

等位基因特異性競爭型 TagMan 雙重 PCR 定量檢測法之開發：一個高專一且高靈敏度的 *JAK2V617F* 等位基因突變檢測法

嘉義長庚 血液腫瘤科 陳志丞醫師

費氏染色體陰性的骨髓增生性腫瘤 (Myeloproliferative neoplasms, 簡稱 MPN), 是源自於骨髓造血幹細胞的血液疾病。依據其增生的細胞系不同, 可區分為: 真性紅細胞增多症(PV), 原發性血小板增多症(ET)和骨髓纖維化(PMF)。血球增生訊號透過調節 *JAK2* 基因啟動來刺激細胞生長。若 *JAK2* 基因 exon14 發生 1849 G-T 點突變, 會導致胺基酸序列第 617 位置由 valine 轉變為 phenylalanine (V617F), 這個突變將使細胞在無特定激素刺激下, 也能不斷活化下游基因, 造成血球細胞增生。在臨床病人檢體中, 約 90% 的 PV 和 55% 的 ET 和 MF 患者帶有 *JAK2V617F* 這個基因突變, 也因此, 檢測 *JAK2V617* 突變已成為 MPN 診斷檢查的先決條件。

隨著 MPN 醫療方式與處理的穩健推進, *JAK2V617F* 精確定量檢測的需求不斷增加, 特別是在治療後, 用以監測管理微量的疾病殘留。因此, 為了提高 *JAK2V617* 檢測的準確性, 我們開發了高靈敏度的定量競爭性等位基因特異性 TaqMan 雙重 PCR (qCAST-Duplex PCR) 測定, 透過我們所改良之新方法, 可以將靈敏度由 0.1~1% 降低至 0.1~0.01%。

過去的檢測方法受限於 PCR 中引子的非特異性結合, 基因拷貝數量異常, 以及無法絕對定量之標準品的來源。為了解決以下問題, 新的技術有以下三個關鍵: (1) 添加 3'-雙脫氧寡核苷酸阻斷劑; (2) 在一個反應管中進行雙重 PCR 並選擇 *JAK2* 的 exon 21 來進行突變及拷貝數量之標準化; (3) 使用序列設計之質體作為標準品。

