control只需投入1 μ l,即10ng即可;
- [0042] (2) 准备RT反应混合液及进行RT孵育;将7 μ l mix加入至上一步的13 μ l 中,吹打混匀,反应总体积20 μ l,在PCR上进行反转录反应,反应完成后存放至-20 $^{\circ}$ C保存;
- [0043] (3) cDNA QC评估:采用试剂盒自带的HELA control primer,进行PCR 反应,跑胶验证条带,质控反转录反应的完成情况。

[0044] 实施例:样本:血液样本及NB4-模拟AF 0.01%;

[0045] 表一:RNA提取结果——Nanodrop

[0046]

样本名称	浓度 (ng/ μ l)	总量 (ug)	A260/280	A260/230
WBC	105	3ug	2.07	1.10
NB4	790.2	15ug	2.11	1.98

[0047] cDNA的QC结果如图3所示,ddPCR的结果如图4所示。

[0048] 第一列:无假阳检出,positive数目为0。第二列:K562样本检测,高丰度样本。第三列至第五列:AF为0.05%的样本其投入量逐渐增加,positive检出数目也增加。第六列至第八列:AF为0.01%的样本其投入量逐渐增加,positive 检出数目也增加。

[0049] 最后应当说明的是,以上内容仅用以说明本发明的技术方案,而非对本发明保护范围的限制,本领域的普通技术人员对本发明的技术方案进行的简单修改或者等同替换,均不脱离本发明技术方案的实质和范围。

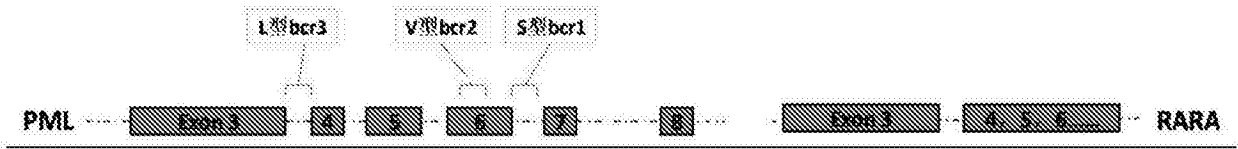


图1

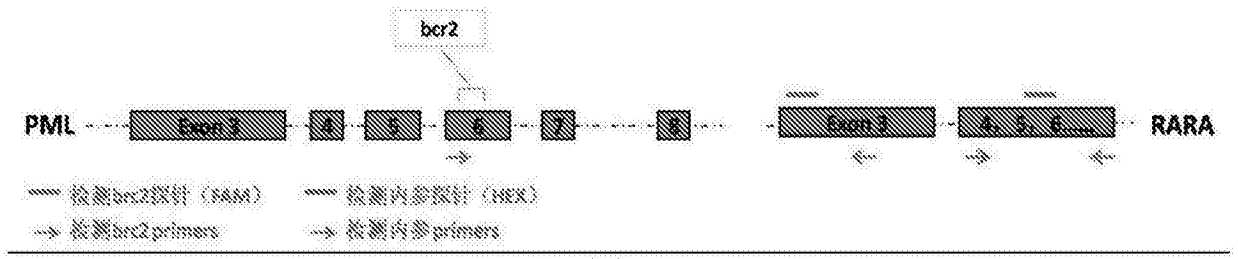


图2

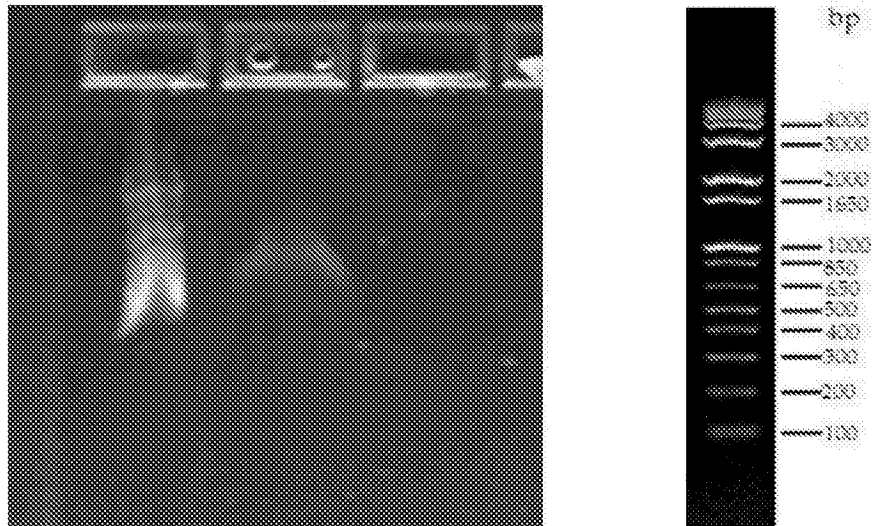


图3

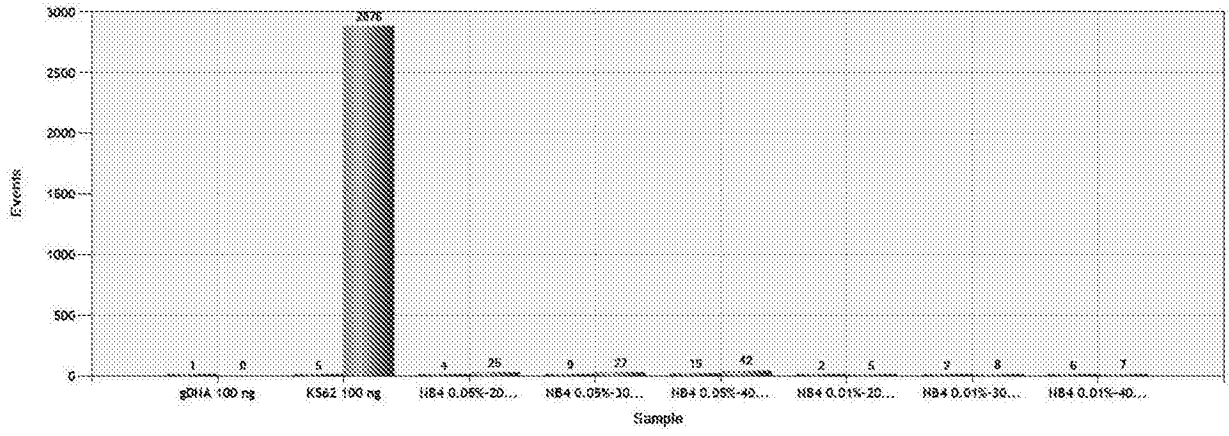


图4