

TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测外周血 CK19 mRNA

经纬¹, 毕建威^{1*}, 张军², 魏国¹, 李闻捷²

(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:**应用 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 技术, 建立定量检测 CK19 mRNA 的方法。**方法:**采用 RT-PCR 从胃癌细胞中克隆 CK19 片段(230 bp), 装入 pMD 18-T Simple 载体。纯化质粒, 制备荧光定量 PCR 标准品。应用 LightCycle 荧光定量 PCR 仪检测标准品、30 例正常人外周血和 5 例肿瘤组织 CK19 mRNA。**结果:**PCR 扩增及测序均证实 CK19 cDNA 片段重组到 pMD 18-T 载体上, 建立了稳定的检测 CK19 mRNA 的标准, 即设定 C_T 值在 35 个循环之内, 检测结果低于 100 个拷贝数量级为阴性标本。**结论:**采用 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 技术检测外周血 CK19 mRNA 是一种稳定可靠的方法。

[关键词] CK19; 实时荧光定量 PCR; TaqMan; 胃肿瘤

[中图分类号] R 735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0315-03

TaqMan real time quantitative RT-PCR in detection of peripheral blood CK19 mRNA

JING Wei¹, BI Jian-wei^{1*}, ZHANG Jun², WEI Guo¹, LI Wen-jie² (1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Central Laboratory, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a quantitative method for determination of CK19 mRNA with TaqMan real time quantitative RT-PCR. **Methods:** A 230 bp fragment of CK19 mRNA was amplified from the total RNA of gastric cancer cells using RT-PCR methods and was introduced into pMD 18-T Simple vector. The plasmid was purified and the fluorescent standard PCR product was prepared. The expression levels of CK19 mRNA in standard PCR product, 5 tumor tissue specimens and 30 healthy subjects were observed. **Results:** A 230 bp fragment of CK19 mRNA was successfully cloned into the pMD 18-T Simple vector and was verified by sequence analysis. A stable standard for detection of CK19 mRNA was established, that is, when C_T was set within 35 cycles, negative specimen was defined when the result was lower than 100 copies. **Conclusion:** TaqMan real time quantitative RT-PCR is stable and reliable in quantitative detection of CK19 mRNA in peripheral blood.

[KEY WORDS] cytokeratin 19; real time quantitative PCR; TaqMan; stomach neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 315-317]

细胞角蛋白(cytokeratin, 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 表达于单层上皮。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^[1]。最近几年, 实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR) 技术以其敏感性高、重复性好、速度快和污染少等特点使 PCR 技术又向前迈进了一步。本研究的目的是将 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术用于检测外周血 CK19 mRNA, 并对其进行方法学评价。

1 材料和方法

1.1 标本 取术中切除胃癌组织 5 例(术后经病理证实), 标本离体后立即切取, 迅速置入冰桶中运送至实验室, -80℃ 冻存。选取健康本校大学生志愿者外周血 30 份, 每份外周血均用两管注射器抽取, 第 1 管先抽 3 ml 留作他用, 更换注射器后再抽取 5 ml 血液, 置入肝素化抗凝及去核糖核酸酶(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-80℃ 冻存。

1.2 主要试剂及仪器 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0, TaKaRa Ex Taq™ Hot Start

Version, TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version. 2. 1, DNase (RNase Free), PCR 分子量标准 DNA Marker, pMD 18-T Simple Vector 均购自 TaKaRa 公司。淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司。DNA 凝胶回收试剂盒及超纯质粒 DNA 纯化试剂盒均购自杭州维特杰公司。普通 PCR 反应使用 Biometro 公司生产的 T Gradient PCR 仪。定量 PCR 反应使用 Roche 公司生产的 LightCycle 荧光定量 PCR 仪及其自带 LightCycle software 5.1 软件。DNA 和 RNA 定量采用 Bio-Rad 公司制造的 Smart 3000 分光光度计。凝胶成像分析采用 Fluor™-s Multilmager 成像仪和 Quantity one 分析软件。

