

## RT-PCR 检测外周血中 CK19 mRNA 方法的优化

毕建威<sup>1\*</sup>, 经纬<sup>1</sup>, 张 军<sup>2</sup>, 李闻捷<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433; 2. 长海医院中心实验室)

**[摘要]** **目的:**探讨应用 RT-PCR 技术检测 CK19 mRNA 的优化方法。**方法:**采用 RT-PCR 方法分别检测经病理确诊的胃癌组织及有明确肿瘤病灶的胃癌患者和健康对照者外周血中 CK19 mRNA 的表达。**结果:**通过设计多对引物进行对比及设立未经逆转录的 RNA 为模板的对照可观察到 CK19 假基因及基因组 DNA 的干扰现象。在合理设计错配引物的基础上选择合适的退火温度可消除干扰。**结论:**在运用 RT-PCR 法检测外周血中 CK19 mRNA 表达时常存在基因组及假基因等因素的干扰,通过本方法可有效地克服这种干扰作用。

**[关键词]** 胃肿瘤;细胞角蛋白 19;微转移;RT-PCR

**[中图分类号]** R 735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0319-04

### Problems in detecting CK19 mRNA with RT-PCR and corresponding countermeasures

BI Jian-wei<sup>1\*</sup>, JING Wei<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>2</sup>, LI Wen-jie<sup>2</sup> (1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Central Laboratory, Changhai Hospital)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To search for a better RT-PCR method for detecting CK19 mRNA. **Methods:** RT-PCR methods were used to detect the expression of CK19 mRNA in the tumor tissues and in the peripheral blood of patients with gastric cancer and in the peripheral blood of healthy subjects. **Results:** The influence of pseudogene and genome was observed through non-reversely transcribed RNA controls and comparison of several pairs of primers. The interference could be effectively eliminated by regulating the annealing temperature based on mismatched primers. **Conclusion:** The presence of pseudogene and genome interferes the experimental protocol in RT-PCR, which can be resolved with the method introduced in our paper.

**[KEY WORDS]** stomach neoplasms; cytokeratin19; micrometastasis; RT-PCR

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 319-322]

正常人外周血中不存在上皮细胞及上皮源性细胞,如果从癌症患者外周血中检出上皮源性细胞,则可以说明癌细胞已转移入外周血。近年来,众多学者报道应用 RT-PCR 技术来检测癌症患者外周血中细胞角蛋白 19(CK19)mRNA,但报道的结果差别很大<sup>[1,2]</sup>。本研究旨在探讨 RT-PCR 检测 CK19 方法学中存在的问题并进行优化,以期建立可靠的胃癌微转移的检测方法。

### 1 材料和方法

1.1 标本 阳性对照样本:经病理证实的胃癌组织 10 例。阴性对照样本:选取健康本校大学生外周血 22 份。每份外周血均用 2 管注射器抽取,第 1 管先抽 3 ml 留作他用,更换注射器后再抽取 5 ml 血液,置入肝素化及经去 RNase 处理的试管中。立即用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,随即于 -80℃ 冻存。

1.2 主要试剂及仪器 淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0,

TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version DNA 聚合酶, DNase (RNase Free), PCR 相对分子质量标准 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司。PCR 反应使用 Biometro 公司生产的 T Gradient PCR 仪。

1.3 引物设计 按 Neumaier 等<sup>[3]</sup>的“最大错配原则”,根据 CK19 的 cDNA 全序列 (gi:34038) 及已知的 CK19 假基因序列设计出 3 组套式引物 (表 1)。

1.4 RT-PCR 按照 TRIzol 试剂说明书进行操作,提取标本的总 RNA,并对 RNA 进行定量,要求  $D_{260}/D_{280}$  达 1.95 以上。整个过程严格防止 RNase 和 PCR 产物的污染。将 RNA 约  $\leq 1 \mu\text{g}$  加入以下逆转录体系中: Random 9 mers (50 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ , dNTP 各 1 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol/L, RNase Inhibitor 1 U, AMV-RT 2.5 U, 总体积 10  $\mu\text{l}$ 。部分需用 DNase 酶预处理的 RNA 标本在逆转录前用 DNase 0.2

