

实时荧光定量PCR检测外周血TREC的方法研究

造血干细胞移植后,免疫功能的重建机制和胸腺功能的恢复机理尚不清楚。近期研究表明,通过检测胸腺在近期输出的初始T细胞的数量,即能够真正明确机体T细胞的增殖能力和胸腺再生输出功能。因此,通过测量初始T细胞的生成数量来监视胸腺功能在免疫重建研究中的作用就变得非常重要[1][2][3]。

在TCR α 键基因重排时,需首先将位于其中间的TCR δ 基因删除,由TCR δ 基因两侧的 δ Rec和 J α 两个删除片段重组形成一环行DNA而被删除,该删除的TCR δ 基因作为染色体外的环行删除产物(extrachromosomal circular excision product)仍存在于细胞中,称为T细胞受体删除DNA环(T-cell receptor excision circles, TREC),或称信号结合T细胞受体删除环(sj TRECs),TREC很稳定,并不随细胞分裂而复制,而是随着细胞分裂逐渐被稀释。即说明TREC的含量代表了TCR基因重排时初始T细胞的含量。因此,TREC可作为胸腺再生输出功能的标志,即T(初始T细胞)的标志[4]。本研究拟利用先进的FQ-PCR技术建立定量检测TREC的方法,从确定初始T细胞含量而了解胸腺新近的再生输出功能。

1 材料与方法

1.1 检测对象

10份正常人标本取自南方医院输血科健康成年献血者,中位年龄33岁(18 ~46岁)。

1.2 构建TREC的标准品

由暨南大学血液病研究所李杨秋老师馈赠。TREC的标准品同时包括TREC及看家基因RAG2序列。标准品中100 ng DNA(μ l)中含TREC分别为 1×10^7 、 1×10^6 (2 μ l)、 1×10^5 (2 μ l)、 1×10^4 (2 μ l)、 1×10^3 (2 μ l)、 1×10^2 (2 μ l)、20 cps、10 cps、保存在-20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 合成引物及探针

1.3.1 TREC引物 序列(5'-3')T₁: CAG AGG GGT GTC TCT GTC AAC AAA GTT G; T₂: GCC AGC TGC AGG GTT TAG GCA

1.3.2 TREC探针 序列(5'-3')T(MGB): FAM-CCA CAT CCC TTT CAA CAA TG-MGB, T₁、T₂、T₃、T₄及T(P)、T(MGB)在TREC序列中的位置如图1。

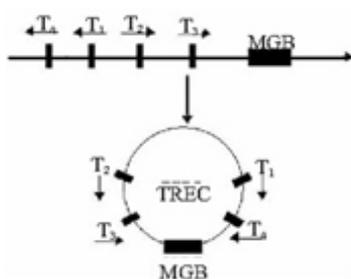


图1 T₁、T₂、T₃、T₄及T(P)、T(MGB)在TREC序列中的位置

1.3.3 RAG引物 序列(5'-3)R₁: TGA AGA TGA TAC TAA TGA AGA GCA GACA; R₂: CAG AGT CTT CAA AGG GAG TGG AA。

1.3.4 RAG探针 序列(5'-3)R(P): 6-FAM- CCC CTG GAT CTT CTG TTG ATG TTTGAC TGT TTT G-TAMRA, T₁、T₂、T(MGB)、R₁、R₂、R(P)均由加拿大Alpha公司合成, HPLC纯化。引物依据PCR- Express

2.0 设计。

1.4 提取DNA

采集患者外周血6 ml, 肝素抗凝处理, 应用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 分别采用经典的蛋白酶K及酚/氯仿方法和UNIQ-10柱式基因组DNA抽提试剂盒方法抽提DNA, -80 °C冻存备用。

1.5 PCR反应

3 mmol/L MgCl₂, 5 μl 10×缓冲液, 0.2 mmol/L dNTP, 0.6 mmol/L引物, 0.15 mmol/L探针, 100 ng DNA, 2 U Taq酶, 加水将总体积补至50 μl。荧光素设定: 报告基团FAM, 淬灭基团MGB。

