

新型 Taq Man-MGB 探针实时荧光定量 PCR 检测人类 *mdr1* 基因

邹亚伟¹, 封志纯³, 胡斌², 乔英飒², 吴梓梁¹, 陈福雄¹, 叶铁真¹ (¹广州医学院第一附属医院儿科, 广东 广州 510120; ²中山大学达安基因诊断中心, 广东 广州 510089; ³南方医科大学珠江医院儿科, 广东 广州 510282)

摘要:目的 建立一种比现有方法敏感、准确性高、重复性好的人类 *mdr1* 基因的新型实时荧光定量 PCR 检测新方法。方法 用 Primer Express 2.0 引物设计软件设计引物和 MGB 探针, 以 Taq Man-MGB 探针技术为基础, 运用 Taq Man-MGB 探针, 以含有目的基因 *mdr1*cDNA 的质粒 pHaMDR1/A 为阳性模板, 建立实时荧光定量 PCR 检测方法。结果 所建立方法的最低检测限度为 15 个基因拷贝 / 反应, 在待扩增 DNA 浓度为 3.061×10^3 cps/ml~ 3.061×10^9 cps/ml 范围时, 模板浓度与循环阈值(Ct)之间的相关性良好, 决定系数 r^2 为 0.988243。结论 应用 Taq Man-MGB 探针的实时荧光定量 PCR 方法检测人类 *mdr1* 基因, 具有灵敏度高、特异性高和精确性高等优点。

关键词: Taq Man-MGB 探针; 实时荧光定量 PCR; *mdr1*

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)04-0466-03

Detection of *mdr1* gene by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction using Taq Man-MGB probe

ZOU Ya-wei¹, FENG Zhi-chun³, HU Bin², QIAO Ying-sa², WU Zi-liang¹, CHEN Fu-xiong¹, YE Tie-zhen¹

¹Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China; ²DaAn Gene Diagnostic Center, Sun Yat Sen University, Guangzhou 510089, China; ³Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Primer Express 2.0 software was used to design the primers and the MGB probe. With the plasmid pHaMDR1/A containing *mdr1* cDNA as the template, we established a real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction system, which, at the template concentration of 3.061×10^3 to 3.061×10^9 cps/ml, had a correlation coefficient of 0.988243 between template concentration and threshold cycle value. This PCR method allows sensitive, specific and quantitative detection of human *mdr1* gene.

Key words: Taq Man-MGB probe; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; *mdr1* gene

近年来的文献报道显示, 实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 技术是一种新的体外核酸扩增技术, 是目前国际上公认的最准确、最特异、重现性最好的核酸分子定性、定量检测标准方法, 克服了传统 PCR 技术的假阳性及不能定量等缺点, 在病原体测定、肿瘤基因检测、免疫组份分析、基因表达、突变及其多态性的研究等方面有着广泛的应用前景。人类多药耐药 (MDR) 相关基因 *mdr1* (multidrug resistance 1) 编码的 P 糖蛋白是肿瘤耐药研究中最具代表性的载体蛋白, 其产生机制涉及到 ABC (ATP binding cassette, ABC) 型膜载体蛋白家族, *mdr1* 基因是一个高度保守的基因家族, 其表达受多种因素调节^[1]。我们使用新型 Taq Man-MGB 探针代替常规 Taq Man 探针, 建立了较新的实时 FQ-PCR 检测 *mdr1* 的方法。

1 材料和方法

收稿日期: 2005-11-25

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (2005288)

Supported by Science fundation of Guangdong (2005288)

作者简介: 邹亚伟 (1964-) 男, 副教授, 博士研究生, 硕士研究生导师, E-mail: zouyawei@163.com

1.1 病例选择及标本的采集

选择本院住院和门诊病例共 15 例, 非肿瘤病人 10 例, 其中传染性单核细胞增多症 2 例, 感染性贫血 3 例, 特发性血小板减少性紫癜 5 例, 急性白血病 5 例。

1.2 试剂

Ficoll 淋巴细胞分离液购自天津浩灏生物工程有限公司。RNA 提取试剂合 RNA-SOLV Reagent 购自广州齐特科生物工程有限公司。含目的基因 *mdr1* cDNA 的原核质粒 pHaMDR1/A 由中国医学科学院血液病研究所杨纯正教授赠送 (由美国国立癌症研究所 Michael M. Gottesman 博士制备)^[2], 其中插入全长 *mdr1* cDNA。青霉素购自广州天心药业股份有限公司。胰蛋白胍购自北京双旋微生物培养基制品厂。酵母提取物购自英国 Oxoid 公司。PCR 试剂盒购自广州威佳生物工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 提取 将 2 ml 骨髓液或 4 ml 外周血用肝素抗凝, 用生理盐水稀释 1~2 倍, 用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 再用生理盐水洗涤 3 次, 离心后弃上清, 沉淀内加入 Trizol 1 ml -80℃ 保存或直