**[基金项目]** 上海市自然科学基金 (034119827)。

**[作者简介]** 毕建威 (1964-), 男 (汉族), 博士, 教授、主任医师, 硕士生导师。

\* Corresponding author. E-mail: bijianwei@cscs.org.cn

U/ $\mu$ g 核酸消化,将混和物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 min,随后再用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)抽提纯化标本 1 次。将逆转录产物分

别用上述 3 组引物进行套式 PCR 反应。最后取 PCR 产物 5  $\mu$ l 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,最后在紫外透射反射仪上观察结果及拍照。

表 1 CK19 基因扩增引物  
Tab 1 Oligonucleotide primers of CK19

Primer number	Sequence	Amplified position(cDNA)	Product length(bp)
P1	CGG GAC AAG ATT CTT GGT G	444-989	546
P2	GGC AGC TTT CAT GCT CAG	(Outer)	
P3	CCA AGT TTG AGA CGG AAC AG	532-792	261
P4	GAT CCT GAG TGA CAT GCG AA	(Inner)	
P5	GGA GGA AAT CAG TAC GCT GA	689-1073	385
P6	GGC TTC AAT ACC GCT GAT CA	(Outer)	
P7	GAC ATG CGA AGC CAA TAT G	783-1018	236
P8	CCT CCG TTT CTG CCA GTG	(Inner)	
P9	AAG CTA ACC ATG CAG AAC CTC AAC GAC CGC	273-1342	1 070
P10	TTA TTG GCA GGT CAG GAG AAG AGC C	(Outer)	
P11	TCC CGC GAC TAC AGC CAC TAC TAC ACG ACC	402-1147	746
P12	CGC GAC TTG ATG TCC ATG AGC CGC TGG TAC	(Inner)	

## 2 结果

2.1 基因组及假基因对各组引物的影响 上述 3 组引物在对肿瘤组织逆转录产物进行套式 PCR 反应时均得到相应的目的基因片段,未见明显非特异性条带。

对正常人外周血标本未经逆转录的 RNA 样品及逆转录产物进行套式 PCR 反应时,P1P2、P3P4 引物在 66 $^{\circ}$ C 退火温度下得到的扩增片段与肿瘤组织的基本一致(1% 琼脂糖凝胶中不能区别为明显非特异扩增)(图 1);P5P6、P7P8 两对引物在 60 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C、66 $^{\circ}$ C 退火温度下虽能得到肿瘤组织的特异性扩增,但在正常人中亦出现了与目的基因大小不一致的非特异性扩增条带(图 2),可见仅靠不同退火温度,并不能消除这种基因组及假基因对扩增的影响。

