

基于高通量微弱荧光快速检测的高分辨熔解 曲线分析仪

彭年才¹ 张镇西² 李 政² 赵玉龙¹ 蒋庄德¹

(¹ 西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 陕西 西安 710049)
(² 西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049)

摘要 高分辨熔解(HRM)曲线分析技术是近年发展起来的一种用于基因突变检测和单核苷酸多态性(SNP)分析的新方法,它通过实时监测 PCR 产物升温过程中双链 DNA 饱和染料的荧光强度变化来分析核酸序列的微小差异。根据 HRM 分析仪对荧光检测的时间和灵敏度需求,提出基于光开关阵列的多路高速荧光激发和检测模块实现高通量的微弱荧光快速检测;并根据 HRM 荧光数据特点,对原始荧光曲线进行滤波、基线探测、归一化和对温度微分等处理,从熔解曲线两端的线形区域自动提取基线作为归一化的标准,可以在不损失曲线形态特征信息的情况下获得更为精确的熔解温度,从而实现不同基因型熔解曲线的快速、准确识别。

关键词 生物光学;荧光快速检测;高分辨熔解曲线;光开关阵列

中图分类号 Q632 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201232.0217001

High Resolution Melting Analyzer Based on High Throughout Fast Detection of Weak Fluorescence

Peng Niancai¹ Zhang Zhenxi² Li Zheng² Zhao Yulong¹ Jiang Zhuangde¹

¹ State Key Laboratory for Manufacturing System Engineering,
Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710049

² Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Education Ministry, Xi'an Jiaotong University,
Xi'an, Shaanxi 710049, China

Abstract High resolution melting curves analysis (HRM) is a recently developed powerful technique for the detection of gene mutations and SNP analysis. Monitoring the changes in fluorescence from saturated dye labeled on dsDNA, as a PCR products (amplicons) are melted, the minor difference of nucleic acid sequence can be discriminated. Here fast fluorescence detection system based on fiber-optics switch array is designed for fulfilling the requirements of speed and sensitivity. High-density fluorescence data are processed by a series of procedure, such as smoothed, automatic baseline detection, normalizing and differential to temperature, different gene types could be recognized quickly and correctly by the high resolution melting curves.

Key words bio-optics; fast fluorescence detection; high resolution melting curves; fiber-optics switch array

OCIS codes 170.1420; 260.2510; 060.2380

1 引 言

基因突变是指 DNA 序列的各种变异,它的发生与 DNA 的复制、损伤、修复以及癌变和衰老都有关系。近年来高分辨熔解(HRM)曲线分析技术逐渐成为基因突变检测和单核苷酸的多态性(SNP)分

析的有力工具^[1]。HRM 是一种联管式 PCR 后分析技术,可以有效区分不同 SNP 位点与不同的基因型。HRM 不仅可以对已知突变进行分析,更重要的是还可以对未知突变进行筛查、扫描。HRM 分析技术具有三个突出的优势:1)高通量、高灵敏度、

收稿日期: 2011-07-15; 收到修改稿日期: 2011-08-31

基金项目: 国家 863 计划重点项目(2007AA042100)和国家自然科学基金(60927011)资助课题。

作者简介: 彭年才(1962—),男,博士,教授,主要从事生物医学及科学仪器等相关方面的研究。

E-mail: pnc@mail.xjtu.edu.cn

高特异性、低成本且不受检测位点的限制;2)操作简单、方便、灵活,节省时间成本;3)闭管无污染且不损伤 DNA,熔解分析后可进行凝胶电泳或测序。根据 2010 年最新文献报道,HRM 技术针对人类肿瘤相关的基因突变检测,428 例标本检测灵敏度为 96.9%,3080 例标本检测特异性为 97.1%^[2]。由于 HRM 分析技术的众多优势,它在医学、生物和农业等领域的突变扫描、SNP 分析、基因分型和甲基化分析等多个方面表现出非常好的应用前景。同时,与其相关的专用仪器的研究也越来越受到重视。

专用的 HRM 分析仪通过实时监测升温过程中饱和型双链 DNA(dsDNA)荧光染料与被研究生物标本 PCR 扩增产物的结合情况,根据采集的高分辨率荧光数据以温度为横坐标构建熔解曲线,并基于熔解曲线特征和熔解温度的变化来分析判断是否存在 SNP 及基因突变。Herrmann 等^[3]2007 年详细分析和评价了目前科学工作者使用的 HRM 仪器及其替代品的性能,HRM 分析的应用依赖于 HRM 分析仪的温度及荧光检测分辨率。国内关于 HRM 专用仪器的研究还未见报道。