1.3 总 RNA 抽提及反转录 取 20~100 mg 肿瘤组织按照 TRIzol 试剂说明书进行操作, 提取标本的总 RNA, 并对 RNA 进行定量, D₂₆₀/D₂₈₀ 达 1.95 左右, 整个过程严格防止

[基金项目] 上海市自然科学基金(034119827)。Supported by Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Government (034119827)。

[作者简介] 经纬, 硕士生, 住院医师。

* Corresponding author. E-mail: Bijianwei@cscso.org.cn

核糖核酸酶和 PCR 产物的污染。健康者外周血用同样的方法抽提总 RNA,并用 DNase(RNase Free, TaKaRa)进行消化。所有抽提总 RNA 样品均经过电泳证实条带完整,将最终纯化的 RNA 按上述体系进行反转录,然后应用管家基因 GAPDH 的引物^[2]进行 PCR 反应(TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version)进一步检验 RNA 的抽提效果,上游引物为:5'-ATG ACC ACA GTC CAT GCC AT-3',下游引物为:5'-TTC CTC TTG TGC TCT TGC TG-3'。

1.4 CK19-pMD 18-T 载体的构建及标准品的制备 采用 PCR 扩增特异性 CK19 片段,上游引物为:5'-AGA TCC TGA GTG ACA TG CGA-3',下游引物为:5'-TGT GTC TTC CAA GGC AGC TT-3'(772-1001, gi: 34038)。用维特杰公司生产的 DNA 凝胶回收试剂盒对 CK19 片段(230 bp)进行胶回收纯化。再采用 TaKaRa 公司 pMD 18-T 载体进行连接。按照常规 CaCl₂方法^[3]制备 JM109 感受态细胞,连接产物转化 JM109 在氨苄青霉素(50 μg/ml)平板上筛选阳性转化菌。挑取单个克隆,用含氨苄(50 μg/ml)的 LB 培养基培养扩增。采用维特杰公司生产的质粒 DNA 小量纯化试剂盒抽提细菌质粒,用上述 CK19 片段(230 bp)的引物对重组质粒进行扩增,观察是否有预期的目的片段。同时取阳性转化菌 1.5 ml 送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序,测序结果用 BLAST 软件(www.ncbi.nlm.nih.gov)进行同源性分析。

1.5 质粒的抽提纯化及浓度测定 采用维特杰公司生产的超纯质粒 DNA 纯化试剂盒抽提纯化质粒,抽提 100 ml 菌液,最终用 200 μl 去离子水溶解。用分光光度计测定重组质粒提取物 λ 260 nm 及 280 nm 的光密度,根据载体分子量计算其拷贝浓度。最终制备成 2.5 × 10⁹ 拷贝/μl 标准品原液, -80℃ 冻存。

1.6 质粒及标准曲线的建立 将重组质粒标准品原液按梯度稀释成 2.5 × 10⁷、2.5 × 10⁶、2.5 × 10⁵、2.5 × 10⁴、2.5 × 10³、2.5 × 10²、2.5 × 10¹ 拷贝/μl,使用 LightCycle 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 检测。实时荧光定量 PCR 反应上游引物序列:5'-GGTCATGGCCGAGCAGAA-3';下游引物序列:5'-GCGACCTCCCGTTCAAT-3'; TaqMan-MGB 探针序列:FAM-CCAGCCGGACTGAA-MGB。所有引物和探针由我们和上海基康生物技术有限公司共同设计,由该公司合成和修饰,引物在设计中避免了假基因的干扰。同时通过 DNase 消化去除了基因组 DNA 的污染。PCR 反应体系为 25 μl,其中含 5 × Real Time PCR 缓冲液 5 μl, dNTP(10 mmol/L)0.75 μl, Mg²⁺(250 mmol/L)0.5 μl,上下游引物(250 mmol/L)0.2 μl, TaqMan-MGB 探针(25 mmol/L)0.12 μl, TaKaRa Ex Taq™ HS(5 U/μl)0.25 μl,质粒标准品 2 μl,用 H₂O 补足体系。扩增条件经过优化,最终定为 94℃ 20 s, 60℃ 10 s, 66℃ 25 s, 共 40 个循环。数据处理: LightCycle 荧光定量 PCR 仪检测结果由 LightCycle software 5.1 系统进行分析,标本重复性及组间比较采用 SPSS

