

479-484.

2010,77(3):867-876.

[17] Cai XW, Shedden K, Ao X, et al. Plasma proteomic analysis may identify new markers for radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,

(收稿日期:2011-12-31)

• 综 述 •

不同实时荧光定量聚合酶链反应技术研究进展

陈淑云, 采云 综述, 陈激扬 审校
(武警北京市总队医院检验科, 北京 100024)

关键词: 聚合酶链反应; 荧光探针; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.022

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)05-0558-03

聚合酶链反应(PCR)由美国 PE 公司 K. B Mulliss 博士在 1987 年发明^[1]。PCR 技术是指以 PCR 为基础的核酸检测技术,通过对扩增反应,能在短时间内将靶序列放大百万倍甚至千万倍,从而实现靶序列的体外检测及分析。随后发展起来的实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术既保留了传统 PCR 的优点,又实现了从定性检测到定量检测的飞跃^[2]。目前,RT-PCR 技术作为成熟、有效的分子生物学试验方法,广泛应用于基因突变及病原体的临床检测,在相关科研领域也占有重要地位^[3-4]。笔者现结合多年临床及科研经验及成果,对 RT-PCR 技术和各种荧光探针的应用进行综合性阐述。

1 RT-PCR 技术的原理

RT-PCR 与传统 PCR 的区别在于,RT-PCR 在 PCR 的基础上运用荧光共振转移原理实现荧光能量传递,使荧光探针某一端标记的荧光能量能够淬灭(激发)另一端的荧光能量,以达到检测靶序列的目的^[5]。通过 RT-PCR 分析仪,借助特异性荧光标记探针检测靶序列,即在序列 PCR 扩增的同时进行荧光信号的收集,在 PCR 循环结束时即可对结果进行分析判读。

2 循环阈值(Ct)

Ct 值是 RT-PCR 技术中的一个重要概念,即每个 PCR 反应管中的荧光信号达到设定的阈值所经过的循环数。PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,缺省设置是 3~15 个循环。研究表明每个 DNA 模板的 Ct 值与该 DNA 的起始拷贝数存在线性关系,拷贝数缺少,Ct 值越小^[6]。

3 荧光探针的种类及反应原理

RT-PCR 技术所需的探针标记由最初的单一荧光染料法(SYBR Green I),发展至特异性更高、重复性更好的荧光标记探针,如 TaqMan 水解探针、FRET 杂交探针、分子信标、Scorpions 探针等。

3.1 SYBR Green I 单一荧光染料 单一荧光染料法是早期最为常用的荧光标记检测方法,即仅采用一种只与 DNA 双链结合的荧光染料,该染料在游离状态下不发出荧光,而在与 DNA 双链结合后可发出荧光^[7]。SYBR Green I 荧光染料能与所有的 DNA 双链结合,对 DNA 模板没有选择性,所以特异性不强。要想用荧光染料法得到比较好的定量结果,对 PCR 引物设计特异性和 PCR 反应质量的要求就比较高,但检测成本较为低廉^[8]。

3.2 水解探针 水解探针即 TaqMan 探针,目前国内应用较为广泛,是美国应用生物系统(ABI)公司的专利技术。TaqMan 探针是具有较高的特异性,经 Taq 酶 3'→5'外切核酸酶活性切断探针后产生荧光信号。

在采用 TaqMan 探针的 RT-PCR 体系中,包括 1 对 PCR 引物和 1 条探针。探针只与模板特异性结合,其结合位点在 2 条引物之间^[9]。探针的 5'端标记有报告基团,如 FAM、VIC 等,3'端标记有荧光淬灭基团,如 TAMRA^[10]。当探针结构完整时,报告基团所发射的荧光能量被淬灭基团吸收,RT-PCR 分析仪检测不到信号。随着 PCR 的进行,Taq 酶在链延伸过程可结合至已与模板结合的探针,通过 3'→5'外切核酸酶活性切断探针,报告基团远离淬灭基团,其能量不能被吸收,即可产生荧光信号^[11]。每经过 1 个 PCR 循环,荧光信号也和目的片段一样,存在同步指数增长的过程。所以,TaqMan 探针的荧光信号属于累计信号,可用于基因及 mRNA 的定量检测^[12]。TaqMan 探针与 SYBR Green I 反应各有优缺点,SYBR Green I 主要优点是不用针对每个 PCR 反应设计探针,缺点是其特异性较差,因为 SYBR Green I 是非选择性地与双链 DNA 结合^[13-14]。

