技术方法 文章编号:0253-3626(2009)06-0752-04

实时荧光定量 PCR 检测尿液 CK20 方法的建立

郭 斌[1],罗春丽[1],荀春华[1],谢建红[1],吴小候[2],蒲 军[2]

(1. 重庆医科大学医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室;2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立一种简便、快速、灵敏度和特异性较好的定量检测尿液 CK20 方法,用于膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of the bladder,TCCB)早期诊断、预后及复发的评估。方法:培养膀胱癌 T24 细胞,针对 CK20 基因保守序列设计合成两对引物和 Taqman 探针,将 PCR 扩增产物片段克隆,作为定量检测的标准品,优化反应条件,建立快速检测 CK20mRNA 的实时荧光定量 PCR 方法,并进行方法学评价。结果:荧光定量 PCR 检测尿液 CK20 方法能较好的定量检出尿液 CK20mRNA,检测范围为 $10^2 \sim 10^9$ copies/μl,灵敏度为 10^2 copies/μl,特异性好,批内、天间重复性(Coefficient of variation,CV)分别为 0.89%和 2.45%。结论:成功建立了快速检测尿液 CK20 的荧光定量 PCR 方法,为进一步开发出用于 TCCB 早期诊断、预后及复发评估的定量检测试剂盒奠定了基础。

【关键词】膀胱移行细胞癌;CK20;实时荧光定量 PCR

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-25

Development of fluorescent quantitation PCR method for detection of urinary CK20

GUO Bin, et al

(*Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To develop a novel real-time fluorescence PCR method using Taqman probe for convenient, fast, sensitive and specific detection of urinary CK20 and use in early diagnosis and follow-up of transitional cell carcinoma of the bladder (TCCB). *Methods*: CK20 gene from cultured T24 cells was amplified by conventional RT-PCR, the standard quantitative plasmid was constructed by T-Aclone method. Taqman probe and primers was designed according to the sequence of CK20 cloned gene, the real-time PCR method for determination of CK20 mRNA was established and evaluated. *Results*: The developed real-time PCR method showed high sensitivity(10^2copies /μl) and good specificity; the linear range was $10^2 \sim 10^9$ copies /μl, the coefficient variation(CV) was 0.89 % in intra-assay and 2.45% in day to day. *Conclusion*: A novel real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of CK20 was established. It provided a basis for developing new diagnostic kits using the Taqman probe for clinical application.

【Key words】Transitional cell carcinoma of the bladder; CK20; Real-time PCR

膀胱肿瘤是泌尿系统最常见的肿瘤,其中 90%以上是膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of the bladder,TCCB)。一般早期诊断,治疗效果较好,但仍然有 50%的病人复发且部分进展为侵袭性癌。目前 TCCB 的诊断主要应用膀胱镜及病理活检,虽然该法是金标准,但对病人有创伤性,不利于早期诊断及疗效预后的观察。CK20 作为理想的 TCCB 肿瘤标志物,特异性强、灵敏度高[1],但现用的免疫法与 RT-PCR 法均为非定量检测。因此,本研究利用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)TaqMan 探针原理,建立一种绝对定量检测 CK20 的新方法,对该病的早期诊断及预后评估有重要意义。

作者介绍:郭 斌(1982-),男,硕士,研究方向:泌尿系肿瘤诊治。

通讯作者:罗春丽,女,教授,E-mail: luochunli79 @126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 膀胱移行细胞癌 T24 细胞(本室保存,以下简称 T24 细胞),1640 培养基(GIBCO 公司),小牛血清(GIBCO 公司),Trizol(宝生物公司),逆转录试剂盒(宝生物公司),PCR 试剂(宝生物公司),胶回收试剂盒(上海尧舜公司),小量质粒抽提试剂盒(天根公司),pMD18-T vector 连

接试剂盒（宝生物公司），感受态菌 DH5α（本室保存），氨苄青霉素 50 mg/ml（晶美公司），紫外分光光度仪（美国 Gene Quant GE），普通 PCR 仪（美国 Bio-Rad），定量 PCR 仪（美国 ABI7000）。

