

多重 PCR 高分辨熔解分析同时检测骨髓增殖性肿瘤 JAK2, MPL 及 CALR 基因突变的初步研究

杨晓慧^{1a, 2}, 许 蕾^{1b}, 晏耀明^{1a}, 李建新^{1a}

(1. 北京大学深圳医院 a. 检验科; b. 血液科, 广东深圳 518036; 2. 深圳大学总医院检验科, 广东深圳 518055)

摘要: **目的** 建立同时检测经典骨髓增殖性肿瘤患者中常见的 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)、钙网素 (calreticulin, CALR) 和骨髓增殖性白血病病毒 (myeloproliferative leukemia virus, MPL) 基因突变的多重聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) - 高分辨熔解分析 (high resolution melting analysis, HRM) 体系。**方法** 先以各个合成的突变等位基因片段为模板分别进行 PCR 和 HRM 分析, 优化 PCR 体系后, 在单管中进行多重 PCR 扩增和 HRM 分析, 同时检测上述三个基因的 8 种常见突变。**结果** 在适宜的条件下, 上述三个基因的野生型和突变型均能扩增出各自的目的条带和收集到可区分的熔解峰, 野生型与突变型的熔解温度差为 0.3℃ ~ 2.0℃。多重 PCR-HRM 体系中, 除 JAK2 外显子 12 相关片段, 其他基因均可有效扩增, 但 JAK2 V617F 突变型的扩增效率明显低于 MPL 及 CALR 基因。**结论** 目前该多重 PCR-HRM 检测体系可鉴别 MPL 和 CALR 基因常见突变, 但 JAK2 V617F 突变型由于扩增效率低导致突变峰与野生峰不能明显区分, JAK2 V617F 和外显子 12 的引物需重新设计。

关键词: 骨髓增殖性肿瘤; Janus 激酶 2; 骨髓增殖性白血病; 钙网素; 多重聚合酶链式反应; 高分辨熔解分析

中图分类号: R551.3; Q503; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2023) 04-063-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.04.011

Preliminary Study on Simultaneous Detection of JAK2, MPL and Calreticulin Mutations in Patients with Myeloproliferative Neoplasms by Multiplex PCR High Resolution Melting Analysis

YANG Xiaohui^{1a, 2}, XU Lei^{1b}, YAN Yaoming^{1a}, LI Jianxin^{1a} (1a. Department of Clinical Laboratory;

1b. Department of Hematology, Peking University Shenzhen Hospital, Guangdong Shenzhen 518036, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen University General Hospital, Guangdong Shenzhen 518055, China)

Abstract: **Objective** To establish a multiplex polymerase chain reaction (PCR)-high resolution melting analysis (HRM) for simultaneous detection of JAK2, MPL and CALR mutations in Philadelphia chromosome negative patients with myeloproliferative neoplasms (MPN). **Methods** Firstly, PCR and HRM analysis were performed by using individual synthetic mutant allele fragment as template respectively. Then, multiplex PCR and HRM analysis were carried out in single tube to detect 8 common mutations in the above-mentioned three genes simultaneously after the primers and PCR system were optimized. **Results** Under suitable conditions, the wild and mutant alleles of above three genes could be amplified individually, and distinguishable melting peaks could be collected. The melting temperature differences between the wild and the mutant amplicons were 0.3℃ ~ 2.0℃. In the multiplex PCR-HRM system, except JAK2 exon 12, other genes could be amplified simultaneously, but the amplification efficiency of JAK2 V617F mutant was significantly lower than that of MPL and CALR. **Conclusion** At present, the multiplex PCR-HRM detection system could effectively identify common mutations in MPL and CALR. The JAK2 V617F mutant in the multiplex system could not be clearly differentiated due to poor amplification efficiency. The primers for JAK2 V617F and exon 12 mutations need to be redesigned.

