

低温变性下复合 PCR 技术及其应用

梁卉^{1,2}, 陈国杰³, 于燕⁴, 熊礼宽^{1,2}

1. 暨南大学附属深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室, 深圳 518102

2. 深圳市出生缺陷重点实验室, 深圳 518102

3. 郑州大学附属第一医院消化科, 郑州 450052

4. 暨南大学附属深圳市宝安区妇幼保健院产科, 深圳 518102

摘要: 低温变性下复合 PCR(co-amplification at lower denaturation temperature-polymerase chain reaction, COLD-PCR)是一种在高丰度野生型序列背景下选择性变性和扩增低丰度突变型序列的方法, 可将突变型序列富集 10~100 倍。基于突变片段 T_m 值的改变和异源双链 DNA 分子的形成, COLD-PCR 可富集扩增片段中所有类型 and 位置的突变, 也可富集未知突变, 具有敏感、特异、精确、廉价和易操作等优点。COLD-PCR 及其衍生方法被应用于肿瘤、微生物、产前筛查和动植物等领域, 对疾病的早期诊断、病程和治疗监控、药物选择、预后判断和植物育种等均有积极的作用。本文就 COLD-PCR 的原理、关键技术、衍生方法及其应用进行综述。

关键词: 低温变性下复合 PCR; 精确的变性温度; 选择性富集; 低丰度突变; 检测阈值

Co-amplification at lower denaturation temperature-PCR: methodology and applications

Hui Liang^{1,2}, Guojie Chen³, Yan Yu⁴, Likuan Xiong^{1,2}

1. Central Laboratory, Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Jinan University, Shenzhen 518102, China

2. Shenzhen Key Laboratory of Birth Defects, Shenzhen 518102, China

3. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

4. Department of Obstetrics, Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Jinan University, Shenzhen 518102, China

Abstract: Co-amplification at lower denaturation temperature-polymerase chain reaction (COLD-PCR) is a novel form of PCR that selectively denatures and amplifies low-abundance mutations from mixtures of wild-type and mutation-containing sequences, enriching the mutation 10 to 100 folds. Due to the slightly altered melting temperature (T_m) of the dou-

收稿日期: 2017-11-06; 修回日期: 2018-02-02

基金项目: 深圳市三名工程-出生缺陷防治研究与转化团队(编号: SZSM201406007), 深圳市出生缺陷重点实验室(编号: ZDSYS201504301707152)和深圳市宝安区医疗卫生基础研究项目(编号: 2014067, 2017JD001)资助[Supported by Sanming Project of Medicine in Shenzhen-Birth Defects Prevention Research and Transformation Team (No. SZSM201406007), Shenzhen Key Laboratory of Birth Defects (No. ZDSYS201504301707152 and Science and Technology Plan Project of Baoan District (Nos. 2014067, 2017JD001)]

作者简介: 梁卉, 硕士, 主管技师, 研究方向: 出生缺陷疾病的遗传学研究。E-mail: lianghui2016615@126.com

陈国杰, 博士, 主治医师, 研究方向: 染色质结构和表观遗传调控。E-mail: chenguojie.hi@163.com

梁卉和陈国杰并列第一作者。

通讯作者: 熊礼宽, 博士, 研究员, 研究方向: 出生缺陷防治与研究。E-mail: xionglk@sina.cn

DOI: 10.16288/j.yczz.17-369

网络出版时间: 2018/2/8 11:31:42

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180208.1131.001.html>

ble-stranded DNA and the formation of the mutation/wild-type heteroduplex DNA, COLD-PCR methods are sensitive, specific, accurate, cost-effective and easy to maneuver, and can enrich mutations of any type and at any position, even unknown mutations within amplicons. COLD-PCR and its improved methods are now applied in cancer, microorganisms, prenatal screening, animals and plants. They are extremely useful for early diagnosis, monitoring the prognosis of disease and the efficiency of the treatment, drug selection, prediction of prognosis, plant breeding and etc. In this review, we introduce the principles, key techniques, derived methods and applications of COLD-PCR.

Keywords: co-amplification at lower denaturation temperature polymerase chain reaction (COLD-PCR); Tc; selectively amplifies; low-abundance mutation; detection threshold

随着分子诊断技术的不断发展和疾病分子标志物的发现, 基因突变检测越来越多地被应用于个体化医疗。突变可分为胚系突变和体细胞突变(嵌合突变), 前者的细胞遗传缺陷呈均一性, 后者的细胞遗传缺陷呈嵌合性, 突变比例多变(0%~100%)^[1]。当个体存在体细胞突变时, 特别是当嵌合突变比例低于分型技术的检测阈值时, 常因方法限制而出现假阴性。目前已有多种基于 PCR 原理的低频突变检测法, 根据检测的位点是否已知, 主要分为两类: (1)用于检测已知突变位点的方法, 包括等位基因特异性扩增 PCR(allele-specific amplification PCR, AS-PCR)、野生型阻滞扩增 PCR(wild-type blocking PCR, WTB-PCR)和数字 PCR 等; (2)用于检测未知突变位点的方法, 包括变性高效液相色谱法(denaturing high performance liquid chromatography, dHPLC)和基于反向 PCR 的限制性片段长度多态性(inverse PCR-based amplified restriction fragment length polymorphism, iFLP)等^[2]。这些技术的应用范围、灵敏度和优缺点各有不同。

低温变性下复合 PCR(co-amplification at lower denaturation temperature polymerase chain reaction, COLD-PCR)是一种在高丰度的野生型序列背景下选择性变性和扩增低丰度突变型序列的方法, 主要目的是富集突变序列, 使产物中低丰度的突变序列比例增高, 高于后续分型技术的检测阈值。通过优化变性温度和反应条件, COLD-PCR 可富集目的片段中所有位点的已知或未知的各类型突变, 具有敏感、特异、精确、廉价和易操作等优点, 可在不增加实验设备的前提下提高其他基因突变分型技术的敏感性^[3]。

COLD-PCR 在肿瘤、微生物、产前筛查和动植物等方面的研究日益增多, 如 COLD-PCR 可用于体液样本或肿瘤组织混合样本中 *KRAS* 等基因热点突变的检测, 进行肿瘤的早期诊断、病程和治疗监测、临床预后评估和靶向药物的选择等^[4]。本文对 COLD-PCR 技术的原理、关键技术、衍生方法及其应用展开综述。

