

- treatment[J]. Clin Liver Dis, 2004, 8(4): 839-859.
- [27] Abousouan LS, Stoller JK. Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency: a review[J]. Respir Med, 2009, 103(3): 335-341.
- [28] Brantly M. Efficient and accurate approaches to the laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: The promise of early diagnosis and intervention[J]. Clin Chem, 2006, 52(12): 2180-2181.
- [29] Rodríguez-Frias F, Vila-Auli B, Homs-Riba M, et al. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: limitations of rapid diagnostic laboratory tests[J]. Arch Bronconeumol, 2011, 47(8): 415-417.
- [30] Greene DN, Procter M, Grenache DG, et al. Misclassification of an apparent alpha 1-antitrypsin "Z" deficiency variant by melting analysis[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(15/16): 1454-1456.
- [31] Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, et al. Laboratory diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: a review[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(15/16): 1454-1456.

• 综述 •

实时荧光定量 PCR 法检测儿童常见病原菌的研究进展

闫超 综述, 孙红妹[△] 审校

(首都儿科研究所细菌研究室, 北京 100020)

关键词:聚合酶链反应; 病原; 细菌; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1114-03

实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR)是根据荧光共振能量转移原理,设计相应的荧光标记核酸探针,通过 PCR 反应对靶 DNA 进行定性、定量测定的技术^[1],可根据样品的循环阈值,参照标准曲线准确计算出样本内核酸的起始浓度,实现 PCR 从定性到定量的飞跃。在 PCR 扩增的早期即可监测其反应动力学,既保持了 PCR 技术快速和灵敏的优点,又克服了传统 PCR 技术中存在的假阳性污染和不能进行准确定量的缺点。与现有基因检测方法相比较,该方法具有多病原同时检测、操作简便、仪器设备要求不高、经济等优势,可迅速应用于临床。

1 Real-time PCR 的原理

Real-time PCR 是在常规 PCR 基础上添加了荧光染料或荧光探针,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,见图 1。其基本原理在于 PCR 反应体系中加入了荧光化学物质,PCR 产物随着 PCR 反应的进行不断积累,荧光强度与 PCR 产物的数量呈对应关系,实时检测荧光信号强度,进而确定扩增产物的数量,即检测每个循环结束后的产物量,从而实现 PCR 扩增的动力学监测,扩增曲线为 S 型。

在 Real-time PCR 技术中 2 个重要的概念: 荧光阈值和 CT 值。荧光阈值是在荧光扩增曲线上人为设定的一个值,一般设置为扩增过程 3~15 个循环的荧光信号的标准差的 10 倍。当荧光值超过阈值时的循环数被称为 CT 值。CT 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多,CT 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,以 CT 值为横坐标,以一系列标准 DNA 分子的起始拷贝数的以 10 为底的对数为纵坐标,因此,只要获得未知样品的 CT 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数^[2]。

phal-antitrypsin deficiency[J]. Transl Res, 2007, 150(5): 267-274.

[32] Luisetti M, Balfour-Lynn IM, Johnson SR, et al. Perspectives for improving the evaluation and access of therapies for rare lung diseases in Europe[J]. Respir Med, 2012, 106(6): 759-768.

[33] 欧海龙, 雷霆雯, 李红梅, 等. 慢病毒介导的重组人 α1-抗胰蛋白酶在小鼠体内的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(19): 1720-1725.

[34] Senn O, Russi EW, Imboden M, et al. Alpha1-Antitrypsin deficiency and lung disease: risk modification by occupational and environmental inhalants[J]. Eur Respir J, 2005, 26(5): 909-917.

(收稿日期:2012-10-17)

2 Real-time PCR 的类型及特点

Real-time PCR 技术可以分为非特异性的 DNA 结合染料法和特异性探针法,后者由于增加了探针的识别步骤,特异性更高,但前者则简便易行。

2.1 非特异性的 DNA 结合染料法(非探针类) 荧光染料可以非特异性结合双链 DNA 的小沟,嵌合进 DNA 双链,但是不与单链结合。反应起始时,只产生很少的荧光,但随着反应进行,扩增产物的增加,即双链 DNA 的增加,荧光强度也随之增强。当 DNA 变性时则荧光信号降低。因此,通过每个循环结束时荧光强度的变化可估计 DNA 增加的量。此方法的优点是不需设计探针,简便,同时降低了检测成本,但其特异性较差,染料可以和任意双链 DNA 结合。目前常用的 DNA 结合染料为 SYBR Green I^[3]。