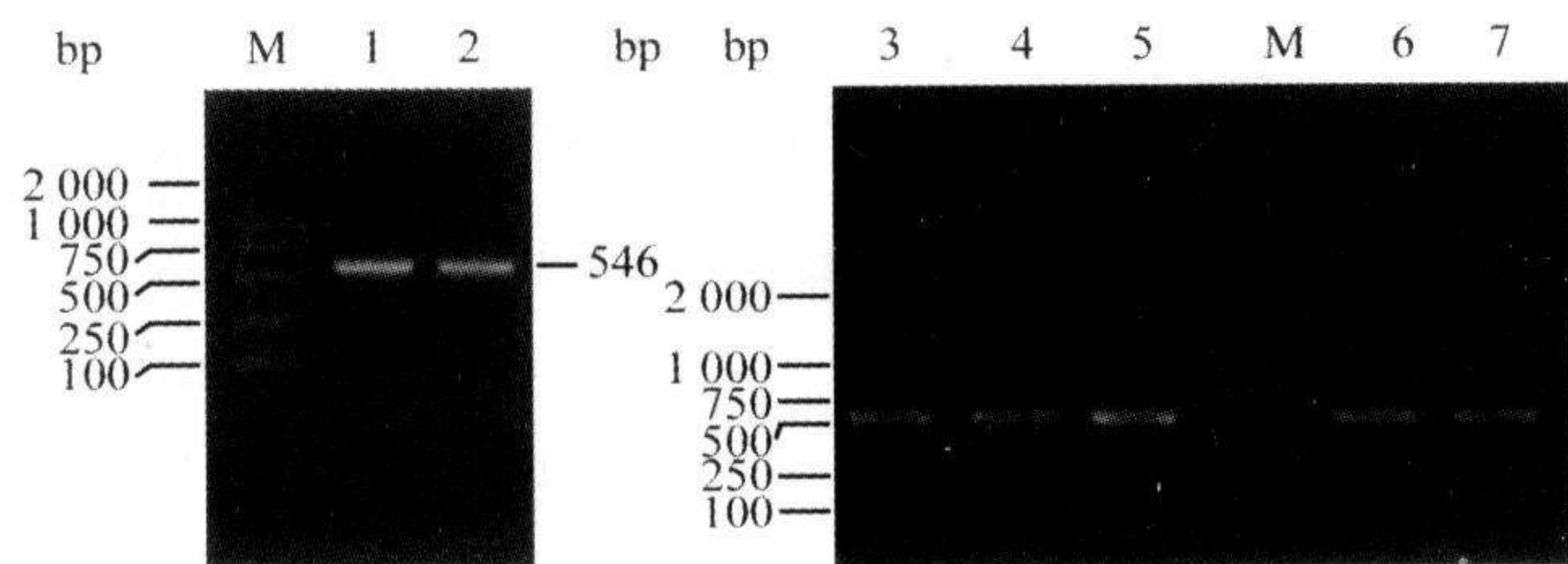


图 1 P1P2 对肿瘤组织、正常人未经逆转录的 RNA 样品及逆转录产物 PCR 扩增结果

Fig 1 P1P2 PCR results of normal and reversely transferred RNA samples from normal and cancer tissue

M: Marker; 1: PCR products of CK19 cDNA in gastric cancer; 2: PCR products of nontranscribed(-RT) RNA in normal control; 3-7: PCR products of CK19 cDNA in normal control

