

采用 QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统进行拷贝数变异分析

简介

拷贝数变异 (CNV) 是基因座的野生型拷贝数相比参考基因组增加或减少造成的基因组失衡。这些基因组改变从小的 (小于 10 kb) 插入或缺失到大的 (超过 1 Mb)、复杂的多等位基因复制均有。CNV 是人类基因组中最常见的遗传变异, 与多种疾病有关, 包括癌症或遗传性疾病易感性 [1, 2]。因此, 我们需要简单可靠的方法定量 CNV, 用作潜在的生物标记物, 并用于了解肿瘤形成的分子机制。

目前的 CNV 评估方法如表 1 所示。这些方法包括原位杂交, 但该方法耗时、费力且结果分析具有主观性 [3]。阵列比较基因组杂交 (aCGH) 可以提供更高的精度, 但该方法需要大量的操作时间且分辨率取决于所需的阵列类型 [4]。最近, 下一代测序技术的进步使得通过单次运行即可经济高效地检测多种类型的遗传变异成为可能 [5]。最后, 在目前所有方法中, 实时荧光定量和数字 PCR 技术提供了最简单的工作流程, 可以获得准确的拷贝数结果, 且操作时间极短, 周转时间较快。

利用传统实时荧光定量 PCR 仪器和软件, TaqMan® Copy Number Assay 可广泛应用于 CNV 评估。产品提供了逾 160 万种预设计 Assay 和定制设计工具, 以及简单的工作流程, 可以获得特异且高度可重复的拷贝数结果。尽管该工作流程具有诸多明显的优势, 但是采用传统实时荧光定量 PCR 运行拷贝数分析的限制之一是测量精度下降, 后续测量亦会出现倍增或损失。在许多情况下, 测量精确度不够, 无法用于高拷贝数或极小的拷贝数差异检测。



QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统采用数字 PCR (dPCR) 技术——能够实现高度精确的测量, 区分拷贝数的微小变化。在本应用说明中, 我们证明了低拷贝数和高拷贝数基因的精确测量。结果证明, 该方法的分辨率优于实时荧光定量 PCR, 且可重复性高, 即便是使用福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的组织样本亦是如此。我们还提供了同一基因组区域内紧密连锁基因的拷贝数测量的一般指南。我们的结果证明, QuantStudio® 3D 系统可提供一种灵敏、准确且可靠的 CNV 分析方法, 适用于癌症研究及其他领域, 具有无与伦比的精度。

表 1. 常用的 CNV 评估的分子学方法。

	原位杂交	aCGH	下一代测序	实时荧光定量 PCR	数字 PCR
说明	采用标记探针检测单个固定细胞的 DNA 序列	单独标记以 1:1 比例混合的单链检测 DNA 和参照 DNA, 然后与寡核苷酸点样或 BAC 阵列杂交	高通量测序, 然后定位并计数目的序列, 测定绝对或相对拷贝数	通过实时监测 PCR 扩增过程, 对靶 DNA 序列进行相对定量	将 PCR 反应样本进行有限稀释, 分成很多份, 对靶 DNA 分子进行绝对定量; 然后使用标准泊松统计学方法计算浓度
样本制备要求	细胞保存和切片	标准基因组 DNA 分离方法	标准基因组 DNA 分离方法	标准基因组 DNA 分离方法	标准基因组 DNA 分离方法
操作时间	极长	很长	很长	很短	很短
获得结果的时间	数天	数天	数天	数小时	数小时
结果分析	主观	客观	客观	客观	客观
定量精度	•	••	••••	••••	•••••
分辨率	•	•••	•••••	•••••	•••••

材料与方法

QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统的一般工作流程如图 1 所示。该系统采用包含 20,000 个反应孔的高密度纳升流控芯片，将样本分成成百上千个单独的 PCR 反应。样本制备步骤因实验不同而异，但与目前用于标准 PCR 的步骤大致相同。如需了解详细的工作流程说明，以及关于数字方法的详细信息，请参阅 QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统用户指南 [6]。

