

荧光定量 PCR 技术及其应用(二)

3 应用

由于 FQ-PCR 具有高灵敏性, 高特异性和高精确性的特点, 目前, 该项技术已被应用于病原体测定、肿瘤基因检测、免疫分析、基因表达、突变及其多态性的研究等多个领域。

3.1 病原体测定

由于 PCR 技术的问世, 使得病原体检测能够快速而方便的进行。但由于其高灵敏性, 实验操作很容易受到污染而出现假阳性。只要有微量病原体存在, PCR 扩增即可为阳性结果, 但并不能作为诊断依据, 只有当一定数量的病原体存在时才有临床意义, 因此结模板定量显得特别重要。常规 PCR 由于不能定量而限制了其应用, 然而, PE 公司研制的 FQ-PCR 技术给解决这一问题提供了可能。目前该技术已经应用于丙肝病毒、人类乳头瘤病毒、结核杆菌和食品中大肠杆菌等许多病原体的检测研究。Morris 等用 FQ-PCR 对黑猩猩丙型肝炎动物模型和临床丙型肝炎患者血清中丙肝病毒 (HCV) 进行了研究。测定显示, 可测得的样品浓度相当于每毫升 13 个基因组。与巢式 PCR 比较显示, FQ-PCR 有着与巢式 PCR 相同的敏感性。另外, 还对 48 例临床丙型肝炎病人血清样品进行了测试, 32 例样品两种检测方法均为阳性, 10 例均为阴性; 另有 6 例用两种方法测定的结果不一致。该 6 例样品又让第三个实验室用巢式 PCR 方法重新测定, 其结果与 FQ-PCR 测定的结果一致率为 100%。FQ-PCR 技术在保持巢式 PCR 高度敏感性的同时又能提高效率, 因此可作为一种检测 HCV 的有效方法。同时, 由于 FQ-PCR 可以测出血清中病原体浓度, 故可给药物治疗及疗效观察提供参考依据。与宫颈癌及其癌前病变有关的人类乳头瘤病毒 (HPV) 有多种类型, 以 HPV-16、18、31、33、35 等类型危险性最高。Swan 等 1997 年用 FQ-PCR 技术对子宫阴道灌洗标本进行了研究。

他们发现, 由于荧光探针的应用, 对各型 HPV 的检测变得十分方便和准确。由于 HPV-16 的特异引物可以和 HPV-66 的模板 DNA 发生错配, 用一般 PCR 方法扩增时, 如有 HPV-66 存在, 即可扩增出 HPV-66 片段而发生误诊, 但

是 HPV-16 特异探针的应用使 HPV-66 在 TaqMan 系统中不能扩增。因此，FQ-PCR 对不同亚型的病毒检测具有高度特异性。同时也发现 FQ-PCR 具有高度敏感性，用一般 PCR 方法检测不到的 HPV 模板浓度在 TaqMan 系统中却可检测到。对于 HPV-16、18、31、33、35 类型敏感高达到每 100~1000 个细胞中含有一个拷贝的 HPV 基因组，平均每 300 个细胞中含有一个拷贝的 HPV 基因组。

以前常规检测大肠杆菌的方法，都是采用多种选择性培养基培养分离法，对产志贺氏毒素的大肠杆菌（SLTEC）缺乏特异性，因此这种菌株的检测又费时又困难。后来又有应用抗体的免疫学方法和核酸序列测定的生化方法及以 DNA 扩增为基础的 PCR 方法等，都因为繁琐，需要大量的 PCR 后处理过程及不能对本标本定量而受到限制。美国 Witham 等 1996 年将 FQ-PCR 技术应用于牛肉中大肠杆菌志贺氏毒素基因的检测研究。针对不同血清变异型的大肠杆菌，他们设计应用不同的探针，从而提高了实验特异性。他们同时还对探针相对于引物的位置、反应液中探针浓度、镁离子浓度等影响实验的因素进行了优化实验，以提高实验的准确性和精确性。由于 TaqMan 系统可以一次测量 96 管样品，还可对模板进行准确定量，又不需要进行电泳及 EB 染色后处理过程，实际应用方便，从而提高了实验的参考价值和应用价值。因此该实验方法是食品检测方面的一个突破。此外，加拿大 Chen 等 1997 年也把 FQ-PCR 技术用于食品中沙门氏杆菌的检测研究。在抗痨治疗开始后，结核病人痰中可持续存在有结核杆菌，为了研究结核病人痰标本 DNA 定量结果是否与有活力的结核杆菌数量相符合并监测治疗反应，1998 年美国 Desardin 等用 FQ-PCR 和竞争性 PCR 两种方法定量检测治疗期间连续收集的结核病人痰标本，结果显示两种方法有较好的重复性和准确性。痰中结核杆菌 DNA 定量结果与抗酸染色显微镜下计数的结果一致。