2.2 特异性荧光定量 PCR 方法(探针类) 此方法是根据荧光共振能量转移原理,当荧光基团与一个荧光淬灭基团(可以淬灭前者的发射光谱)的距离接近至一定范围(7~10 nm)时,会发生荧光能量转移,淬灭基团会吸收荧光基团在激发光作用下激发的荧光,从而使其不发光,一旦二者分开,淬灭作用即消失。根据荧光探针类型,目前常用的有 TaqMan 探针、双杂交探针、分子信标、蝎形探针等相关技术。以 TaqMan 探针为例说明其工作原理,探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'~3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号。

3 Real-time PCR 对于儿童常见病原菌的检测

国内系统性的关于儿童常见病原菌种类的报道较少,但总体上从城市儿科医院收集的标本测定结果看,儿童常见致病菌与成人有不少相似之处,少数存在特异性^[3]。其中,革兰阴性菌的比例约占 60%,超过革兰阳性菌。革兰阴性菌中肠杆菌

科细菌超过 2/3, 其中 1/2 以上为大肠埃希菌, 是呼吸道分泌物、尿液和伤口分泌物培养最常见的细菌。

由于呼吸道、消化道常见致病菌感染率较高, 耐药菌株不断增加, 对儿童危害较大。但目前细菌的鉴定还是采用传统培养及生化鉴定法, 受抗菌药物影响较大, 需要的时间较长, 且有些标本的检出率不高, 常规的微生物敏感性试验需要 2~3 d, 而在此之前治疗均为临床医师的经验性治疗。为满足临床早期、快速、可靠的病原学辅助检查的需要, 病原体基因检测方法不断涌现。与传统的细菌培养法或酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法相比, Real-time PCR 准确性好、特异性强、敏感性高, 不受标本中存在的抗菌药物或其他抑菌物质的干扰。国内多数 Real-time PCR 检测试剂盒可检测 10^2 拷贝的病原体核酸, 还有报道采用多重 Real-time PCR 法进行结核杆菌种、沙门菌血清型、志贺菌属、大肠埃希菌肠毒素及艾滋病相关泌尿生殖道病原菌的鉴定工作等。

由于 Real-time PCR 反应和分析在完全闭管的条件下进行, 能有效防止 PCR 产物的污染, 提高检测结果的可靠性; 试剂在 PCR 检测仪上进行扩增和分析, 无需电泳和紫外灯观测等步骤, 只需 0.5~1.2 h 即可完成 PCR 过程, 自动化程度高。因荧光信号的产生是模板与探针杂交及模板扩增共同作用的结果, 因此其特异性强。传统 PCR 法均为终点监测, Real-time PCR 很好地解决了这一局限, 可根据荧光强度实时监测反应过程, 并可根据标准曲线获得定量结果。多重 Real-time PCR 可同时检测多种病原菌, 并区分主要致病菌和次要致病菌, 为临床诊治提供依据。目前 Real-time PCR 已经被广泛应用于儿童呼吸系统、消化系统及泌尿生殖系统等常见病原菌的检测。

3.1 呼吸系统病原菌

呼吸道感染是目前国内儿童发病率最高的疾病, 常见病原菌主要包括肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、流感嗜血杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、结核杆菌、百日咳鲍特菌、化脓性链球菌、嗜肺军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、白色念珠菌、脑膜炎双球菌, 卡他莫拉菌等。

孟茹等^[4] 采用 Real-time PCR 对于结核杆菌初始模板的最低检出限可达 1×10^1 copies/ μ L, 比常规 PCR 法高 100 倍。苏明权等^[5] 用此法检测金黄色葡萄球菌的最低检出限为 10^2 copies/mL, 相当于 10 个菌细胞。Morozumi 等^[6] 对于肺炎支原体检测显示, 此法的敏感性可达 99.2%, 特异性可达 97.5%, 最低检出限可达 100 CFU/mL。Gullsby 等^[7] 利用此法检测肺炎支原体和肺炎衣原体, 与普通 PCR 比较, 肺炎衣原体的敏感性和特异性分别为 93%、100%, 肺炎支原体的敏感性和特异性分别为 100%、98%。Hindiyyeh 等^[8] 利用此法分析肺炎克雷伯菌的 BLAKPC 基因, 其特异性达 91.6%, 检出值为 1 CFU, 且与其他混合耐药致病菌没有交叉感染。Bayram 等^[9] 利用 Real-time PCR 法检测肺炎链球菌, 与传统的培养法比较, 其敏感性和特异性分别为 97.2%、60.9%。Seputiené 等^[10] 检测了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 其灵敏性可达 98.7%, 特异性达 100.0%, 阳性、阴性预测值分别为 100.0%、96.6%。Abdeldaim 等^[11] 利用多重 PCR 法检测引起下呼吸道感染的肺炎链球菌和流感嗜血杆菌, 敏感性分别为 95%、90%, 特异性分别为 75%、65%。McCulloch 等^[12] 检测儿童囊性纤维化患者的铜绿假单胞菌, 其结果与金标准培养法比较, 特异性为 100%, 敏感性为 58%。