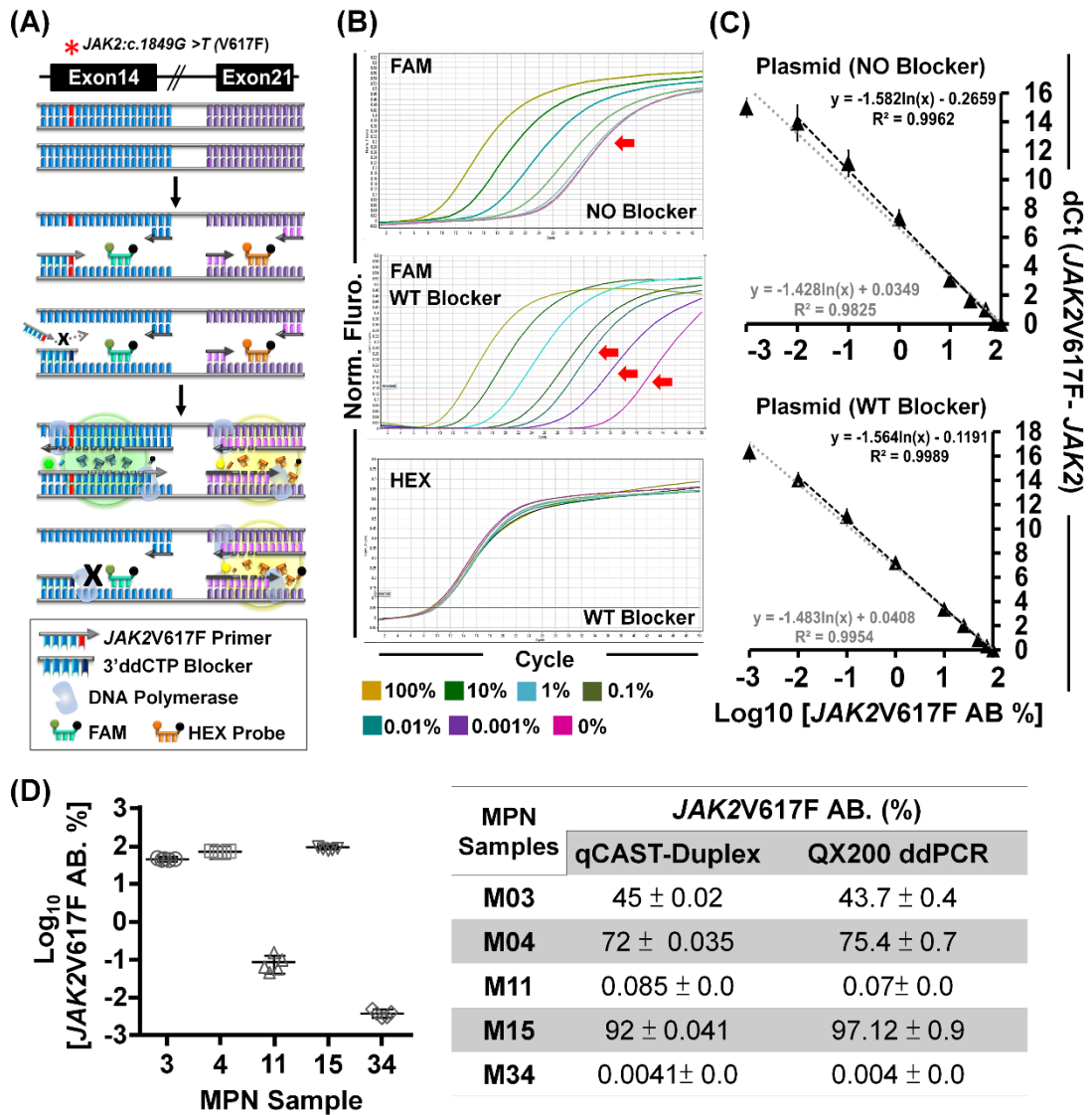
透過 qCAST-Duplex PCR 方法, 在各項測試中, 觀察值與期望值皆有相當好的一致性, 表示該方法的高靈敏度和專一性。該檢測之可信任值可以精確至 0.01% 的 *JAK2V617F* 突變率。利用此方法, 我們也發現過去常使用作為標準對照的兩種細胞 HEL 與 UKE-1 皆存在基因拷貝數的變異, 也因此, 我們認為傳統使用的這兩種細胞, 都不適合用來測量 *JAK2V617F* 突變率的標準。最後, 我們比較 qCAST-Duplex PCR 與其他檢測產品之檢測效果, 我們發現, 我們所改良之方法與市面上現有的產品來比較, 效果並不遜於其他高價測定法。

總而言之, 我們精確的 qCAST-Duplex PCR 方法, 可以獲得高度準確和可重複的結果, 同時具有低假陽性率和假陰性率。相比於其他的標準測定法, 不僅準確且更經濟實惠。此方法的創新, 可推動 MPN 分子診斷方面的重大進展, 並且可以將同樣的方法推廣至各種單一核苷酸突變異常之基因檢色。