1.1.2 临床标本处理 收集 35 例 2007 年 9 月到 2008 年 4 月临床确诊 TCCB（病理证实）的患者晨尿 100~150 ml，均在病人炎症期收集，此时，由于炎症，细胞易脱落于尿液，尤其是肿瘤细胞，标本收集后立即 4℃离心 1 500 r/min，10 min，肉眼血尿标本加入 0.5 ml Triton X-100 先溶血再离心，收集脱落细胞 10^3 ~ 10^5 个 /ml，用 5 ml 磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤后再次离心，移去上清液，用 1 ml PBS 悬浮脱落细胞后转入 1.5 ml EP 管，离心后移去上清液，加入细胞裂解液（Trizol）1 ml，混匀，立即置 -80℃冰箱中保存。

1.1.3 目的基因的选择及引物、探针的设计 从 Genbank 基因库序列（NM-019010）中选择 CK20 高保守区段，设计两对引物，外围引物扩增片段为 371 bp，用于质粒标准品构建；内围引物扩增片段为 96 bp，用于荧光定量 PCR（为避免定量检测中 DNA 污染，内围上游引物跨内含子设计）。荧光标记的 TAQMAN 探针，上海基康公司合成（表 1）。

表 1 CK20 引物和探针序列

F/R		引物序列（5'~3'）	产物大小（bp）
外围引物	F	5'-CAGACACACGGTGAACTATGG -3'	371 bp
	R	5'- GATCAGCTTCCACTGTTAGACG -3'	
内围引物	F	5'-TTGAAGAGCTGCGAAGTCAGAT -3'	96 bp
	R	5'-TGAAGTCCTCAGCAGCCAGTT -3'	
Taqman 探针		5'-FAM- TCAACTGCAAAATGCTCGGTGTGTCC-TAMRA -3'	

1.2 *方法*

1.2.1 质粒标准品的构建及鉴定

1.2.1.1 细胞培养和总 RNA 提取 用含 10%小牛血清 1640 培养 T24 细胞（饱和湿度、37℃孵箱温度、5%CO_2 浓度），Trizol 提取总 RNA，30 μl DEPC 水溶解。用紫外分光光度仪和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度并鉴定，-80℃保存备用。

1.2.1.2 RT-PCR 扩增 用 Primescript RT Reagent Kit 反转录（RT）合成 cDNA，产物用外围引物进行 PCR，反应体系：总体积：50 μl，10×PCR buffer：5 μl、dNTPs（2.5 mmol/L）：4 μl、$MgCl_2$ 浓度（25mmol/L）：5 μl、正义和反义引物（10 pmol/μl）各 2 μl、Taq 酶（5 U/μl）：0.5 μl、cDNA：5 μl、灭菌蒸馏水：26.5 μl。反应条件为：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，58.6℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环，72 ℃延伸 5 min。PCR 产物于琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.2.1.3 质粒标准品构建 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，进行胶回收，然后在连接酶的作用下与 PMD18-T 载体进行连接，连接体系为：pMD18—T 载体 1 μl，PCR 产物 2.0 μl，连接液 5.0 μl，ddH_2O 2 μl，总 10 μl。16℃连接过夜，连接产物直接转化入 200 μl 大肠埃希 DH5α 感受态菌，冰上放置 30 min，42 ℃静置水浴 90 s，加入 200 μl LB 培养液，37℃摇床 1 h，取 100 μl 涂布 Amp LB 平板，筛选阳性克隆菌；用小量质粒抽提试剂盒提取质粒，并进行 PCR（条件同上），酶切及测序鉴定。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 方法建立，优化反应条件和体系反应条件选用两步法，即变性和退火，在退火时收集荧光，设定不同退火温度（60℃、55℃、51℃）和退火时间（1 min、1:10 min、1:30 min），进行循环参数的优化；反应体系中使用不同的酶、镁离子（Mg^{2+}）浓度、探针和引物（内围）浓度，观察其对检测结果的影响，选择最佳反应体系，选用总体积 25 μl，模板用 2 μl，对 Taq 酶、Mg^{2+} 浓度、引物和探针浓度进行浓度梯度实验，Taq 酶（5 U/μl）：0.25、0.3、0.35、0.4 μl；Mg^{2+} 浓度（25 mmol/L）：2.5、3、3.5、4 μl；引物浓度（10 pmol/μl）：1、1.5、2、2.2 μl；探针浓度（10 pmol/μl）：1、1.3、1.5、1.7、2、2.2 μl。

