文章编号:1000-5404(2010)13-1479-03

技术方法

三重实时荧光 PCR 相对定量法快速诊断 21 和 X 染色体数目异常

刘彦慧[1],吴亚敏[1],黎丽芬[1],李超强[1],周万军[2] (523110 广东 东莞,中山大学附属东莞东华医院医学遗传学实验室[1];510515 广州,南方医科大学基础医学院医学遗传学教研室[2])

[摘要] **目的** 建立三重 *Taq*Man 实时荧光定量 PCR 体系,快速诊断 21、X 染色体数目异常。**方法** 选取 21 号染色体唐氏综合征特异区域(DSCR3)和 X 染色体 1113K DNA 序列范围分别作为 21 号和 X 染色体目的基因,同时选择 12 号染色体上磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)为参比基因,分别设计引物和 *Taq*Man 探针,经 PCR 反应体系优化,采用单管三重及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量数据分析,根据基因拷贝数变化诊断 21 号和 X 染色体数目异常,并进行方法学应用评价。**结果** 通过优化,模板量在 5 ~ 30 ng/μl 时 3 个基因都可以得到有效扩增,目的基因和参照基因扩增效率基本一致,均接近 100%。采用上述体系检测 24 例正常标本和 20 例异常标本(包括血液和羊水标本),正常标本的 21 号 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值均为 2,而唐氏综合征患者均为 3;正常男性的 X 染色体 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值均为 1,而正常女性均为 2。其临床标本检测结果的敏感性、特异性均达 100%。**结论** 建立的三重 *Taq*Man 实时荧光 PCR 相对定量法快速诊断 21 和 X 染色体数目异常方法,稳定性、可靠性和实用性均较好。

[关键词] 荧光定量 PCR;拷贝数;染色体数目异常
[中图法分类号] R394-33 **[文献标志码]** A

染色体异常是导致先天畸形的重要原因,畸形胎儿染色体核型异常的比例位于各类产前诊断指征的第 1 位[1,2]。传统的染色体疾病诊断方法是经细胞培养的核型分析,其稳定性与可靠性较高,可对染色体数目和结构进行分析,但存在实验过程较长、操作繁琐、工作量大、检测通量小,仅能分析中期染色体,且存在培养失败的概率等技术局限。开发具有高特异性和灵敏性、经济省时、操作简单的实验室诊断方法,是当前染色体疾病诊断与研究工作中的切实需要。本研究应用三重 *Taq*Man 实时荧光 PCR 技术,通过对 21 号、X 染色体目的基因拷贝数进行相对定量,快速诊断其染色体数目异常。

1 资料与方法

1.1 对象

20 例正常个体(男性 10 例,女性 10 例);10 例唐氏综合征、5 例 Turner 综合征、5 例克氏综合征患者外周抗凝血标本各 3.0 ml;4 例孕中期正常男胎、1 例孕中期 21 三体男胎、1 例孕中期 21 三体女胎羊水标本;共计 46 例,于 2008 年 6 月至 2009 年 10 月由中山大学附属东莞东华医院中心实验室收集,均经染色体 G 显带核型分析证实。另收集 5 例正常成年男性外周血标本作为正常参照标本。标本均用酚氯仿法抽提基因组 DNA(gDNA),并将 5 例正常参照 gDNA 标本等量混合至 0.2 μg/μl, -20 ℃保存备用。

1.2 引物及探针设计合成

参照文献[3],于 21 号染色体的唐氏综合征特异区域选择 DSCR3 基因(Down's syndrome critical region gene3)为目的基因,扩增产物长度为 132 bp;选取 X 染色体 1 113 kb 的 RPL21P21(ribosomal protein L21 pseudogene 21)基因中一段 DNA 序列作为 X 染色体目的基因,扩增长度为 147 bp;同时选择 12 号染色体上的磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase,GAPDH)基因为参照基因,扩增产物长度为 150 bp(相应引物及 *Taq*Man 探针见表 1)。以上引物及探针由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 三重 *Taq*Man 实时定量荧光 PCR 体系优化

