

• 论 著 •

荧光定量 PCR 溶解曲线监测 HIV 感染者 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系漂移技术的建立^{*}

李志峰^{1,2}, 宋方洲^{2△}, 冯连贵¹, 周全华¹, 凌 华¹, 张 敏¹

(1. 重庆市疾病预防控制中心 400042; 2. 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室 400016)

摘 要:目的 建立荧光定量 PCR(FQ-PCR)溶解曲线分析技术监测人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者外周血 T 细胞受体(TCR) α 、 β 链 CDR3 谱系漂移。方法 提取 HIV 感染者外周血单个核细胞中的总 RNA, 逆转录成 cDNA, 设计人 32 个 TCRAV、26 个 TCRBV 基因家族上、下游引物, FQ-PCR 扩增 HIV 感染者 TCRAV 和 TCRBV 基因各家族 CDR3 谱系, 溶解曲线法分析各家族 CDR3 谱系的寡克隆增生, 并与传统的 CDR3 检测技术基因扫描检测结果比较分析。结果 FQ-PCR 溶解曲线分析技术与基因扫描检测结果一致, HIV 感染者 TCR α 链和 β 链家族 CDR3 表达频率不一致, 多数家族为多克隆增生的高斯分布, 但出现数量不等的寡克隆增生家族。结论 FQ-PCR 溶解曲线法监测 HIV 感染者 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系漂移技术操作简单, 检测成本低, 可以用来监测 HIV 感染者外周血 T 细胞 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系漂移。

关键词:互补决定区; 聚合酶链反应; 溶解曲线

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)14-1535-03

Detection of CDR3 shewing of TCR α 、 β gene repertoire in HIV infected individuals by using real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction with DNA melting curve analysis^{*}

Li Zhifeng^{1,2}, Song Fangzhou^{2△}, Feng Liangui¹, Zhou Quanhua¹, Ling Hua¹, Zhang Min¹

(1. Chongqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract:Objective To detect the CDR3 shewing of TCR α 、 β gene repertoire in peripheral blood of HIV infected individuals by using real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(FQ-PCR) with DNA melting curve analysis. **Methods** The total RNA of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from HIV infected individuals were transcribed reversely into cDNA. The cDNA of 32 TCRAV and 26 TCRBV gene family CDR3 were amplified by FQ-PCR. Polyclonal CDR3 spectratyping was analyzed with DNA melting curve and compared with the results of Genescan method. **Results** The two methods showed the same results that the TCRAV and TCRBV family CDR3 expressed with different frequencies and the most CDR3 spectratyping of TCR α 、 β families showed polyclonal peak (Gaussian distribution), but some showed different polyclonal peaks in HIV infected individuals. **Conclusion** The technique of FQ-PCR with DNA melting curve analysis could be used for detecting the CDR3 shewing of TCR α 、 β gene repertoire in HIV infected individuals.

Key words: complementarity determining region; polymerase chain reaction; melting curve

健康人外周血中的 T 细胞大约 95% 是 α 、 β T 细胞, γ 、 δ T 细胞仅占大约 5%, 因此 α 、 β T 细胞在特异性细胞免疫中起主要作用。T 细胞免疫在获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的疾病进程中起着重要作用, 监测人类免疫缺陷病毒(HIV)抗原特异性 T 细胞可以更好地了解 AIDS 的免疫状况和 HIV 的致病机理, 一种 CDR3 序列代表一个 T 细胞克隆, 相同主要组织相容性复合体(MHC)肽复合物结合的大部分克隆 T 细胞有着相同结构或长度的 CDR3 区, 因此, 测定特定 CDR3 序列出现的频率及特征可以反映 T 细胞克隆扩增的程度, 从而反映 T 细胞功能状态。有学者利用实时定量 PCR 结合溶解曲线分析技术检测出恶性淋巴瘤多克隆背景中的特异性克隆 T 细胞^[1], 本实验拟利用荧光定量 PCR(FQ-PCR)溶解曲线这一新技术, 建立适于监测 HIV 感染者 T 细胞 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系漂移的 FQ-PCR 溶解曲线分析技术。

1 材料与方法

1.1 材料 总 RNA 提取试剂盒(Sigma), cDNA 合成 kit (Promega), Realtime PCR Master Mix(TOYOBO)等; 标本: 男

性 HIV 感染者外周血来源于重庆市疾病预防控制中心。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 参照文献[2-5], 分别合成 32 条 TCRAV 和 26 条 TCRBV 基因家族上游引物及共同的 TRAC、TRBC 下游引物各 1 条, 对照的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上、下游引物(P1: 5'-CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA; P2: 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC T), 引物由 invitrogen 上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成 按试剂盒说明操作, 提取 HIV 感染者外周血单核细胞(PBMC)中的总 RNA, 以 Oligo dT 为引物扩增 cDNA。