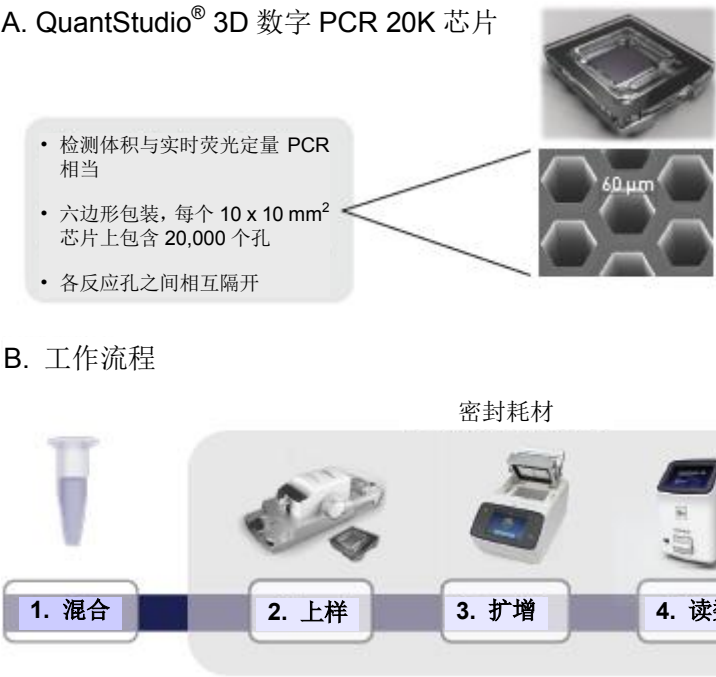


图 1. QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统 20K 芯片和工作流程。(A) QuantStudio® 3D 数字 PCR 芯片包括 20,000 个单独的反应孔。在整个工作流程中，芯片中包含了样本和扩增产物。(B) PCR 反应混合物包括样本、Assay 和预混液，将 PCR 反应混合物上样至 QuantStudio® 3D 数字 PCR 芯片，采用 PCR 仪扩增，并在 QuantStudio® 3D 数字 PCR 仪上读取靶点浓度 (拷贝数/µL)。采用 AnalysisSuite™ Cloud 软件进行二次分析。工作流程采用了密封耗材，操作时间较短，可实现最少的样本损失。

基因组 DNA 样本和预先酶切

用于 CNV 分析的基因组 DNA (gDNA) 样本购自卡瑞尔人数据库。本研究中分析的基因是 *CCL3L1*、*ERBB2 (HER2)* 和 *C4A/C4B*。对于高拷贝数或相邻的基因，需要通过限制性酶切分离拷贝。对于 *C4A/C4B* 拷贝数分析，在 25 µL 酶切反应中使用 DpnII (New England Biolabs) 及推荐的酶切缓冲液，37°C 孵育 1 小时，然后 65°C 热灭活 20 分钟。对于 *CCL3L1* 和 *HER2* 拷贝数分析，无需对样本进行限制性酶切即可直接上样至芯片。请参见附录，了解有关限制性酶选择的更多详情。

TaqMan® Copy Number Assay

现有的 TaqMan® Copy Number Assay 可与 dPCR 兼容。表 2 显示了本研究中使用的拷贝数和参照 Assay 的 Assay ID。将针对目的靶点的 FAM™ 染料标记的 Assay 与针对 RNA 酶 P 的 VIC® 染料标记的 TaqMan® Copy Number Reference Assay (货号：4403326) 进行双链化。针对 *TERT* 的拷贝数参照 Assay (货号：4403316) 也可用作替代。尽管这些参照 Assay 适用于大部分研究样本，但还必须根据经验确认所有检测样本中始终包含 2 个拷贝的参照基因。

表 2. 本研究中使用的人类检测和参照 Assay。

基因名称	Assay ID
CNV assay	
<i>CCL3L1</i>	Hs03198166_cn
<i>C4A/C4B (C4L)</i>	Hs07226352_cn
<i>ERBB2 (HER2)</i>	Hs00817646_cn
CNV 参照 Assay	
RNAse P	4403326
<i>TERT</i>	4403316

数字 PCR 反应设置

反应混合物中包含 QuantStudio® 3D 数字 PCR 预混液、针对目的靶点的 TaqMan® Copy Number Assay、RNAse P Reference Assay 和卡瑞尔人 gDNA 样本 (参见图 2 和图 3，了解特定的样本 ID)。针对每个样本制备总体积为 16 µL 的 PCR 反应混合物，取 14.5 µL 上样至芯片。最终的 dPCR 反应混合物中包含 200–2,000 个拷贝/µL 的 gDNA (上样至芯片的 gDNA 量)，因此芯片的每个反应孔中平均包含 0.6–1.6 个拷贝的靶序列。需要根据目的靶点的拷贝数调整 gDNA 上样量。由于 dPCR 反应是双链反应，因此我们建议目的靶点和参照靶点应在此浓度范围内。如果靶点与参照的比例极高 (8–10 甚至更高)，则需要连续稀释。PCR 热循环条件及其他详情，请参见用户指南 [6]。