反应条件设定: 95 °C 10 min后95 °C 5 s, 53 °C 30 s, 40循环结束反应。将反应管置于ABI7000荧光PCR仪中, 参照仪器操作说明设定阳性标准、待检、阴性样品参数进行PCR反应。

1.6 标准曲线绘制

每次实验使用的阳性标准品为已提取并定量的含有TREC和RAG2的质粒, 实验结束后调节起始循环数和阈值, 使标准曲线相关系数大于0.98

1.7 统计学方法

在SPSS 10.0统计软件上进行配对t检验。

2 结果

2.1 UNIQ-10柱式基因组DNA抽提试剂盒与酚氯仿抽提DNA的比较

同时应用试剂盒法与酚氯仿法抽提10名正常人外周血中MNC的DNA, 并对其相关检测结果进行SPSS 10.0统计分析: 柱式基因组DNA抽提法得到的DNA的D(λ)值与FQ-PCR的CT值的平均值分别是1.863±0.006、33.36±0.013; 酚氯仿抽提法得到的DNA的D(λ)值与CT值的平均值分别是1.761±0.012, 35.49±0.016; 分别对两指标进行配对t检验, P值均<0.05。显示两种方法有统计学差异。用柱式基因组DNA抽提法得到的DNA比酚氯仿抽提法得到的DNA含量高, 纯度好; 相同的反应条件下, FQ-PCR扩增的效率强。

2.2 T₁、T₂引物与T₃、T₄引物扩增效率的比较

如图2所示, 反应体系中除引物不同外, 其余均相同, 探针为TaqMan-MGB。a₁、a₂反应模板为TREC标准品1×10⁴/100 μgDNA(2 μl), b₁、b₂反应模板为标准品1×10³/100 μgDNA(2 μl); 其中, a₁、b₁使用T₃、T₄引物, a₂、b₂使用T₁、T₂引物; 相同的模板CT值相同, 反应条件设定: 95 °C 10 min后95 °C 5 s, 53 °C 30 s 40循环结束反应。a₂与a₁、b₂与b₁相比, T₁、T₂引物的扩增效率不如T₃、T₄引物。

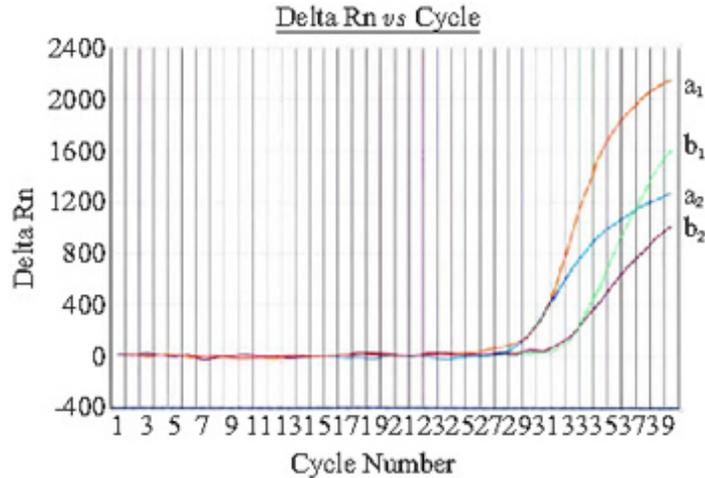


图2 T_1 、 T_2 引物与 T_3 、 T_4 引物扩增标准品结果图

Fig.2 Results of amplification of the standard sample with primer pair of T_1 and T_2 and with T_3 and T_4