Keywords: myeloproliferative neoplasms; Janus kinase 2; myeloproliferative leukemia; calreticulin; multiplex PCR; high resolution melting analysis

骨髓增殖性肿瘤 (myeloproliferative neoplasms, MPN) 是一组起源于造血干细胞、骨髓一系或多系

基金项目: 深圳市科技创新委基础研究资助项目 (JCYJ20170307111612356): 一管法多重 PCR- 高分辨熔解曲线同时检测 JAK2, MPL 和 CALR 突变。

作者简介: 杨晓慧 (1995-), 女, 本科, 技师, 从事分子生物学实验诊断工作, E-mail: lucyyxh913@163.com。

通讯作者: 李建新 (1968-), 男, 博士, 主任技师, 从事血液病实验诊断工作, E-mail: ljxdoctor@126.com。

克隆性过度增殖为特征的慢性血液肿瘤。费城染色体阴性的经典 MPN 的分子基础已基本阐明^[1]：由于 MPN 限制性驱动基因 [包括 Janus 激酶 2 (janus kinase 2, JAK2)、钙网素 (calreticulin, CALR) 和骨髓增殖性白血病 (myeloproliferative leukemia, MPL)] 病毒突变, 导致不正常地激活 JAK2/STAT 通路和下游通路, 引起血细胞过度增殖^[1]。根据 2016 年 WHO 关于髓系肿瘤和急性白血病分类标准, JAK2, CALR 和 MPL 突变是经典 MPN 的主要诊断标准之一^[2]。JAK2, CALR 和 MPL 基因突变的检测方法很多, 大多基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR), 大多数方法只能检测单一基因突变。PCR- 高分辨熔解分析 (high resolution melting assay, HRM) 是一种在 PCR 体系基础上加入双链 DNA 结合染料, PCR 结束后直接运行 HRM, 根据扩增子的解链温度不同, 应用检测仪器极高的温度分辨率来区分单个碱基差异的 PCR 扩增后检测技术。本研究旨在建立一管法多重 PCR-HRM 同时检测 JAK2, MPL 和 CALR 常见八种突变, 为经典 MPN 基因诊断提供一种简单、快速、闭管、低成本的检测手段。

1 材料与方法

1.1 研究对象 根据文献[1], JAK2, CALR 和 MPL 常见突变包括: JAK2 外显子 14 V617F, JAK2 外显子 12 K539L, N542-E543 del 和 E543-D544 del; MPL 外显子 10 W515K 和 W515L; CALR 外显子 9 I 型 (c1092-1143 del) 和 II 型 (c1154-1155 ins)。以上八种常见突变型等位基因模板, 除 JAK2 V617F 突变模板从临床 MPN 确诊患者标本提取外, 其它七种突变由 Invitrogen 公司生物合成, -80℃低温冻存于质粒及含相应质粒的甘油菌中。野生型等位基因模板从健康人 EDTA 抗凝血提取。

1.2 仪器与试剂 采用 Lab-Aid 820 核酸提取仪, 以 Lab-Aid 核酸 (DNA) 分离试剂盒 (厦门致善生物科技股份有限公司) 提取全血 DNA; 采用 2 × HRM PCR Master Mix (Type-it HRM PCR Kit,

Qiagen) 扩增试剂; 采用 HR-1 高分辨率熔解曲线分析系统 (Idaho Technology, USA) 进行 HRM 分析。

1.3 方法

1.3.1 PCR 及多重 PCR: 针对 JAK2 外显子 14 V617F, JAK2 外显子 12 三种突变, MPL 外显子 10 两种突变及 CALR 外显子 9 两种突变分别采用 Primer 3 软件 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 共设计 4 对引物, 由 Invitrogen 公司合成, 见表 1, 并通过 uMelt (<https://dna.utah.edu/>) 软件对扩增产物的解链温度进行预测。PCR 反应采用 C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, USA)。