接提取 RNA 备用。将裂解液置离心管中,15~30 °C 孵育 5 min,加入氯仿(0.2 ml 氯仿 /1 ml Trizol),盖紧盖子,用力摇动 15 s,15~30 °C 孵育 2~3 min,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液至新的离心管,加异丙醇(0.5 ml 异丙醇 /ml TRIzol),15~30 °C 孵育样品 10 min,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,75%乙醇洗涤沉淀一次(至少 1 ml 75%乙醇 /ml Trizol),4 °C 7500 r/min 离心 5 min,弃乙醇,空气或真空干燥 5~10 min(不要完全干燥),加 DEPC 处理水溶解 RNA,-80 °C 保存备用。若长期保存,加入 2.5 倍体积乙醇,置-80 °C 保存。

PCR 引物和荧光探针的设计和合成 根据杨纯正教授惠赠质粒的 CDNA 全长序列,用 Primer Express 2.0 引物设计软件,设计一对引物和一个 MGB 探针,其序列见表 1。PCR 产物全长 69 bp,跨过 2 个内含子,包括 MGB 探针结合碱基序列。引物由上海英骏生物技术有限公司合成,探针由上海基康生物工程技术有限公司合成。

表 1 引物和 MGB 探针的序列

Tab.1 Sequences of the primers and MGB probe

Primer	Sequence
Primer 1(upper stream)	5'-GATACATGGTTCATCCATG-3'
Primer 2(down stream)	5'-CAGTGGTGTTCATGGTTCATCA-3'
MGB probe	5'-FAMCAACTCACATCCTGCTGAP-MGB-3'

1.3.2 原核质粒提取^[3]

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 MDR1cDNA 逆转录反应 取 2 μl RNA 模板做逆转录反应(RT)。反应条件 37 °C 1 h,然后 95 °C 3 min。

用德国 Eppendorf 公司生产的 Biometer 微量核酸 / 蛋白定量仪测定 pHaMDR1/A 质粒浓度为 50 μg/ml,根据公式:待扩增 DNA 浓度(cps/ml)=[质粒浓度×10⁻⁶/(平均相对分子量×待扩增 DNA 的长度)]×6.02×10²³,换算出待扩增 DNA 浓度为 3.061×10¹² cps/ml。将质粒进行梯度稀释,使待扩增 DNA 浓度分别为 3.061×10⁹ cps/ml、3.061×10⁸ cps/ml、3.061×10⁷ cps/ml、3.061×10⁶ cps/ml、3.061×10⁵ cps/ml、3.061×10⁴ cps/ml、3.061×10³ cps/ml、3.061×10² cps/ml、3.061×10¹ cps/ml。荧光定量 PCR(美国 PE 公司产 ABI 7000 型全自动荧光定量 PCR 仪)反应体系为 5×定量缓冲液 PCR 缓冲液 10 μl,上游引物(25 μmol/L)1 μl,下游引物(25 μmol/L)1 μl,dNTPs(10 mmol/L)1 μl,荧光探针(20 μmol/L)1 μl,Taq DNA 聚合酶(2U/μl)2 μl,质粒 5 μl,ddH₂O 29 μl。阴性质控品采用灭菌超纯水。反应条件为 93 °C 3 min,然后 93 °C 1 min,54 °C,45 s,共 40 个循环;反应结束后由计算机根据反应过程中产生的荧光信号进行数据处理并绘制标准曲线,

样品的定量结果由计算机自动得出。

2 结果

2.1 标准曲线

每一数量级稀释液各取 5 μl 作为模板进行 Taq Man-MGB FQ-PCR 检测,结果最低稀释度 3.06×10³ 拷贝 /ml 的标本在 33 循环处可见到明显的扩增曲线(按每一反应管内加 5 μl 的提取 DNA,大约相当于检测最低限度为每个反应 15 DNA 拷贝量)。图 1 为待扩增 DNA 浓度在 10³~10⁹ cps/ml 区间时,其扩增循环数与检测荧光信号的关系,由图 1 可见:①模板浓度越高,可检测到荧光信号的循环数越少,即其循环阈值(threshold cycle, cycle threshold, Ct)越小,Ct 表示 PCR 循环过程中,每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数;②随着循环数的增加,荧光信号逐渐增强,而当循环数达到一定程度时,荧光强度达到平台;③经梯度稀释的模板浓度每降低 10 倍,可检测到荧光信号的起始循环数增加约 3~5 次。图 2 为待扩增 DNA 浓度在 10³~10⁹ cps/ml 范围内,Ct 值和 DNA 拷贝数的相关图,由此可见模板浓度与可检测到荧光信号的循环数呈负相关,其决定系数 *r*² 为 0.988243。