1.2.3 标准曲线的制作和方法学评价 提取并纯化重组质粒标准品，用紫外分光光度仪测吸光度 A 值，计算基因拷贝数，梯度稀释为一系列浓度（10^1 ~10^{10} copies/μl），以此为模板进行 FQ-PCR 扩增，制作标准曲线。以相关系数 0.99 以上判断线性范围；以方法能检出最低质粒浓度来确定检出限，用以评价方法的灵敏度；分别在批内和天间重复检测标本，以确定方法的重复性；用本法检测多种泌尿系疾病尿标本 CK20 表达，以评价方法的特异性。

1.2.4 初步临床应用 Real-time PCR 方法检测临床确诊 TCCB 尿标本 CK20。对数据用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。

2 结 果

2.1 RNA 提取和 CK20 目的基因扩增

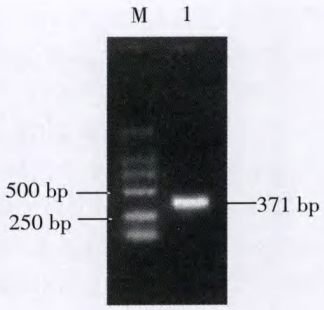
总 RNA OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0 之间，在凝胶电泳图上均可见清晰 28S、18S、5S 3 条带，其中 28S 条带的亮度达到 18S 亮度的两倍以上，符合本实验要求（图 1）。PCR 扩增 CK20 克隆 DNA 片段，产物于琼脂糖凝胶电泳（图 2）。

2.2 克隆重组质粒鉴定

经 *Hind* Ⅲ 和 *BamH* Ⅰ 单酶切，切出预期 3 063 bp 片段；双酶切，可切出预期 2 654 bp 和 413 bp 片段（图 3）；重组质粒测序，经 BLAST 比对，克隆 CK20 DNA 片段与 Genbank 序列完全相同，证明成功构建重组质粒。

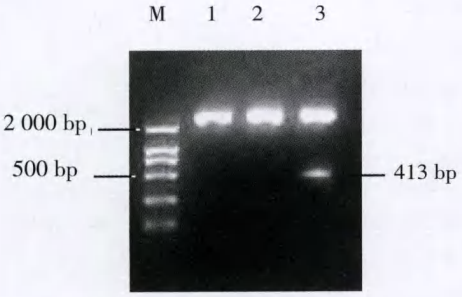


图 1　T24 细胞 RNA 电泳图



M. Marker DL2000；1.T24 CK20 PCR 扩增产物 371 bp

图 2　PCR 扩增 CK20 克隆 DNA 片段电泳图



M.Marker DL2000；1.*Hind* Ⅲ 酶切；2.*BamH* Ⅰ 酶切；3.*Hind* Ⅲ，*BamH* Ⅰ 双酶切切出 413 bp 片段

图 3　重组质粒酶切鉴定电泳图

2.3　荧光定量 PCR 条件优化和标准曲线

根据荧光曲线形态、峰值和电泳条带效果，判断反应条件和体系优劣，每批反应设阴性对照（未加模板）和空白对照（ddH_2O）各 1 个（表 2）。

最佳反应条件：95℃预变性 5 min，95℃变性 30 s，51℃退火 1:10 min，在退火时收集荧光，进行 40 个循环。

在最优的 PCR 反应条件下，用稀释度为 10~10^{10} copies/μl 的标准品做标准曲线，经定量 PCR 仪 SDS 软件分析，以 10^2~10^9 copies/μl 有较好线性，回归方程为 Y=−3.025 X+35.991，复相关系数为 0.993 5，标准曲线（图 4），产物电泳（图 5）。