单独扩增各基因的 PCR 体系包括: 含 Eva Green 饱和染料的 2 × HRM PCR Master Mix (Type-it HRM PCR Kit, Qiagen) 12.5 μl, 上下游引物终浓度各为 0.4 μmol/L, DNA 模板浓度为 1 ng/μl, 加双蒸水至 25 μl。扩增 JAK2 V617F, MPL 及 CALR 基因的反应条件为: 95℃预变性 5min; 95℃变性 10s, 58℃退火 30s, 72℃延伸 10s, 共 40 个循环; 72℃延伸 5min。扩增 JAK2 外显子 12 的最适退火温度为 50℃, 其余反应条件同上。扩增产物经 2.2g/dl 琼脂糖凝胶电泳, 采用 Gel Doc XR 凝胶成像仪 (Bio-Rad, USA) 及 Image Lab 3.0 成像软件进行成像分析。

多重 PCR 反应体系包括: 含 Eva Green 饱和染料的 2 × HRM PCR Master Mix 12.5 μl, 各引物终浓度均为 0.3 μmol/L, 突变型和野生型模板终浓度均为 2 ng/μl, 加双蒸水至 25 μl。反应条件为: 95℃预变性 5min; 95℃变性 10s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 20s, 共 45 个循环; 72℃延伸 5min。

1.3.2 HRM 检测: PCR 扩增完成后, 将 15 μl 扩增产物装载于 PCR 毛细管 (大菱公司), 以 10 μl 石蜡油 (Sigma, USA) 封闭, 采用 HR-1 高分辨率熔解曲线分析系统 (Idaho Technology, USA) 进行 HRM 分析。熔解曲线荧光信号收集温度设定为 65℃ ~ 98℃, 0.5℃/s。各熔解曲线使用 HR-1 analysis tool 软件进行分析。

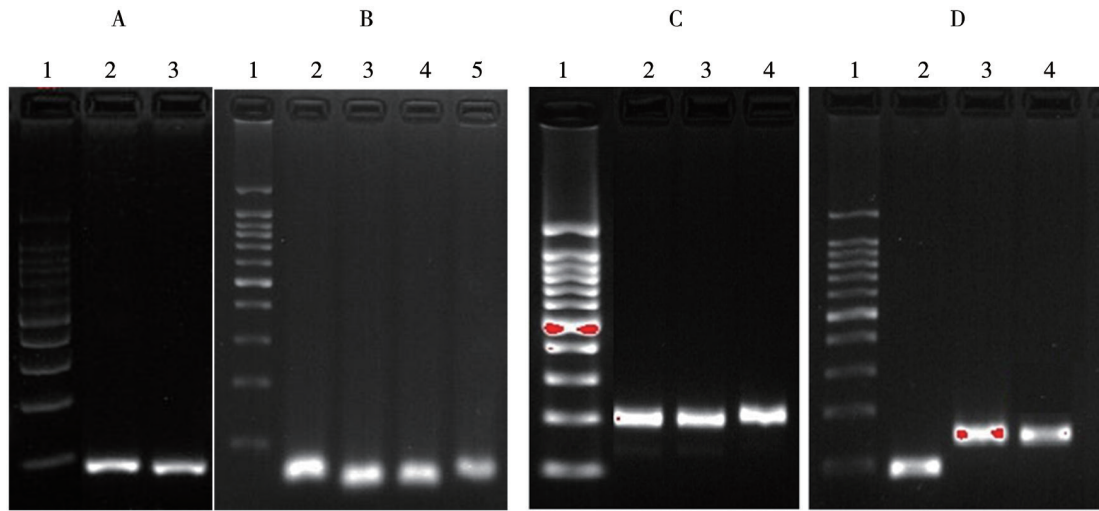
表 1 PCR 引物序列

类别		引物序列	野生型产物长度 (bp)
JAK2 V617F	F	5'-AAGCAGCAACTATGATGAGC-3'	112
	R	5'-AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTA-3'	
JAK2 外显子 12	F	5'-CATATGAACCAATGGTGT-3'	63
	R	5'-CTAATGACTTACAAATATCA-3'	
MPL	F	5'-TCTCCTAGCCTGGATCTCCTT-3'	188
	R	5'-CAGAGCGAACCAAGAATGC-3'	
CALR	F	5'-GGCAGCAGAGAAACAAATGA-3'	158
	R	5'-CTTCCTCCTTGTCCTCCTCA-3'	