1 COLD-PCR 原理

COLD-PCR 是常规 PCR 的改进方法, 最大特点是变性温度由高温变成一个较低的可选择性扩增突变型序列的精确的温度, 定义为 Tc(critical denaturation temperature)。基因突变可能导致序列的溶解温度(melting temperature, T_m)发生改变, 在低于野生型序列 T_m 温度下变性, 野生型序列的扩增效率低于突变型序列, 从而实现富集突变型序列的目的^[3]。

Tc 值的确定是 COLD-PCR 的关键。Tc 值主要取决于两个因素: (1)突变(G:C>A:T)导致的目的片段 T_m 值降低: ≥ 200 bp 大小的序列发生点突变时, T_m 值一般改变 0.2~1.5^[3]。(2)异源双链 DNA 分子的形成: 突变型序列和野生型序列杂交形成异源双链 DNA 分子, 由于不完全配对, 异源双链 DNA 分子比同源双链 DNA 分子稳定性低, 因此具有更低的 T_m 值; Tc 温度下, 异源双链 DNA 分子变性为单链, 而同源双链 DNA 分子仍保持双链^[3]。Tc 值可通过实验确定: 荧光定量 PCR 检测野生型序列 T_m, 然后进行一系列 PCR, 初始变性温度为 T_m, 并依次递减 0.5^{°C}, 直到无产物出现, 此时温度记为 T_m'。在 T_m' 基础上, 再依次递增 0.1~0.2^{°C} 作为变性温度, 继续

进行一系列 PCR 反应,直到产物出现,此时的温度被定义为 T_c 。大量的实验发现, $T_c = T_m - (1.0 \sim 2.0)$ 。

COLD-PCR 可分为两种形式,完全 COLD-PCR(full COLD-PCR)和快速 COLD-PCR(fast COLD-PCR)。Full COLD-PCR 的基本过程为:第一步进行常规 PCR 反应,增加模板数量;第二步进入 COLD-PCR 阶段,富集突变型序列:95℃变性,70℃杂交形成异源双链 DNA 分子, T_c 温度下变性,58~62(基于引物 T_m)退火,72℃延伸,循环 30~45 次(图 1A)。Full COLD-PCR 形成异源双链 DNA 分子,可

富集所有类型的突变,但扩增时间长。Fast COLD-PCR 无高温变性阶段和 70℃杂交形成异源双链 DNA 分子阶段,直接在 T_c 温度下变性和扩增(图 1B)。Fast COLD-PCR 不生成异源双链 DNA 分子,扩增时间短。Full COLD-PCR 富集倍数低于 fast COLD-PCR,但 fast COLD-PCR 仅能富集 T_m 值降低的突变^[3]。然而,最新的研究发现将反应体系中的 dGTP 和 dATP 分别用 dITP 和 dDTP 代替,fast COLD-PCR 也可富集 T_m 增加的突变^[5]。因此,fast-COLD-PCR 也适用于所有类型的突变。