1.2.3 TCR α 、 β CDR3 基因扫描(Genescan)分析 扩增的 cDNA 模板送上海英骏生物技术有限公司, 提供上游引物, 由测序公司分别合成带 FAM 标记的 TRAC、TRBC 下游引物, PCR 产物在 6% 变性聚丙烯酰胺测序胶上电泳做基因扫描。

1.2.4 TCRAV 和 TCRBV 家族 CDR3 区段 cDNA 的 FQ-PCR 扩增 每例样本做 32 个 TCRAV PCR 反应管和 26 个

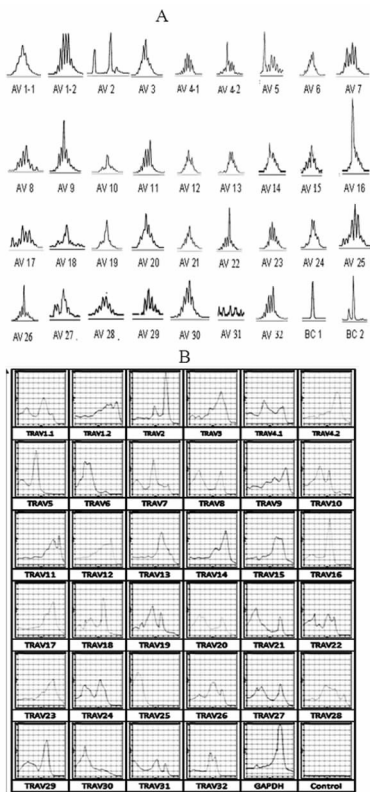
* 基金项目: 卫生部 2007 年艾滋病防治应用性研究项目(WA-2007-03)。△ 通讯作者, E-mail: fzsongcq@163.com。

TCRBV PCR 反应管, 分别扩增 32 条 TCRAV 和 26 条 TCRBV 基因家族 CDR3, 另分别扩增 TRAC、TRBC 和 GAPDH, 设一无引物的阴性对照管。各上、下引物取 1 mL (各引物浓度均为 10 mmol/L), 样品 cDNA 1 μ L, 荧光定量 Mix 10 μ L、纯水 7 μ L, 总体积 20 μ L; 标准曲线选取健康人红细胞的 GAPDH 表达量为相对量标准。反应条件: (1) 94 $^{\circ}$ C 3 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min 1 个循环; (2) 溶解曲线分析: 75~95 $^{\circ}$ C 以 0.2 $^{\circ}$ C/s 读取荧光值, 100 个循环, 屏幕抓图截取各 CDR3 溶解曲线扩增图。

1.2.5 CDR3 谱型分布和表达频率的判定标准 参照文献 [1], 确定 CDR3 谱型分布和表达频率的判定标准。基因扫描分析技术: 寡峰(多克隆)为出现显著的单个峰, 其相对荧光密度(RI, RI= 目的峰面积/相应家族峰的总面积)大于家族的 35% 以上; 偏峰为非标准的高斯分布家族中, 出现较显著的异常峰, RI 大于家族的 25% 以上。FQ-PCR 溶解曲线分析技术: 寡峰(多克隆)为出现显著的单个峰, 其相对导数(-dF/dT)大于 85; 偏峰为在非标准的高斯分布家族中, 出现较显著的异常峰, 其相对导数(-dF/dT)大于 75 以上。

2 结 果

2.1 TCR α 链 CDR3 谱型的基因扫描和 FQ-PCR 结果 HIV 感染者外周血单核细胞(PBMC)的 32 个 TCR α 链 CDR3 产物谱型在基因扫描和 FQ-PCR 的分析显示结果基本一致: 各家族相对表达情况不一, TCRAV 1~32 的 CDR3 产物多数为多峰图形, 出现寡峰(TCRAV 2、TCRAV 16)、偏峰(TCRAV 5), 单个 PCR 产物对照的 TRAC、GAPDH 均为单峰图形, 阴性对照无熔解曲线峰, 见图 1。