3.2 消化系统病原菌

引起儿童感染性腹泻的病原微生物主要是肠道致病菌和病毒, 也有少部分由寄生虫感染引起。其中, 肠道致病菌主要是肠致病性大肠埃希菌、沙门菌属、志贺菌属、空肠弯曲菌等。目前, Hardegen 等^[13] 利用多重 TaqMan PCR 法检测致病性大肠埃希菌, 可有效区分致病性大肠埃希菌和黏附性大肠埃希菌。Guion 等^[14] 利用熔解曲线分析及多重 Real-time PCR 法对于大肠埃希菌的检测, 特异性可达 100%, 敏感性可达 99%。Lin 等^[15] 对于粪便中空肠弯曲菌的检测表明, 此法敏感性为 10^3 CFU/g, 便于操作且耗时短(3.5~4.0 h), 可用于临床诊断和流行病学监测。Nga 等^[16] 对于沙门菌的检测, 特异性可达 100%, 敏感性可达 53.9%。杨俊超等^[17] 检测沙门菌的检出率为 12.5%, 高于常规 PCR 的 10% 和细菌分离培养的 5.0%。

3.3 泌尿生殖系统病原菌

大多数泌尿系统感染是由 1 种细菌感染所致, 混合感染少见。革兰阴性菌是泌尿系统感染的常见致病菌, 其中又以大肠埃希菌最为常见。其他革兰阴性杆菌, 如变形杆菌、克雷伯菌、绿脓杆菌等也占一定比例。在由革兰阳性菌引起的儿童泌尿系统感染中, 以葡萄球菌和肠球菌感染为主。此外, 沙眼衣原体、支原体、腺病毒感染、结肠内阿米巴原虫、红斑丹毒丝菌等感染也有报道。

Real-time PCR 法检测阴道加德纳菌含量的线性范围为 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^5$ 拷贝/mL, 其诊断细菌性阴道炎的总体敏感性和特异性分别为 92.9%、80.3%^[18]。陈暖等^[19] 利用此法检测淋球菌, 其阳性检出率可达 29.35%。许菁^[20] 利用此法对于淋球菌、沙眼衣原体、解脲脲原体检测的特异性达 76.61%, 敏感性为 97.83%, 高于培养法的检出率(27.38%)。Lehmann 等^[21] 利用 SeptiFast Real-time PCR 法检测泌尿生殖系统常见致病菌及真菌, 其敏感性及特异性分别为 82%、60%, 与常规培养法比较, 节省了 43 h。

3.4 其他病原菌

Smythe 等^[22] 对于钩端螺旋体的检测表明, 此法可检测血液或尿液, 不依赖于培养法, 可特异性区分病原体, 最低检出下限为 2 个细胞。对于念珠菌的最低检测下限达到 1~5 CFU/mL, 可同时检测 5 种念珠菌(白色念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌及克柔念珠菌)的熔解温度^[23]。此外, 还可用于芽孢杆菌等非常见病原体的检测。

4 Real-time PCR 的应用前景

目前, Real-time PCR 已广泛应用于部分儿童常见病原菌的检测。但是随着 PCR 仪的不断更新、诊断标准的优化、芯片技术的发展、光学和热循环技术的改进, Real-time PCR 技术将被广大临床诊断实验室应用, 有助于临床医师对疾病的诊断和治疗。Chakravorty 等^[24] 将探针与 DNA 熔解温度结合检测目的片段, 与单一探针检测单一片段相比, 此法可利用极少的探针检测较多的目的片段。此外, Real-time PCR 技术可以帮助积累大量有关病原体核酸数量与感染性疾病发生、发展和预后之间关系的资料, 从而形成感染性疾病的临床分子诊断。

参考文献

- 许琰,丛喆,魏强. 实时荧光定量 PCR 的研究进展及应用[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(2): 155~158.
- 王学波,李建远. 实时荧光定量 PCR 技术在医学诊断中的应用[J]. 中外医学研究, 2010, 8(9): 28~29.
- 汪复. 2006 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(1): 1~9.
- 孟茹,陈创夫,张辉,等. 布氏杆菌和结核杆菌二重实时荧光定量

- PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(8): 1012-1017.
- [5] 苏明权, 杨柳, 马越云, 等. 实时荧光定量 PCR 检测金黄色葡萄球菌方法的试验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 794-796.
- [6] Morozumi M, Ito A, Murayama SY, et al. Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients[J]. Can J Microbiol, 2006, 52(2): 125-129.
- [7] Gullberg K, Storm M, Bondeson K. Simultaneous detection of *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by use of molecular beacons in a duplex real-time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 727-731.
- [8] Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, et al. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(9): 2879-2883.
- [9] Bayram A, Kocoglu E, Balci I, et al. Real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples from patients with community-acquired pneumonia [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2006, 39(6): 452-457.
- [10] Seputiené V, Vilkočaité A, Armalyt J, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using double duplex real-time PCR and dye Syto 9[J]. Folia Microbiol (Praha), 2010, 55(5): 502-507.
- [11] Abdeldaim GM, Stralin K, Korsgaard J, et al. Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*[J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 310.
- [12] McCulloch E, Lucas C, Ramage G, et al. Improved early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population[J]. J Cyst Fibros, 2011, 10(1): 21-24.
- [13] Hardegen C, Messler S, Henrich B, et al. A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2010, 8: 1-6.
- 综述 •
- crob, 2010, 9: 5.
- [14] Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, et al. Detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(5): 1752-1757.
- [15] Lin S, Wang X, Zheng H, et al. Direct detection of *Campylobacter jejuni* in human stool samples by real-time PCR[J]. Can J Microbiol, 2008, 54(9): 742-747.
- [16] Nga TV, Karkey A, Dongol S, et al. The sensitivity of real-time PCR amplification targeting invasive *Salmonella* serovars in biological specimens[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 125.
- [17] 杨俊超, 杜亚平, 徐德顺. 实时荧光定量 PCR 法与常规 PCR 法及细菌培养法检测沙门菌的比较[J]. 浙江预防医学, 2009, 21(11): 92-93.
- [18] 陈丽, 李红海, 鲁勇, 等. 实时荧光定量 PCR 检测阴道加德纳菌的方法与应用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(5): 286-289.
- [19] 陈暖, 彭学宏, 李粉莲. 实时荧光定量 PCR 技术对淋球菌感染的诊断价值[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2008, 7(1): 29-30.
- [20] 许菁. 实时荧光定量 PCR 法检测 NG、CT 和 UU 的临床意义[J]. 实用预防医学, 2008, 15(6): 1967-1968.
- [21] Lehmann LE, Hauser S, Malinka T, et al. Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by SeptiFast real-time PCR[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17146.
- [22] Smythe LD, Smith IL, Smith GA, et al. A quantitative PCR (Taq-Man) assay for pathogenic *Leptospira* spp[J]. BMC Infect Dis, 2002, 2: 13.
- [23] 郭强, 高志祥, 张军东, 等. 实时荧光定量 PCR 快速鉴定五种常见念珠菌[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(3): 205-206.
- [24] Chakravorty S, Aladegbami B, Burday M, et al. Rapid Universal identification of bacterial pathogens from clinical cultures by using a novel sloppy molecular beacon melting temperature signature technique[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(1): 258-267.

(收稿日期: 2012-11-20)

C-erbB-2 基因在消化道肿瘤研究中的进展

侯振江 综述, 侯建章 审校

(沧州医学高等专科学校, 河北沧州 061001)

关键词: 食管肿瘤; 胃肿瘤; 肝肿瘤; 胰腺肿瘤; 基因, C-erbB-2

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)09-1116-04

C-erbB-2 是目前研究较多的癌基因之一, 属于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的家族成员, 其编码相对分子质量为 185 000 的跨膜糖蛋白与 EGFR 相似, 具有酪氨酸激酶活性, 与配体结合后激活蛋白激酶活性, 促进细胞的分裂、增殖^[1]。C-erbB-2 作为一种细胞来源的原癌基因, 正常情况下处于非激活状态, 当受到体内、外某些因素作用时被激活, 其结构改变、扩增或过表达会促进细胞有丝分裂、DNA 合成增加, 使某些不正常细胞的独立生长能力失控, 加快细胞增殖, 导致细胞生长异常, 从而转化为肿瘤细胞^[2]。研究表明, 肿瘤患者 C-erbB-2 基因扩增或过度表达与肿瘤转移、病

理分型、临床分期和预后相关。本文就 C-erbB-2 基因在消化道肿瘤研究中的进展概述如下。

1 食管癌

食管癌患者 C-erbB-2 阳性表达率的结果差异较大。有研究报道, 食管鳞癌患者 C-erbB-2 蛋白过表达率为 18%; 食管癌患者 C-erbB-2 阳性表达率为 50.8%, 与肿瘤分级、浸润、淋巴结转移和预后有关。贵永贤等^[3]报道, 早期食管癌 C-erbB-2 表达阳性率(35.3%)显著高于食管上皮异型增生的表达率(7.5%), 并与肿瘤的分化程度和分级密切相关。符宝敏等^[4]报道, I、II、III 级食管癌患者 C-erbB-2 的表达率分别为 50%、