2 结果

2.1 PCR结果 见图1。在适宜的PCR反应条件下,设计的四对引物均能特异地扩增出各自相对应的目

的条带,扩增的野生型与突变型产物长度均与理论相符,且扩增效率良好。



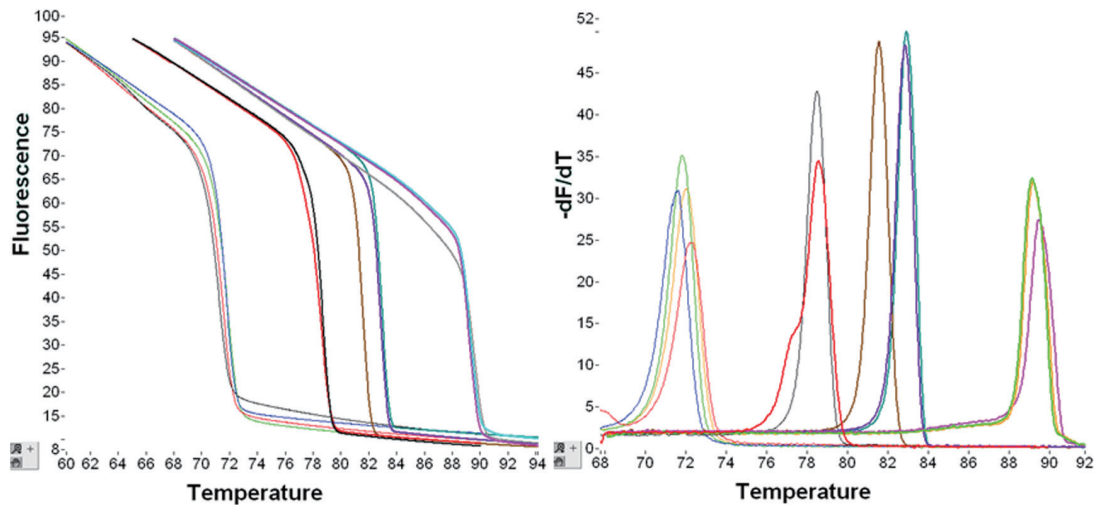
注: A: 1. Marker (100bp DNA ladder, 下同); 2. JAK2 V617F; 3. JAK2 野生型。B: 1. Marker; 2. JAK2 外显子 12 K539L; 3. JAK2 外显子 12 N542-E543del; 4. JAK2 外显子 12 E543-D544del; 5. JAK2 外显子 12 野生型。C: 1. Marker; 2. MPL W515L; 3. MPL W515K; 4. MPL 野生型。D: 1. Marker; 2. CALR 外显子 9 I 型缺失; 3. CALR 外显子 9 II 型插入; 4. CALR 外显子 9 野生型。

图1 各基因单独 PCR 扩增产物电泳图

2.2 HRM 结果

2.2.1 各基因单独扩增 HRM 结果: 各基因单独扩增时扩增效率佳, 荧光信号强。JAK2 外显子 14 V617F, JAK2 外显子 12, MPL 和 CALR 的单独

PCR 扩增产物经过 HRM 分析, 可以得到四组熔解峰, 四组熔解峰之间分离良好, 相互无重叠; 野生型和突变型扩增子熔解温度差均在 0.3℃ 以上。它们的 PCR-HRM 曲线见图 2。



注: 按解链温度由低到高依次为: JAK2 外显子 12, JAK2 V617F, CALR 和 MPL。左图为各基因单独 PCR-HRM 的曲线。右图为熔解曲线求导后各基因的熔解峰: 第一组为 JAK2 外显子 12 熔解峰 (蓝色为 E543-D544del, 土黄色为 N542-E543del, 浅绿色为 K539L, 浅红色为野生型), 野生型与各突变型扩增子熔解温度相差 0.3℃ 以上; 第二组为 JAK2 V617F 熔解峰 (红色为 V617F, 灰色为野生型), 野生型与突变型熔解温度相差 1.5℃ 左右, 因 JAK2 V617F 为临床收集杂合子标本, 故可见突变型曲线呈双峰, 理论上纯合突变峰应位于 77℃; 第三组为 CALR 基因熔解峰 (棕色为 I 型缺失, 蓝色为 II 型插入, 紫色为野生型), 野生型分别与 I 型、II 型突变峰熔解温度相差 2℃ 和 0.3℃ 左右; 第四组为 MPL 基因熔解峰 (黄绿色为 W515K, 橙色为 W515L, 粉紫色为野生型), 野生型与突变型熔解温度相差 1℃ 左右, 两突变型之间相差 0.1℃ 左右。