数据分析

PCR 扩增结束后，在 QuantStudio® 3D 数字 PCR 仪上读取芯片。从 QuantStudio® 3D AnalysisSuite™ Cloud 软件中导出绝对定量数据。采用 Excel® 软件计算每个二倍体基因组的拷贝数，先使用 FAM™ 染料标记的靶点和 VIC® 染料标记的 RNA 酶 P 参照的绝对定量数确定单倍体基因组的拷贝数，然后乘以 2，转换为二倍体基因拷贝数。

结果

高拷贝数定量，具有高精度和高准确度

传统实时荧光定量 PCR 的精度限制和对数算法，使该方法无法分辨出拷贝数超过 4 的微弱差异。为证明 dPCR 检测更高拷贝数基因的能力，采用 QuantStudio® 3D 系统和针对 *CCL3L1* 基因 (个体中拷贝数可变的趋化因子基因) 的 TaqMan® Copy Number Assay 对 9 种 gDNA 样本进行分析 [7]。结果显示样本中每个基因组包含的拷贝数从 0 到 8 个拷贝不等 (图 2)。由于检测的高精度，可以清晰辨别出包含 7 个和 8 个拷贝数的样本之间的明显差异，说明 dPCR 能够区分低于 1.2 倍的差异。

A

样本	重复数	预期 CN	检测 CN_平均值	标准差	CV (%)
NA17245	6	0	0.08	0.06	不适用
NA17251	6	1	0.98	0.022	2.21
NA17258	6	2	1.96	0.048	2.47
NA17132	6	3	2.98	0.055	1.85
NA19194	8	4	4	0.049	1.22
NA18507	8	5	5.11	0.128	2.5
NA17110	8	6	5.91	0.122	2.07
NA17202	8	7	7.02	0.072	1.02
NA18854	8	8	7.95	0.203	2.55

异质性样本中的高分辨率拷贝数分析

为进一步证明 dPCR 的高精度检测性能，从卡瑞尔人数据库中取两个样本，分别含有 2 个拷贝和 3 个拷贝的 *CCL3L1* 基因座，以不同的比例混合，模拟预计拷贝数为 2 至 3 个拷贝的样本，增量为 0.1 个拷贝。鉴于单个细胞无法显示微小的拷贝数差异，该模拟与异质性细胞群体高度相关，测定的拷贝数是所有细胞的平均值。采用 QuantStudio® 3D 系统检测混合样本的拷贝数，并对照预计拷贝数绘制曲线 (图 3)。结果显示 QuantStudio® 3D 系统能够分辨出极其微小的拷贝数差异 (<5%)。

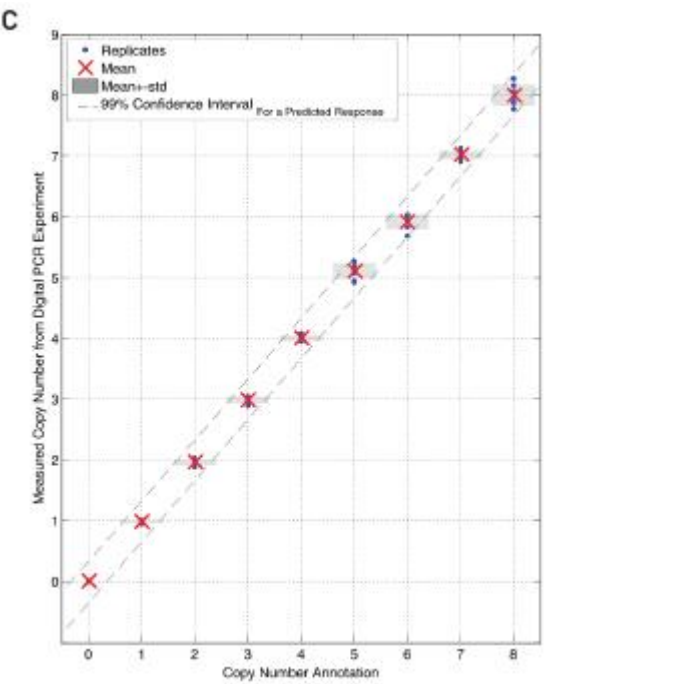
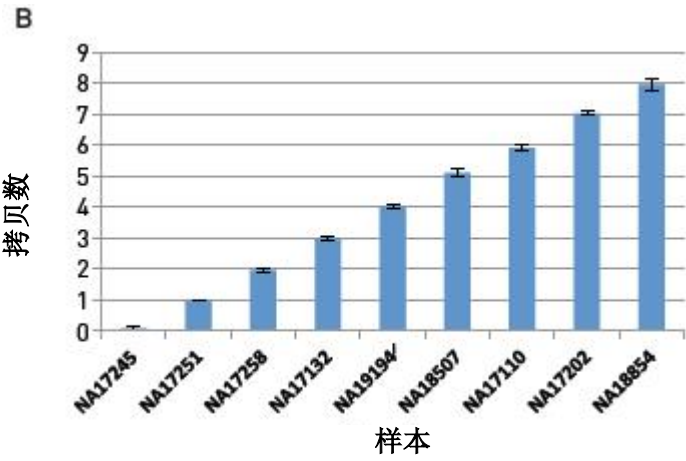