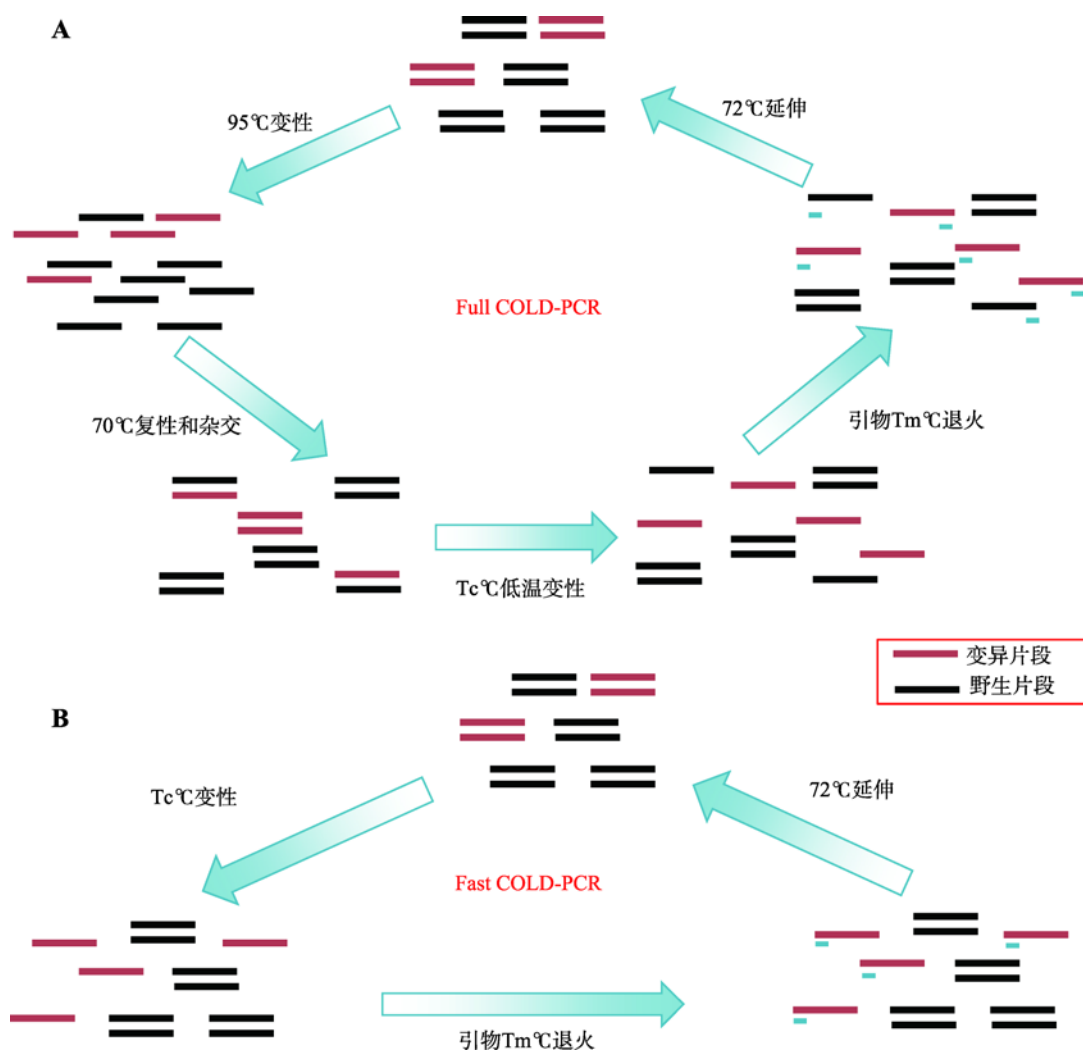


图1 Full COLD-PCR 和 fast COLD-PCR 原理图

Fig. 1 Schematic view of full COLD-PCR and fast COLD-PCR

A: Full COLD-PCR 技术原理。DNA 95℃ 高温变性后,降低温度至 70℃复性,杂交形成同源双链 DNA 分子和异源双链 DNA 分子。由于突变型序列罕见,大部分突变型序列与野生型序列错配形成异源双链 DNA 分子,具有较低的熔解温度。在 T_c 温度下变性时,异源双链 DNA 分子优先解链,随后进行扩增富集。B: Fast COLD-PCR 技术原理。基本过程与常规 PCR 相似,仅将变性温度由高温 95℃ 改为 T_c 。在 T_c 温度下,突变型序列由于 T_m 值低于野生型序列而优先变性和富集。

结合 COLD-PCR, 基因分型技术的检测敏感性可提高 10~100 倍。常规 PCR 扩增后, Sanger 测序、焦磷酸测序、高分辨溶解曲线(high-resolution melting, HRM)、数字 PCR 和第二代测序技术(next generation sequencing, NGS)的基因分型检测阈值分别为 10%~30%, 10%, 5%~15%, 0.1%和 2%~5%; 改用 COLD-PCR 富集后, 分别提高到 0.5%~3%, 0.5%~1.0%^[3], 1%~2%^[6], 0.2%~1.2%^[7]和 0.02%~1%^[8](表 1)。为进一步增加检测敏感性, Li 等^[9]在 fast COLD-PCR 的基础上增加一轮 nested fast COLD-PCR, 结合 Sanger 测序后, 可检测到 0.01%的突变。但 Kristensen 等^[10]对 *KRAS* 基因突变进行两轮相同的 COLD-PCR 扩增后, 并未获得更高的检测敏感性, 可能与第二轮 COLD-PCR 未使用巢式引物有关。Song 等^[6]在 COLD-PCR/HRM 中加入 7%的 DMSO 可检测到 0.2%~0.3%的 *TP53* 突变, 与不加 DMSO 相比(1%~2%), 敏感性提高近 10 倍。Hashida 等^[11]使用突变富集 COLD-PCR/HRM 检测到 0.01%的 *EGFR* 基因 T790M 突变。该方法加入 *Bst*U I 酶, 将野生型序列酶切成不能扩增富集的小片段, 进一步提高了敏感性。

2 COLD-PCR 衍生方法

COLD-PCR 的最大挑战为 T_c 值要求非常精确,

反应过程中温差不能超过 ± 0.2 。普通的 PCR 仪精密密度不够, 不能满足常规 COLD-PCR 的实验条件。因此, 需要变温更快且精密密度更高的变温气流式 PCR 仪。且 T_c 值还与 COLD-PCR 的反应体系和实验室环境有关, 因此同一实验室在不同的时期即使进行同一片段富集时, 也可能由于实验室环境和操作人员改变而需要重新确定 T_c 值。因此, 研究人员开发了一系列对 T_c 值要求不高的 COLD-PCR 衍生方法。

2.1 改良型完全富集 COLD-PCR (improved and complete enrichment COLD-PCR, ice-COLD-PCR)

Ice-COLD-PCR 是 COLD-PCR 的衍生方法, 主要特点是加入非扩增的参考序列(reference sequence, RS), 与突变序列杂交形成异源双链 DNA 分子。RS 具有以下特征: (1)与野生型序列中的一条单链完全匹配; (2)不与引物结合; (3)3'端磷酸化确保 RS 不扩增。 T_c 温度下变性时, RS-突变型异源二聚体更容易解链, 进行突变序列的类线性扩增。与 full-COLD-PCR 相比, 虽然均形成异源双链 DNA 分子, 但 ice-COLD-PCR 杂交时间仅为 30 s, 远低于 full COLD-PCR 的 5~8 min, 大大缩短了反应时间。Ice-COLD-PCR 可富集所有类型的突变, 富集程度略高于 full COLD-PCR(3~5 倍), 略低于 fast COLD-PCR

表 1 COLD-PCR 的方法学比较

Table 1 Comparison of COLD-PCR methods

| | 常规 PCR | Full COLD-PCR | Fast COLD-PCR | Ice-COLD-PCR | E-ice-COLD-PCR | TT-COLD-PCR |
|---------------|---------|---------------|---------------|------------------|---------------------------|-------------|
| 突变类型 | — | 所有类型 | T_m 降低突变 | 所有类型 | 所有类型 | 所有类型 |
| 富集倍数 | — | 3~10 倍 | 10~100 倍 | 16 倍 | ~16 倍 | 6~17 倍 |
| 时间 | — | 耗时 | 快速 | 较耗时 | 最快 | 最耗时 |
| RS/浓度 | — | — | — | 有(任意链 20 nmol/L) | LNA(不能为 GC 突变链 10 nmol/L) | — |
| T_c 范围 | — | ± 2 | ± 2 | ± 2 | 5~10 | 2.5~3 |
| 预扩增 | — | 需要 | 需要 | 需要 | 不需要 | 需要 |
| 杂交时间 | — | 2~8 min | — | 30 s | 30 s | 2~8 min |
| Sanger 测序 | 10%~30% | 3% | 0.5% | 1% | 0.1% | 3% |
| 焦磷酸测序 | ~10% | 0.5%~1% | — | 0.1% | 0.01% | — |
| 高分辨溶解曲线 (HRM) | 5%~10% | 1~2% | 2% | — | — | 3% |
| 数字 PCR | 0.1 % | — | 0.2%~1.2% | — | — | — |
| 第二代测序技术 (NGS) | 2%~5% | — | 0.02%~0.2% | — | — | 0.01%~0.1% |

(~10 倍)。结合下游分型技术, ice-COLD-PCR 检测阈值分别为 1%(Sanger 测序)和 0.1%(焦磷酸测序)^[12], 比常规 COLD-PCR 敏感性提高 10 倍, 该方法已商业化用于 *KRAS* 基因突变的检测(Transgenomic, Omaha, NE)。虽然, ice-COLD-PCR 部分弥补了 COLD-PCR 的不足, 但仍需要精密的 T_c 值, 临床应用仍受到限制。