11.5 软件进行统计分析。

1.7 样品检测 对标准品进行检测同时,为了检测上述体系的特异性和敏感度,采用 LightCycle 荧光定量 PCR 仪扩增 30 例正常人外周血和 5 例肿瘤组织。同时进行了重复性的检测。

2 结果

2.1 重组质粒的 PCR 扩增鉴定 以重组质粒 DNA 作模板,用 CK19 片段(230 bp)引物进行 PCR 扩增,结果可见一 230 bp 的条带(图 1)。

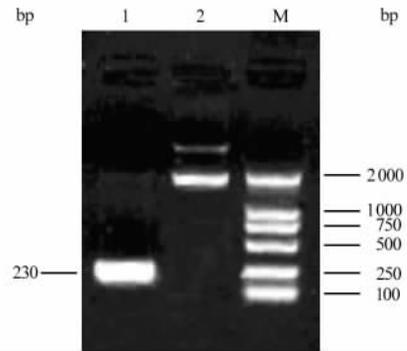


图 1 CK19 片段及重组质粒的电泳结果
Fig 1 Electrophoretic result of recombinant plasmid and PCR products of CK19 fragment

1: PCR products of CK19; 2: Recombinant plasmid; M: DNA marker

2.2 重组质粒序列分析 取菌液 1.5 ml 送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序,测序结果经 BLAST 软件进行同源性分析,显示所克隆 CK19 基因片段(230 bp)与已知扩增片段完全相符,说明目的片段已成功重组于载体中并保持了序列的完整性。

2.3 标准曲线的建立及方法线性检测范围 选择质粒做标准品,小量分装后使用,避免反复冻融使 DNA 降解。通过逐步优化 dNTP、Mg²⁺、引物和探针的浓度,并采用不同的扩增条件来最大程度地优化实验方案。通过以上措施我们成功地建立了胃癌患者外周血 CK19 mRNA 标准曲线。图 2 中 C_T 值定义为仪器所能检测到的荧光强度第 1 次超过阈值(即 PCR 起始 3~15 个循环时平均荧光强度标准差的 10 倍)的循环数。其线性范围可达 7 个数量级,最高检测上限 5 × 10⁷,最低检测下限 5 × 10¹。标准曲线的直线回归相关系数 r = -0.99 ~ -1.00,斜率为 -3.03 ~ -3.56。

2.4 灵敏度及特异性检测 将所有的标准品经普通 PCR 扩增和 LightCycle software 5.1 系统分析,将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,电泳图显示各泳道在 230 bp 的位置均有特异性条带出现。5 例肿瘤组织均能检测到 CK19 mRNA (10⁷ ~ 10⁸),同时用该法对 30 例正常人外周血检测,发现在有 3 例检测结果在 10¹ 数量级,其余 27 例未能检测到。因此设定 C_T 值在 35 个循环之内,检测结果低于 100 个拷贝数量