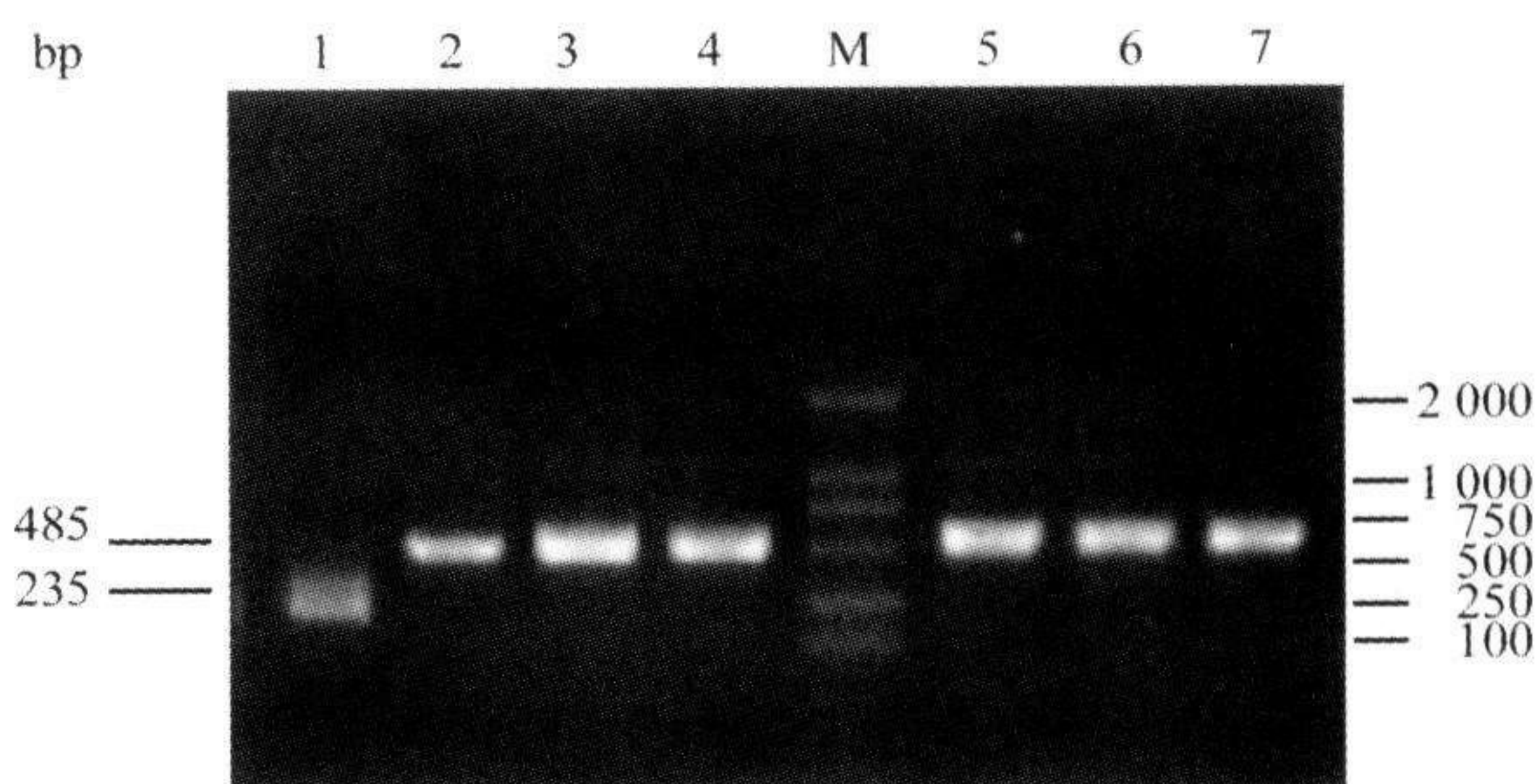


图 2 P5P6、P7P8 对肿瘤组织、正常人未经逆转录的 RNA 样品及逆转录产物 PCR 结果

Fig 2 P5P6 and P7P8 PCR results of reversely transferred RNA samples from normal and cancer tissue

1: PCR products of CK19 cDNA in gastric cancer at 66 $^{\circ}$ C annealing temperature; 2-4: PCR products of nontranscribed(-RT) RNA in normal control at 60 $^{\circ}$ C, 62 $^{\circ}$ C, 66 $^{\circ}$ C annealing temperature, respectively; M: Marker; 5-7: PCR products of CK19 cDNA in normal control at 60 $^{\circ}$ C, 62 $^{\circ}$ C, 66 $^{\circ}$ C annealing temperature, respectively

根据文献<sup>[4]</sup>引物 P9P10、P11P12 在 68 $^{\circ}$ C 退火温度下可以达到较好的敏感性与特异性,遂在 68 $^{\circ}$ C、69 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、71 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C 退火温度下分别对肿瘤组织及正常人进行检测,正常人均未见明显非特异条带,肿瘤组织目的条带均明显出现(图 3),最终选择 68 $^{\circ}$ C 以达到最佳敏感性。

2.2 两组引物敏感性的对比 鉴于基因组非特异片段的明显扩增可能会对目的基因的扩增产生竞争性抑制作用,我们曾用 P9P10、P11P12 对 10 例晚期胃癌患者外周血单核细胞的逆转录产物进行扩增,

结果 3 例患者呈阳性(图 4)。再用 P5P6、P7P8 对这 10 例胃癌患者外周血单核细胞的同一批逆转录产物进行扩增时,只有 2 例患者呈阳性,原有 1 例阳性患者转为阴性,而其结果中可见非特异条带明显扩增(图 5)。最终我们认为 P9P10、P11P12 是一组较为合适的引物。