2.4　*方法学评价*

2.4.1　线性范围　质粒 DNA 稀释度在 10^2~10^9 copies/μl 范围时，有较好线性，复相关系数为 0.993 5。

2.4.2　灵敏度　用已知拷贝质粒做 10 倍梯度稀释，以能出现典型 S 型的最低浓度为检出限，本方法检出限为 10^2 copies/μl。

2.4.3　特异性　收集不同种泌尿系疾病：膀胱癌、膀胱炎、肾癌、阴茎癌、尿道炎症的病人尿液标本各 10 例，经定量检测，唯有膀胱癌病人检出 CK20，证明本法特异性好。

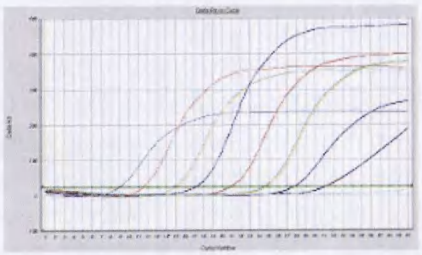
表 2　荧光定量 PCR 最佳反应体系

试剂	体积（μl）
10 × PCRbuffer	2.5 μl
$MgCl_2$（25 mmol/L）	3.5 μl
dNTPs（2.5 mmol/L）	2 μl
Taq（5 U/μl）	0.35 μl
正义引物（10 pmol/μl）	2.2 μl
反义引物（10 pmol/μl）	2.2 μl
Taqman 探针（10 pmol/μl）	2.2 μl
cDNA	2 μl
灭菌蒸馏水	8.05 μl
总体积	25 μl

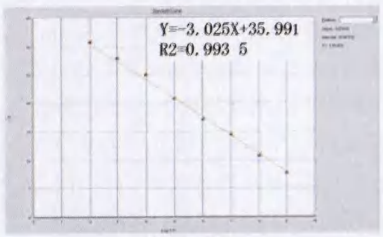
2.4.4　重复性　用荧光定量 PCR 方法对样本进行重复检测，结果其批内和天间重复性（CV）分别为 0.89%和 2.45%（表 3、表 4）。

2.5　*初步临床应用*

检测 35 例膀胱移行细胞癌病人尿脱落细胞标本，用 ROC 曲线确定 CT 值，在诊断实验中以真阳

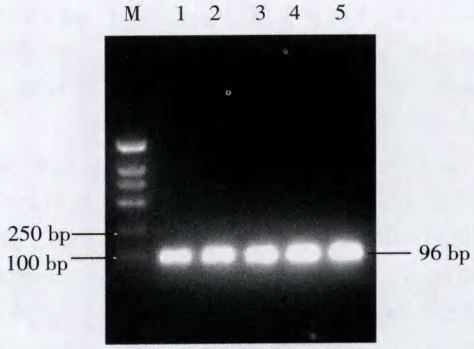


A：扩增曲线



B：标准曲线

图 4　实时荧光定量 PCR 标准曲线



M. Marker DL2000；1~5. CK20 荧光定量 PCR 产物 96 bp

图 5　实时荧光定量 PCR 产物电泳图

表 3 标本批内重复性

标本号	标本类型	CT 值	变异系数(CV)
1	尿样	19.63	
2	尿样	19.26	
3	尿样	19.72	0.89%
4	尿样	19.48	
5	尿样	19.53	
6	阴性对照	0	
7	空白对照	0	

表 4 标本天间重复性

标本号	标本类型	CT 值	变异系数(CV)
1	尿样	19.46	
2	尿样	19.96	
3	尿样	20.03	2.45%
4	尿样	19.18	
5	尿样	18.93	
6	阴性对照	0	
7	空白对照	0	

