

两种定量聚合酶链反应方法检测 CK20 mRNA 表达的比较

Comparison of Two Kinds of Quantitative Polymerase Chain Reaction to
Detecting Expression of CK20 mRNA // XU Lan

徐 兰 (辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042)

摘 要: [目的] 比较两种荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测结肠腺癌细胞系中 CK20 mRNA 的表达。[方法] 分别用 TaqMan 探针和 SYBR Green I 荧光染料作为荧光指示剂, 检测 CK20 mRNA 在结肠腺癌细胞系中的表达水平, 比较两种检测模式的差异。[结果] 两种检测模式的检测结果均显示结肠腺癌细胞中有 CK20 mRNA 的表达, TaqMan 荧光定量方法检测出 CK20 mRNA 的表达量高于 SYBR 实时定量 PCR, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。[结论] 两种荧光定量聚合酶链反应均能检测出结肠腺癌中 CK20 mRNA 的表达, 且 TaqMan 荧光定量方法检出 CK20 mRNA 的表达量高于 SYBR 实时定量 PCR。

关键词: 荧光定量 PCR; TaqMan 探针; SYBR GREEN; CK20; 结肠肿瘤
中图分类号: R735.3*5 **文献标识码:** B
文章编号: 1671-170X (2013) 12-0995-02
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.12.B019

细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 属于 I 型细胞角质蛋白的一种 (I 型细胞角质蛋白包括角质蛋白 10~20), 不与其他细胞角质蛋白单抗发生交叉反应, 在原发及转移的结直肠癌中均呈阳性。CK20 在正常的血液、骨髓及淋巴结中不表达, 有肿瘤转移时 CK20 可被检出。因此, CK20 mRNA 可作为结直肠癌患者血或骨髓中肿瘤细胞转移的生物标志物。

实时荧光定量 (PCR) 技术作为检测基因表达的最简便易行的手段, 在科研和临床上都已得到普遍的应用。通常使用的标志物有 TaqMan 探针和 SYBR GREEN I 荧光染料, 现用两种检测模式同时检测 CK20 mRNA 在结肠腺癌细胞系中的表达, 并进行比较。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Trizol (Invitrogen)、AMV 逆转录酶、SYBR[®] Green PCR Master Mix 和 TaqMan[®] PreAmp Master Mix (ABI 公司) ABI7700 型荧光定量 PCR 仪。本研究采用荧光定量 PCR 技术, 使用 TaqMan 探针和 SYBR GREEN 染料两种检测模式 (Table 1), 检测结肠腺癌细胞系中 CK20 mRNA 的表达。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的制备

共收取 10 种冻存的结肠腺癌细胞系, RNA

通讯作者: 徐 兰, 主任检验师, 硕士; 辽宁省肿瘤医院 输血科, 辽宁省沈阳市大东区小河沿路 44 号 (110042); E-mail: 1173372417@qq.com
收稿日期: 2013-11-04

提取应用异硫氰酸—酚—氯仿一步法^[1]。

1.2.2 cDNA 的合成

Primer (Oligo dT) 1 μ l, 0.1 μ g/ μ l 总 RNA 5 μ l, DEPC 水 4 μ l, 65 $^{\circ}$ C 5min, 置于冰上, 加入下列缓冲液: 5 $\times$ Buffer 4 μ l, 0.1mol/L DT 1 μ l, RNaseout 1 μ l, 10mol/L dNTP 2 μ l, Thermo-script 1 μ l, DEPC 水 1 μ l, 50 $^{\circ}$ C 60min, 85 $^{\circ}$ C 5min, 加入 RnaseH 1 μ l, 37 $^{\circ}$ C 20min, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 检测体系与反应条件

SYBR GREEN 模式: 50 μ l 体系包括 ABI 2 $\times$ SYBR GREEN Master mix 25 μ l, F-P 1 μ l, R-P 1 μ l, cDNA 1 μ l, DEPC 水 22 μ l, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5s 变性, 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 40s, 50 个循环。

TaqMan 探针模式: 50 μ l 体系包括 ABI 2 $\times$ TaqMan[®] PreAmp Master Mix 25 μ l, F-P 1 μ l, R-P 1 μ l, cDNA 1 μ l, probe 1 μ l, DEPC 水 22 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5s 变性, 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 40s, 50 个循环。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计学分析, 采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

将 10 种结肠腺癌细胞的 cDNA 分别用两种 PCR 方法检测 CK20 mRNA, 检测结果显示每种结肠腺癌细胞中 CK20 mRNA 都有不同程度的表达, 说明 CK20 mRNA 在结肠癌细胞中均有表达。而且结果显示 TaqMan 荧光定量方法检测 CK20 mRNA 的表达量高于 SYBR 实时定量 PCR ($t=15.032$, $P=0.001$) (Table 2)。

3 讨 论

CK 是上皮细胞骨架的组成部分, 表达于正常上皮以及

Table 1 Primer sequence

Mode	Primer sequence	Tm($^{\circ}$ C)
TaqMan	F-P: 5'-GCCACTACACTGCATAGTGCATATTACAGACAA-3'	58.9
	R-P: 5'-GCAGGACACACCGAGCATTT-3'	58.4
	Probe: 5'-TGAGCATCCTTAATCTGACTTCGCAGC-3'	
SYBR GREEN	F-P: 5'-CAGACACACGGTGAAGTATGG-3'	58.9
	R-P: 5'-GATCAGCTTCCACTGTTAGACG-3'	58.6

Table 2 Comparison of two kinds of quantitative PCR to detect expression of CK20 mRNA