图 2. *CCL3L1* 基因座拷贝数分析的精度和准确度。(A) 检测 9 个 gDNA 样本的拷贝数。每组技术重复的变异系数 (CV, 第 6 列) 低于 2.6%，证明每个重复组中的检测重复性很高。(B) 无重叠的误差线显示，通过精确测量能够区分出包含 7 至 8 个拷贝 *CCL3L1* 的样本的统计学差异。(C) 对照每个样本的预期拷贝数，以测得的拷贝数值做图。蓝点代表单个芯片的拷贝数，红色十字代表特定样本所有测量值的平均值。灰色阴影的长方形代表其标准差，虚线代表预计反应的 99%置信区间。数据质量已经过 QuantStudio® 3D AnalysisSuite™ Cloud 软件验证，并采用 QuantStudio® 3D AnalysisSuite™ Cloud 软件报告的绝对定量数据在 Excel® 软件中计算拷贝数。

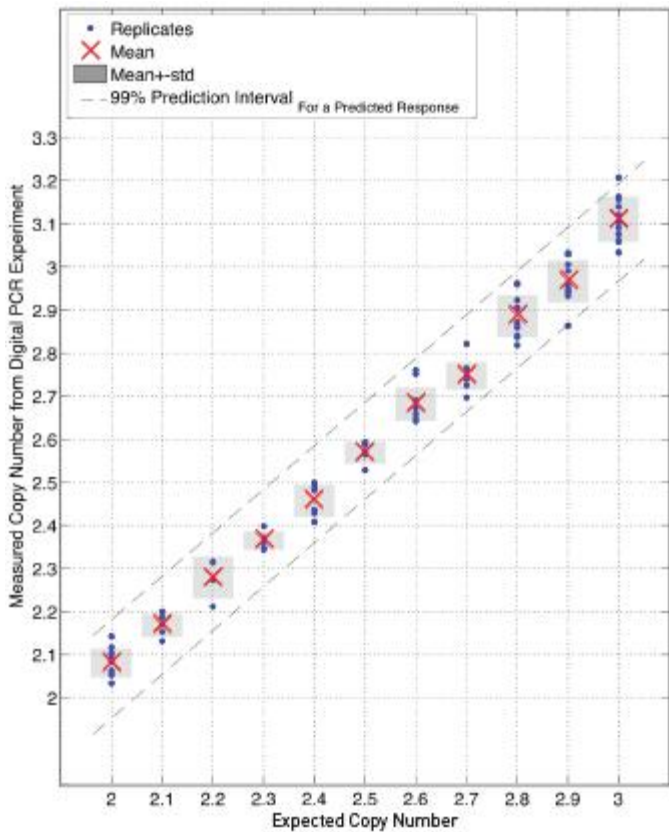


图 3. CCL3L1 基因座的高分辨率拷贝数分析。从卡瑞尔人数据库中取两个样本，分别含有 2 个拷贝 (NA17258) 或 3 个拷贝 (NA17132) 的 CCL3L1 基因，混合后生成预计拷贝数为 2 至 3 个拷贝的样本，增量为 0.1 个拷贝 (2.0、2.1、2.2 等)。从 QuantStudio® 3D AnalysisSuite™ Cloud 软件中导出 QuantStudio® 3D 仪器的绝对定量数据，采用 Excel® 软件计算混合样本的拷贝数。