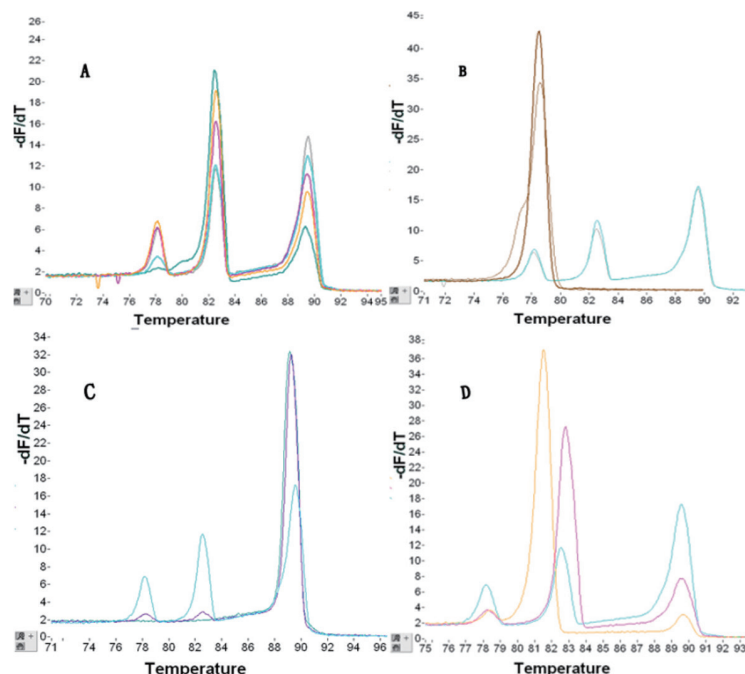
图2 各基因单独 PCR-HRM 的曲线及熔解峰

2.2.2 多重 PCR-HRM 体系探索结果: 首先采用健康人标本 (野生型) 作为模板进行多重 PCR-HRM 实验, 探索多重 PCR 体系适宜的引物浓度和退火温度。结果显示, 采用 0.3 μmol/L 和 0.4 μmol/L 引

物浓度, 55℃ 复性时, JAK2 外显子 12 无扩增产物, 0.3 μmol/L 引物浓度的体系中其他各基因扩增效率皆优于 0.4 μmol/L 体系 (图 3A, 黄色曲线各引物浓度均为 0.3 μmol/L, 紫红色曲线各引物浓

度均为 $0.4 \mu\text{mol/L}$)。在 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 引物浓度的条件下, 55°C 复性时, JAK2 V617F 及 MPL 扩增效率均优于 50°C , CALR 扩增效果则和 50°C 无区别 (图 3A, 灰色退火温度为 55°C , 天蓝色退火温度为 50°C); 若将退火温度降至 48°C , 则除 CALR 外, 其余基因扩增效果均不佳 (图 3A, 深蓝色退火温度为 48°C)。所以, 多重 PCR-HRM 体系各引物浓

度采用 $0.3 \mu\text{mol/L}$, 退火温度采用 55°C 较为适宜。
2.2.3 多重 PCR-HRM 体系突变检测: 该多重 PCR-HRM 体系最终只实现了三个基因的同时扩增, JAK2 外显子 12 在多重体系中扩增失败, 71°C 左右无熔解峰生成 (图 3A), 其余野生型基因的熔解温度皆与单独扩增时相符。