How-Kit 等^[4]在 ice-COLD-PCR 的基础上, 将 RS 用类寡核苷酸衍生物锁核酸(locked nucleic acid, LNA)代替, 建立了 E-ice-COLD-PCR(enhanced-ice-COLD-PCR)。E-ice-COLD-PCR 的优点是: (1)无需预扩增样本和省时, 反应模板仅需 25 ng DNA, 结合焦磷酸测序可在 3 h 内完成基因分型; (2)无需精密的 T_c 值, T_c 值跨度为 5~10°C, 实验操作难度小, 可重复性好^[4]; (3)可进行批量扩增^[13]; (4)可实现多重 COLD-PCR 反应^[14]; (5)较廉价。E-ice-COLD-PCR 阻滞剂的加入量(10 nmol/L)远小于 ice-COLD-PCR (20 nmol/L)和 WTB-PCR(1~100 μ mol/L); (6)检测敏感性高, 检测敏感性为 0.01~0.05%(焦磷酸测序); (7)不重叠 LNA 对野生型序列的抑制作用更强^[4]; (8)对 DNA 质量要求不高。E-ice-COLD-PCR 适用于所有来源和类型的样本, 如冰冻组织、福尔马林固定石蜡包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)样本和体液样本等^[15]。

E-ice-COLD-PCR 是一种简便、高效且相对廉价的方法, 但也具有一定的局限性。当 LNA-DNA 单碱基错配发生在 G-T 错配时, T_m 值并不发生明显的改变, 因此, E-ice-COLD-PCR 在 LNA 设计时需避免 G-T 突变单链。此外, E-ice-COLD-PCR 对野生型序列的抑制作用部分达到 100%, 当无产物出现时, 不能确定是由扩增失败或抑制作用过强所导致^[4]。后续的研究还应该考虑是否可通过增加内参序列进行改进。

2.2 温度耐受性 COLD-PCR(temperature-tolerant COLD-PCR, TT-COLD-PCR)

Castellanos-Rizaldos 等^[16]建立了 TT-COLD-PCR 法, 在 COLD-PCR 基础上, T_c 值变为横跨 2~3 的温度窗。TT-COLD-PCR 是一种变性温度递增的梯度 PCR, 每个梯度递增 0.3~0.5 °C, 扩增 7~15 个循

环, 共 5~10 个梯度, 以保证反应中的序列均有一个合适的变性温度用于富集。该原理应用于 COLD-PCR 中, 已发展为 TT-fast-、TT-full-和 TT-ice-COLD-PCR, 相对于普通 PCR, 新方法的富集程度分别提高了 8~17 倍、6~8 倍和 12 倍。进行多重扩增时, 可通过加入 DMSO 降低 T_m 值, 使得所有序列均位于一定的 T_c 范围内。但 TT-COLD-PCR 还存在缺陷: 多对引物加入, 易形成引物二聚体; TT-COLD-PCR 循环次数多, 可能超过 PCR 仪允许的最大循环数(115 个循环); 多次高温变性可能导致聚合酶失活等。此外, 富集效率也低于其他 COLD-PCR。虽然 TT-COLD-PCR 的 T_c 温度窗使得多重 COLD-PCR 成为可能, 但是由于引物二聚体的形成, 在进行多重 COLD-PCR 时, 需要将不同的序列在独立的反应管中扩增, 增加了反应操作的复杂性。

为了改进上述缺陷, Castellanos-Rizaldos 等^[17]在油包水乳剂中进行 TT-fast-eCOLD-PCR (TT-fast-COLD-PCR in emulsion)反应: 将每个 PCR 反应体系(水相)和油相分别混匀涡旋形成油包水乳剂, 然后合并到单管中进行多重 TT-fast-eCOLD-PCR。该方法解决了引物二聚体导致的扩增失败。但是, 需要 3 次 PCR 扩增, 且每个序列的反应体系均要进行乳剂形成, 操作过程极其繁琐且耗时, 在临床上使用受限, 仅适合特殊样本的处理。随后, 该研究小组用修饰核苷酸 dITP 和 dDTP 代替 dGTP 和 dATP 后, 可同时富集包括 T_m 增高的所有类型的突变。使用商业化试剂盒构建文库后, 增加 1 或 2 轮的多重 fast-TT-COLD-PCR 提高了 NGS (0.01%~0.1%)和 Sanger 测序的检测阈值(0.1%~0.3%)^[5]。该方法比其他 COLD-PCR/NGS(0.02%~1%)的检测敏感性更高^[8], 也是实现多重 COLD-PCR 的方法之一。

3 COLD-PCR 的应用

3.1 COLD-PCR 与肿瘤

3.1.1 COLD-PCR 与 *KRAS* 基因

COLD-PCR 多用于肿瘤特异性突变检测的研究。COLD-PCR 可提高肿瘤样本中低频 *KRAS* 基因突变的检出率, 常规方法检测到 30%~40% 的结直肠癌

(colorectal cancer, CRC)患者携带 *KRAS* 基因突变, 而 COLD-PCR 富集后, CRC 患者中 *KRAS* 基因突变携带率可提高到 50%^[18,19], 部分研究甚至高达 80% 以上^[10]。*KRAS* 基因突变与 EGFR 抑制剂的个体化治疗有关, 因此 COLD-PCR 在肿瘤化疗药物的合理使用中具有指导意义^[3]。

此外, 由于 COLD-PCR 提高了低丰度突变检测的敏感性, 该方法从技术层面上增加了样本来源的多样性, 组织样本(如新鲜冰冻组织、FFPE)和体液样本(如循环肿瘤细胞、循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、唾液和腹水等)均适用基因突变检测, 可实现实体肿瘤的“液态活检”。Liu 等^[20]使用 COLD-PCR 在所有已证实的 16 例突变携带患者中, ctDNA 中检出 13 例, 肿瘤组织样本中检出 12 例, 对同一患者的 ctDNA 和肿瘤组织分别检测 *KRAS* 基因突变, 基因分型结果一致率为 75%。由于外周血可重复获得, COLD-PCR 可通过对 ctDNA 的多次检测实现病程和疗效的监控^[21]。