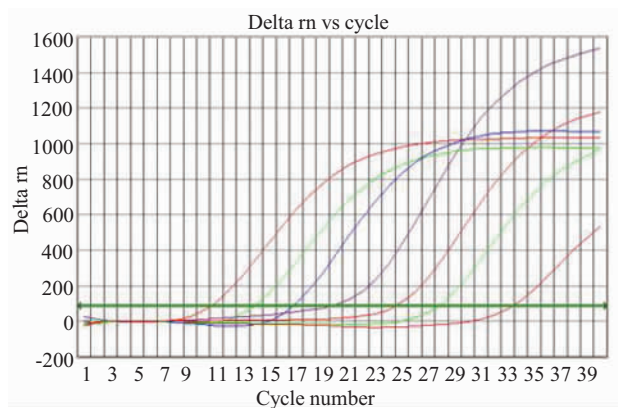


图 1 Mdr1 模板浓度与荧光强度的关系

Fig.1 Relationship between template concentration and fluorescent intensity(The leftmost curve is 10⁹ cps/ml, and the rightmost one is 10³ cps/ml.)

2.2 病例结果

非白血病的普通病人 10 例中,只检测出 1 例阳性表达,强度为 3.061×10² cps/ml;而急性白血病 5 个病例中亦仅查出 1 例阳性表达,其强度为 3.061×10⁵ cps/ml。

3 讨论

迄今为止,由多药耐药基因 *mdr1* 编码的 P-gp(P 糖蛋白)高表达介导的 MDR 是目前研究最为广泛和深入的肿瘤化疗药物耐药课题,而且是在临床实践中

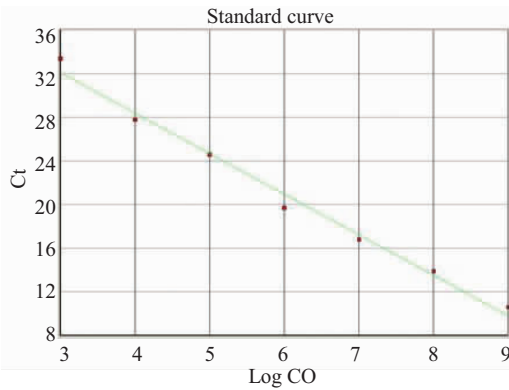


图 2 模板浓度与循环阈值的相关性

Fig.2 Correlation between the template concentration and Ct

得到证实的耐药机制。P-gp 是由 1280 个氨基酸组成的单链跨膜糖蛋白,其肽链占 140 000 相对分子质量,受糖基化程度的不同而略有改变,通常为 170 000,故又称 P170。编码 P-gp 的基因为 *mdr* 基因,人类 *mdr* 基因组有 *mdr1* 和 *mdr2*。转基因动物实验证明,只有 *mdr1* 与肿瘤细胞的 MDR 有关,而 *mdr2* 与之无关。*mdr1* 基因位于 7q21.1,基因组长度约 330kb,共 28 个外显子,其相应的 cDNA 序列在第 1 至 3840 碱基对之间为可读区,起始密码子为 AUG。*mdr1* 基因扩增、mRNA 过度表达使得肿瘤细胞产生 MDR。*mdr1* 基因属于人类基因组中的看家基因,在正常骨髓细胞中有一定的表达。本实验检测非肿瘤患者仅出现 1 例阳性,而且其表达强度明显小于阳性表达的肿瘤患者。