对于 TaqMan 探针特异性的改进包括将小槽沟结合剂(MGB)加入探针以提高其 DNA 熔解温度值(Tm 值),也可以设计更短的探针,以降低荧光本底^[15]。实验证明,TaqMan MGB 探针对于富含 A/T 的模板可以区分得更为理想,针对病毒 DNA 的检测效果更为明显,也适合于单核苷酸多态性(SNP)的检测及病毒 DNA 定量检测,不足之处在于不能对未知等位基因进行鉴别,不能重复反应^[16-18]。

3.3 杂交探针 杂交探针即 FRET 探针,目前在国内的应用较少,是罗氏(Roche)公司的专利技术;由 2 条位于靶序列上下游的独立探针组成^[19]。下游探针在 5'端标记受体荧光基团,上游探针在 3'标记供体荧光基团(见图 1)。当 2 条探针杂交至靶序列时,形成首尾相连的结构,中间跨度为 1~5 bp^[12]。2 条探针相邻时可发生荧光能量传递,受体基团接受供体基团的能量而激发荧光。供体基团在不同波长下释放能量,与 PCR 过程呈线性关系。与 TaqMan 探针不同的是,FRET 探针属于非累积信号。FRET 探针可通过熔解曲线进行基因突变位点检测(见图 2)。该方法主要用于 Roche 公司 Light Cycle 系列 RT-PCR 分析仪器,适合用于病原体、未知突变位点的检测,优点是可用熔解曲线进行重复分析。

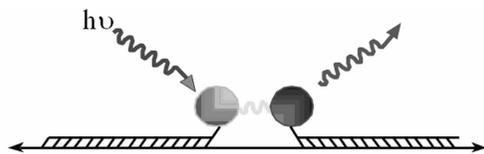


图 1 FRET 探针结构及信号产生机制

3.4 分子信标 分子信标是具有发夹结构的荧光标记探针，当荧光基团和淬灭基团紧密接触时，不产生荧光；当 PCR 反应处于退火阶段时，由于发夹结构被打开，探针环形区域与靶序列特异性结合，荧光基团和淬灭基团分开，形成线性结构探针，结构类似于 Tqaman 探针，使得荧光基团无法被淬灭而发出荧光(见图 3)^[20-21]。与等长度的 TaqMan 及 FRET 探针相比，分子信标具有很高特异性，能够识别只有 1 个核酸不同的 DNA 片段，适合进行点突变的检测^[22]。不足之处在于需要特定的能量才能打开环形结构，对 PCR 反应的条件要求较高，对于分子信标的设计要求也较高要求，存在因实验或探针设计失败而导致检测失败的可能，常用于科研及对特异性要求较高的点突变检测。

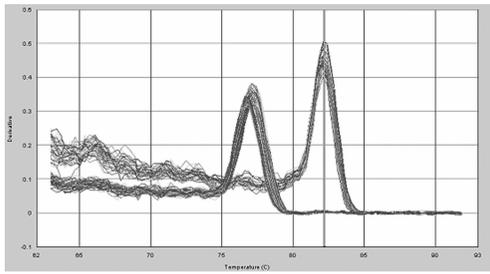


图 2 FRET 探针检测 SNP 熔解曲线分析图

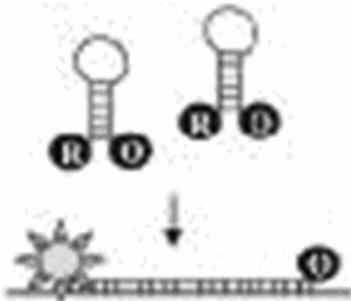


图 3 分子信标结构及信号产生机制

3.5 Scorpions 探针 Scorpions 探针即蝎型探针，是以分子信标为基础的带有 1 条引物的荧光标记探针(见图 4)。与分子信标一样，在 5' 和 3' 端分别标记荧光基团和淬灭基团，但在 3' 端加入了 1 条非扩增单位的引物^[23]。PCR 反应处于变性阶段时，环状结构打开，探针与未扩增单位引物的构象发生变化，退火时与模板特异性结合，发出荧光信号。该探针对于等位基因检测的特异性很高，且容易实现多重分析，已用于肿瘤细胞基因突变的检测，如 EGFR、K-ras 等^[24]。

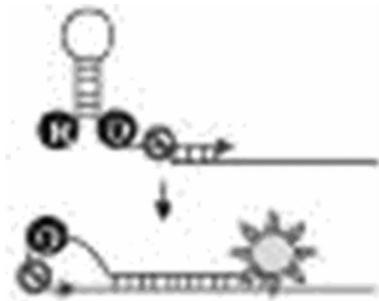


图 4 Scorpions 探针结构及信号产生机制

3.6 高分辨率熔解曲线(HRM) 该方法是在 RT-PCR 基础上发展起来的一种新的定量检测技术，可实时监测升温过程中双链 DNA(dsDNA) 荧光染料与 PCR 产物的结合情况^[25]。