COLD-PCR 用于 *KRAS* 基因突变的分型检测阈值为 0.01%~5%。Sanger 测序法是基因分型的金标准, 但常规 PCR/Sanger 测序法仅能检测高于 10~30% 的突变, 而 COLD-PCR/Sanger 测序可检测到~5% 突变^[21]。相对于 Sanger 测序法, HRM 法更为敏感, 且省时, 更适用于临床样本的常规检测: 常规 PCR/HRM 可检测到 5%~10% 的 *KRAS* 突变, 而 COLD-PCR/HRM 可将检测敏感性提高到 3%^[22]。Pritchard 等^[19]使用 fast COLD-PCR/HRM-cy5.5 标记探针后, 检测敏感性可达到 1%。COLD-PCR/焦磷酸测序其检测敏感性提高到 0.5%~1%, E-ice-COLD-PCR 更是将检测敏感性提高到 0.1~0.01%, 优于目前推荐的 ARMS 方法(0.1%~1%)^[4]。

3.1.2 COLD-PCR 与异柠檬酸脱氢酶 1(isocitrate dehydrogenase 1, *IDH1*)基因

胶质瘤活检组织中常混有大量的正常脑组织、脉管系统和浸润淋巴细胞, 大大增加了肿瘤基因的检测难度。COLD-PCR 可富集混杂于正常组织中的肿瘤特异性突变, 不仅提高了检测敏感性, 结合其他技术, 还可以实现术中快速诊断。Pang 等^[23]利用 COLD-PCR/荧光熔解曲线法(fluorescence melting

curve analysis, FMCA)将 *IDH1* 基因的检测敏感性提高到 1%。Boisselier 等^[24]比较了常规 PCR/HRM、常规 PCR/COLD-PCR/HRM 和 COLD-PCR/COLD-PCR/HRM, 发现胶质瘤特异性 *IDH1* 基因的检测敏感性分别为 25%、2% 和 0.25%。虽然 COLD-PCR/COLD-PCR/HRM 具有更高的检测敏感性, 但在临床应用中, COLD-PCR/FMCA 更为简单、省时, 且可避免多次 PCR 导致的污染。基于 COLD-PCR/FMCA 的特点, Kanamori 等^[25]建立了术中快速检测 *IDH1* 和 *IDH2* 突变的方法, 其结合了商业化冰冻快速切片 DNA 提取试剂盒(15 min)、fast COLD-PCR 快速扩增(40~45 min)和 FMCA 检测技术(5 min), 可在 60~65 min 内实现术中组织样本的快速分子病理检测。该术中快速检测方法的建立, 将术中快速病理检测技术拓展到分子水平, 将会极大推动术中病理学的发展。

先前的研究发现胶质瘤患者的 ctDNA 存在杂合性丢失和表观遗传学改变, 可能对胶质瘤的预后评估具有一定的价值。由于血脑屏障作用, 胶质瘤的 ctDNA 相对于其他部位的肿瘤如乳腺癌、直肠癌等的可检测性较低, 因此需要高敏感性检测技术用于胶质瘤 ctDNA 的检测。Boisselier 等^[26]使用 COLD-PCR 结合数字 PCR 对不同程度的胶质瘤进行 ctDNA 检测, 发现低级别胶质瘤和高级别胶质瘤患者的 *IDH1* 突变携带率分别为 37.5% 和 70.6%, 提示 COLD-PCR 对高级别胶质瘤具有较高的敏感性。虽然 COLD-PCR 不能解决所有胶质瘤的分子检测, 但是对于拒绝病理活检的患者, 以及需要在治疗前后进行多次检测的患者具有重要意义。尽管 E-ice-COLD-PCR 还未用于胶质瘤 *IDH1* 基因的检测, 但其高的野生序列抑制作用和高的突变序列富集能力, 可以预测, 对于 *IDH1* 基因在胶质瘤中的“液体活检”中具有广泛的应用前景。

3.1.3 COLD-PCR 与其他肿瘤相关基因

当肿瘤的病理形态难以区分时, COLD-PCR 还可用于肿瘤的鉴别诊断。肌内黏液瘤是一种罕见的疾病, 病理形态学上与低度粘液纤维肉瘤难以区分。Fast COLD-PCR/突变特异性限制性酶切(mutation-specific restriction enzyme digestion, MARED)发现

GNAS1 基因突变在肌内黏液瘤的携带率为 60.71% (17/28), 且在低度粘液纤维肉瘤样本和正常对照样本中并未发现突变, 该研究提示, 可用 COLD-PCR 检测 *GNAS1* 基因的突变情况来辅助临床医生鉴别诊断这两种疾病^[27]。

COLD-PCR 的高敏感性还可用于鉴定肿瘤相关基因。以往的研究认为先天性黑素细胞痣(congenital melanocytic nevus, CMN)与 *NRAS* 和 *BRAF* 基因突变均有关, 不同的研究小组发现 *NRAS* 突变携带率不同(22%~80%)。Charbel 等^[28]使用 E-ice-COLD-PCR 方法确认了这 2 个基因在不同分型的 CMN 中的意义。在巨大(>20 cm)CMN 和大(10~20 cm)CMN 中, *NRAS* 基因突变携带率高达 94.7%, *BRAF* 基因突变仅在 1 例患者中检测到;而在中-小 CMN 中, *NRAS* 基因突变携带率为 70%, *BRAF* 基因突变携带率为 30%。因此 *NRAS* 可能为 CMN 的主要致病基因, 提示恶性黑色素瘤的风险增加。

此外, COLD-PCR 还被用于其他肿瘤相关基因, 如 *EGFR*、*p53*、*BRAF*(黑色素瘤)^[15]、*NF2*(神经纤维瘤病 2 型)^[29]、*H-ras*(膀胱癌)^[30]、*c-KIT*(犬肥大细胞肿瘤)^[31]基因的分型研究中, 均可提高检测敏感性, 提示 COLD-PCR 可广泛应用于肿瘤相关基因的精准检测。

3.2 COLD-PCR 与微生物感染

在感染性疾病中, 耐药基因的检测对抗感染治疗有重要作用。由于携带耐药突变的菌种混杂于微生物群中, 特别是在用药前比例较低, 耐药株不易被检出。COLD-PCR 在结核杆菌和乙肝病毒耐药突变的检测研究中, 可将检测敏感性提高 5~20 倍。在进行 COLD-PCR 时, 微生物在血浆中的浓度不能过低, 如乙肝病毒耐药突变的检测, 需要病毒数达到 50 IU/mL(fast COLD-PCR)~100 IU/mL(full COLD-PCR), 否则可能由于模板量太低导致检测失败^[32]。单链探针反向杂交(line probe assay, LiPA)仅可检测已知的突变^[33], 而 COLD-PCR 还可检测未知突变, 用于微生物耐药突变应用范围更广, 但可能存在漏检(COLD-PCR 法: 148/215, LiPA 法: 155/215)。