2.3 R_1 、 R_2 引物与 R_3 、 R_4 引物扩增效率的比较

如图3所示，反应体系中除引物不同外，其余均相同，探针为TaqMan-MGB。 a_1 、 a_2 反应模板为TREC标准品 $1 \times 10^5/100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$)， b_1 、 b_2 反应模板为标准品 $1 \times 10^4/100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$)， c_1 、 c_2 反应模板为TREC标准品 $1 \times 10^3/100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$)；其中， a_1 、 b_1 、 c_1 使用 R_3 、 R_4 引物， a_2 、 b_2 、 c_2 使用 R_1 、 R_2 引物；相同的模板CT值相同，反应条件设定： $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s， $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 40循环结束反应。 a_2 与 a_1 、 b_2 与 b_1 、 c_2 与 c_1 相比， R_1 、 R_2 引物的扩增效率不如 R_3 、 R_4 引物。

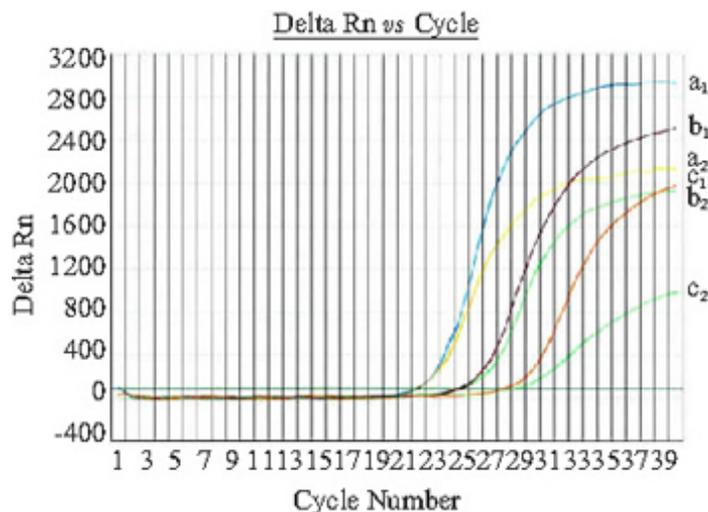


图3 R_1 、 R_2 引物与 R_3 、 R_4 引物扩增标准品结果图

Fig.3 Results of amplification of the standard sample with primer pair of R_1 and R_2 and with R_3 and R_4

2.4 TaqMan-MGB探针与普通TaqMan探针扩增效率的比较

如图4所示，反应体系中除探针不同外，其余均相同，引物为 T_3 、 T_4 。 a_1 、 a_2 反应模板为TREC标准品 $1 \times 10^4/100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$)， b_1 、 b_2 反应模板为TREC标准品 $1 \times 10^3/100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$)；其中 a_1 、 b_1 为TaqMan-MGB探针， a_2 、 b_2 为普通TaqMan探针；反应条件设定： $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s， $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 40循环结束反应。相同的反应模板及反应条件， a_2 比 a_1 、 b_2 比 b_1 的CT值均推迟了1~2个循环出现，且普通TaqMan探针的扩增效

率不如TaqMan-MGB探针。

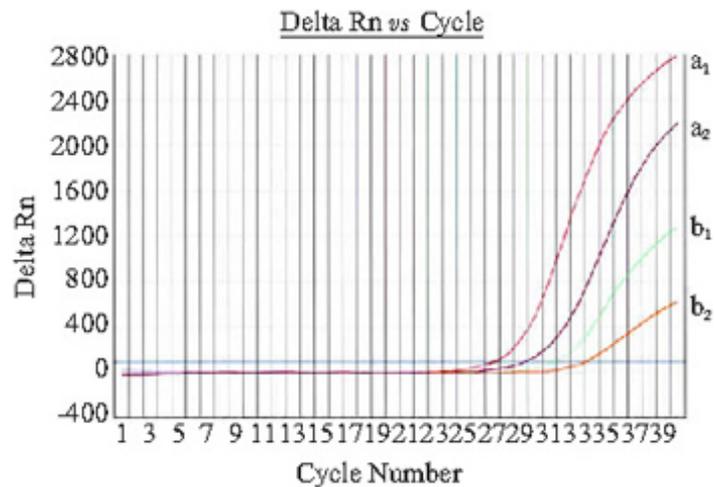


图4 应用TaqMan-MGB探针与普通TaqMan探针扩增标准品结果图

Fig.4 Results of amplification of the standard sample with TaqMan-MGB probe and general TaqMan probe

