

复合式蝎形引物实时定量检测端粒酶延伸产物

黄艳萍^{a, b} 孔德明^a 张晓滨^a 沈含熙^{*, a} 宓怀风^{a*}

(^a 南开大学化学学院高分子功能材料吸附与分离国家重点实验室 天津 300071)

(^b 天津医科大学药学院 天津 300070)

摘要 针对端粒酶延伸产物中靶基因序列的特殊性,开发了一种可产生荧光的复合式蝎形引物,该引物的 5' 端带有可特异性检测靶基因的探针序列,PCR 阻断剂将其与引物序列连接.当复合式蝎形引物延伸,探针序列与同一分子内的靶基因杂交,荧光信号产生.运用该技术,建立了定量检测端粒酶延伸产物的实时荧光 PCR 方法.该法可在快速 PCR 循环条件下,对 $0.15 \sim 1.50 \times 10^3$ amol/ μ L 范围内的样品进行定量检测,线性相关系数 $R^2 = 0.9992$.该法操作简便,无需 PCR 后额外的检测步骤.

关键词 复合式蝎形引物,端粒酶,实时检测,聚合酶链式反应(PCR)

Real-time Quantitative Assay of Telomerase Product Using the Duplex Scorpion Primer

HUANG, Yan-Ping^{a, b} KONG, De-Ming^a ZHANG, Xiao-Bin^a

SHEN, Han-Xi^{*, a} MI, Huai-Feng^a

(^a State Key Laboratory of Functional Polymer Materials for Adsorption and Separation,
Chemical School, Nankai University, Tianjin 300071)

(^b College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070)

Abstract To specific target sequence of telomerase product, a fluorogenic duplex scorpion primer has been designed. A probe element attached at the 5'-end of it can specifically detect target gene. A PCR blocker—carbon chain with C_3 group, whose length is as the same as a base pair, is joined between the primer sequence and the probe in the duplex scorpion primer. A fluorescence signal is only produced when the probe sequence is hybridized with the target gene in the extended duplex scorpion primer. Using this technology, a novel method has been developed for quantitative assay of telomerase product by real-time PCR. Accurate quantitative assay can be achieved with sample detected within $0.15 \sim 1.50 \times 10^3$ amol/ μ L under fast cycling conditions. The linear correlation factor $R^2 = 0.9992$. The method is specific, simple and without post-PCR manipulation.

Key words duplex scorpion primer, telomerase, real-time assay, polymerase chain reaction (PCR)

端粒酶是一种独特的具有逆转录酶功能的核糖核蛋白酶,主要功能是合成端粒序列(TTAGGG)并维持端粒序列长度(10~50 kb).由于其在良性肿瘤和正常细胞中几乎无活性,而在大多数恶性肿瘤细胞中均能检测到其活性,因此,端粒酶被公认为是目前最广谱的恶性肿瘤的预警标志物,其活性对大多数恶性肿瘤的诊断均具有较高的敏感性和特异性^[1].

检测端粒酶活性的“端粒重复扩增法”(Telemetric repeat amplification protocol, TRAP)^[2],是评估端粒酶是否为肿瘤标志物的重要手段.最初的 TRAP 法分为转录和聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)两步.首先,端粒酶以自身 RNA 的片段为模板,在适宜的寡核苷酸链的末端添加端粒重复序列,生成端粒酶延伸产物;随后,对延伸产物进行 PCR

* E-mail: hxshen@eyou.com

Received September 24, 2003; revised December 22, 2003; accepted January 8, 2004.

国家自然科学基金(No. 20075012)资助项目.

扩增,扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后放射自显影检测.由于 TRAP 法中端粒酶延伸产物经过 PCR 大量扩增,因此灵敏度很高.但它存在放射性污染、无法定量及操作时间长等缺点.以后又出现了各种改进方法,如杂交保护法^[3]、荧光染料法^[4]、能量转移引物法^[5]、放射性膜过滤测定法^[6]以及无机焦磷酸盐检测法^[7].然而,这些技术都需要在 PCR 后进行额外检测,同时仍然不能避免 PCR 产物的交叉污染问题.