HRM 分析仪涉及的关键技术有:样品温度的精确控制和孔间温度均匀性,高通量、高灵敏度、高密度荧光数据(至少每摄氏度 10 荧光数据点)的快速采集以及荧光熔解曲线自动分析方法。由于前两项技术在系统集成时往往是矛盾的,不容易在同一设备上集成,因此同时提高热学模块和光学检测模块的分辨率和集成性能是 HRM 仪器的核心技术之一。现有的具有 HRM 功能的 qPCR 如罗氏的 LC480,其温控系统性能较好,为了实现高通量荧光采集它采用了 CCD 成像的方式进行多孔检测,国内刘军等^[4]也采用 CCD 基因芯片的荧光靶点扫描,但其灵敏度和信噪比都无法与光电倍增管(PMT)检测相比,而且各通道间的光学信号干扰大;而其他采用 PMT 进行高通量检测时则需要机械扫描方式,目前较快的美国安捷伦 Stratagene Mx3000p 型实时荧光定量 PCR 仪 96 路扫描时间需 3.5 s,这限制了荧光的采集速度,导致荧光数据点的减少。本文针对高通量微弱荧光检测提出了基于光开关阵列的多路荧光激发和检测模块,实现了无机械扫描动作的高速荧光采集。这种方法不仅可以提高荧光数据密度,还有利于降低通道串扰、提高检测灵敏度。根据 HRM 荧光数据特点,本文对原始荧光曲线进行滤波、基线探测、归一化和对温度微分等处理,从熔解曲线两端的线形区域自动提取基线作为归一化的

标准,可以在不损失曲线形态特征信息的情况下获得更为精确的熔解温度,进而实现不同基因型熔解曲线的快速、准确识别。

2 HRM 分析仪中的高通量微弱荧光检测

HRM 分析仪进行高通量分析时,每个通道中均以 0.1 °C/s 的升温速度从 70 °C 左右向 90 °C 左右缓慢上升,在此过程中 dsDNA 不断解螺旋并最终变性成两条单链 DNA,同时饱和荧光染料(标记在 DNA 双螺旋结构中的小沟)的荧光强度也随温度升高而逐渐减小。为了保证不同生物学标本哪怕只有一个碱基不同导致熔解荧光曲线有细微差别就能被高分辨地捕捉出来,需要每个通道的荧光数据密度至少每摄氏度 10 个荧光数据点^[5]。

2.1 基于光开关阵列的荧光检测系统

目前已经有多种双链 DNA 饱和荧光染料,这包括 LCGreen, ResoLight 与 EverGreen 等。这些都是绿色荧光染料,最佳激发波长范围 440~470 nm,发射荧光波长 470~520 nm。相应地,本系统中使用的光源是 450 nm 的发光二极管,检测器采用日本滨松(Hamamatsu)的高性能金属平面式光电倍增管 H5784。本文设计的荧光检测系统如图 1 所示。

要实现至少每摄氏度 10 个荧光数据点的数据密度和 0.1 °C/s 的升温速度,系统必须在 1 s 内采集到所有通道中的荧光数据。在激发端和荧光检测端都采用光开关阵列进行快速切换,从而实现高速荧光采集。单个试管的激发与荧光检测结构如图 1 的左下角所示,独立的荧光收集光纤避免了荧光串扰。前端的微透镜用于提高荧光收集的范围,提高检测灵敏度。

光开关是一种具有一个或多个可选的传输端口,对光传输线路或集成光路中的光信号进行相互转换或逻辑操作的光学器件^[6]。光开关可以在毫秒级时间内进行操作,具有波长范围宽、开关速度快、低插损、高回损、光路无胶和稳定可靠等显著优点^[7,8]。选取中国电子集团公司桂林激光通信研究所研制的 FSW1×24 型光开关模块,其关键技术参数如表 1 所示。该模块通过微机电装置改变输入光的传播方向实现光路切换功能,相邻通道间的顺序切换时间小于 10 ms。