根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相对定量的方法学要求[4],在验证了各个 PCR 反应的特异性之后,则对三重 *Taq*Man 实时定量荧光 PCR 体系进行优化,以保证 3 个 PCR 反应效率高且基本一致。此多重体系,针对其中的 Buffer、镁离子、引物、探针、dNTPs 等成份的浓度,均进行了一系列优化[5]。然后,于 20 μl 反应体系中,分别加入 50、100、200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600 ng 的同一正常人 gDNA 模板量梯度,采用标准品模式于荧光 PCR 仪上定量检测,仪器将自动计算斜率及扩增效率;同时,根据检测 Ct 值,以手工方式计算 ΔCt,根据目的基因 ΔCt 值评价扩增效率的一致性。

表 1 目的及参比基因引物、*Taq*Man 探针

扩增片段	正向引物	反向引物	TaqMan 探针	片段长度
DSCR3(Chrom:21)	5′-CATCCATTAGCA AGTCAGAGGTTTC-3′	5′-GAAAACATTGACT GTGGCTCTTG-3′	FAM-CTCCAGCAAGCTCAAACTGCTGTCAC-TAMRA	132 bp
RPL21P21(Chrom:X)	5′-CAATGCGGGAG CGATG-3′	5′-CCTTCCTGTGT CTGTCGGTG-3′	HEX-CCTGATGGATTTCCTCGATGAGCC-TAMRA	147 bp
GAPDH(Chrom:12)	5′-GCCTAGGGCTGC TCACATATTC-3′	5′-GGCAACAATATC CACTTTACCAGAG-3′	ROX-CCTCCCCTCCTCATGCCTTCTTG-TAMRA	150 bp

[基金项目] 广东省医学科研课题(A2008782);广东省东莞市科研课题(2008105150054)
[通信作者] 周万军,电话:(020)61648510, E-mail: zhouwanjun72@163.com

表2 Chrom21、ChromX数目正常及异常标本相对拷贝数定量检测结果(包括6例羊水标本)

样本核型	46,XY(n=14)		46,XX(n=10)		47,XY,+21(n=7)		47,XX,+21(n=5)		45,XO(n=5)		47,XXY(n=5)	
目的基因	21	X	21	X	21	X	21	X	21	X	21	X
$2^{-\triangle\triangle Ct}$值($\bar{x}\pm s$)	1.01±0.15	0.47±0.08	1.06±0.18	1.04±0.09	1.52±0.10	0.51±0.13	1.49±0.11	1.02±0.13	1.02±0.08	0.53±0.13	1.01±0.12	0.96±0.14
相对拷贝数	2	1	2	2	3	1	3	2	2	1	2	2

1.4 三重*Taq*Man实时定量荧光PCR体系确定及样本检测

此三重*Taq*Man实时荧光PCR反应体系20 μl,含样本模板gDNA 100~600 ng,200 nmol/L引物,100 nmol/L *Taq*Man探针,3 μl 10×Ex *Taq* Buffer, 1.0 U Ex *Taq*(TaKaRa),5.0 mmol/L Mg^{2+}。于Strategene 3005p型PCR仪(美国Agilent公司)按以下热循环条件检测:95 ℃预变性10 min, 然后95 ℃ 20 s, 60 ℃ 1 min,于60 ℃步骤末采集相应荧光信号,循环30次。仪器附带软件自动计算Ct值。每次检测反应,包含待检标本及正常参照标本。

1.5 数据分析

根据$2^{-\Delta\Delta Ct}$法相对定量方式计算待检样本相对拷贝数[4],计算公式为:同一标本目的基因$\triangle Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{参比基因}$;待检标本目的基因$\triangle\triangle Ct = \triangle Ct_{待检标本} - \triangle Ct_{参照标本}$;待检标本目的基因相对拷贝数则为$2^{-\triangle\triangle Ct}$值。如果$2^{-\triangle\triangle Ct}=1$,则说明此待检标本目的基因与正常参照标本的基因拷贝数之比为1,也就是如果正常参照标本的相对拷贝数是2,则待检标本的相对拷贝数也为2。然后根据拷贝数结果进行分子诊断。