采用 FFPE 样本进行 HER2 基因拷贝数分析

FFPE 样本被广泛应用于临床样本的分子表达谱和生物标记物研究。我们分析了 43 个乳腺癌 FFPE 样本，对 HER2 基因 (又称为 ERBB2) 进行扩增，该基因可以促进癌细胞的增殖，是一种重要的靶向治疗生物标记物 [8, 9]。采用针对 HER2 的预设计的 TaqMan® Copy Number Assay 和 TaqMan® RNase P Copy Number Reference Assay 进行分析。采用 Microsoft Excel® 及 QuantStudio® 3D AnalysisSuite™ Cloud 软件导出的数据计算绝对定量比例，确定 HER2 拷贝数 (图 4)。同时检测针对 TERT 的 TaqMan® Copy Number Reference Assay，可以获得一致的结果 (数据未显示)。

为验证结果，我们将 dPCR 数据与此前采用原位杂交 (SISH) 检测相同样本获得的数据进行比较。对于 SISH，根据美国临床肿瘤学会 (ASCO) 和美国病理学家协会 (CAP) 指南 (2007) 将 HER2 基因的扩增定义为阳性 (P) 或阴性 (N) [10]。dPCR 和 SISH 结果具有高度一致性，如图 4 所示。如需了解有关本研究的更多信息，请参阅参考文献 11。

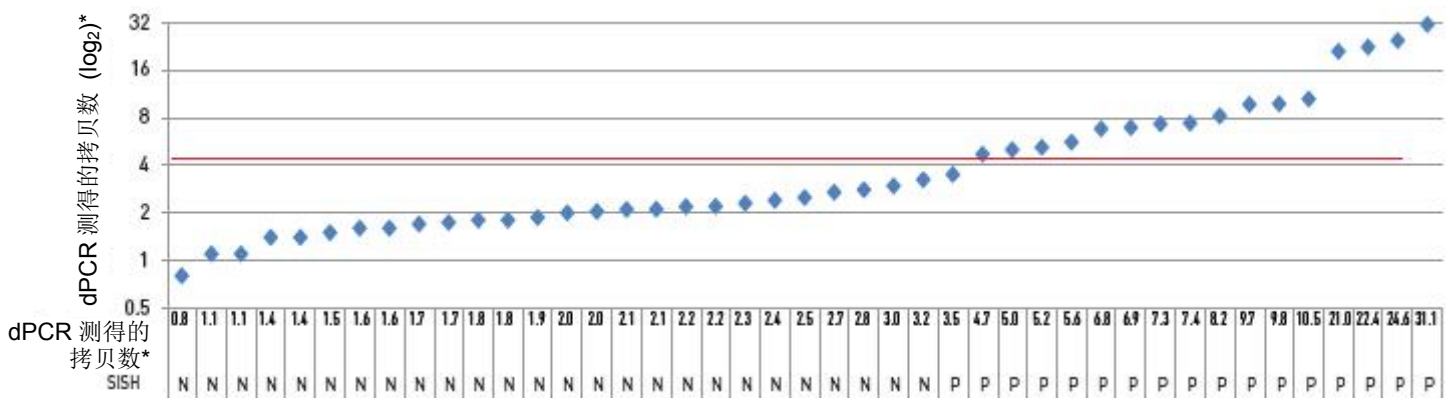


图 4. 采用 dPCR 和 SISH 对 HER2 基因进行拷贝数分析。在 QuantStudio® 3D 系统上分析 43 个 FFPE 样本，测定 HER2:RNA 酶 P 拷贝数比例。随后将该比例转换为二倍体拷贝数。根据此前的 SISH 测定结果，HER2 扩增状态显示为阳性 (P) 或阴性 (N)。红线代表拷贝数 4.4，使用 ASCO/CAP 指南 (2007)，对应的 HER2/CEP17 比例的阳性结果阈值为 2.2。CEP17 是 SISH 中使用的参照序列，靶向 17 号染色体的着丝粒区域。除接近阈值的一个样本外，其他全部样本采用两种方法测定的 HER2 状态均一致。