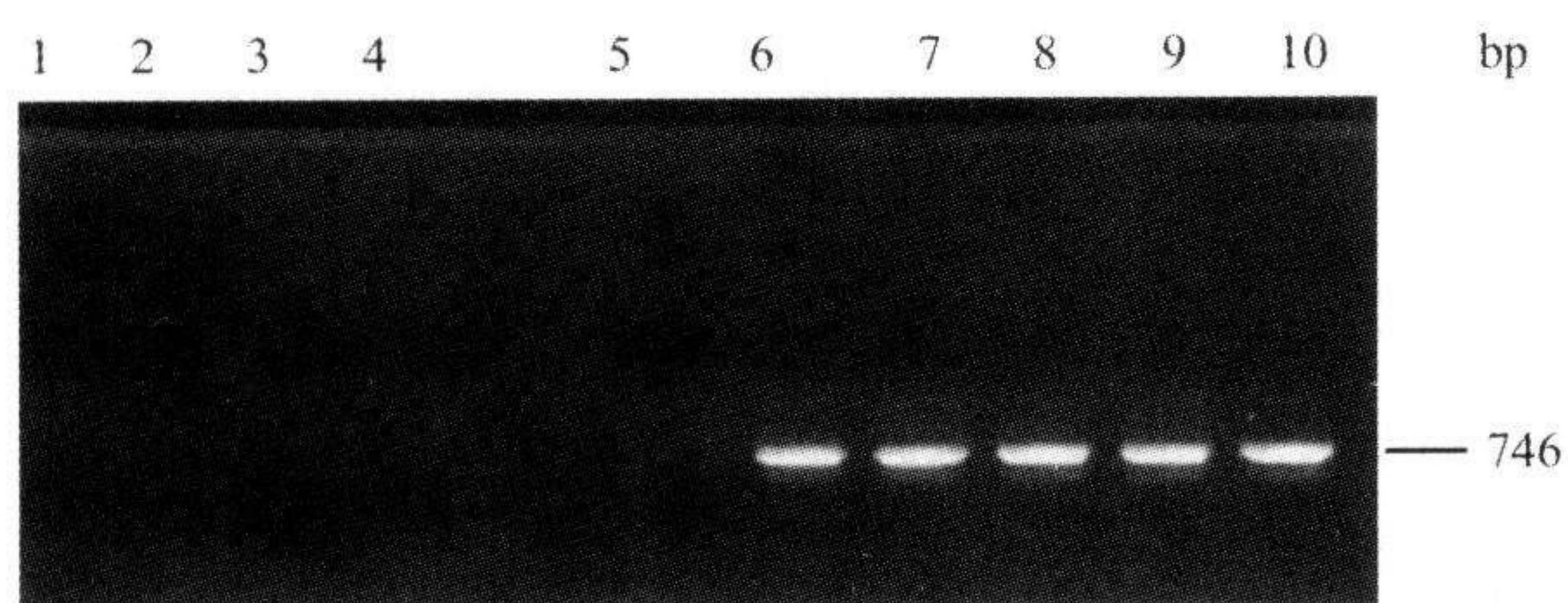


图 3 P9P10、P11P12 对正常人和肿瘤组织逆转录产物在不同退火温度的 PCR 结果

Fig 3 P9P10 and P11P12 PCR results of reversely transferred RNA samples from normal and cancer tissue at different annealing temperatures

1-5: PCR products of CK19 cDNA in normal contrast at 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C annealing temperature, respectively; 6-10: PCR products of CK19 cDNA in gastric cancer at 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C annealing temperature, respectively