在微生物的混合感染中, 当一种微生物处于绝对优势时, 其他微生物很难被检测到。Takahashi 等^[34]

使用改进的 COLD-PCR(modified COLD-PCR, mCOLD-PCR)特异性抑制优势微生物片段的扩增, 间接提高产物中劣势微生物的比例。结合梯度变性凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)可检测出 1/10 000 的劣势微生物。随后在发酵饮品中, 使用 mCOLD-PCR/DGGE 可检测出浓度远低于优势酿酒酵母菌的劣势微生物(如假丝酵母菌、枝孢霉菌和汉森氏酵母菌), 因此, COLD-PCR 可帮助工作人员在一些致病菌浓度较低时发现食品污染问题, 采取预防措施, 避免致病菌的爆发, 提高食品安全。

mCOLD-PCR 结合 NGS 用于微生物群的研究, 产物中优势微生物的丰度从 80.8%降低到 8.8%, 有效避免了优势细菌的干扰, 获得更为广泛的微生物群数据。鉴于该方法的优点, 也可用于混合感染中低丰度基因型片段的富集和检测, 提高多重感染时的检出率, 相关研究还有待开发。

COLD-PCR 应用于微生物的检测还存在一定的缺陷, 由于微生物的基因组不稳定, 扩增序列中的新发突变和多个突变混杂使得 Tc 值的确定存在巨大的挑战。此外, 经过临床干预后, 感染灶中的微生物的浓度降低, 当低于 COLD-PCR 扩增的最低浓度时, 也可能导致检测失败。但是由于该方法廉价、易操作和高敏感性, COLD-PCR 仍可作为微生物基因型检测的有效方法^[35]。

3.3 COLD-PCR 与产前筛查

传统的绒毛膜取样和羊膜腔穿刺等侵入性产前诊断对母体和胎儿有一定的风险。胎儿游离 DNA(cell-free fetal DNA, cfDNA)的发现为无创产前筛查与诊断提供了新思路, 已用于染色体非整倍体和部分单基因病的检测^[36]。cfDNA 在母外周血中含量较低, 仅占总游离 DNA 的 3%~20%, COLD-PCR 对低丰度突变的富集效能可提高母外周血中胎儿父源突变的检出率。

COLD-PCR 用于评估胎儿患病风险是一种廉价且有效的方法^[36,37]。Full COLD-PCR/Sanger 用于检测孕早期母血中胎儿 β 地中海贫血致病突变, 与绒毛基因型结果一致^[38]。Galbiati 等^[39]使用 COLD-PCR 在母血中检测到胎儿携带的 *TWIST* 18 bp 缺失突变, 提示 COLD-PCR 对中等大小的缺失突变也有富集效

力,拓展了应用范围。COLD-PCR/限制性酶切法用于母血中胎儿 *CYP21* p.Q318X 突变的检测,获得明显的分型结果,提示其在基层医院具有推广前景^[40]。Galbiati 等^[41]比较了 Full-和 fast- COLD-PCR 对 β 地中海贫血和囊胞性纤维症的常见突变富集效率和检测敏感性,发现 fast COLD-PCR 虽然具有较高的富集效率,但存在一定的漏检(16%(5/31))。与肿瘤常见的突变(T_m 降低)不同,引起遗传性疾病的致病突变多样,因此,full COLD-PCR 可能更适用于无创产前筛查^[38,41]。

随着二胎政策的开放和对优生优育的认识,产前筛查的需求量日益增加。COLD-PCR 较高的敏感性、廉价、易操作、不需要复杂仪器等优点对于产前筛查项目的开展和基层医院的推广有重要的意义。但是,COLD-PCR 应用于产前筛查的研究主要集中于小样本量和单个病例,研究采用横跨 1 或 5 的 T_c 窗,缺少必要的突变梯度丰度检测和常规方法学的比较,使用 COLD-PCR 进行无创产前筛查的检测阈值还不清楚,敏感度更高的 E-ice-COLD-PCR 尚待研究^[40]。

3.4 COLD-PCR 在其他方面的应用

重亚硫酸盐处理后,未甲基化的胞嘧啶(C)全部转化为尿嘧啶(U),使序列 T_m 值下降约 5 $^{\circ}$ 。因此,COLD-PCR 可用于未甲基化 DNA 的富集扩增。Castellanos-Tizaldos 等^[42]用 fast COLD-PCR 结合甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MS-PCR)检测 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶基因,发现 fast COLD-MS-PCR 对未甲基化 DNA 的检测敏感性为 0.05%,而常规 MS-PCR 的检测敏感性为 5%。

COLD-PCR 还被用于植物育种研究,Chen 等^[43]利用 COLD-PCR/HRM 提高了 *PpAG* 和 *PpTFL1* 基因突变的检测敏感性,对缩短植物诱变育种周期具有重要意义。

4 结语与展望

COLD-PCR 是一种敏感、特异、精确、廉价和易操作的 PCR 扩增方法,可在“非均一性”基因型样本中富集低丰度的突变,提高突变的检出率。含

有“非均一性”基因型的样本均可考虑使用 COLD-PCR 进行富集,如肿瘤的嵌合突变样本、感染灶样本和包含游离 DNA 的血浆样本等已用于 COLD-PCR 的研究。此外,COLD-PCR 还被用于法医学^[44],但目前还未有 COLD-PCR 用于线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变检测的研究。对于遗传与环境共同作用导致的线粒体疾病,低丰度 mtDNA 突变的检测对于早期避免环境暴露具有重要意义,可通过临床干预降低线粒体疾病的发病率^[45]。

虽然 COLD-PCR 在多个领域均有研究,但其临床应用目前仅限于 *KRAS* 基因热点突变检测。在我国 COLD-PCR 还未有相关试剂盒的开发,遗传性疾病父源致病突变的无创产前筛查和微生物耐药突变研究有待进一步深入。此外鉴于 E-ice-COLD-PCR 的优势,在肿瘤、微生物感染、无创产前筛查以及线粒体疾病检测具有更为广泛的应用前景。

参考文献(References):