实时 FQ-PCR 是通过实时检测扩增过程中荧光物质的强度变化,对待测 DNA 进行定量分析的一种方法。与常规定量 PCR 方法相比^[4],FQ-PCR 的优点有:①同时具有 DNA 扩增的高效性、DNA 探针技术的高特异性和光谱技术的高敏感性,克服了传统的 PCR 只能定性或半定量、可能存在非特异性扩增等弊端;②PCR 反应只须在加样时打开一次盖子,之后全程闭管操作,各管内无交叉污染;③PCR 反应的实时监控,无需进行扩增后处理,提高了工作效率,减少了误差^[5];④由于传统的 PCR 通过凝胶电泳 EB 染色或者同位素标记只能定量检测 PCR 的终产物量,而不能定量起始 DNA 模板的拷贝数,而且终点检测在靶模板浓度较高时结果并不真实;实时荧光定量 PCR 技术有效地解决了传统定量只能终点检测的局限,实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度,并记录在电脑软件之中,通过对每个样品 Ct 值的计算,根据标准曲线获得定量结果;⑤绝对定量,由于 Ct 值与起始模板的对数存在线性关系,可利用标准曲线对未知样品进行绝对定量测定。为保证实验结果的可靠性,操作必须准确规范^[6]。

同常规 Taq Man 探针相比,Taq Man-MGB 探针还具有如下优点:①荧光本底低。Taq Man-MGB 探针

3' 端标记了自身不发光的淬灭荧光分子,以取代常规可发光的 Tamra 荧光标记。这一新技术使荧光本底降低;②分辨率更高,淬灭荧光分子与报告基团在空间位置上更接近,使实验的结果更精确,分辨率更高;③杂交特异性增强;由于探针 3' 端另结合了小沟结合物(minor groove binder, MGB),使得探针的 T_m 值有近 10 °C 的提高,大大增加了探针的杂交稳定性,提高了配对与非配对模板间的 T_m 值差异,从而使探针的杂交稳定性和特异性显著增强;④探针长度缩短,常规 Taq Man 探针长度达 30~40 个碱基,而用 Taq Man-MGB 探针,其长度一般在 13~18 个碱基范围之内,一些无法用常规 Taq Man 探针设计的目的基因片段也可以很容易地设计出 Taq Man-MGB 探针,从而提高了方法的可行性^[7]。

实时 FQ-PCR 通过荧光信号的检测可以直接对产物进行定量,定量检测敏感度可在(0~10) cps/ml 范围。本实验的实时 FQ-PCR 定量范围也有一定的限度,在本实验中检测区间为 10^3 ~ 10^9 cps/ml 水平,在此范围时决定系数 r^2 为 0.988243;检测最低限度为每个反应 15 个 DNA 拷贝量,测定结果准确可靠。

本研究根据多药耐药 *mdr1* 基因的 cDNA 序列设计引物和新型 MGB 探针,以含有 *mdr1* cDNA 的质粒为模板,建立了 FQ-PCR 检测人类 *mdr1* 基因的新方法,为 *mdr1* 基因的深入研究提供了新的先进可靠的手段^[8]。

参考文献:

- [1] Chauncey TR. Drug resistance mechanisms in acute leukemia [J]. *Curr Opin Oncol*, 2001, 13(1): 21-6.
- [2] 王珊,金先庆,杨纯正,等.探讨 MDR1 基因转染 K562 细胞的最适条件[J].*中华小儿外科杂志*, 2002, 23(6): 564-5.
- [3] 赵素然,祁忠占,白艳玲.质粒 DNA 快速提取法在基础课实验中的应用[J].*实验技术与管理*, 2005, 11(9): 24-6.
- [4] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔著 DW.分子克隆实验指南[M].第 3 版.北京:科学出版社,2002: 663-6.
- [5] Olesen LH, Norgaard JM, Pallisgaard N, et al. Validation and clinical implication of a quantitative real-time PCR determination of MDR1 gene expression: comparison with semi-quantitative PCR in 101 patients with acute myeloid leukemia[J].*Eur J Haematol*, 2003, 70: 296-303.
- [6] 陈文学,陈岳青,黄秀珍,等.荧光定量 PCR 技术在肿瘤研究中的应用[J].*医学分子生物学杂志*, 2004, 1(5): 323-6.
Chen WX, Chen YQ, Huang XZ, et al. Application of fluorogenic quantitative PCR in tumor research[J].*J Med Mol Biol*, 2004, 1(5): 323-6.
- [7] Kutuyavina IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-minor groove binder DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures [J].*Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 655-9.
- [8] 房定珠,廖清奎,李丰益,等.多药耐药基因在 K562 细胞诱导分化过程中的表达[J].*实用儿科临床杂志*, 2004, 19(1): 44-6.
Fang DZ, Liao QK, Li FY, et al. The expression of multidrug resistance gene during K562 cell differentiation [J].*J Appl Clin Pediatr*, 2004, 19(1): 44-6.