级为阴性标本。

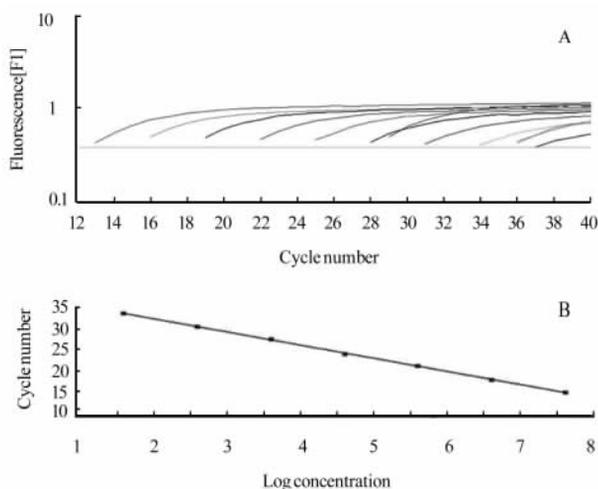


图 2 CK19 基因标准曲线

Fig 2 Standard curves for CK19 by real-time FQ-PCR

A: Amplification plots of CK19. Seven folds serial dilutions of CK19 plasmid and some samples were amplified; B: Standard curve for CK19

2.5 方法的重复性 将 7 个不同稀释度的标准品 ($2.5 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^1$ 拷贝/ μl) 分 6 批次检测, 拷贝数批间变异 (CV) 分别为: 22.15%、23.73%、21.79%、29.25%、39.34%、36.63%、41.58%; 我们将上述 7 个标准品各分 3 份进行检测, 以拷贝数计算其批内变异 (CV) 分别为: 10.39%、7.19%、15.20%、11.89%、24.84%、23.90%、24.56%。

3 讨论

随着实时荧光定量 PCR 技术的发展, 其目前已成为定量检测核酸较为准确的方法, 我们利用 LightCycle 荧光定量 PCR 仪, 设计特异的 TaqMan-MGB 探针, 成功地建立了 CK19 mRNA 定量检测的标准。

标准品的制备是实时荧光 PCR 进行定量的基础, 我们采用 CK19 片段 (230 bp) 作为标准制备物, 并把目的片段重组至质粒中得到稳定的重组质粒并进行纯化。然后进行逆转录, 再与标准品同时进行 PCR, 从而达到绝对定量目的。定量标准、目的片段的特异性和扩增后序列的完整性至关重要。对目的基因重组克隆进行鉴定, 我们采用直接 PCR 和序列分析法。实验结果表明: 目的基因 PCR 扩增均得到预

期大小的 PCR 产物。重组质粒序列分析结果用 BLAST 软件进行同源性分析, 与 CK19 (gi: 34038) 序列相同。此目的片段的成功制备、重组并保持了序列的完整性和特异性, 可以作为 CK19 mRNA 定量检测的标准。

外周血存在 CK19 mRNA 是目前国内外用于判断胃癌、乳腺癌等表达 CK19 的肿瘤是否有外周血转移的一个直接的证据。在进行临床标本检测时, 由于 PCR 产物的污染、假基因的干扰、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原因从而导致 CK19 的检测过程中容易出现假阳性。为此, 我们在设计引物时尽量做到与假基因及基因组最大错配, 从而避免假基因及基因组的干扰。同时我们在抽提总 RNA 后, 通过 DNase 消化去除基因组 DNA 的污染, 以避免扩增基因组 DNA, 保证检测结果的准确性。尽管如此, 我们在 30 例正常人外周血中仍检测到 3 例存在非特异性的低拷贝数 (10^1 数量级), 为了保证检测结果的特异性和减少假阳性率, 我们最终确定以高于 100 个拷贝数, 同时 C_T 值小于 35, 作为最终判断阳性的标准, 我们应用该方法检测了 5 例肿瘤组织和部分胃癌患者的外周血, 得到了较好的结果 (另文发表)。

综上所述, 采用荧光定量 PCR 方法检测 CK19 mRNA 并进行定量, 是一种稳定性、精确度、特异性较好的检测方法^[4]。该方法可以用于 CK19 mRNA 表达的定量, 也可以用于检测临床胃癌、乳腺癌等患者外周血中存在的癌细胞中的 CK19 mRNA。

[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: 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: 499-503.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫 译. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 55-56.
- [4] Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 5145-5151.

[收稿日期] 2005-07-27

[修回日期] 2005-12-13

[本文编辑] 曹 静