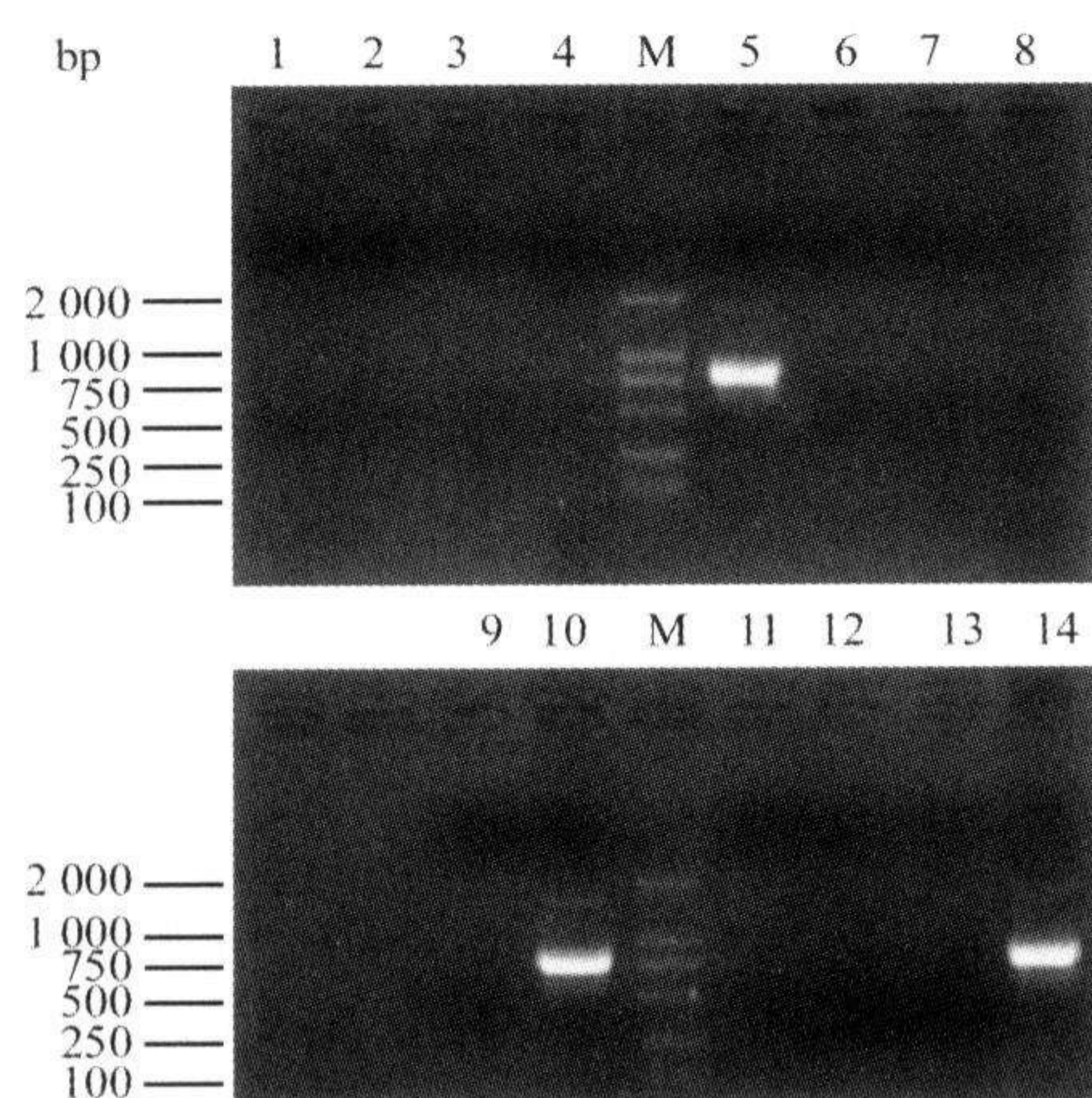


图 4 P9P10、P11P12 对 4 名正常人及 10 例胃癌患者外周血单核细胞的逆转录产物 PCR 结果

Fig 4 P9P10 and P11P12 PCR results of reversely transferred CK19 cDNA of PBMN in normal controls and 10 gastric cancer patients

1-4: Normal control; M: Marker; 5-14: gastric cancer patients. The PCR results of 3 gastric cancer patients(5,10,14) were positive

由于在抽提总 RNA 的过程中很难避免基因组 DNA 的污染,我们运用 DNase 酶(RNase Free)对抽提获得的 RNA 标本进行去 DNA 处理,然后再对其逆转录产物进行套式 PCR,最终未见明显条带。