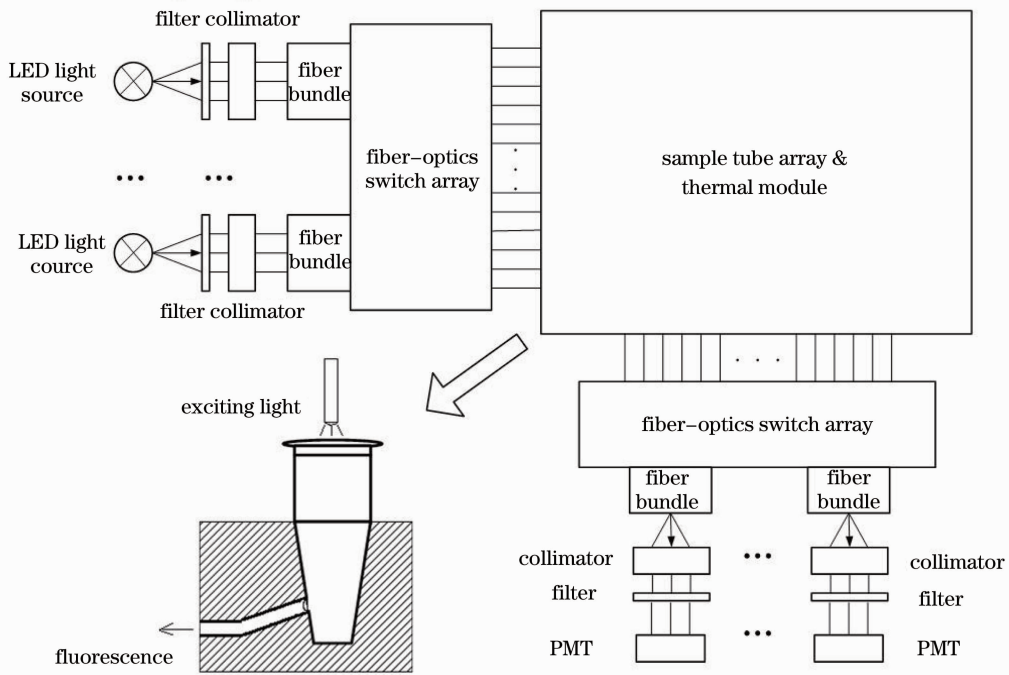


图 1 基于光开关阵列的快速荧光检测系统结构图

Fig. 1 Structure of fast fluorescence detection system based on fiber-optics switch array

表 1 FSW1×N 型光开关的关键技术参数

Table 1 Key parameters of fiber-optics switch FSW1×N

Type	FSW1×N-SM/MM-A
Wavelength	Customed 470 nm, 520 nm
Insertion loss	≤0.8 dB (typed ≤0.5 dB)
Repeatability	≤±0.05 dB
Service life	≥10 ⁷
Return loss	≥25 dB (multi-mode fiber), ≥50 dB (single-mode fiber)
Cross talk	≤-70 dB
Switch time	≤10 ms (adjacent channel, switch in turn)
Driving voltage	DC 5 V
Operating temperature	-15 °C ~ +65 °C
Storage temperature	-40 °C ~ +75 °C

对于 96 孔高通量的荧光快速检测,在荧光激发端和检测端分别使用 4 组 FSW1×24 型光开关组成光开关阵列,每个光开关对应 2×12 个 PCR 试管的孔位。控制系统以 100 Hz 的频率同步切换激发与检测端两个对应的光开关,四组光开关同时运行,对四路 PMT 的信号同时检测。每个通道的切换时间为 10 ms,本课题进行 10 ms 的荧光数据采集,24 孔的荧光采集时间共需约 24×20 ms,由于四组光开关阵列可以并行进行荧光的激发与检测,所以完成所有 96 孔的荧光数据采集时间约 500 ms。

2.2 荧光检测速度测试与串扰测试

随机选择经 PCR 热循环扩增过的 DNA 试剂标本(含饱和荧光染料 LCGreen)装入 96 孔载台,设置

激发端和检测端的光开关同步切换频率为 100 Hz,相当于每个通道的切换时间为 10 ms。采用 Tektronix TDS 2024B 型数字示波器记录光电倍增管输出 O/E 端信号,即各路荧光对应的模拟电信号。示波器记录的信号如图 2 所示,从中可以看出光开关切换频率为 100 Hz 时,随机 PCR 标本对应的输出幅度各异的脉冲输出上升沿和下降沿很陡,能满足之后 A/D 转换及数字和软件系统对各路信号的识别和采集,实现多路荧光信号无机械动作快速扫描检测。实测的单通道切换加上荧光采集时间约 23 ms,四组光开关阵列同步实现的 96 路荧光采集时间约 540 ms。