*采用 Excel® 软件计算的拷贝数比例

结论

QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统提供了一种灵敏、准确且可靠的拷贝数分析技术，工作流程十分简单。结果证明，采用 *CCL3L1* 基因拷贝数已知的样本，可以高度准确地检测 0 至 8 个拷贝，且精度较高 ($CV < 2.6\%$)。此外，该方法的分辨率高于传统实时荧光定量 PCR，且可重复性高，可以从高度异质性模拟样本中鉴别出极其微小的差异。最后，我们检测了 FFPE 样本中的 *HER2* 基因扩增，证明其与相同样本的 SISH 结果高度一致。

我们可提供逾 160 万种预设计的 TaqMan® Copy Number Assay，适用于 QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统。如果您的目的基因座不在上述产品之列，我们还可以提供定制设计选项。鉴于实时荧光定量 PCR 的成本和通量优势，它仍然适用于 CNV 分析，而数字 PCR 可以用于需要检测极其微小的样本差异的研究。该方法具有无与伦比的精度，适用于异质性样本的 CNV 分析和高拷贝数靶点的分析，常用于癌症研究及其他领域。

附录

选择限制性酶用于拷贝数分析

根据相邻拷贝之间的距离和样本类型不同，可能需要使用限制性酶切分离紧密连锁的拷贝。我们的数据证明，如果距离超过 100 kb (我们研究中的 *CCL3L1*) 或者如果使用 FFPE 样本，鉴于其自身的片段化状态 (我们研究中的 *HER2*)，无需酶切。我们选择较长的 *C4* (*C4L* 或 *C4A/C4B*) 进行分析，因为拷贝之间的距离短于本研究

中的其他基因。这些基因是血液补体系统的组分，由两个高度相似的基因座编码 [12]。如果距离短于 100 kb (我们研究中的 *C4A/C4B*) 或者距离未知，我们建议进行酶切。图 5 显示了酶切和未酶切样本可以观察到的拷贝数差异。包含 3 个拷贝以上 *C4A/C4B* 的未酶切样本的拷贝数被低估，但限制性酶切对 *CCL3L1* 的结果无影响，因为拷贝之间的距离超过了 100 kb。

采用从 NCBI 或 EMBL 下载的 DNA 序列信息以及网络上提供的诸多定位工具之一，或者专门的序列分析软件 (如 Vector NTI® 软件)，可以对候选的限制性酶切位点进行定位。所选的限制性酶切位点必须在重复序列之间，且不在 Assay 的靶序列之内。我们推荐使用可以从 Assay 位置酶切超过 150 bp (Life Technologies™ 网站提供 Assay 介绍) 且甲基化不敏感的限制酶。例如，DpnII 适用于 *C4A/C4B* 和 *CCL3L1* 基因靶点酶切，符合上述所有标准。

确定最佳样本稀释度

在酶切之前应先计算 gDNA 浓度，整个工作流程都会用到该浓度值，并且确保达到 QuantStudio® 3D 数字 PCR 芯片的最佳上样浓度。为了最大程度地降低酶切缓冲液对下游 PCR 的潜在效应，应计算并进行酶切后稀释。如果起始材料有限，则使用 100–500 ng 未酶切 gDNA。如果 gDNA 上样量较低，则需要减少限制性酶切体积。如需进一步了解样本稀释信息，请参阅用户指南 [6]。