SNP 位点碱基不同会使 dsDNA 的 T_m 值发生变化，使其在升温过程中先后解开，形成不同的熔解曲线，荧光染料从局部解链的 DNA 分子上释放，从荧光强度与时间曲线上就可判断是否存在 SNP，而且不同 SNP 位点、杂合子与纯合子等都会影响熔解曲线的峰形，因此 HRM 能够有效区分不同 SNP 位点与不同基因型。HRM 采用新型的饱和染料，如 LC Green, SYTO 9 等^[26]。与 SYBR Green I 不饱和染料法相比，HRM 更易于检测单碱基突变、小片段插入或缺失，适用于甲基化、多位点突变的检测。其不足在于，对 RT-PCR 分析仪的要求较高。国内已有针对 EGFR 中 4 个外显子突变检测的商业试剂盒上市。

4 小 结

尽管 RT-PCR 技术发展迅速，所采用的方法和手段也多种多样，但还是存在一些问题。与此同时，如何正确认识各种方法的合理性，以及了解不同方法的检测原理和对仪器的要求，都需要深入学习和探讨。随着 RT-PCR 技术在临床中的广泛应用，对检验工作提出了新的挑战，例如如何将 RT-PCR 技术、仪器与检测目标更高级地结合起来，使其在科研及临床中得到最合理的应用。相信在不久的将来，随着 RT-PCR 技术的完善，其应用范围将得到进一步扩大，在临床应用和科研中也将发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Parida M, Posadas G, Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus[J]. Clin Microbial, 2004, 42(2): 257-263.
- [2] Quereda C, Corral I, Laguna F, et al. Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders[J]. Clin Microbial, 2000, 38(10): 3061-3067.
- [3] 邓少丽, 罗阳. 荧光定量 PCR 技术及其在临床上的应用综述[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2002, 23(5): 301-303.
- [4] 张盛. 荧光实时定量 PCR 技术初探[J]. 生命科学趋势, 2003, 1(4): 1-10.
- [5] 欧阳松应, 杨冬, 欧阳红生, 等. 荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 74-76.
- [6] Klein D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(6): 257-60.
- [7] Moody A, Sellers S, Bumstead N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR[J]. Virol Methods, 2000, 85(1-2): 55-64.
- [8] 马莉, 汤承, 李明义, 等. SYBR Green I 定量 RT-PCR 快速检测 H5 亚型禽流感病毒方法的建立[J]. 中国家禽, 2008, 30(20): 18-21.
- [9] 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.
- [10] 张华, 徐叔祥. 定量聚合酶链反应的研究进展与临床应用[J]. 中华医学检验杂志, 2000, 23(2): 120-121.
- [11] Weiss J, Wu H, Farrenkopf B, et al. Real time TaqMan PCR detection and quantitation of HBV genotypes A-G with the use of an internal quantitation standard[J]. J Clin Virol, 2004, 30(1): 86-93.
- [12] Lovatt A. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products[J]. J Biotechnol, 2002, 82(3): 279-300.
- [13] 郝麟, 朱平, 于晓梅, 等. PCR 基因芯片上荧光 PCR 反应的研究

[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(5): 1-4.

[14] 张金波, 罗佳滨. 荧光定量 PCR 技术原理及在分子诊断中的应用进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(12): 13-14.

[15] Buh Gasparic M, Cankar K, Zel J, et al. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms[J]. BMC Biotechnol, 2008, 8(1): 26.

[16] 卢亦愚, 严菊英, 冯燕, 等. TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 技术快速检测 H5 亚型禽流感病毒[J]. 中国病毒学, 2006, 21(5): 472-476.

[17] 毛晓露, 陶志华, 陈晓东, 等. 荧光实时定量 RT-PCR 检测 DD3 mRNA 方法的建立[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(5): 335-337.

[18] 赵锦荣, 白玉杰, 罗明, 等. 新型 TaqMan-MGB 探针在结核分枝杆菌实时 PCR 检测中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 12(19): 807-810.

[19] Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards[J]. Mol Cell Probes, 2000, 14(2): 127-135.

[20] 杜秀敏, 齐法莲, 徐军, 等. 临床诊断中的实时 PCR 技术[J]. 放射免疫学杂志, 2004, 17(6): 461-462.

[21] 章晓波, 徐洵. 分子信标探针用于 PCR 检测对虾白斑杆状病毒[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(3): 277-280.

[22] 张立国, 张璐. 实时定量 PCR 技术的介绍[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 39-40.

[23] 白恩琪, 陈华云. 荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 基因诊断, 2009, 3(35): 22-27.

[24] Wang X, Li X, Currie RW, et al. Application of real-time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin-1 beta mRNA in ischemic brain tolerance[J]. J Neurosci Res, 2000, 59(2): 238-246.