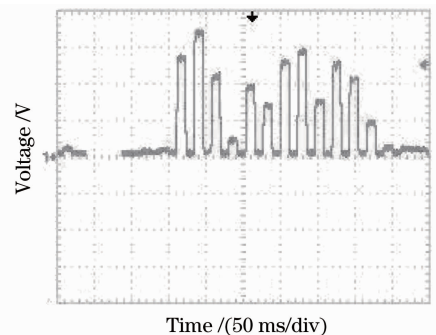


图 2 荧光检测速度测试示波器图

Fig. 2 Oscillogram of fluorescence detection speed test

随机选择经 PCR 热循环扩增过的 DNA 试剂标本(含饱和荧光染料 LCGreen)装入 96 孔载台的

1号、3号和5号等奇数号样本孔中,同样设置光开关同步切换频率为100 Hz。示波器记录的各通道荧光信号如图3所示,偶数号样本孔对应的PMT输出基本上为背景噪声,实验证明系统的结构和运行模式避免了荧光的激发和检测串扰。

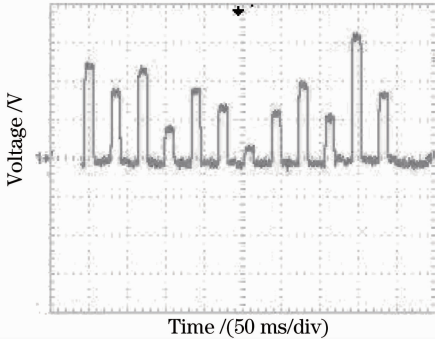


图3 荧光串扰测试示波器图

Fig. 3 Oscillogram of fluorescence crosstalk test

3 荧光数据处理与熔解曲线特征提取

HRM 荧光数据处理分为两部分:1)在下位机进行荧光数据采集时进行快速软件滤波,系统采用改进的跳水滤波算法;2)在完整的实验数据上传到计算机后进行的预处理、熔解曲线拟合等过程,预处理包括粗大误差剔除和中值滤波,采用双S曲线模型进行拟合。由熔解曲线来区分不同的基因型和DNA突变,还需要对熔解曲线进行基线探测、归一化和微分等数据处理与特征提取过程。

把熔解曲线对荧光强度归一化是进行特征提取的第一步。归一化需要确定荧光曲线成线形变化的两个基线区域,这两个区域分别对应 dsDNA 的双螺旋状态(螺旋度为100%)和全部熔解为单链DNA的状态(螺旋度为0%)。如图4所示,自动基线探测可以在熔解曲线上寻找两个线形区域作为归一化的标准。

完成荧光强度的两个基线区域的探测后,将熔解曲线在荧光强度轴上进行归一化,如图5所示。熔解温度定义为DNA双螺旋结构失去一半时对应的温度,经过准确的基线探测后,熔解温度在熔解曲线上对应荧光强度降到50%时对应的温度。目前还有一种常用的归一化方法——温度移位归一化,通过这种归一化可以部分补偿由于各样品孔间的温度差异造成的熔解曲线差别,使得从熔解温度的不同就可以区分出杂合子变异;但这种温度归一化也会造成熔解曲线的一些有用信息丢失,使得它无法分辨纯合子变异。本文涉及的仪器采用了压控热管

