

• 临床检验研究论著 •

TaqMan 实时 PCR 与 SYBR Green I 实时 PCR 检测 HLA-B*27 的比较性分析

马红玲^{1,2}, 王雪萍¹, 陈凤花¹, 马荣红¹, 温晓波¹, 袁琳¹, 潘世秀¹, 胡丽华^{1△}, 李一荣^{1▲}

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科, 湖北武汉 430022;

2. 华中科技大学同济医学院检验系, 湖北武汉 430022)

摘要:目的 探讨 TaqMan 实时 PCR 与 SYBR Green I 实时 PCR 检出中国汉族人群基因组标本中 HLA-B*27 等位基因能力的差异。方法 首先采用 SYBR Green I 实时 PCR 对 243 例人基因组标本中的 HLA-B*27 等位基因进行检测, 随后采用 TaqMan 实时 PCR 对 HLA-B*27 进行再次检测。结果 SYBR Green I 实时 PCR 发现 243 例人基因组标本中, 132 例 HLA-B*27 阳性, 111 例 HLA-B*27 阴性, 而 TaqMan 实时 PCR 检测结果显示 131 例 HLA-B*27 阳性, 112 例 HLA-B*27 阴性, 两者比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 与 SYBR Green I 实时 PCR 一样, TaqMan 实时 PCR 也是一种快速有效的检测中国汉族人群 HLA-B*27 等位基因的方法。

关键词:聚合酶链反应; 基因; HLA 抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)07-0771-02

Comparative evaluation of TaqMan real-time PCR assay and SYBR Green I real-time PCR assay for detecting HLA-B*27

Ma Hongling^{1,2}, Wang Xueping¹, Chen Fenghua¹, Ma Ronghong¹,

Wen Xiaobo¹, Yuan Lin¹, Pan Shixiu¹, Hu Lihua^{1△}, Li Yirong^{1▲}

(1. Department of Clinical Laboratory, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China; 2. Department of Clinical

Laboratory, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China)

Abstract: Objective To compare the capacity of TaqMan real-time PCR assay with SYBR Green I real-time PCR assay for detecting HLA-B*27 allelic gene in genomic samples from Chinese Han population. **Methods** HLA-B*27 allelic gene of 243 human genomic samples was detected by SYBR Green I real-time PCR assay following by TaqMan real-time PCR assay. **Results** SYBR Green I real-time PCR assay found that 132 of 243 human genomic samples were HLA-B*27 positive and the other 111 were HLA-B*27 negative. TaqMan real-time PCR assay showed that 131 of 243 human genomic samples were HLA-B*27 positive and the other 112 were HLA-B*27 negative, there was no statistically significant difference between two methods ($P>0.05$). **Conclusion** TaqMan real-time PCR assay was also a rapid and efficient method for detecting HLA-B*27 allelic gene in genomic samples from Chinese Han population as well as SYBR Green I real-time PCR assay.

Key words: polymerase chain reaction; genes; HLA antigens

研究发现检测 HLA-B*27 对于强直性脊柱炎等脊柱关节病的诊断具有重要价值^[1-3]。一般多采用传统的聚合酶链反应(PCR)检测 HLA-B*27 等位基因, 由于其需要在 PCR 后进行凝胶电泳, 使其应用受到一定限制^[4-6]。SYBR Green I 实时 PCR 则无需 PCR 后处理。TaqMan 实时 PCR 是目前临床基因检测中最常用的实时 PCR 技术。前期实验显示 TaqMan 实时 PCR 是一种快速可信的检测 HLA-B*27 的方法^[7-8], 因此本研究拟比较 2 种方法检测中国汉族人群 HLA-B*27 等位基因的能力是否存在差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料 华中科技大学同济医学院附属协和医院 2011~2012 年住院与门诊患者 243 例, 其中, 男 156 例, 女 87 例; 年龄 2~68 岁。每个研究对象均采集静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸二钾抗凝, 采用碘化钠提取 200 μ L 全血中的基因组 DNA 并置-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 试剂与仪器 SYBR Green I 实时 PCR 试剂盒购自北京博奥生物技术有限公司。引物与探针参考文献^[7]略加修改, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 具体序列见表