2 结果

2.1 三重*Taq*Man实时荧光PCR相对定量体系优化及扩增效率评价

通过优化调整,于1.5×PCR Buffer、5.0 mmol/L Mg^{2+}等成分浓度的反应体系,3个PCR反应的斜率分别为-3.217(Chrom21)、-3.273(ChromX)和-3.218(GAPDH),均接近-3.32,表明具有接近100%的PCR扩增效率。同时,按$\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{参比基因}$进行计算,以加入模板量为横座标、ΔCt为纵座标绘图,计算斜率,斜率越小,说明此3个PCR反应之间扩增效率一致性越高,本研究中,两目的基因的斜率均<0.01,说明此三重体系中各扩增效率基本一致,满足采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$值法相对定量分析要求[4]。

2.2 最佳检测模板浓度范围的确定

根据扩增效率分析曲线,模板浓度为5~30 ng/μl时,扩增曲线平滑,指数期明显,3个基因都可以得到有效扩增,并且不同浓度的扩增曲线平行性好,故选此为检测模板浓度最佳范围。

2.3 临床样本检测

46例正常及临床标本检测后的$2^{-\triangle\triangle Ct}$值及相对拷贝数结果见表2,经统计,检测方法的敏感性、特异性均达100%,通过相对拷贝数的变化,可准确诊断21号及X染色体数目异常。

3 讨论

目前对于绝大多数出生缺陷都缺乏有效的治疗方法,及时准确的产前诊断是唯一有效防止畸形儿出生的技术手段。现已知早孕期流产50%以上是因为染色体异常造成,其中染色体数目异常占到了整个染色体异常的86%,而染色体结构异常只占到了6% ,其他异常如单基因突变和嵌合体等占8%左右[6]。所以,及时、准确、快速诊断染色体数目异常,就意味着能及时有效处理86%的染色体异常胎儿。染色体数目异常的经典诊断方法是细胞遗传学核型分析,此法需经细胞培养,耗时耗力,实用性有限。在当前诊断策略研究进展中,基于孕妇血清指标的筛查方案,只能筛查不能确诊[7]; FISH及CGH虽然有一定技术优势[8],但由于检测成本等原因,尚不能被普遍接受。建立与开发操作简单、方便、省时省力、易于实现自动化的方法,是目前的现实需要。

本研究所建立的三重*Taq*Man实时荧光PCR体系,其相对定量模式不同于绝对定量分析方法[9,10],此模式无需建立标准曲线, 只需同时检测一正常参照标本,于单管同时定量检测目的基因及参比基因,即可通过拷贝数的变化直接诊断21号及X染色体数目异常。不用细胞培养,采集标本当天就可以获得检测结果。本研究应用此方法对46例临床正常和异常标本(包括6例羊水标本)的检测,结果表明其特异性与准确性均达到100%,能准确诊断21号及X染色体数目异常,且操作简单快速,高通量、成本低,易于实现自动化,有实际应用价值与前景。同时,该技术的建立也将为其他染色体数目异常的分子诊断方法学研究提供借鉴。

按照$2^{-\triangle\triangle Ct}$相对定量的方法学要求[4],必须优化多重*Taq*Man实时荧光PCR体系,使目的基因和参比基因具有基本一致的高扩增效率,因此,反应体系的优化是方法学研究的关键。本研究中,先优化引物及探针以避免二聚体的形成、采用短片段扩增以保证高扩增效率,然后再调整体系组份以保证扩增反应稳定高效。体系优化调整后,以不同模板量所测CT值计算标准曲线,评价其扩增效率,标准曲线斜率越接近-3.32,则说明其效率越接近100%;并以不同浓度模板量目的基因与参比基因间的ΔCt值绘图,评价PCR反应间扩增效率的一致性。本研究的评价结果显示目的基因和参比基因的标准曲线斜率均接近于-3.32,比较评价分析的斜率<0.01,说明此3个PCR反应的扩增效率基本一致,且均接近100%,符合相结定量要求。