注: 熔解峰组从左到右依次为: JAK2 V617F, CALR 和 MPL。

图 3 单管多重 PCR-HRM 同时检测 JAK2、MPL 和 CALR 突变

因 JAK2 外显子 12 在多重体系中扩增失败, 后续改为对包含 JAK2 V617F, MPL 及 CALR 突变的标本进行多重 PCR-HRM 实验。在这一多重 PCR-HRM 体系中, JAK2 V617F 因扩增效率低, 突变型扩增子熔解峰未能与野生型区分开来 (图 3B, 深棕色为 JAK2 V617F 野生型单独扩增熔解峰, 浅棕色为 JAK2 V617F 杂合突变型单独扩增熔解峰, 蓝色连续曲线为正常人标本, 灰色连续曲线为 JAK2 V617F 杂合突变标本)。

MPL 和 CALR 突变型在多重 PCR-HRM 体系中扩增产物的熔解温度与单独扩增时相符, 但多重体系中突变基因与其他野生型基因之间相互竞争, 两者的扩增效率不一, 突变基因扩增效率高 (图 3C, 蓝色为 MPL W515K 单独扩增熔解峰, 天蓝色连续曲线为正常人标本, 紫色连续曲线为 MPL W515K 合成模板 + 正常人标本; 图 3D, 天蓝色连续曲线为正常人标本, 黄色连续曲线为 CALR 突变 I 型合成模板 + 正常人标本, 紫红色连续曲线为 CALR 突变 II 型合成模板 + 正常人标本)。

3 讨论

JAK2, CALR 和 MPL 突变检测对经典 MPN 的

诊断、治疗监测、预后判断具有重要的临床意义^[2-3]。多重 PCR-HRM 是一种简单、快速、高通量、闭管、低成本的突变检测和基因分型技术, 广泛用于遗传病、肿瘤、病原微生物及个体化用药的分子诊断检测^[4-5]。国内外已有学者应用 PCR-HRM 技术检测这三个基因中的单个或两个基因突变, 如早期 RAPADO 等^[6]对 JAK 2 基因外显子 14 和 12 的检测, LIM 等^[7]对 CALR 外显子 9 的检测。NUSSENZVEIG 等^[8]应用单管多重 PCR-HRM 技术同时检测 JAK 2 外显子 14, 12 及 MPL 基因外显子 10 突变; MATSUMOTO 等^[9]应用这一技术同时筛选 JAK2 和 CALR 基因突变。尚未见应用多重 PCR-HRM 技术同时检测上述三个基因突变的报道。本研究尝试建立一管法多重 PCR-HRM 同时检测涵盖经典 MPN 90% 左右基因诊断信息的上述三个基因 8 种常见突变, 以便为经典 MPN 的基因诊断提供一种简单、快速、闭管、低成本检测手段的可能。

本研究建立的一管法多重 PCR-HRM 体系可以同时良好地筛选 CALR 及 MPL 基因突变, 但该体系未达到预期效果, 不能同步扩增 JAK2 外显子 12, 且 JAK2 V617F 突变型因扩增 (下转第 71 页)

- (Albany NY), 2019, 11(10): 3182-3197.
- [14] RUSH C J, BERRY C, OLDROYD K G, et al. Prevalence of coronary artery disease and coronary microvascular dysfunction in patients with heart failure with preserved ejection fraction[J]. JAMA Cardiology, 2021, 6(10): 1130-1143.
- [15] 费松柏, 陈小霞, 马可忠, 等. miR-328, miR-147 和 miR-22 在慢性心力衰竭病人中的表达变化及临床意义[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(2): 274-277.
- FEI Songbai, CHEN Xiaoxia, MA Kezhong, et al. Expression and clinical significance of miR-328, miR-147 and miR-22 in patients with chronic heart failure[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease, 2020, 18(2): 274-277.
- [16] SUN Dangze, WU Yao, ZHANG Shanshan, et al. Distinct roles of miR-34 family members on suppression of lung squamous cell carcinoma[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 142: 111967.
- [17] ZHANG Lizhi, YANG Fan. Tanshinone IIA improves diabetes-induced renal fibrosis by regulating the miR-34-5p/Notch1 axis[J]. Food Science Nutrition, 2022, 10(11): 4019-4040.
- [18] PEI Haifeng, YU QiuJun, XUE Qiang, et al. Notch 1 cardio protection in myocardial ischemia/reperfusion involves reduction of oxidative nitrative stress[J]. Basic Research in Cardiology, 2013, 108(5): 373.
- [19] CHEN Baoyu, LIN Jinjia, LU Mingkun, et al. Neurodevelopment regulators miR-137 and miR-34 family as biomarkers for early and adult onset schizophrenia[J]. NPJ Schizophrenia, 2021, 7(1): 35.
- [20] GHASEMPOUR G, SHAIKHANIA F, SOLEIMANI AA, et al. Correlations between vitronectin, miR-520, and miR-34 in patients with stenosis of coronary arteries[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(12): 7913-7920.
- [21] KOLIJN D, PABEL S, TIAN Yanna, et al. Empagliflozin improves endothelial and cardiomyocyte function in human heart failure with preserved ejection fraction via reduced pro-inflammatory-oxidative pathways and protein kinase G α oxidation[J]. Cardiovascular Research, 2021, 117(2): 495-507.
- 收稿日期: 2022-11-04
修回日期: 2023-03-20