2.5 普通Taq酶(GIBCO)与金牌Taq酶(热启动)扩增效率的比较

如图5、6，反应体系中除酶不同外，其余均相同，均使用TaqMan-MGB探针与T₃、T₄引物。反应模板为TREC标准品1×10⁷，1×10⁵，1×10⁴，1×10³/100 μg DNA(2μl)。普通Taq酶(GIBCO)扩增的反应条件为变性94℃ 2分钟后95℃ 5 s，53℃ 30 s，40循环结束反应。金牌Taq酶(热启动)扩增的反应条件为：95℃ 10分钟后95℃ 5 s，53℃ 30 s，40循环结束反应。相同的模板CT值相同，但热启动酶的扩增效率明显高于普通Taq酶。

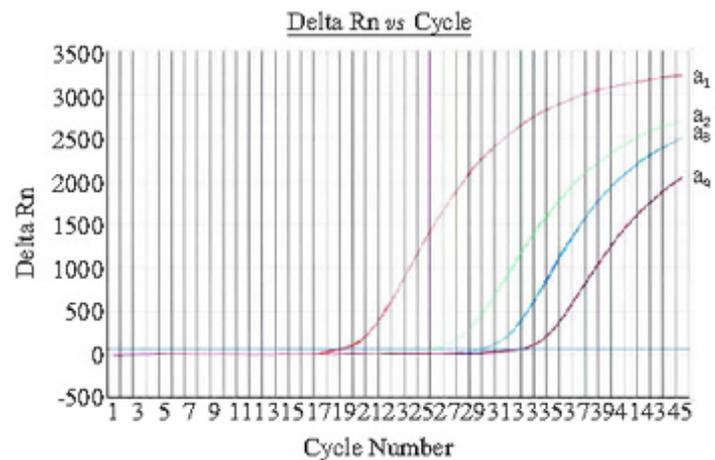


图5 金牌Taq酶(热启动)扩增标准品结果图

Fig.5 Results of amplification of the standard sample with GeneAmp Gold Taq enzyme warm boot

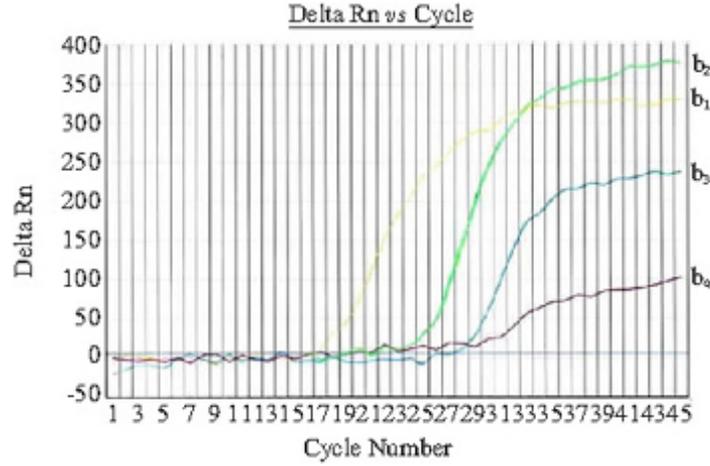


图6 普通Taq酶(GIBCO)扩增标准品结果图

Fig.6 Results of amplification of the standard sample with general Taq enzyme (GIBCO)

2.6 10×缓冲液的选择

首先将《PCR反应原理》(林万明著, 1993年第1版)提供的10×缓冲液配方配制的缓冲液2与缓冲液1(华银公司自配)进行比较。引物均为T₃、T₄、探针为TaqMan-MGB, 反应模板为1×10⁶, 1×10⁵, 1×10⁴/100 μgDNA(2μl) TREC标准品, 反应条件设定: 95 °C 10 min后95 °C 5 s, 53 °C 30 s, 40循环结束反应。