1。PCR 仪为美国 Stratagene 公司生产的 Mx3000P 荧光 PCR 仪。

1.3 SYBR Green I 实时 PCR 首先将 1 μ L 的 DNA 模板加入到主反应混合物中, 混匀后置于 Mx3000P 荧光 PCR 仪进行扩增, 首先 37 $^{\circ}$ C 温育 10 min, 96 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 随后 96 $^{\circ}$ C 变性 25 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环, PCR 反应完成后, 进行熔解曲线分析, 最后根据熔解曲线峰的面积与熔解温度(T_m)分析是否存在 HLA-B*27 等位基因。

1.4 TaqMan 实时 PCR TaqMan 实时 PCR 反应同时扩增 HLA-B*27 和 GAPDH(三磷酸甘油醛脱氢酶)基因。PCR 反应总体积为 20 μ L, 包括 10 μ L 的 2 $\times$ Premix Ex TaqTM, 0.75 μ mol/L 的 FP-B 和 RP-B 混合物, 0.4 μ mol/L 的 TP-B, 0.5 μ mol/L 的 FP-G 和 RP-G 混合物, 0.2 μ mol/L 的 TP-G 和 1 μ L 的 DNA 模板, 采用 Mx3000P 荧光 PCR 仪进行扩增。PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。参照文献设定本研究的阴阳性判断标准^[7]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件分析, $P<0.05$

作者简介: 马红玲, 女, 检验技师, 主要从事自身免疫的检测研究。
rong838@163.com。

Δ 通讯作者, E-mail: xhhlh@126.com。 $\blacktriangle$ 通讯作者, E-mail: liyi-

为差异有统计学意义。

表 1 TaqMan 实时 PCR 所用的引物和探针

引物	靶基因	序列	位置 (bp)	基因编号
FP-B	HLA-B*27	5'-GTG GGC TAC GTG GAC GAC ACG CT-3'	72~94	HLA02246
RP-B	HLA-B*27	5'-GTC AGT CTG TGC CTT GGC CTT GC-3'	199~221	HLA02246
TP-B	HLA-B*27	5'FAM-TTC GTG AGG TTC GAC AGC GAC GC-TAMRA 3'	96~117	HLA02246
FP-G	GAPDH	5'-CAT GGT GAG TGC TAC ATG GTG AGC -3'	2 100~2 12	NC_000012
RP-G	GAPDH	5'-CCT GGA AGA TGG TGA TGG GAT TTC C-3'	42 272~2 29	NC_000012
TP-G	GAPDH	5'HEX-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TGA CGG-TAMRA 3'	62 266~2 247	NC_000012

2 结 果

2.1 SYBR Green I 实时 PCR 结果 研究显示内对照 PCR 产物的熔解曲线峰 Tm 约为 84.0 ℃,而 HLA-B*27 等位基因 PCR 产物的 Tm 约为 90.0 ℃,因此 HLA-B*27 阴性标本仅在 84.0 ℃附近出现熔解曲线峰,而阳性标本则于 84.0 ℃和 90.0 ℃附近均出现熔解曲线峰,且后一个峰的面积通常大于前一个峰面积的 2.925 倍,以此为标准,本研究收集的 243 例标本中,132 例 HLA-B*27 阳性,111 例阴性。

2.2 TaqMan 实时 PCR 结果 TaqMan 实时 PCR 扩增完成后,HLA-B*27 阴性标本仅一条“S”型扩增曲线,即 GAPDH 扩增曲线,而阳性标本则有两条“S”型扩增曲线,分别是 GAPDH 扩增曲线与 HLA-B*27 扩增曲线。以 CtB27≤33.75 且 21.40≤CtGAPDH≤26.98 为阳性判断标准,则 243 例测试标本中,131 例 HLA-B*27 阳性,112 例阴性。

2.3 2 种检测方法结果的比较 SYBR Green I 实时 PCR 检测 HLA-B*27 [阳性率 54.3% (132/243)、阴性率 45.7% (111/243)]与 TaqMan 实时荧光 PCR [阳性率 53.9% (131/243)、阴性率 46.1% (112/243)]比较,差异无统计学意义(P>0.05)。