本方法实验设计中,所选择的21号染色体扩增片

段及GAPDH参比基因,已有相关文献报道此基因于人群中无拷贝数变异多态性[11],具有可靠的代表性。所选择的X染色体扩增片段,在实验过程中,暂未发现人群中的拷贝数变异多态性,但其最终验证尚需大规模人群筛查,此工作有待完善。另外,本法是根据目的基因DNA片段相对拷贝数变化诊断染色体数目异常,不能区分易位型、嵌合体和游离型。

参考文献:

[1] 姚宏, 李力. 染色体病的临床分析及产前诊断[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(12): 1119-1120.
[2] 彭大振, 卢根生, 朱开常, 等. 138例两性畸形的临床诊治分析[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(19): 1901-1904.
[3] 高斌, 肖白, 邹起练, 等. 多重实时荧光PCR相对定量法快速诊断唐氏综合征[J]. 遗传, 2007, 29(8):934-938.
[4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
[5] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, *et al*. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23(3): 504-511.
[6] Bryndorf T, Lundsteen C, Lamb A, *et al*. Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence in situ hybridization: a one-year clinical experience with high-risk and urgent fetal and postnatal samples[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2000, 79(1): 8-14.
[7] O'Leary P, Breheny N, Dickinson J E, *et al*. First-trimester combined screening for Down syndrome and other fetal anomalies[J]. Obstet Gynecol, 2006, 107(4): 869-876.
[8] Miura S, Miura K, Masuzaki H, *et al*. Microarray comparative genomic hybridization(CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid[J]. J Hum Genet, 2006, 51(5): 412-417.
[9] 郑明明, 胡娅莉, 许争峰, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应技术在产前诊断唐氏综合征中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(10): 678-681.
[10] Yulug E, Yenilmez E, Unsal M A, *et al*. Apoptotic and morphological features of the umbilical artery endothelium in mild and severe preeclampsia[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2006, 85(9): 1038-1045.
[11] Helmy S M, Ismail S, Bassiouni R, *et al*. Sensitivity of DCSR3/GAPDH ratio using quantitative real-time PCR in the rapid prenatal diagnosis for down syndrome[J]. Fetal Diagn Ther, 2009, 25(2): 220-223.

(**收稿**:2009-12-05;**修回**:2010-02-05)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2010)13-1481-03

技术方法

尿蛋白质组双向电泳的样品制备

张 渊[1],代 义[1],邱 峰[2],李艳艳[1],邱宗荫[1] (400016 重庆,重庆医科大学:药学院药物分析教研室[1],附属第一医院药剂科[2])

[摘要] **目的** 建立与优化非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者尿液全蛋白双向凝胶电泳技术(2-DE)。**方法** 采用4种不同的方法制备尿液蛋白质样品,以非线性预制胶条进行第一向等电聚焦,12%的SDS-PAGE进行第二向电泳,银染显色。**结果** 以乙腈沉淀蛋白后经过超滤制备的蛋白质样品,在300μg上样量时,可获得图像清晰、分辨率高、重复性好的双向电泳图谱。**结论** 建立了较稳定的非小细胞肺癌患者尿蛋白质组双向凝胶电泳技术。

[关键词] 非小细胞肺癌;尿液;双向电泳
[中图法分类号] R446.12 **[文献标志码]** A

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的80%,其疗效令人失望,虽然手术是其首选的治疗方法,但大多数患者确诊时已属晚期而失去了手术机会或手术效果不佳。目前肺癌的诊断一般通过纤维支气管镜、影像学及组织细胞学检查,早期诊断率不够高。

尿液中蛋白质种类和数量的变化携带有与疾病发生、发展及预后有关的各种信息;又因为尿能够无创地大量获得,并且相对于其它生物液体而言比较稳定,因此尿蛋白质组学正在成为临床蛋白质组学研究中的一项重要内容[1]。双向凝胶电泳技术(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE)是目前蛋白质组学研究中的主要分离技术之一。要获得具有高分辨率和重复性的双向凝胶电泳图谱,样品的制备是关键[2]。尿液成分十分复杂,含有的多种盐分和代谢产物都可能影响蛋白质的分离,目前国内外研究者对于尿液蛋白质样品的制备尚无统一方法[3-8]。

[通信作者] 邱宗荫,电话:(023)68485727,E-mail:zongyin141@126.com