

实时荧光定量 PCR 检测外周血 TREC 的方法研究

阴继霞,武大林,许文娟,孙 竞(南方医科大学南方医院医学中心实验科,广东 广州 510515)

摘要:目的 建立及优化检测移植后患者外周血 TREC 拷贝数的实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)的方法及实验影响条件,为临床研究造血干细胞移植的免疫功能重建机制提供方法学基础。方法 在 ABI7000 PCR 仪上实时扩增检测构建的 TREC 质粒标准品,摸索最佳扩增条件及建立标准曲线,然后用优化的 FQ-PCR 方法检测临床样本。结果 T_3 、 T_4 引物和 R_3 、 R_4 引物的扩增效率分别优于 T_1 、 T_2 引物和 R_1 、 R_2 引物。TaqMan-MGB 探针比普通的 TaqMan 探针扩增效率高。金牌热启动 Taq 酶,比较普通 Taq 酶而言,提高了 PCR 的特异性和敏感性。FQ-PCR 的反应条件设定:95 °C 10 min 后 95 °C 5 s,53 °C 30 s,40 循环结束。结论 通过摸索与优化实验条件,建立了实时荧光定量 PCR 检测外周血单个核细胞中 TREC 的方法。

关键词:实时荧光定量 PCR;T 细胞受体删除 DNA 环(TREC);造血干细胞移植

中图分类号:R446.11;R551 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)07-1009-05

Real-time fluorescent quantitative PCR for detection of peripheral blood T-cell receptor excision circles

YIN Ji-xia, WU Da-lin, XU Wen-juan, SUN Jing

Medical Laboratory Center, Nangfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To develop and optimize real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) with the housekeeping gene RAG2 as cell number control to quantify T-cell receptor excision circle (TREC) in the peripheral blood. **Methods** The real-time PCR system for amplifying TREC and RAG2 genes was established on the basis of ABI 7000 apparatus using Golden Taq system, designed primers, TaqMan-MGB probes and optimized buffer. PCR conditions were optimized with standard samples of TREC plasmid. **Results** The amplification with the primer pair T_3 and T_4 was more efficient than that with T_1 and T_2 . More specific and efficient amplification in FQ-PCR was achieved using TaqMan-MGB probes as compared with general Taq-Man probes. Golden Taq was more effective than general Taq in improving the specificity and decreasing the artifact, and 95 °C for 10 min, 95 °C for 5 s, and 53 °C for 30 s for a total of 40 cycles using ABI7000 was found as the optimized thermal parameter setting. **Conclusion** An optimized real-time PCR protocol for detecting TREC in peripheral blood mononuclear cells is established.

Key words: real-time fluorescent quantitative; T-cell receptor excision circles; hematopoietic stem cell transplantation

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^[1-3]。

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 $J\alpha$ 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 °C 备用。

1.3 合成引物及探针

收稿日期:2005-09-15

作者简介:阴继霞(1975-),女,技师,020-61641114-87295

通讯作者:武大林,020-61641042

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。

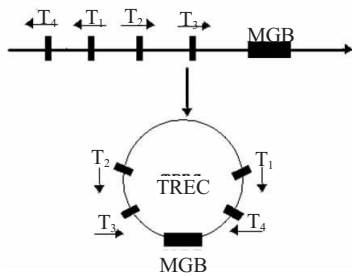


图 1 T₁、T₂、T₃、T₄ 及 T(P)、T(MGB)在 TREC 序列中的位置
Fig.1 Positions of T₁, T₂, T₃, T₄ primers and T(P), T(MGB) in TREC gene sequence

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 H₂O 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。