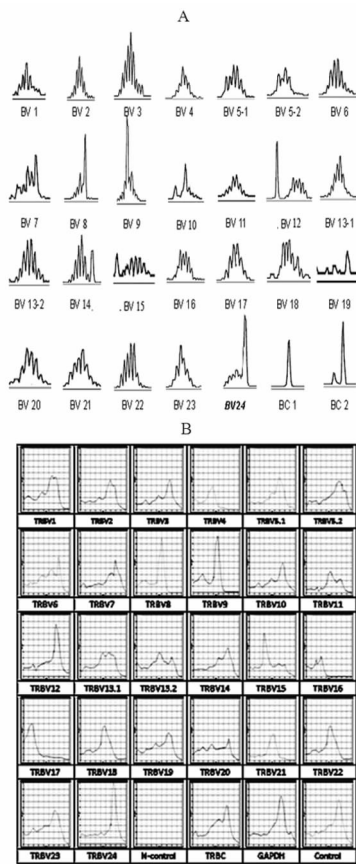


A: 基因扫描; B: FQ-PCR 溶解曲线。

图 1 HIV 感染者 TCR α 链 CDR3 谱型的基因扫描和 FQ-PCR 溶解曲线结果

2.2 TCR β 链 CDR3 谱型的基因扫描和 FQ-PCR 结果 HIV 感染者 PBMC 的 26 个 TCR β 链 CDR3 产物谱型在基因扫描

和 FQ-PCR 的分析显示结果基本一致: 各家族相对表达情况不一, 出现寡峰(TCRBV 8、TCRBV 9)、偏峰(TCRBV 12、TCRBV 24), 单个 PCR 产物对照的 TRBC、GAPDH 均为单峰图形, 阴性对照无熔解曲线峰, 见图 2。



A: 基因扫描; B: FQ-PCR 溶解曲线。

图 2 HIV 感染者 TCR β 链 CDR3 谱型的基因扫描和 FQ-PCR 溶解曲线结果

3 讨 论

抗原特异性 T 细胞的质量主要由 TCR 决定。经典的克隆选择学说认为, TCR 由 α 和 β 2 条多肽链组成不同 V、D、J 基因重排及连接时插入的核苷酸序列, 分别组成了特异的 TCR α 和 β 的 CDR3 的基因谱型, 组成应答 T 细胞库。 α 、 β T 细胞的 C 区(恒定区)与细胞膜相连, 其羧基末端有 5~12 个氨基酸伸入胞浆内, V 区在细胞外侧是与抗原多肽-MHC 分子复合物结合的部位, V 区内有与抗原决定簇发生结合的互补决定区(CDR1~3), 其中 CDR3 变异程度最大, 是决定与抗原特异性结合的主要部位, CDR3 的多样性直接反映了 TCR 的多样性 [6-9]。

目前, TCR α 、 β 链 CDR3 谱系的研究取得了一些成果, 并初步应用于临床相关疾病的诊治, 但仍有许多问题有待进一步明确 [10-13]。首先, 感染性疾病、肿瘤、自身免疫病、移植排斥等 TCRBV 基因谱型的特异性漂移(偏移), 在机制上是抗原刺激后优势表达所致, 还是存在中枢和外周中 TCR 第 2 次重排、编辑、修正与选择后产生新的 TCR 的结果。其次, 相同的自身免疫病或相同的肿瘤或同一病毒感染后不同个体间存在不一致的 TCRBV 基因亚家族谱型, 是否只是由于不同的 MHC 所致。能否在所有 MHC 相同的个体中找到同一疾病的共同的 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系亚家族。再次, 目前 TCR CDR3 谱型检测方法多样, 但大多繁琐、检测成本较高。解决上述几个问

题,首先是要建立一个大家公认的检测 TCR CDR3 基因谱型的,特异性、敏感性好、高通量、重复性好、操作简便、检测成本低的技术,从而监测较大样本人群,排除个体差异,在 MHC 相同个体中找到同一疾病的共同的 TCRBV CDR3 亚家族,更好地反映出疾病状态下机体克隆特异性 T 细胞的存在与分布情况,从而用于疾病的诊断和治疗。

Yang 等^[1]利用实时定量 PCR 结合熔解曲线分析技术检测出恶性淋巴瘤多克隆背景中的特异性克隆 T 细胞,该方法对比了基因扫描方法,熔解曲线分析技术的敏感性和特异性达到了 100%和 97%。本研究利用这一技术建立了监测 HIV 感染者 T 细胞 α 、 β 链 CDR3 漂移的 FQ-PCR 结合熔解曲线分析技术方法,通过平行样检测与基因扫描对比,二者结果一致,并且本研究建立的方法具有以下优点:(1)试验过程简单,PCR 和 CDR3 谱型分析在封闭管中一步完成,能同时能对每个 TCRAV 家族的 CDR3 PCR 产物进行相对定量和克隆增生情况分析,发现特异性的 CDR3;(2)操作简单,核酸提取、逆转录(cDNA 合成)和 FQ-PCR 所需人员的技术要求低,操作过程简单,具有一般分子生物学理论和实验技能的人员就能进行。而变性聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描技术则需要专门的技术人员才能得以进行,这项检测大多都需要由少数特定的专业实验室或测序公司来进行;(3)实验周期短,本方法和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描技术前期实验所花费的时间基本一致,但在监测 HIV 感染者 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系漂移,发现 HIV 感染者表位特异性的 CDR3 这一环节,方法只需要 1.5 h 左右,实验周期大大缩短。(4)研究成本低,本方法所采用的是 Realtime PCR Master Mix 试剂盒,单个样本的检测成本大约只有基因扫描的 1/4,节约研究经费,更有利于推广和应用。