结果如图7: 图中a₁、a₂、a₃为缓冲液1扩增曲线, b₁、b₂、b₃为自配10×缓冲液扩增曲线。结果显示虽然相同的模板CT值相同, 但缓冲液1的扩增效率明显优于缓冲液2(常规标准10×缓冲液)。

然后以缓冲液1 为标准参照缓冲系统, 进行以下优化: 以TREC标准品1×10⁵/100 μg DNA(2 μl)为反应模板, 使用不同Mg²⁺浓度以及不同pH值的Tris-HCl进行反应。结果显示: Mg²⁺的最适浓度为30 mmol/L, Tris-HCl的最适pH值为8.9[缓冲液1扩增标准品1×10⁵/100 μgDNA(2μl)的CT值为24](表1)。以下所有反应使用的缓冲液2均按优化后的缓冲系统配制。

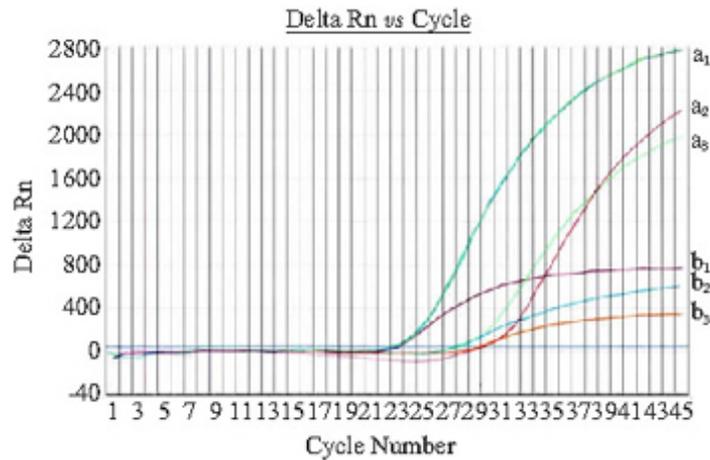


图7 应用10×缓冲液与缓冲液1扩增标准品结果图

Fig.7 Results of amplification of the standard sample with 10×Buffer or Buffer1

表 1 FQ-PCR 检测 TREC 的缓冲系统 2 配制的优化

Tab.1 TREC Buffer2 optimized for FQ-PCR detection

| CT | Mg ²⁺ 15 mmol/L | Mg ²⁺ 20 mmol/L | Mg ²⁺ 25 mmol/L | Mg ²⁺ 30 mmol/L | Mg ²⁺ 35 mmol/L | Mg ²⁺ 40 mmol/L |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| pH=8.3 | 25.9 | 25.6 | 25.6 | 25 | 25.1 | 25.6 |
| pH=8.6 | 25.4 | 25.3 | 25 | 24.6 | 24.5 | 25.1 |
| pH=8.9 | 25 | 24.6 | 24.5 | 24.1 | 24.3 | 24.7 |
| pH=9.2 | 25.2 | 25.3 | 25 | 24.3 | 24.4 | 25 |

2.7 标准曲线

如图8所示，反应模板为TREC标准品 1×10^5 ， 1×10^4 ， 1×10^3 ， 1×10^2 ， $1 \times 10/100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$)，反应系统使用MGB探针、 T_3 、 T_4 引物、优化的缓冲液2 和金牌Taq酶(热启动)；反应条件为：95 °C 10 min后95 °C 5 s，53 °C 30 s，40循环结束反应。结果显示标准曲线相关系数为0.998574，截距为39.589779，斜率为3.058113。敏感度至少为 $1 \times 10/100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$)。