- [1] Lu YW, Wang KH. Research progress on genetic heterogeneity between primary and paired metastatic colorectal cancer. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(6): 482–490. 鲁有望,王昆华. 结直肠癌原发与配对转移肿瘤遗传异质性研究进展. *遗传*, 2017, 39(6): 482–490. [DOI]
- [2] Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 632–640. [DOI]
- [3] Li J, Wang LL, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med*, 2008, 14(5): 579–584. [DOI]
- [4] How Kit A, Mazaleyrat N, Daunay A, Nielsen HM, Terris B, Tost J. Sensitive detection of *KRAS* mutations using enhanced-ice-COLD-PCR mutation enrichment and direct sequence identification. *Hum Mutat*, 2013, 34(11): 1568–1580. [DOI]
- [5] Castellanos-Rizaldos E, Richardson K, Lin R, Wu G, Makrigiorgos MG. Single-tube, highly parallel mutation enrichment in cancer gene panels by use of temperature-tolerant COLD-PCR. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 267–277. [DOI]
- [6] Yuan F, Xu J, Ji LD, Fei LJ, Liu PP, Zhang LN. Application of T_m -shift genotyping method in genetic studies. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(11): 1484–1490.

- 袁芳, 徐进, 季林丹, 费丽娟, 刘盼盼, 张莉娜. Tm-shift 基因分型方法在遗传学中的应用. *遗传*, 2012, 34(11): 1484–1490. [DOI]
- [7] Castellanos-Rizaldos E, Paweletz C, Song C, Oxnard GR, Mamon H, Jänne PA, Makrigiorgos GM. Enhanced ratio of signals enables digital mutation scanning for rare allele detection. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3): 284–292. [DOI]
- [8] Milbury CA, Correll M, Quackenbush J, Rubio R, Makrigiorgos GM. COLD-PCR enrichment of rare cancer mutations prior to targeted amplicon resequencing. *Clin Chem*, 2012, 58(3): 580–589. [DOI]
- [9] Li J, Milbury CA, Li C, Makrigiorgos GM. Two-round coamplification at lower denaturation temperature-PCR (COLD-PCR)-based sanger sequencing identifies a novel spectrum of low-level mutations in lung adenocarcinoma. *Hum Mutat*, 2009, 30(11): 1583–1590. [DOI]
- [10] Kristensen LS, Daugaard IL, Christensen M, Hamilton-Dutoit S, Hager H, Hansen LL. Increased sensitivity of *KRAS* mutation detection by high-resolution melting analysis of COLD-PCR products. *Hum Mutat*, 2010, 31(12): 1366–1373. [DOI]
- [11] Hashida S, Soh J, Toyooka S, Tanaka T, Furukawa M, Shien K, Yamamoto H, Asano H, Tsukuda K, Hagiwara K, Miyoshi S. Presence of the minor EGFR T790M mutation is associated with drug-sensitive EGFR mutations in lung adenocarcinoma patients. *Oncol Rep*, 2014, 32(1): 145–152. [DOI]
- [12] Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): e2. [DOI]
- [13] Tost J. The clinical potential of enhanced-ice-COLD-PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(3): 265–268. [DOI]
- [14] Mauger F, Daunay A, Deleuze JF, Tost J, How-Kit A. Multiplexing of E-ice-COLD-PCR Assays for mutation detection and identification. *Clin Chem*, 2016, 62(8): 1155–1158. [DOI]
- [15] How-Kit A, Lebbé C, Bousard A, Daunay A, Mazaleyrat N, Daviaud C, Mourah S, Tost J. Ultrasensitive detection and identification of *BRAF* V600 mutations in fresh frozen, FFPE, and plasma samples of melanoma patients by E-ice-COLD-PCR. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(22): 5513–5520. [DOI]
- [16] Castellanos-Rizaldos E, Liu PF, Milbury CA, Guha M, Brisci A, Cremonesi L, Ferrari M, Mamon H, Makrigiorgos GM. Temperature-tolerant COLD-PCR reduces temperature stringency and enables robust mutation enrichment. *Clin Chem*, 2012, 58(7): 1130–1138. [DOI]
- [17] Castellanos-Rizaldos E, Milbury CA, Makrigiorgos GM. Enrichment of mutations in multiple DNA sequences using COLD-PCR in emulsion. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51362. [DOI]
- [18] Zuo Z, Chen SS, Chandra PK, Galbincea JM, Soape M, Doan S, Barkoh BA, Koeppen H, Medeiros LJ, Luthra R. Application of COLD-PCR for improved detection of *KRAS* mutations in clinical samples. *Mod Pathol*, 2009, 22(8): 1023–1031. [DOI]
- [19] Pritchard CC, Akagi L, Reddy PL, Joseph L, Tait JF. COLD-PCR enhanced melting curve analysis improves diagnostic accuracy for *KRAS* mutations in colorectal carcinoma. *BMC Clin Pathol*, 2010, 10: 6. [DOI]
- [20] Liu PJ, Liang HY, Xue L, Yang C, Liu Y, Zhou K, Jiang XF. Potential clinical significance of plasma-based *KRAS* mutation analysis using the COLD-PCR/TaqMan[®]-MGB probe genotyping method. *Exp Ther Med*, 2012, 4(1): 109–112. [DOI]
- [21] Carotenuto P, Roma C, Cozzolino S, Fenizia F, Rachiglio AM, Tatangelo F, Iannaccone A, Baron L, Botti G, Normanno N. Detection of *KRAS* mutations in colorectal cancer with fast COLD-PCR. *Int J Oncol*, 2012, 40(2): 378–384. [DOI]
- [22] Mancini I, Santucci C, Sestini R, Simi L, Pratesi N, Cianchi F, Valanzano R, Pinzani P, Orlando C. The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves the limit of detection of *KRAS* and *BRAF* mutations in colorectal cancer. *J Mol Diagn*, 2010, 12(5): 705–711. [DOI]
- [23] Pang B, Durso MB, Hamilton RL, Nikiforova MN. A novel COLD-PCR/FMCA assay enhances the detection of low-abundance *IDH1* mutations in gliomas. *Diagn Mol Pathol*, 2013, 22(1): 28–34. [DOI]
- [24] Boisselier B, Marie Y, Labussière M, Ciccarino P, Desestret V, Wang XW, Capelle L, Delattre JY, Sanson M. COLD PCR HRM: a highly sensitive detection method for *IDH1* mutations. *Hum Mutat*, 2010, 31(12): 1360–1365. [DOI]
- [25] Kanamori M, Kikuchi A, Watanabe M, Shibahara I, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Kumabe T, Kure S, Tominaga T. Rapid and sensitive intraoperative detection of mutations in the *isocitrate dehydrogenase 1* and *2* genes during surgery for glioma. *J Neurosurg*, 2014, 120(6): 1288–1297. [DOI]
- [26] Boisselier B, Gállego Pérez-Larraya J, Rossetto M, Labussière M, Ciccarino P, Marie Y, Delattre JY, Sanson M. Detection of *IDH1* mutation in the plasma of patients with glioma. *Neurology*, 2012, 79(16): 1693–1698. [DOI]
- [27] Delaney D, Diss TC, Presneau N, Hing S, Berisha F, Idowu BD, O'Donnell P, Skinner JA, Tirabosco R, Flana-