综上所述,FQ-PCR 熔解曲线法监测 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系漂移技术操作简便、实验周期短、研究成本低,特别适用于 HIV 感染者外周血样本 TCR CDR3 谱系漂移的监测。

参考文献

- [1] Yang XY, Xu D, Du J, et al. Rapid detection of clonal T-cell receptor-beta gene rearrangements in T-cell lymphomas using the Lish-tCycler-polymerase chain reaction with DNA melting curve analysis[J]. J Mol Diagn, 2005, 7(1): 81-88.
- [2] Manfras BJ, Rudert WA, Tmcco M, et al. Analysis of the alpha/

beta T-cell receptor repertoire by competitive and quantitative/ve family-specific PCR with exogenous standards and hish resolution fluorescence based CDR3 size imaging[J]. J Immunol Methods, 1997, 210(2): 235-249.

- [3] 姚新生,马骊,温茜,等. 监测 TCR CDR3 漂移的免疫扫描谱型分析技术的建立与鉴定[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2006, 26(6): 571-573.
- [4] Han M, Harrison L, Kehn P, et al. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) and CD8⁺ T cells[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 301-311.
- [5] Ikeda H, Sato N, Matsuura A, et al. Analysis of T-cell receptor V region gene usage of cytotoxic T-lymphocytes and Tumor infiltrating lymphocytes derived from human autologous gastric signet ringcell carcinomas[J]. Cancer Res, 1993, 53(13): 3078-3084.
- [6] 姚新生. TCR β 链 CDR3 谱序与疾病研究概况及进展[J]. 国际免疫学杂志, 2007, 30(4): 240-243.
- [7] Arstila TP, Casrouge A, Baron V, et al. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity[J]. Science, 1999, 286(5441): 958-961.
- [8] Lim A, Baron V, Ferradini L, et al. Combination of MHC-peptide multimer-based T cell sorting with the Immunoscope permits sensitive ex vivo quantitation and follow-up of human CD8⁺ T cell immune responses[J]. J Immunol Methods, 2002, 261(1/2): 177-194.
- [9] 莫红梅,李蕾. 慢性乙型肝炎病毒感染与免疫球蛋白、T 淋巴细胞关系的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2001, 32(2): 194-195.
- [10] Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition[J]. Nature, 1988, 334(6181): 395-402.
- [11] Bentley GA, Boulout G, Karjalainen K, et al. Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor[J]. Science, 1995, 267(5206): 1984-1987.
- [12] Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, et al. Major expansion of CD8⁺ T cell with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV[J]. Nature, 1994, 370(6489): 463-467.
- [13] 阮光萍,姚翔,潘兴华,等. HIV 特异细胞免疫研究进展及其对疫苗发展的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2001, 32(1): 80-82.

(收稿日期:2011-03-20)

(上接第 1534 页)

酶的选择方法。但由于本研究中菌株数量偏少,国内外均没有关于对此类评估的相关报道,因此有必要进行更大样本量的评估,以便能更好地评价 AES 是否能成为临床实验室检测该酶的常规方法。

参考文献

- [1] Pimental JD, Low L, Styles K, et al. Control of an outbreak of multi-drug-resistant acinetobacter baumannii in an intensive care unit and a surgical ward[J]. J Hosp Infect, 2005, 59(3): 249-253.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S19 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- [3] Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases[J]. J Clin Microbial, 2005, 43(7): 3110-3113.
- [4] 萨姆克鲁克·拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译.

北京: 科学出版社, 2005.

- [5] 叶惠芬,陈惠玲,刘朝晖,等. 广州地区鲍曼不动杆菌 AmpC 酶检测及耐药性分析[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(1): 134-135.
- [6] 刘丁,黄鑫,陈萍. 鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶的检测[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(2): 83-85.
- [7] 张军民,罗燕萍,崔岩,等. 临床评价 VITEK2 高级专家系统对常见细菌 β 内酰胺耐药表型的检测和分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 26(4): 233-235.
- [8] 侯伟伟,蒋燕群. 三种 AmpC 酶表型检测方法比较[J]. 检验医学, 2010, 25(2): 122-125.
- [9] Philippon A, Alert G, Hanson ND. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(1): 1-11.
- [10] Schmidtke AJ, Handson ND. Model system to evaluate the effect of ampD gene mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(6): 2030-2037.

(收稿日期:2011-03-03)