荧光定量 PCR 技术是近年来出现的一种新技术,它将基因扩增、分子杂交和光学检测结合于一体,使扩增和产物分析的全过程均在单管封闭条件下进行,并通过微机控制进行实时(real-time)动态检测及自动报告分析结果.该技术从根本上解决了常规 PCR 的交叉污染和无法准确定量的问题.一般来说,荧光定量 PCR 技术需在常规扩增体系中,加入一个两端带有荧光标记的寡核苷酸探针.而在 TRAP 法中,由于 PCR 反应的下游引物是端粒重复序列的互补序列,可结合在端粒重复序列的任意部位,导致了 PCR 产物长度与端粒酶延伸产物长度不一致(变长或变短),这种情况给常规均相荧光探针的设计增加了相当大的难度.若单纯以此重复序列为靶设计探针,则在探针与靶基因杂交时,释放的报告荧光基团与端粒酶延伸产物之间不能呈现正比关系,因此无法进行定量检测.为了解决这个问题,本课题组在开发了两类新探针(TaqMan-分子灯标^[8]及单标记探针引物^[9])的基础上,首次开发出了一种可用于端粒酶延伸产物的新型的探针——复合式蝎形引物(Duplex scorpion primer, DSP),该引物将探针序列固定在引物末端,利用分子内杂交发出荧光,使荧光信号与 PCR 产物形成一对一的关系.在本研究中,我们将其与实时荧光 PCR 仪联用,顺利地实现了对合成端粒酶延伸产物的实时定量检测.

1 实验部分

1.1 仪器

GeneAmp^R 5700 型荧光定量 PCR 仪(美国,ABI 公司),恒压恒流 DF-D 型电泳仪(北京东方特力科贸中心),凝胶成像系统(英国,UVI tec 公司),RF-540 型荧光分光光度计(日本,岛津),16.40-F-Q-10 型微量荧光池(英国,Starna Brand).

1.2 试剂

DSP 由探针引物(Probe Primer, PP): FAM-5'-[CCCTAA]₃-阻断剂-AATCCGTCGACGAGGTT-3 (阻断剂为三个碳原子的碳链,带下划线的为探针序列)与猝灭探针(Quencher probe, QP): 5'-[TTAGGG]₃-DABCYL 所组成,由上海申友生物技术有限责任公司合成.上游引物:5'-AATCCGTCGACGAGGTT-3,下游引物:5'-CCGCGG[CTTACC]₃CTAACC-3(划线部分为错配的碱基,这三个错配碱基的引入是为了避免引物二聚体的 PCR 产物对结果造成的影响)^[10]以及人工合成的寡核苷酸(端粒酶延伸产物)R5: 5'-AATCCGTCGACGAGGTTAG[GGTTAG]₄-3,由上海生物工程技术有限公司合成,其它生物试剂亦购自于该公司.

1.3 步骤

1.3.1 PCR 反应条件

每管反应液包括 2.5 μ L 的 10 \times TRAP 缓冲溶液[200 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.3), 10 mmol/L EGTA, 630 mmol/L KCl, 0.05% Tween-20, 1 mg/mL BSA], 0.13 μ L dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 各 10 mmol/L), 2U Taq 聚合酶, 1.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 1.4 μ L 上游引物(75 μ g/mL)或 0.5 μ L PP/2.5 μ L QP (25 μ mol/L), 2.8 μ L 下游引物(36 μ g/mL)和 2 μ L 不同浓度 R5,最后加水至总体积为 25 μ L. 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C, 3 min, 1 个循环;94 $^{\circ}$ C, 30 s, 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 轮流 27 个循环.

1.3.2 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

取 25 μ L 的 PCR 产物,进行 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压 130 V) 2~3 h 至溴酚兰染料泳带移动至凝胶前沿,电泳结束后用溴化乙锭(ethidium bromide)染色,于凝胶成像系统上观察并拍照.

1.3.3 荧光熔融曲线

反应液总体积为 25 μ L,由 TRAP 缓冲溶液,PP, QP 及 MgCl₂(浓度见步骤 1.3.1)组成.熔融曲线在荧光定量 PCR 仪上完成.条件为:95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 20 s,从 45 $^{\circ}$ C 到 80 $^{\circ}$ C 缓慢升温 20 min,在此升温阶段连续检测荧光.

2 结果与讨论

2.1 反应原理

本实验是在 Kim 等^[10]建立的改进版 TRAP 法基础上设计 DSP,并以人工合成的寡核苷酸(R5)作为模板,建立了 DSP 实时定量检测端粒酶延伸产物的新方法.R5 相当于上游引物在端粒酶作用下延伸,产生的带有 5 个端粒重复序列的端粒酶延伸产物.实验中,在不改变其它条件的情况下,将 PCR 扩增体系中的上游引物用 DSP 代替.该引物由两条单标记的寡核苷酸链组成,其中一条为 PP 链,该链在上游引物的 5' 端加入标记有荧光基团 FAM 的探针部分,探针序列为可检测端粒重复序列的[CCCTAA]₃^[11].引物序列与探针序列之间用 PCR 阻断剂(PCR-blocker)(本文选用的是三个碳原子的碳链,其长度与一个碱基相当)连接,以阻止 PCR 产物沿探针序列延伸;另一条为 QP 链,由标记有猝灭基团 DABCYL 的探针互补序列组成,用于猝灭 PP 的荧光.DSP 具有引物和探针的双重功能.在对端粒酶延伸产物(图 1, A)进行 PCR 扩增时,下游引物首先从反向延伸得到模板(图 1, B).然后 DSP 在 Taq 酶的推动下沿该模板延伸,形成带有探针序列的扩增产物(图 1, C).在 PCR 荧光检测步骤中,DSP 的探针序列与同一分子内的靶基因以分子内杂交的形式结合在扩增产物的内部(图 1, D).我们使用 Michael Zuker 的“mfold(版本 3.1)”软件^[12]分析,发现探针序列与同一分子内最靠近它的端粒重复序列杂交,并倾向于形成带一个长尾巴的分子灯标(molecular beacon)结构,这种稳定的茎环结构导致 PP 链与