性率对假阳性率作图,将相应的点连接起来,所得曲线越靠近左上角,诊断效果越好。ROC 曲线结果显示,在本研究中,以 CT 值 30 为阈值,能较好的排除假阳(阴)性,提高诊断的准确率,CT<30 为阳性结果,同一病人标本不同时间分别检测 2 次,以平均值为结果报告方式,结果:29 例(82.8%)为阳性。

3 讨 论

追溯历史,对 TCCB 的早期检测经历了形态学、血清学、和普通 PCR 等发展阶段,传统的 TCCB 诊断方法依赖于膀胱镜及病理活检或尿脱落细胞学,前者对病人有创伤性;而后者灵敏度欠佳。近年来,随着分子生物技术的发展,RT-PCR 广泛应用于对肿瘤标志物 mRNA 的检测,并具有一定的灵敏度和特异性,但此方法是非定量的[2]。实时荧光定量PCR,实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,其原理是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法[3]。与常规 PCR 相比,具有特异性更强、有效解决 PCR 污染、自动化程度高等特点,可有效的对不同分级、分期的病人肿瘤标志物基因进行定量监测。

细胞角蛋白 20(CK20)是 I 型角蛋白的一种,具有严格的上皮细胞分布特征,在膀胱和胃肠黏膜等上皮细胞肿瘤表达,而在正常膀胱上皮细胞及非上皮来源的肿瘤无表达[4,5]。大量研究证实几乎所有 TCCB 都表达 CK20,而正常人几乎无表达[1]。因此,是一种有效的 TCCB 尿标志物。

本研究选取与 TCCB 发生发展密切相关的尿标志物 CK20,与荧光定量 PCR 技术相结合[6,7],通过质粒标准品的构建,定量 PCR 条件的优化,建立了 CK20 的实时荧光定量 PCR 检测方法,取得了比较满意的结果;当标准品的浓度在 10^2~10^9 copies/μl 时,有良好的线性关系,能满足临床检测需要;本法检出限为 10^2 copies/μl,灵敏度达到同类方法的水平;重复性实验发现,本法批内与天间 CV<3.0%,重复性好;本法不受其他基因检测干扰,特异性强。用于临床标本的检测,可较好的定量检出 CK20 的表达,35 例 TCCB 患者中,6 例 CK20 表达阴性,可能原因是:自然脱落的细胞易退变导致 RNA 降解;单个或少数肿瘤细胞存在异质性,不表达 CK20 mRNA。综上所述,本研究所取得的成果充分证明了定量 PCR 用于 TCCB 早期诊断的优越性, 该法有望成为 TCCB 临床诊断和预后评估的新方法。

参 考 文 献

[1] Buchumensky V, Klein A, Zemer R, et al. Cytokeratin 20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma[J]. Urol, 1998, 160 (6pt1): 1971-1974.

[2] Whelan J A, Russell N B, Whelan M A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR[J]. Journal of Immunological Methods, 2003, 278(1-2): 261-269.

[3] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainst ream[J]. Experimental Hematology, 2002, 30(6): 503-512.

[4] Bhatia A, Dey P, Kumar Y, et al. Expression of cytokeratin 20 in urine cytology smears: a potential marker for the detection of urothelial carcinoma[J]. Cytopathology, 2007, 18(2): 84-86.

[5] Leite K R, Mitteldorf C A, Srougi M, et al. Cytokeratin 20, thyroid transcription factor 1, and prostate-specific antigen expression in unusual subtypes of prostate cancer[J]. Ann Diagn Pathol, 2008, 12(4): 260-266.

[6] Christoph F, Muller M, Schostak M, et al. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA expression in bladder carcinoma by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Urology, 2004, 64(1): 157-161.

[7] Inoue T, Nakanishi H, Inada K I, et al. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of urinary cytokeratin20 detects transitional cell carcinoma cells[J]. The Journal of Urology, 2001, 166(6): 2134-2141.

(责任编辑:冉明会)