3.2 肿瘤研究

意大利 Gelmini 等用 FQ-PCR 技术检测乳腺癌标本 c-erbB-2 基因拷贝数目变异情况。他们以 β -肌动蛋白基因为参照探索最佳实验条件，当扩增循环数在 28~31 之间时， ΔRQ 与模板 DNA 有着较好的剂量依赖关系。他们在此条件下扩增了 c-erbB-2 基因和 β -球蛋白基因，发现 ΔRQ 都与各自的模板 DNA 浓度存在着线性关系，虽然二者斜率不同，但是各个实验浓度下二

者的 ΔRQ 之比却是恒定的。说明尽管二者发光效率不同，却不影响定量效果。为了检验 FQ-PCR 的准确性和对不同基因拷贝数的分辨率，他们将 c-erbB-2 基因的 DNA 样本用正常胎盘 DNA 做不同倍数稀释后进行实验，测得的结果与期望值高度相关 ($r=0.997$)。他们将实验数据与 Southern 印迹结果和已报告的竞争性 PCR 结果比较都显示高度相关性 ($n=25$, $r=0.94$, $P<0.01$)。1998 年法国 biece 等用 fq-pcr 测定了 108 例乳腺癌标本。他们选择扩增频率较高的 myc、ccnd1 和 erbb2 基因进行扩增，在 108 例标本中，发现 10% 的 myc 基因、23% 的 ccnd1 基因和 15%>

3.3 基因表达研究

由于 TaqMan 系统及荧光探针的应用，对 mRNA 的检测显得较以前常用的方法如 Northern 印迹、RT-PCR 定量法要方便、快速、准确得多。为了探测骨髓基质血小板生成因子 (TPO) 在巨核细胞生成过程中的作用以及血小板生成因子在特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、再生障碍性贫血 (AA) 和特发性血小板多症 (ET) 等疾病过程中的病理生理意义，日本 Hirayama 等用 TaqMan EZ RT-PCR 试剂盒在 ABI7700 反应系统测定了正常人和 ITP、AA、ET 病人的骨髓基质细胞 TPO mRNA 水平，又用 ELISA 方法测定了骨髓和末梢血的 TPO 浓度。结果显示 ITP 和 AA 病人 TPO mRNA 水平明显升高，而 ET 病人的 TPO mRNA 水平则正常，经类固醇治疗后 ITP 病人 TPO mRNA 水平下降；骨髓 TPO 的浓度与其 mRNA 水平有相关性；在正常人和 ITP 病人，TPO mRNA 表达水平与巨核细胞计数也有相关性。这个实验对阐明 TPO 的作用提供了依据。日本 Shimokawa 等也用 FQ-PCR 技术对鼠成肌细胞系 C2C12 中肌肉调节因子的表达水平及动态变化进行了研究。

3.4 免疫组份分析

对免疫 T 细胞群体 V- β 组份进行分析是研究健康和疾病免疫应答反应的重要手段，可通过流式细胞法或 RFQ-PCR 法来进行。流式细胞法是通过细胞群体进行直接而方便的 V- β 表达方面的研究，但需要一整套单克隆抗体和大量细胞来进行染色分析，而且人类 V- β 特异性抗体尚不完备，因此该方法有许多不便之处。如果用 FQ-PCR 方法，即不需要大量细胞，引物设计也很方便，而且已有多种定量方法，包括锚式 PCR 法、半定量 PCR 法、竞争性 PCR 法等，但都因 PCR 产物的后处理过程需凝胶电泳、EB 染色和光密度测

量等既费时，又降低了准确性，还增加了污染机会，使得 FQ-PCR 的应用受到限制。1997 年 Lang 等用 FQ-PCR 技术进行实验，从而避免了这些问题，他们在反应系统中引入荧光探针，将下游引物与探针固定，然后，针对不同的 V- β 成份，选用特异的上游引物进行扩增，再对反应中产生的荧光信号进行处理，即可获得各个成份的数据。

3.5 基因突变及多态性的研究

美国 Ibrahim 等 1997 用 FQ-PCR 技术对正常痘病毒多态性进行了研究。他们采用一对可与正常痘病毒血凝素基因的某一 DNA 片段结合的引物，并设计两个有单核苷酸差异的寡核苷酸探针，用荧光标记后进行实验，顺利地把有此单核苷酸差异的两个痘病毒株进行鉴定。该技术也可用于猴痘和病毒 DNA 疫苗的单核苷酸变异多态的研究。

3.6 其他方面

日本 Isono 利用 FQ-PCR 进行叶绿体成熟度与其基因组拷贝数关系的研究。他们以核基因 Cab 作为内参照，进行叶绿体基因 rbc1 拷贝数测定，结果发现子叶出现以后，叶绿体基因拷贝数显著增加，进而把叶绿体的基因拷贝数增加与光诱导的叶绿体成熟过程联系起来。1998 年美国 Higgins 等还建立起一套用荧光探针检测鼠疫纤溶酶原激活基因 (pla) 的实验方法。

4 结语

综上所述，FQ-PCR 作为一种核酸定量技术，应用较多且较成熟的主要是在病原体检测方面，其优越性在此方面也得以充分体现。因此将该项技术进一步开发应用于临床，具有很大潜力。但是在遗传病和肿瘤研究方面，尤其是基因表达的研究，该技术目前应用的还较少，在此方面加强研究应用，将会有广阔的前景。