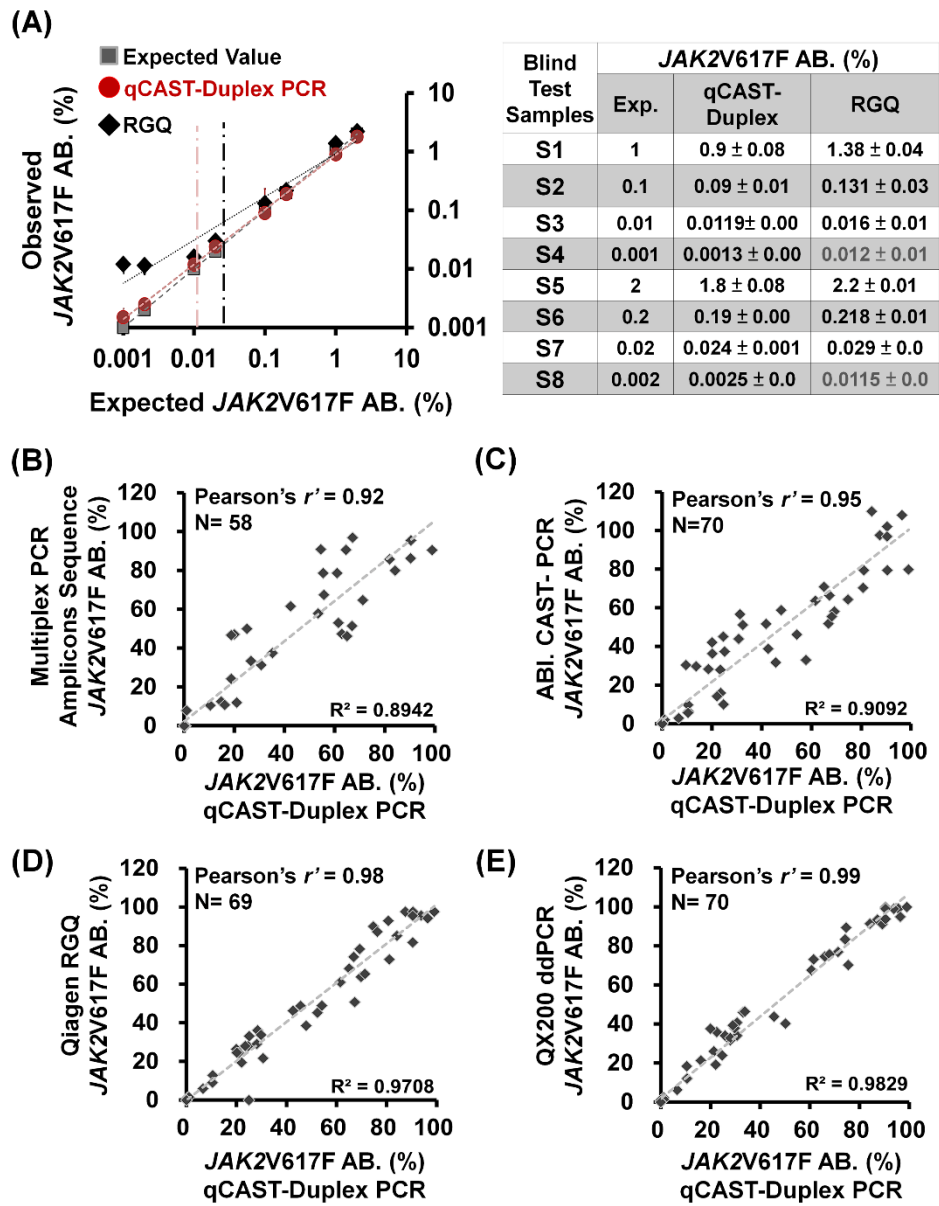
(本篇研究結果已送交專利審查。)

(本篇研究結果發表於國際期刊 *Haematologica*¹, 為血液類 Q1 雜誌)

圖片(一) 此檢驗法之運作模型與測試樣品試驗



圖片(二) 此檢驗法與其他檢驗法之比較



References:

1. Hsu CC, Huang CE, Wu YY, et al. Quantitative competitive allele-specific TaqMan duplex PCR (qCAST-Duplex PCR) assay: a refined method for highly sensitive and specific detection of JAK2V617F mutant allele burdens. *Haematologica*. 2018;