QP 链彻底分离, 荧光基团发出荧光. 由于每个 PCR 扩增产物带有一个荧光探针, 因此无论端粒酶延伸产物上带有多少个端粒重复序列, 一个延伸产物只能对应一个荧光基团, 从而解决了实时检测端粒酶延伸产物的定量问题.

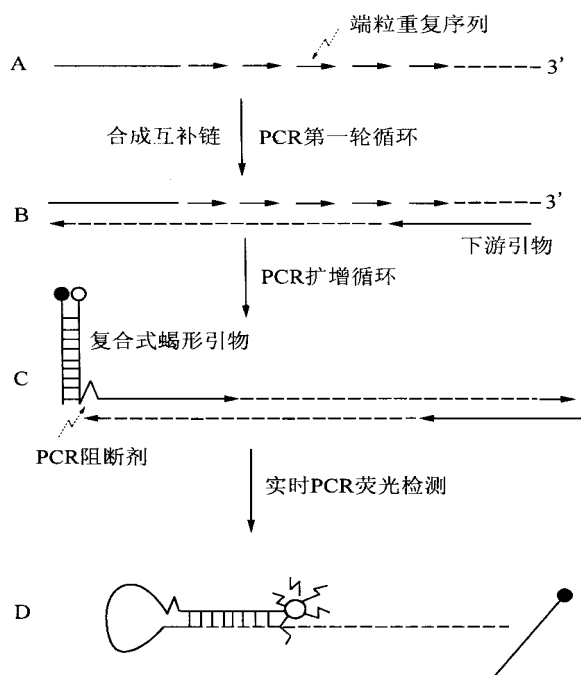


图1 DSP的工作原理
Figure 1 Assay principle of DSP

2.2 DSP的熔融曲线

从图2的荧光熔融曲线可以看出, 当溶液温度升高时, 所设计的DSP具有双链核酸的熔融特点. 即低温时, QP与PP中的探针部分相互杂交, 使得荧光基团与猝灭基团靠近, 抑制了荧光的产生. 高温时, 杂交解链, 导致荧光基团与猝灭基团彻底分离, 荧光基团恢复荧光. 从对应的导数图谱可以得到, DSP的熔融温度 $T_m = 59.5$. 由此可以得出, 实时定

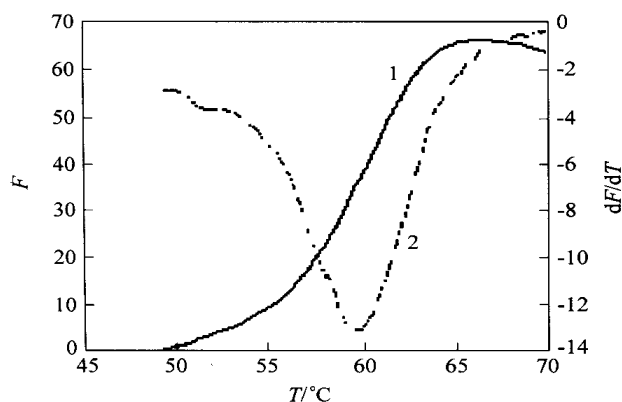


图2 DSP的荧光熔融曲线(1)及对应的导数曲线(2)
Figure 2 Fluorescence melting curve (1) and the derivative curve (2) of DSP

量PCR时, 荧光检测阶段的温度须小于此 T_m 值, 使得未参与反应的PP能充分地QP结合, 以保证DSP可以稳定存在, 从而体系的背景荧光保持在一个较低的水平上.

2.3 可见吸收光谱

我们对PP, QP及DSP的可见吸收光谱进行了考察. 结果表明, 与PP相比, DSP在荧光基团FAM的最大吸收波长495 nm处, 吸收值下降; 同时, 与QP相比, 在猝灭基团DABCYL的最大吸收波长479 nm处, 吸收值增强. 这是由于DSP中, PP与QP杂交形成的双链结构保证了荧光基团与猝灭基团紧密接触, 使得它们之间除荧光共振能量转移外, 还可通过相互碰撞发生直接的能量转移^[13]. 保证了在DSP中DABCYL对FAM保持着较高的猝灭效率, 使体系具有极低的背景荧光.