(上接第66页)效率低。后续实验中,这两组引物需要重新设计,设计引物时应考虑加大各组突变峰之间的解链温度差距,如可以在引物5'端加入高含量的GC或AT或加入探针以提高扩增产物的熔解温度^[10-11]。此外,CALR及MPL的引物也可以进一步优化,拉大CALR II型突变峰与野生型、MPL基因W515K与W515L突变峰之间熔解温度的差距,以便更清晰、直观地判断具体突变。

参考文献:

- [1] VAINCHENKER W, KRALOVICS R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms[J]. Blood, 2017, 129(6): 667-679.
- [2] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. Blood, 2016, 127(20): 2391-2405.
- [3] RUMI E, CAZZOLA M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms[J]. Blood, 2017, 129(6): 680-692.
- [4] 李菲菲, 尤崇革. 基于高分辨率熔解分析的基因分型新技术[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(6): 159-161.
- LI Feifei, YOU Chongge. New genotyping techniques based on high resolution melting[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(6): 159-161.
- [5] 郑昭璟, 傅启华, ZHOU Luming. 高分辨熔解曲线分析技术的发展与展望[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(2): 77-79.
- ZHENG Zhaojing, FU Qihua, ZHOU Luming. The development and prospects of high-resolution melting analysis[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2017, 40(2): 77-79.
- [6] RAPADO I, GRANDE S, ALBIZUA E, et al. High resolution melting analysis for JAK2 exon 14 and exon 12 mutations: a diagnostic Tool for myeloproliferative neoplasms[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2009, 11(2): 155-161.
- [7] LIM K H, LIN H C, CHEN C G S, et al. Rapid and sensitive detection of CALR exon 9 mutations using high-resolution melting analysis[J]. Clinica Chimica Acta, 2015, 440: 133-139.
- [8] NUSSENZVEIG R H, PHAM H T, PERKINS S L, et al. Increased frequency of co-existing JAK2 exon-12 or MPL exon-10 mutations in patients with low JAK2(V617F) allelic burden[J]. Leukemia & Lymphoma, 2016, 57(6): 1429-1435.
- [9] MATSUMOTO N, MORI S, HASEGAWA H, et al. Simultaneous screening for JAK2 and calreticulin gene mutations in myeloproliferative neoplasms with high resolution melting[J]. Clinica Chimica Acta, 2016, 462: 166-173.
- [10] MATSUDA K. PCR-based detection methods for single-nucleotide polymorphism or mutation: real-time PCR and its substantial contribution toward technological refinement [J]. Adv Clin Chem, 2017, 80: 45-72.
- [11] PARK J, SONG M, JANG W, et al. Peptide nucleic acid probe-based fluorescence melting curve analysis for rapid screening of common JAK2, MPL, and CALR mutations[J]. Clinica Chimica Acta, 2017, 465: 82-90.
- 收稿日期: 2021-09-08
修回日期: 2023-04-23