3 讨 论

SYBR Green I 实时 PCR 检测 HLA-B*27 DNA 于 2000 年建立^[9],而且该方法于 2012 年获得中国食品与药品监督管理局委员会(sFDA)批准用于临床检测,本研究显示其内对照 PCR 产物的 Tm 约为 84.0 ℃,HLA-B*27 等位基因 PCR 产物的 Tm 约为 90.0 ℃,ΔTm 约为 6 ℃,易于区分内对照基因与 HLA-B*27 等位基因,而且提供了量化的阴阳性判断标准,易于判读。另外本方法无需进行 PCR 后处理,每次 PCR 实验可节约 2~3 h,且扩增与检测均在密闭状态下进行,不会造成遗留污染,因此该方法是一种简单、快速有效的检测 HLA-B*27 的方法。

Taqman 实时 PCR 是一种基于探针水解技术的基因检测方法^[10-11],前期采用 Taqman 实时 PCR 检测 HLA-B*27 等位基因,灵敏度高,特异性强,与基因测序的结果完全吻合,且具有宽广的动力学范围^[7]。本研究将 Taqman 实时 PCR 与 SYBR Green I 实时 PCR 的检测结果进行比较,SYBR Green I 实时 PCR 检测结果显示 132 例 HLA-B*27 阳性,111 例 HLA-B*27 阴性,而 TaqMan 实时 PCR 则 131 例 HLA-B*27 阳性,112 例 HLA-B*27 阴性(P>0.05)。另外 Taqman 实时 PCR 不仅具有 SYBR Green I 的优点,而且能克服 SYBR Green I 实时 PCR 固有的缺点,如引物二聚体以及非特异性产物的干扰等^[12],因此 Taqman 实时 PCR 检测的干扰因素更少,特异度更高。总之 TaqMan 实时 PCR 是另一种快速有效

的检测中国汉族人群 HLA-B*27 等位基因的方法,并有望获得 sFDA 的注册证书,从而辅助强直性脊柱炎等脊柱关节病的诊断。

参考文献

[1] Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis[J]. Curr Opin Rheumatol,2010,22(2):126-132.

[2] Sims AM, Wordsworth BP, Brown MA. Genetic susceptibility to ankylosing spondylitis[J]. Curr Mol Med,2004,4(1):13-20.

[3] Radouane A, Oudghiri M, Chakib A, et al. HLA-B*27 allele associated to Behcet's disease and to anterior uveitis in Moroccan patients[J]. Ann Biol Clin (Paris), 2011, 69(4):419-424

[4] Nathalang O, Tantimavanich S, Nillakupt K, et al. HLA-B27 testing in Thai patients using the PCR-SSP technique[J]. Tissue Antigens, 2006, 67(3):233-236.

[5] Nieto A, Fraile A, Vinasco J, et al. HLA-B*27 typing by PCR-restriction fragment length polymorphism[J]. Tissue Antigens, 1997, 49(3 Pt 1):283-286.

[6] Välimaa L, Sjöroos M, Luhtala M, et al. Detection of HLA-B27 alleles by group-specific amplification and time-resolved fluorometry[J]. J Immunol Methods, 1998, 219(1/2): 131-137.

[7] Fan W, Huang L, Zhou Z, et al. Rapid and reliable genotyping of HLA-B*27 in the Chinese Han population using a duplex real-time TaqMan PCR assay[J]. Clin Biochem. 2012, 45 (1/2): 106-111.

[8] Roelandse-Koop EA, Buisman B, van Hannen EJ, et al. Rapid HLA-B27 screening with real-time TaqMan PCR: a clinical validation in the Dutch population[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49 (12):1979-1985.

[9] Bon MA, van Oeveren-Dybiec A, van den Bergh FA. Genotyping of HLA-B27 by real-time PCR without hybridization probes [J]. Clin Chem, 2000, 46(7):1000-1002.

[10] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. Mol Aspects Med, 2006, 27 (2/3): 95-125.

[11] Yang YC, Lu PL, Huang SC, et al. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49 (3):797-801.

[12] Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics[J]. Adv Clin Chem, 2005, 40 (1):219-259.