- gan AM. GNAS1 mutations occur more commonly than previously thought in intramuscular myxoma. *Mod Pathol*, 2009, 22(5): 718–724. [DOI]
- [28] Charbel C, Fontaine RH, Malouf GG, Picard A, Kadlub N, El-Murr N, How-Kit A, Su XP, Coulomb-L'Hermine A, Tost J, Mourah S, Aractingi S, Guégan S. NRAS mutation is the sole recurrent somatic mutation in large congenital melanocytic nevi. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(4): 1067–1074. [DOI]
- [29] Paganini I, Mancini I, Baroncelli M, Arena G, Gensini F, Papi L, Sestini R. Application of COLD-PCR for improved detection of NF2 mosaic mutations. *J Mol Diagn*, 2014, 16(4): 393–399. [DOI]
- [30] Wang AX, Chang JW, Li CY, Liu K, Lin YL. H-ras mutation detection in bladder cancer by COLD-PCR analysis and direct sequencing. *Urol Int*, 2012, 88(3): 350–357. [DOI]
- [31] Gentilini F, Mantovani V, Turba ME. The use of COLD-PCR, DHPLC and GeneScanning for the highly sensitive detection of c-KIT somatic mutations in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 2015, 13(3): 218–228. [DOI]
- [32] Liu C, Lin JP, Chen HJ, Shang HY, Jiang L, Chen J, Ye Y, Yang B, Ou QS. Detection of hepatitis B virus genotypic resistance mutations by coamplification at lower denaturation temperature-PCR coupled with sanger sequencing. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(8): 2933–2939. [DOI]
- [33] Wong DKH, Tsoi O, Huang FY, Seto WK, Fung J, Lai CL, Yuen MF. Application of coamplification at lower denaturation temperature-PCR sequencing for early detection of antiviral drug resistance mutations of hepatitis B virus. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(9): 3209–3215. [DOI]
- [34] Takahashi M, Masaki K, Mizuno A, Goto-Yamamoto N. Modified COLD-PCR for detection of minor microorganisms in wine samples during the fermentation. *Food Microbiol*, 2014, 39: 74–80. [DOI]
- [35] Wong DK, Fung J, Lai CL, Yuen MF. COLD-PCR for early detection of hepatitis B virus antiviral drug resistance mutations. *Hong Kong Med J*, 2015, 21(Suppl 7): S8–S10. [DOI]
- [36] Ferro M, Macher HC, Noguerol P, Jimenez-Arriscado P, Molinero P, Guerrero JM, Rubio A. Non-invasive prenatal diagnosis of feto-maternal platelet incompatibility by cold high resolution melting analysis. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 924: 67–70. [DOI]
- [37] Macher HC, Martinez-Broca MA, Rubio-Calvo A, Leon-Garcia C, Conde-Sanchez M, Costa A, Navarro E, Guerrero JM. Non-invasive prenatal diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2A using COLD-PCR combined with HRM genotyping analysis from maternal serum. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51024. [DOI]
- [38] Galbiati S, Brisci A, Lalatta F, Seia M, Makrigiorgos GM, Ferrari M, Cremonesi L. Full COLD-PCR protocol for noninvasive prenatal diagnosis of genetic diseases. *Clin Chem*, 2011, 57(1): 136–138. [DOI]
- [39] Galbiati S, Stenirri S, Sbaiz L, Barberis M, Cremonesi L, Restagno G, Ferrari M. Further considerations concerning non-invasive prenatal diagnosis of craniosynostosis based on the identification of an 18 bp deletion in the TWIST1 gene by COLD-PCR. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52(7): e129–e130. [DOI]
- [40] Du J, Zou X, Pan Y, Li SF, Lu GX. Non-invasive prenatal molecular detection of a fetal point mutation for congenital adrenal hyperplasia using co-amplification at lower denaturation temperature PCR. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(22): 3343–3346. [DOI]
- [41] Galbiati S, Monguzzi A, Damin F, Soriani N, Passiu M, Castellani C, Natacci F, Curcio C, Seia M, Lalatta F, Chiari M, Ferrari M, Cremonesi L. COLD-PCR and microarray: two independent highly sensitive approaches allowing the identification of fetal paternally inherited mutations in maternal plasma. *J Med Genet*, 2016, 53(7): 481–487. [DOI]
- [42] Castellanos-Rizaldos E, Milbury CA, Karatzas E, Chen CC, Makrigiorgos GM, Merewood A. COLD-PCR amplification of bisulfite-converted DNA allows the enrichment and sequencing of rare un-methylated genomic regions. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94103. [DOI]
- [43] Chen YH, Wilde HD. Mutation scanning of peach floral genes. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 96. [DOI]
- [44] Li XZ. Enrichment of minority alleles in mixture by COLD-PCR[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2011.
- 李笑竹. COLD-PCR 用于混合检材中微量等位基因富集的可行性[学位论文]. 洛阳: 河南科技大学, 2011. [DOI]
- [45] Meng XJ, Zhu JP, Gao M, Zhang S, Zhao FX, Zhang JJ, Liu XL, Wei QP, Tong Y, Zhang ML, Qu J, Guan MX. The analysis of mitochondrial DNA haplogroups and variants for Leber's hereditary optic neuropathy in Chinese families carrying the m.14484T>C mutation. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(4): 336–345.
- 孟祥娟, 朱金萍, 高敏, 张赛, 赵福新, 张娟娟, 刘晓玲, 韦企平, 童绎, 张铭连, 瞿佳, 管敏鑫. 中国人群携带 m.14484T>C 突变的 Leber's 遗传性视神经病变线粒体单体型及多态位点分析. *遗传*, 2014, 36(4): 336–345. [DOI]