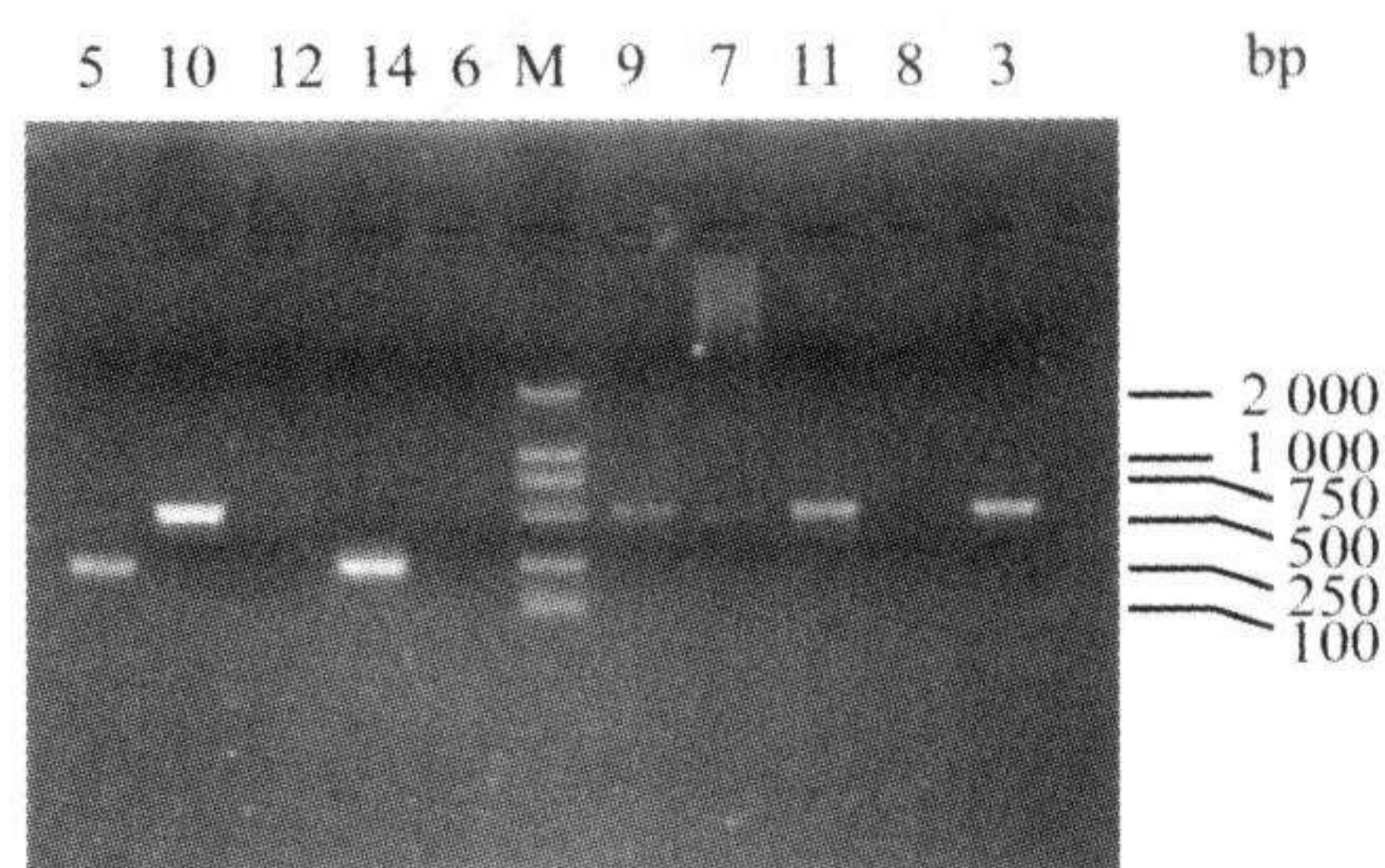


图 5 P5P6、P7P8 对图 4 中 10 例胃癌患者外周血单核细胞的同一批逆转录产物 PCR 结果

Fig 5 P5P6 and P7P8 PCR results of reversely transferred CK19 cDNA of PBMN in same 10 gastric cancer patients

The results of 5-14 corresponded with the same number in Fig 4. And it was showed that the PCR results of 2 gastric patients(5 and 14) were positive, and 1 patient(10) became negative

2.3 特异性检测 在 66°C 退火温度下,用 P5P6、P7P8 两对引物进行套式 PCR 反应;22 份正常人外周血单核细胞检测结果均为阴性;应用 P9P10、P11P12 对上述标本检测,结果亦均为阴性。

### 3 讨论

CK 是上皮细胞及上皮源性肿瘤细胞骨架系统中中间丝的组成成分,其中 CK19 表达标记单层上皮。目前应用 RT-PCR 方法检测患者外周血 CK19 mRNA 的存在与否来判断肿瘤是否发生微转移已成为目前肿瘤研究的热点。该方法是从基因水平来进行诊断,较一般的传统检测方法灵敏,可以达到  $10^{-6}$ [2]。但到目前为止,众多文献报道的结果有很大差别,一方面是由于所选病例的自身情况,另一方面是在方法学上的差异,为达到最佳的检测效果,我们必须对方法学进行优化。

检测中假阳性的出现主要有以下几种情况:PCR 产物的污染、假基因的干扰<sup>[5,6]</sup>、基因组 DNA 的干扰以及组织特异性基因在异位组织中的非法转录等。PCR 产物的污染可以通过规范实验操作来避免。假基因及基因组 DNA 的干扰理论上可以通过合理的引物设计来避免,如设计引物跨越 CK19 DNA 序列多个内含子,同时与已知假基因最大错配,但实践中,迄今为止并没有找到非常理想的引物。

设计引物时应注意除了应用引物来与基因库进行比对,同时还应该用该引物扩增产物全部片段与基因库进行比对,否则设计出的引物仍不能达到很好的特异性。例如 P1P2 这对引物在设计时,引物