[25] 雷学忠, 陈守春. 定量 PCR 技术研究进展[J]. 四川医学, 2000, 21(11): 22-27.

[26] 赵清, 许颂霄, 袁军, 等. 一种快速检测 HBV 基因的荧光定量 PCR 法的建立[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(4): 244-246.

(收稿日期: 2011-12-02)

• 综 述 •

血小板免疫介质分泌及与免疫病理关系研究进展

高淑芳 综述, 李培成 审校

(上海中医药大学附属龙华医院检验科 200032)

关键词: 血小板; 免疫介质; 动脉粥样硬化; 脓毒症; 类风湿关节炎

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 05. 023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)05-0560-03

最早关于血小板与免疫系统联系的认识来自血小板自身免疫攻击(免疫性血小板减少症)和同种异体免疫攻击(胎儿或新生儿同种异体血小板减少和输血后紫癜),以后逐步证实血小板在调节天然免疫和获得性免疫中有重要作用^[1]。

1 血小板结构

血小板为小、卵圆盘形,浆膜表面一般光滑,可被损伤的血管壁激活,形状变为多刺环形,促使血小板膜表面黏附蛋白和凝固蛋白受体数增加,活化血小板吸引其他血小板相互聚集,形成血栓,阻塞血管渗漏处。该过程也导致很多细胞因子、趋化因子和细胞表面分子的表达,不仅激发生止血,也可诱导白细胞聚集到损伤组织,例如活化血小板表达 P 选择素,促进淋巴细胞滚动和黏附至高内皮小静脉^[2]。

2 血小板颗粒

血小板有 3 种主要颗粒:α 颗粒、密集颗粒和溶酶体。α 颗粒占 40%~80%,其内部蛋白包括凝血因子、趋化因子、黏附蛋白、丝裂原因子和血管生成调节因子。有研究发现 α 颗粒也含有纤维蛋白原和血管性血友病因子(vWF),推测血小板颗粒有不同的促炎性反应和抗炎性反应亚群^[3-4]。

3 血小板合成介质

血小板不仅贮存生物活性介质,也能合成分子,在止血和炎性反应过程中可形成自身蛋白^[5]。血小板与凝血酶活化后能分泌 300 种以上蛋白质,其中部分蛋白质,如白细胞介素-1(IL-1)、Toll 样受体(TLR)和 CD154,可参与血液凝固以外的过程,使血小板功能十分复杂^[6-7]。

活化血小板表达的生物活性物质和黏附蛋白有利于血小板与不同免疫细胞群相互作用,例如活化血小板介导中性粒细胞黏附至内皮,亦上调其促炎性反应功能。血小板与树突状细

胞(DC)相互作用使 DC 迁移至组织损伤处,刺激 DC 释放炎症反应趋化因子和细胞因子。因此,血小板在炎性反应过程中是细胞交流的关键介质。

4 血小板表达的免疫介质

4.1 细胞因子和趋化因子 血小板颗粒内贮存有很多分子,如血小板衍生生长因子(PDGF)、腺苷二磷酸(ADP)和血栓素 A₂(TXA₂),均与止血功能有关。PDGF 有助于炎性反应部位的激发和调节伤口愈合。血小板颗粒亦含许多促炎性反应和抗炎性反应细胞因子及趋化因子,例如转化生长因子 β(TGFβ),在调节 TGFβ 方面具有重要作用。免疫性血小板减少症患者体内 TGFβ 减少,治疗后血小板数正常, TGFβ 恢复正常^[8]。近年来有报道认为,免疫性血小板减少症患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg)减少,经治疗(静脉注射免疫球蛋白、地塞米松、血小板生成素)能恢复 Treg 数量和功能^[9],说明 Treg 分化依赖 TGFβ,可能与血小板贮存的 TGFβ 有助于 Treg 细胞内环境稳定有关。血小板内贮存的其他细胞因子和趋化因子功能尚未清楚,是当前研究热点之一。

4.2 CD40 和 CD154 淋巴细胞和抗原递呈细胞间的 CD40 和 CD154 是一对受体-配体,其中心作用是促进相互作用,在血栓性疾病中有重要作用。现知血小板表达 CD154,可与内皮细胞上 CD40 相互作用,上调内皮细胞表达细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1),释放单核细胞趋化蛋白 1(CCL2),促进白细胞募集至炎性反应部位^[10]。另外,活化血小板释放的可溶性 CD154 可通过相同途径促使白细胞募集至炎性反应部位,也可与血管细胞(包括内皮细胞)相互作用,诱导 E 选择素和 P 选择素上调,释放 IL-6 和组织因子。事实上人血浆中大多数可溶性 CD154 来自活化血小板,