2.8 TREC检测计算方法及正常人TREC含量检测结果

根据所检测样本中RAG2的拷贝数(每个细胞含2个RAG2拷贝)确定所检测样本中所含的细胞数(即RAG2的拷贝数除以2)。然后，将同一样本中所检测的TREC的拷贝数除以样本中所含的细胞数，则为平均每一个细胞中所含的TREC的拷贝数。一般以1000个细胞所含的TREC的拷贝数表示结果。计算公式为： $\text{TREC copies}/10^3 \text{ MNC} = \text{TREC} \div [\text{RAG2} \div 2] \times 10^3$ 。同一样本重复检测两次，根据两次检测到的TREC及RAG2的拷贝数求平均值计算TREC结果。结果显示：10例正常人外周血中TREC的平均含量为 $10.2040 \pm 0.9811 \text{ copies}/10^3 \text{ MNC}$ 。

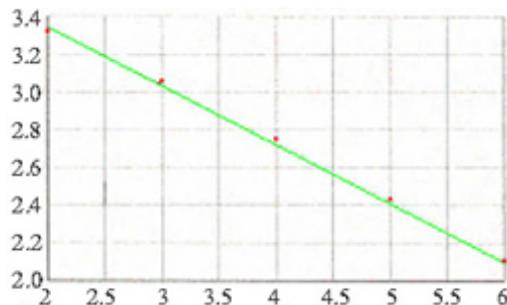


图 8 TREC标准曲线

Intercept: 39.589779; Slope: 3.058113; R_2 : 0.998574

3 讨论

3.1 技术路线的选择

实时荧光定量PCR技术，是指在PCR反应体系中加入荧光标记基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR扩增进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

TagMan的技术是目前应用最成熟，最广泛，高度特异的定量PCR技术。因此，我们的实验即采用的是TagMan的技术路线。

3.2 MGB探针的选择

MGB探针的淬灭基团采用非荧光淬灭基团(Non-Fluorescent Quencher)，本身不产生荧光，可以大大降低本底信号的强度。同时探针上还连接有MGB (Minor Groove Binder) 修饰基团，可以将探针的 T_m 值提高10

℃左右。因此为了获得同样的 T_m 值，MGB探针可以比普通TaqMan探针设计得更短，降低了合成成本。探针越短，整体异源双链的稳定性越大。MGB探针最惊人的特征是对错配碱基的识别，12mer MGB探针配对与错配的 T_m 值间的差异(ΔT_m)达20℃，而足够稳定的无MGB的探针 ΔT_m 值仅是4~6℃。

我们的实验在原有的一对引物 T_1 、 T_2 及探针T(P)的基础上，重新设计合成了一对新的引物 T_3 、 T_4 及探针T(MGB)，经过试验论证，选择应用引物 T_3 、 T_4 及探针T(MGB)结合来定量检测TREC的含量，并取得了预期的效果。

3.3 热启动酶的选择

为保证定量的准确性，要预防非特异性PCR扩增和污染。常用的措施有使用UNG酶(Uracil-N-Glycosylase)和热启动酶。我们的实验即选择的是热启动Taq酶。

普通的Taq酶即使在室温下也有一定的活性，如果不采取措施，在加入PCR试剂的过程中、正式PCR开始前就会完成少量PCR扩增，增加了背景，影响定量精度。而金牌Taq酶经过特殊修饰，常温下其活性部位被封闭，没有活性；只有经过95℃ 10 min的热启动以后，封闭被解除，才能开始DNA链延伸，这样就最大限度地减少了杂讯的生成。

3.4 缓冲液的选择

3.4.1 Tris-HCl的PH值及 Mg^{2+} 的浓度 在实验中，我们对每种模板均进行了 Mg^{2+} 浓度的优化。反应中的PCR缓冲液中不加 Mg^{2+} 。 Mg^{2+} 是从10 mmol/L $MgCl_2$ 储存液中逐一加入反应管中的。在确定了 Mg^{2+} 大概浓度后，再在该浓度上下，以0.5 mmol/L递增和递减几个浓度来精确确定 Mg^{2+} 的最适浓度。