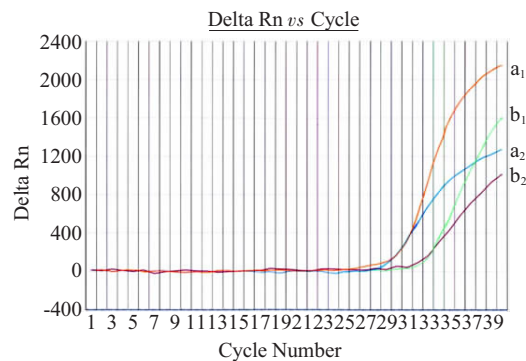


图 2 T₁、T₂ 引物与 T₃、T₄ 引物扩增标准品结果图
Fig.2 Results of amplification of the standard sample with primer pair of T₁ and T₂ and with T₃ and T₄

2.3 R₁、R₂ 引物与 R₃、R₄ 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。a₁、a₂ 反应模板为 TREC 标准品 1×10⁵/100 μgDNA(2 μl),b₁、b₂ 反应模板为标准品 1×10⁴/100 μgDNA (2 μl),c₁、c₂ 反应模板为 TREC 标准品 1×10³/100 μgDNA (2 μl);其中,a₁、b₁、c₁ 使用 R₃、R₄ 引物,a₂、b₂、c₂ 使用 R₁、R₂ 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、c₂ 与 c₁ 相比,R₁、R₂ 引物的扩增效率不如 R₃、R₄ 引物。

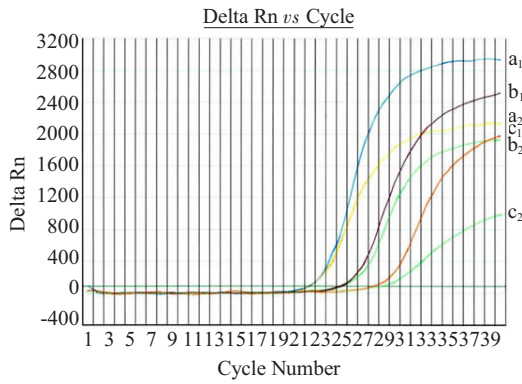


图 3 R₁、R₂ 引物与 R₃、R₄ 引物扩增标准品结果图
Fig.3 Results of amplification of the standard sample with primer pair of R₁ and R₂ and with R₃ and R₄

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 T₃、T₄。a₁、a₂ 反应模板为 TREC 标准品 1×10⁴/100 μgDNA (2 μl),b₁、b₂ 反应模板为 TREC 标准品 1×10³/100 μgDNA (2 μl); 其中 a₁、b₁ 为 TaqMan-MGB 探针,a₂、b₂ 为普通 TaqMan 探针;反应条件设定:95℃ 10 min 后 95℃ 5 s,53℃ 30 s 40 循环结束反应。相同的反应模板及反应条件,a₂ 比 a₁、b₂ 比 b₁ 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。

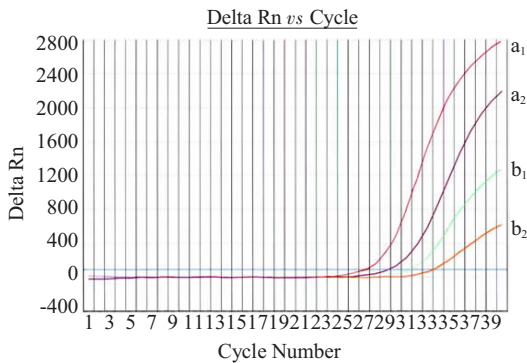


图 4 应用 TaqMan-MGB 探针与普通 TaqMan 探针扩增标准品结果图
Fig.4 Results of amplification of the standard sample with TaqMan-MGB probe and general TaqMan probe

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(2 μl)。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。

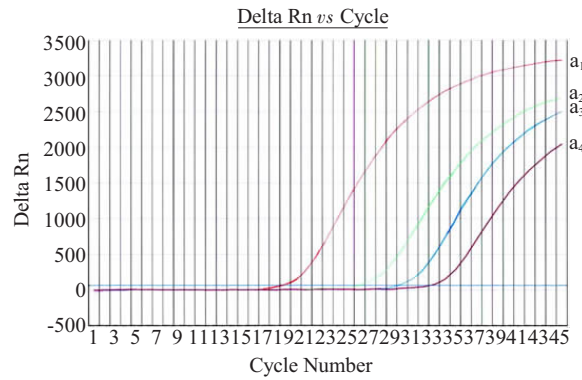


图 5 金牌 Taq 酶 (热启动) 扩增标准品结果图
Fig.5 Results of amplification of the standard sample with GeneAmp Gold Taq enzyme warm boot