与基因组 DNA 比对不完全匹配,但由于 P1 的 3' 端有 15 个碱基与基因组 DNA 匹配,且 P2 的 3' 端有 14 个碱基与基因组 DNA 匹配,从而导致仍有非特异产物产生,且与目的基因长度很接近,故此舍弃。

P5P6、P7P8 两对引物与假基因多处错配,与 CK19 基因组 DNA 可以匹配,但由于跨内含子,非特异扩增产物片段(485 bp)长于目的基因片段(235 bp),因而可以与目的基因相区别。但非特异扩增明显,会产生竞争性抑制作用,从而降低检测的敏感性,亦舍弃。

P9P10、P11P12 与假基因不匹配,与 CK19 基因组 DNA 完全匹配,但其基因组扩增产物片段(大于 4 000 bp)长于目的基因片段(746 bp),而且普通 PCR 条件下基本上不能扩增出如此长的片段。在对未经逆转录的 RNA 样品及逆转录产物进行套式 PCR 反应后未能得到明显条带,肿瘤组织阳性对照则得到明显条带。

有文献<sup>[6]</sup>报道 P9P10、P11P12 两对引物在检测正常人中亦有假阳性的出现。但我们通过预实验优化反应条件后并没有出现假阳性。我们认为可以通过调整反应的条件及退火温度,以达到最佳的特异性及灵敏性。同时抽血时做到用 2 管注射器分别抽取对避免假阳性亦是很重要的步骤<sup>[4]</sup>,第 1 管先抽 1~3 ml 留作他用,更换注射器后再抽取 5 ml 血液以供本实验使用。

我们在实验中还发现基因组非特异片段的明显扩增会产生竞争性抑制作用,从而降低检测的敏感性。应用 P9P10、P11P12 与 P5P6、P7P8 两组引物分别对 10 例晚期胃癌患者外周血单核细胞的逆转录产物进行扩增,结果前者有 3 例阳性,后者有 2 例阳性,原有 1 例阳性患者转为阴性。

运用 DNase 酶(RNase Free)对抽提获得的 RNA 标本进行消化处理,可以消除基因组 DNA 的干扰。但 CK19 mRNA 本来就很微量,经过脱氧核糖核酸酶预处理后很容易丢失,从而使得结果为假阴性。因此虽理论上是可行的,但实际检测时会显

著降低敏感性。再者外周血抽取后应立即进行处理,如果放置的时间过长,将会降低敏感性,因为外周血放置的时间延长后,即使是放置在低温环境中,肿瘤细胞也会死亡<sup>[7]</sup>。

综上所述,检测过程中存在许多干扰因素,容易出现假阳性,但通过合理设计引物,优化反应条件可以达到最佳的检测效果。在本实验中所选用的 P9P10、P11P12 两对引物进行的套式 PCR 反应达到了较好的特异性及敏感性。同时我们应用此法已对 70 例胃癌患者进行了检测,阳性率为 20%(14/70)(未发表资料)。

### [参考文献]

- [1] Ikeguchi M, Ohro S, Maeda Y, *et al.* Detection of cancer cells in the peripheral blood of gastric cancer patients[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(2): 217-221.
- [2] Majima T, Ichikura T, Takayama E, *et al.* Detecting circulating cancer cells using reverse transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin mRNA in peripheral blood from patients with gastric cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2000, 30(11): 499-503.
- [3] Neumaier M, Gerhard M, Wagener C. Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes[J]. *Gene*, 1995, 159(1): 43-47.
- [4] Peck K, Sher YP, Shih JY, *et al.* Detection and quantitation of circulation cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(13): 2761-2765.
- [5] Daimon Y, Yamanishi K, Murakami Y, *et al.* Novel single nucleotide polymorphisms of the cytokeratin 19 pseudogene are associated with primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatol Res*, 2003, 25(3): 281-286.
- [6] Ruud P, Fodstad O, Hoving E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(1): 119-125.
- [7] Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, *et al.* Time is an important factor when processing samples for the detection of disseminated tumor cells in blood/bone marrow by reverse transcription-PCR[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(4): 785-786.

[收稿日期] 2004-07-29

[修回日期] 2004-11-08

[本文编辑] 曹 静