根据反复摸索，我们将Tris-HCl浓度加大到50 mmol/L，pH值提高到8.9，同时确定 Mg^{2+} 最适浓度为30 mmol/L，从而保证了曲线的扩增效率。

3.4.2 PCR促进剂 我们在实验中加入了10% 二甲基亚砷(DMSO)，因其有变性DNA的作用；同时在缓冲液中加入50% 甘油，甘油有助于PCR反应的复性过程，尤其对G+C含量高和二级结构多的靶序列以及扩增长的片断(>1500 bp)更适用。

3.5 细胞计量的参比对照RAG2的选择

我们在实验中是通过适当的参比来完成校正的。参比对照选用的是RAG2看家基因。由于它在细胞中的表达量是恒定的：每一个细胞中含有2个RAG2。同时，同一样本的TREC与RAG2扩增均在相同条件下同时扩增，受环境因素影响较小，其定量结果代表了样本中所含细胞的数量。即通过定量同一样本中RAG2的起始DNA拷贝数来计算所含细胞的数量，从而计算出单个细胞中所含的TREC的拷贝数。因为CT值与起始DNA拷贝数的对数是反比关系，可以证明，这种计算方法在数学上是等价的。

1998年Douek[1]用QC-PCR，1999年Zhang用Real-Time FQ-PCR[5]，2000年Lena[6]用(ELISA-PCR)对TREC分别建立了检测方法。相比较而言，QC-PCR有赖于放射活性，如果要一次检测很多标本则比较烦琐。而ELISA-PCR价格适中，实验方法是定量和可重复的，即使是含较少T细胞的陈旧标本，用0.5 μg DNA就可以检测到TREC，而用QC-PCR法则至少需要1~3 μg的DNA。Real-Time FQ-PCR具有高通量，高灵敏度和高开放性，但过于昂贵，许多实验室不具备条件[7]，然而其无须PCR后的实验操作，又不失为一种快速、准确，又可防止PCR产物交叉污染的好方法。

本研究拟利用先进的FQ-PCR技术建立定量检测TREC的方法，从确定初始T细胞含量而了解胸腺新近的再生输出功能。我们拟应用的方法是利用TCR重排时产生的DNA产物与初始T细胞密切相关来进行检测胸腺再生输出功能，避免了应用CD45的同功异构体区分新近生成的初始T细胞(CD45RA⁺)和记忆T细胞(CD45RO⁺)来研究胸腺对移植后免疫重建过程中的作用的诸多不确定因素。同时将目前TREC计算方法，由DNA含量法改为通过看家基因RAG2作参比对照直接计算细胞数量中TREC的拷贝数，从而能够更直接精确地定量TREC的含量。实时荧光定量PCR技术高精度地定量检测TREC，将PCR技术的扩增和荧光标记的核酸探针杂交技术有机的统一在一个PCR反应体系中，实现了扩增、杂交和荧光自动检测的一体化。

参考文献：

[1] Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and

during the treatment of HIV infection [J]. Nature, 1998, 396(6712): 690.

[2]Bertho JM, Demarquay C, Moulian N, et al. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life [J]. Cell Immunol, 1997, 179(1): 30.

[3]McFarland RD, Douek DC, Koup RA, et al. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype [J]. PNAS, 2000, 97(8): 4215.

[4]AL-Harhi L, Marchetti G, Steffens GM. Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immuno- sorbent assay (PCR-ELISA)[J]. J Immunol Med, 2000, 237: 187.

[5]Zhang LQ. Measuring Percent Thymic Emigrants in Blood of Normal and HIV-infected Individuals before and after Effective Therapy, J Exp Med, 1999 Sep 6; 190(5): 725.

[6]Lena Al-Harhi. Detection of T cell receptor circles(TRECs) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). J Immunological Mets, 2000; 237: 187.

[7]Christian A. Real Time Quantitative PCR[J]. Genome Research, 1996, 986.

[回结果列表](#)