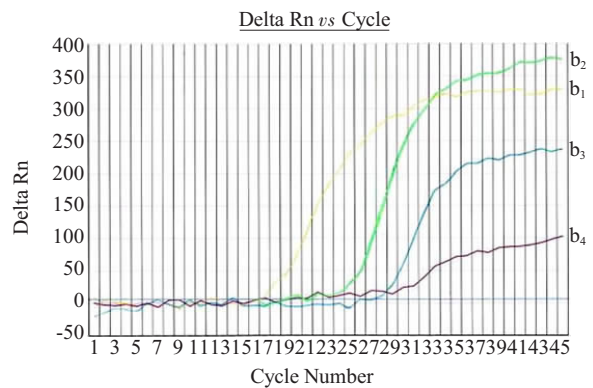


图 6 普通 Taq 酶 (GIBCO) 扩增标准品结果图
Fig.6 Results of amplification of the standard sample with general Taq enzyme (GIBCO)

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(2 μl) TREC 标准品,反应条件设定:95℃ 10 min 后 95℃ 5 s,53℃ 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

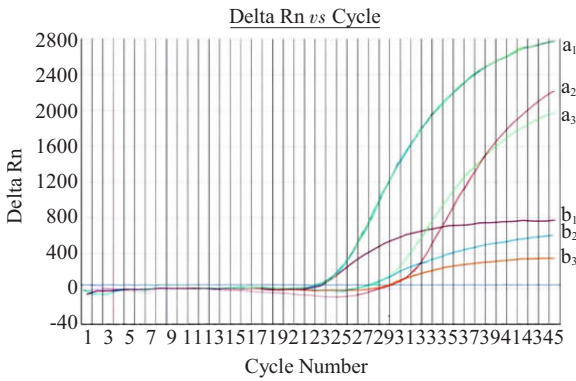


图 7 应用 10x 缓冲液与缓冲液 1 扩增标准品结果图

Fig.7 Results of amplification of the standard sample with 10x Buffer or Buffer 1

标准品 $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$) 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。

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 $1 \times 10^5, 1 \times 10^4, 1 \times 10^3, 1 \times 10^2, 1 \times 10 / 100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$), 反应系统使用 MGB 探针、T₃、T₄ 引物、优化的缓冲液 2 和金牌 Taq 酶(热启动); 反应条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 40 循环结束反应。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。灵敏度至少为 $1 \times 10 / 100 \mu\text{gDNA}$ ($2 \mu\text{l}$)。

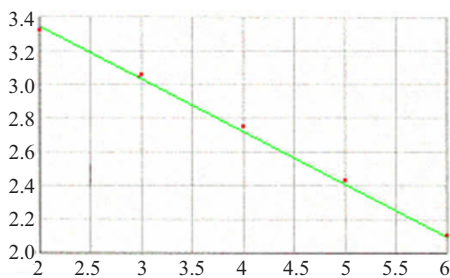


图 8 TREC 标准曲线

Intercept: 39.589779; Slope: 3.058113; R₂: 0.998574

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 $10.2040 \pm 0.9811 \text{ copies}/10^3 \text{ MNC}$ 。

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 $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 而足够稳定的无 MGB 的探针 ΔT_m 值仅是 $4 \sim 6 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

我们的实验在原有的一对引物 T₁、T₂ 及探针 T (P) 的基础上, 重新设计合成了一对新的引物 T₃、T₄ 及探针 T (MGB), 经过试验论证, 选择应用引物 T₃、T₄ 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 °C 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% 二甲基亚砜(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 μ g DNA 就可以检测到 TREC,而用 QC-PCR 法则至少需要 1~3 μ g 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-Harthi 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 immunosorbent 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 A1-Harthi. 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.