Cell	SYBR GREEN	TaqMan probe
caco2	1.20×10 ³	1.70×10 ⁴
LS1034	1.80×10 ⁴	3.40×10 ⁶
sw403	2.90×10 ³	3.80×10 ⁵
sw1463	7.80×10 ⁴	6.80×10 ⁶
ls174	2.80×10 ³	1.10×10 ⁵
RCM	8.00×10 ⁴	1.60×10 ⁷
sw480	1.40×10 ³	3.40×10 ⁴
Ls511	2.10×10 ²	8.70×10 ⁶
HCT8	6.50×10 ²	5.00×10 ⁵
HCT29	7.10×10 ⁴	3.40×10 ⁶

上皮源性原发及转移的肿瘤细胞。CK 至少有 20 种, 其中 CK20 表达范围较特异, 仅局限在胃肠上皮细胞, 几乎全部胃肠道肿瘤以及在侵袭、转移、扩散到其他组织器官时, CK20 均保持稳定表达, 在正常骨髓、血液和淋巴结中均无表达。CK20 的分布特点使其成为良好的肿瘤标志物, 因而成为肿瘤分子生物学领域的一个研究热点^[2,3]。

实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR) 技术是在 PCR 定性技术基础上发展起来的用不同荧光定量核酸的技术, 具有敏感性高、重复性好、速度快、操作简便和污染少等优点。在生物医学领域有着广泛的应用前景。FQ-PCR 技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积, 实时监测整个 PCR 进程, 最后通过参照标准曲线对反应体系中未知模板进行定量分析的方法。

FQ-PCR 最常用的方法有 TaqMan 探针和 SYBR GREEN I 荧光染料两种方法。

TaqMan 探针法是高度特异的定量 PCR 技术, 其核心是利用 Taq 酶的 3'→5' 外切核酸酶活性, 切断探针, 产生荧光信号。由于探针与模板是特异性结合, 所以荧光信号的强弱就代表了模板的数量。具有高适应性和可靠性, 实验结果稳定重复性好, 特异性更高。适用于扩增序列专一体系的检测和样品中靶基因含量过低的定量 PCR 检测。

SYBR GREEN I 是一种只与 DNA 双链结合的荧光染料。当它与 DNA 双链结合时, 发出荧光; 从 DNA 双链上释放出来时, 荧光信号急剧减弱。因此, 在一个体系内, 其信号强度代表了双链 DNA 分子的数量。灵敏度高, 通用性好, 不需要设计探针, 方法简便、省时, 价格低廉。在国内外科研中普遍使用。

国外文献报道用 TaqMan 探针和 SYBR GREEN 荧光定量 PCR 两种方法检测登革热病毒并进行了比较, 结果显示两种方法都具有良好的灵敏度和特异性, 成功检测出了登革热病毒。两种方法的检测结果一致, 并且由于所有实验步骤在同一管中进行, 增加了实验的稳定性, 避免了污染^[4]。

近几年来不断有报道, 用荧光定量 PCR 方法检测结直肠

癌患者外周血及淋巴结中 CK20 mRNA 的表达, 并结合临床和病理等资料, 分析患者的肿瘤转移危险因素, 并指导患者的治疗和评估预后。研究表明结直肠癌患者血液中 CK20 mRNA 的表达与肿瘤分期及浸润转移有关, 而且在 I、II 期患者的外周血中也有 CK20 mRNA 的表达, 表明有些原发病灶较局限的早期结直肠癌患者, 血液中已经有微转移的存在^[5,6]。

本文分别采用上述两种方法检测了 10 种结肠腺癌细胞系中 CK20 mRNA 的表达, 两种方法均检出了 CK20 mRNA, 而且检测结果显示 Taqman 荧光定量方法检测出的表达量高于 SYBR GREEN。SYBR 定量 PCR 虽然容易产生非特异信号, 但各种 DNA 的溶解曲线和熔点温度不同, 很容易区别非特异性扩增。在检测多个基因的定量表达时, 应用 SYBR GREEN 相对于 TaqMan 而言, 可以节省经费, 当然提高荧光染料检测特异性的前提是优化好实验的反应条件, 避免非特异性荧光的检测。

综上所述, CK20 mRNA 的检测对于判断结直肠癌患者微转移发生情况, 评估临床治疗效果及对患者的预后有重要的意义。

参考文献:

- [1] Chomczynski P, Sacchi N. The Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 581-585.
- [2] Wang JY, Wu CH, Lu CY, et al. Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis[J]. World J Surg, 2006, 30(6): 1007-1013.
- [3] Ohlsson L, Hammarström ML, Israelsson A, et al. Biomarker selection for detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR[J]. Br J Cancer, 2006, 95(2): 218-225.
- [4] Gomes-Ruiz AC, Nascimento RT. SYBR green and TaqMan real-time PCR assays are equivalent for the diagnosis of dengue virus type 3 infections[J]. J Med Virol, 2006, 78(6): 760-763.
- [5] Yan DG, Zhang RY, Zhen YH, et al. Expression of CK20 mRNA in blood of patients with colorectal cancer [J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2011, 18(2): 164-167. [颜登国, 张汝一, 甄运寰, 等. 结直肠癌患者血液中 CK20 mRNA 的表达[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(2): 164-167.]
- [6] Shen T, Li YF, Li Q. CK20 and peripheral blood micrometastasis of colorectal cancer[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2011, 16(10): 632-634. [沈焘, 李云峰, 李强. CK20 和结直肠癌患者外周血微转移[J]. 胃肠病学, 2011, 16(10): 632-634.]