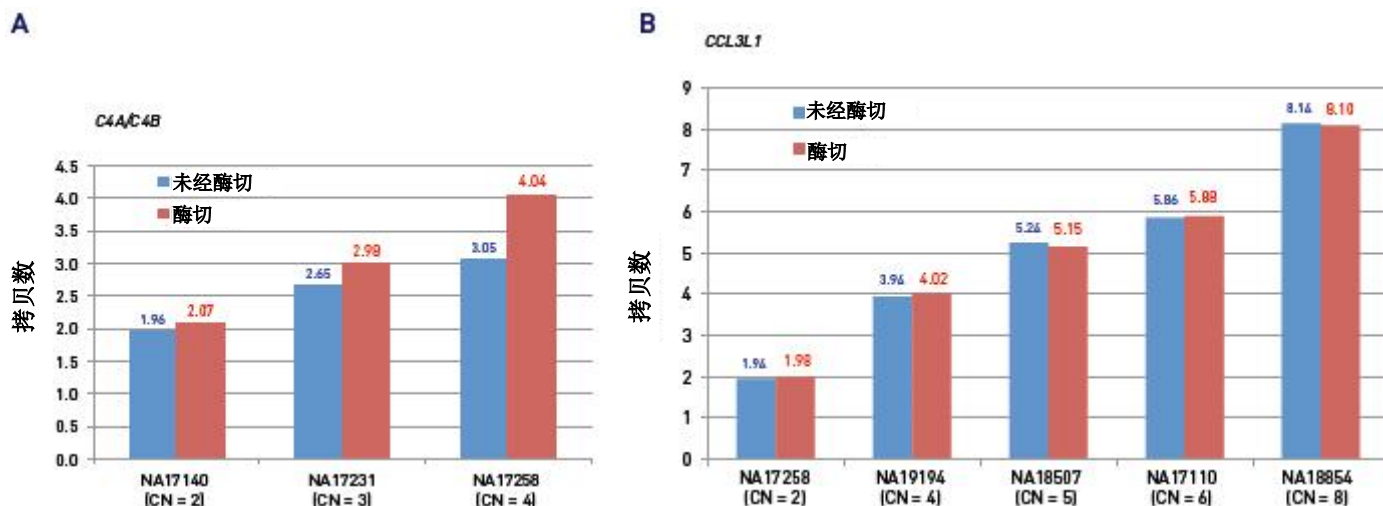


图 5. 限制性酶切对拷贝数测量的影响。采用或不采用 DpnII 酶切标示拷贝数的样本，然后在 QuantStudio® 3D 系统上进行分析。(A) 未进行限制性酶切，包含 3 个拷贝以上 *C4A/C4B* 的样本拷贝数被低估。(B) 限制性酶切对 *CCL3L1* 拷贝数结果无影响，因为拷贝之间的距离超过 100 kb，每个基因组中包含高达 8 个拷贝。

参考文献

1. Inaki K, Liu ET (2012) Structural mutations in cancer: mechanistic and functional insights. *Trends Genet* 28:550–559.
2. Almal SH, Padh H (2012) Implications of gene copy number variation in health and diseases. *J Hum Genet* 57:6–13.
3. Starczynski J, Atkey N, Connelly Y, et al. (2012) *HER2* gene amplification in breast cancer: a rogues' gallery of challenging diagnostic cases. *Am J Clin Pathol* 137:595–605.
4. Li W and Olivier M (2013) Current analysis platforms and methods for detecting copy number variation. *Physiol Genomics* 45:1–16.
5. Fang LT, Lee S, Choi H, et al. (2014) Comprehensive genomic analyses of a metastatic colon cancer to the lung by whole exome sequencing and gene expression analysis. *Int J Oncol* 44:211–221.
6. QuantStudio® 3D Digital PCR System User Guide. Pub. No. MAN0007720, Rev. A.
7. Irving SG, Zipfel PF, Balke J, et al. (1990) Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nucleic Acids Res* 18:3261–3270.
8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER-2/neu* oncogene. *Science* 235:177–182.
9. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R (2012) The *HER2* receptor in breast cancer: Pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. *Chemother Res Pract* 2012:743193.
10. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118–145.
11. Copy number variation in breast cancer translational research; QuantStudio® 3D Digital PCR System as a cost-effective and sensitive alternative for *HER2* gene amplification assessment. Pub. No. CO09771, available at lifetechnologies.com.
12. Blanchong CA, Chung EK, Rupert KL, et al. (2001) Genetic, structural and functional diversities of human complement components *C4A* and *C4B* and their mouse homologues, *Slp* and *C4*. *Int Immunopharmacol* 1:365–392.

订购信息

产品	货号
QuantStudio® 3D 数字 PCR 系统包——包括: **	A25581 [†]
QuantStudio® 3D 数字 PCR 仪及电源线	4489084
QuantStudio® 3D 数字 PCR 芯片配套组件 (适用于槽式热循环仪)	4485513
QuantStudio® 3D 数字 PCR 预混液	4482710
QuantStudio® 3D 数字 PCR 芯片加载系统	4482592
QuantStudio® 3D 数字 PCR UV 密封组件	4488475
QuantStudio™ 3D 数字 PCR 芯片	4485507

**包装列出的货号是针对单独组件的。

[†] 货号 A25581 适用于除欧洲、中东和非洲外的所有地区 (EMEA)。针对 EMEA 客户请使用货号 A25606。包装组件稍有不同。具体详情请与您的区域销售代表核实。

如需了解更多信息，请登录 lifetechnologies.com/quantstudio3d