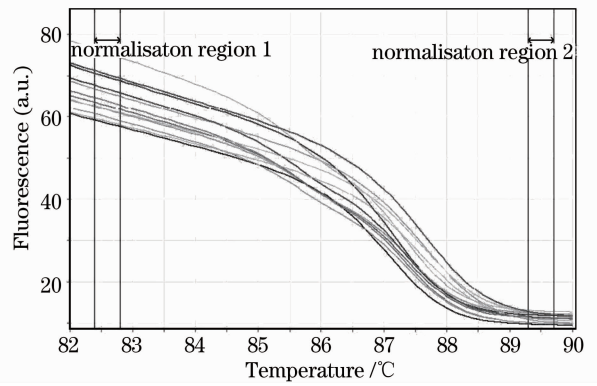


图4 熔解曲线的自动基线探测

Fig. 4 Automation baseline detection of melting curves

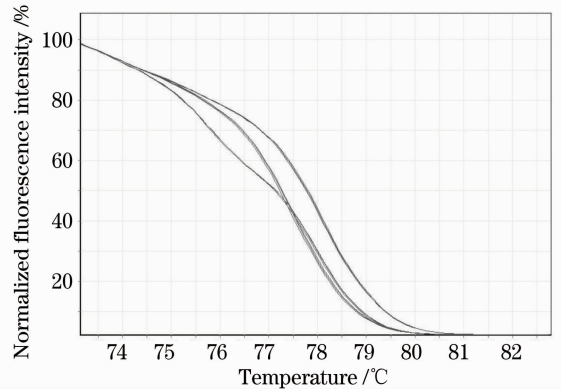


图5 熔解曲线的归一化荧光强度

Fig. 5 Melting curves of normalized fluorescence intensity 恒温槽的热学模块设计,从而可以将孔间的温度均匀性提高到小于等于0.05 °C,不采用温度移位归一化即可以分辨出不同杂合子熔解温度,同时又不会造成熔解曲线的信息丢失,可分辨纯合子变异。

除了熔解温度外,不同基因型和基因发生变异时的熔解曲线的形态特征区别更大。将荧光强度对温度求微分得到的曲线(如图6所示)可以获得更多的特征。

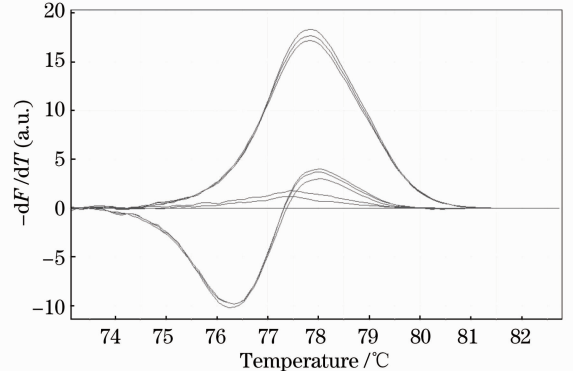


图6 熔解曲线对温度的微分

Fig. 6 Differential to temperature in fluorescence of melting curves

图 4~6 展示了三组不同基因型熔解曲线的数据处理与识别过程,最终通过图 6 可以将这三种不同的基因型快速、准确地区分开。

4 结 论

设计了基于光开关阵列的多路高速荧光激发和检测模块实现高通量的微弱荧光快速检测,满足 HRM 分析仪的荧光检测的快速性和灵敏度需求;通过对原始荧光曲线进行滤波、自动基线探测、归一化和对温度微分等处理,可以实现不同基因型熔解曲线的快速、准确识别。

参 考 文 献

- 1 C. T. Wittwer, G. H. Reed, C. N. Gundry *et al.*. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. *Clin. Chem.*, 2003, **49**(6): 853~860
- 2 J. S. Farrar, G. H. Reed, C. T. Wittwer. High Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics G. P. Patrinos, W. Ansorge Edited Molecular Diagnostics [M]. 2nd Ed. London: Elsevier, 2010; 229~245
- 3 M. G. Herrmann, J. D. Durtschi, C. T. Wittwer *et al.*. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping[J]. *Clin. Chem.*, 2007, **53**(8): 1544~1548
- 4 Liu Jun, Zhao Jibin, Liu Weijun *et al.*. Gene chip microarray fluorescent spots images CCD scanning and acquiring system[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(2): 505~509
刘 军, 赵吉宾, 刘伟军 等. 基因芯片荧光靶点阵列图像 CCD 扫描采集系统[J]. *中国激光*, 2010, **37**(2): 505~509
- 5 K. Meksem. G. Kahl. The Handbook of Plant Mutagenesis and Mutant Screening [M]. Berlin: Wiley-VCH, 2010. 149~165
- 6 Wang Gang, Ming Anjie, Liang Jingqiu. Development of the optical switch[J]. *MEMS Device and Technology*, 2005, **4**: 195~199
王 刚, 明安杰, 梁静秋. 光开关研究进展[J]. *MEMS 器件与技术*, 2005, **4**: 195~199
- 7 Zhi Yanan, Yan Aimin, Shu Rong *et al.*. High-speed digital beam scanner based on electro-optic crystal switch array[J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(12): 3430~3434
职亚楠, 闫爱民, 舒 嵘 等. 高速电光晶体开关阵列数字光束扫描器[J]. *光学学报*, 2010, **30**(12): 3430~3434
- 8 Tan Chunhua, Huang Xuguang. An all optical switch based on the tunable bandgap of a two dimensional photonic crystal[J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(9): 2714~2718
谭春华, 黄旭光. 基于带隙可调的二维光子晶体全光开关[J]. *光学学报*, 2010, **30**(9): 2714~2718

栏目编辑: 韩 峰