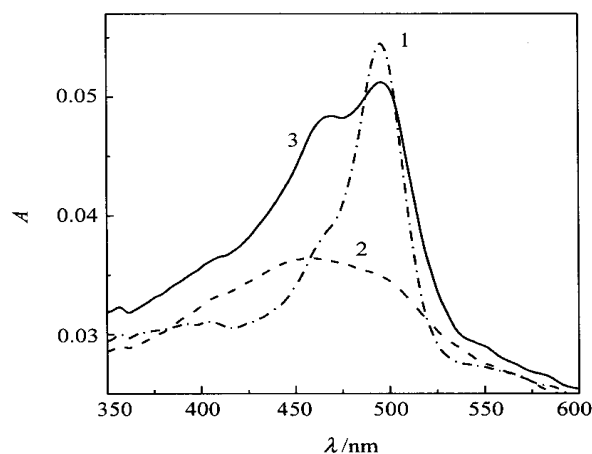


图3 DSP的可见吸收光谱
Figure 3 Absorption spectra of DSP
1—PP; 2—QP; 3—DSP

2.4 QP与PP的浓度比对猝灭效率的影响

猝灭基团对荧光基团的猝灭效率是影响荧光探针性能的重要指标之一. 猝灭效率越高, 探针的检测效果也就越好. 我们在1.5 mmol/L MgCl₂的TRAP缓冲溶液中, 固定PP的浓度为0.3 μmol/L, 加入不同浓度的QP, 在95 °C温育5 min后, 逐渐冷却至室温, 测其荧光值. 根据下列公式: $E_{\text{eff}} = [1 - (F_q - F_b) / (F_{\text{uq}} - F_b)] \times 100\%$ ^[14] 计算猝灭效率, 式中 F_{uq} , F_q 和 F_b 分别代表了PP, PP与QP以及缓冲溶液的荧光强度(表1). 从表中可以看出, 当QP与PP的浓度比 > 1时, 体系的猝灭效率始终保持在97%以上. 由于端粒酶延伸产物序列的特殊性, 所设计的探针序列与PCR下游引物序列相似. 为了避免QP与下游引物的相互作用, 影响猝灭效率. 实验中, 我们选择QP与PP的浓度比为5:1, 务使PP链与QP链充分结合, 以保证DSP具有高效的猝灭效率和良好的检测效率.

2.5 DSP与上游引物扩增产物的比较

DSP是在TRAP法上游引物的基础上构建的. 为了考察其附带的探针结构是否会影响引物的引导延伸作用, 进而影

表 1 DSP 的猝灭效率
Table 1 Quenching efficiencies of DSP

$c(\text{QP})$	$c(\text{PP})$	1 1	2 1	3 1	4 1	5 1
E_{eff}		97.2	97.3	97.6	97.6	97.8

响 PCR 扩增. 我们以 R5 为模板, 以水为阴性参照, 分别用 DSP 或上游引物对其进行 PCR 扩增, 每个模板进行两次实验, 扩增后产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳条带分析 (图 4). 从图中可以看出, 在无模板存在时, DSP 和上游引物均产生引物二聚体, 但 DSP 产生的引物二聚体条带靠下, 不干扰产物条带; 在有模板存在的条件下, 上游引物得到两条扩增产物条带 (50bp 和 56bp, 分别为下游引物结合在 R5 的 21 位碱基和 27 位碱基处的产物)^[10]. DSP 也得到了两条扩增产物条带. 说明探针序列不干扰 DSP 的延伸. 只是由于 DSP 附带的探针部分还有 18 个碱基, 因此, DSP 的扩增条带较上游引物的靠上.



图 4 上游引物 (1~4) 或 DSP (5~8) 扩增产物的凝胶电泳图

1, 2, 5, 6 以水为阴性参照; 3, 4, 7, 8 以 R5 为模板

Figure 4 Gel electrophoresis of PCR products using upstream primer (1~4) or DSP (5~8)

1, 2, 5, 6—water as reference; 3, 4, 7, 8—R5 as template

2.6 实时荧光 PCR 条件的优化

DSP 中的探针序列是以分子内杂交形式形成发夹结构而产生荧光, 该发夹结构的形成可在不到 1 μs 时间内完成^[14], 且具有较高的稳定性. 因此可以在快速循环 (即 94 0 s, 延伸温度 0 s, 检测温度 3 s, 100 个循环) 的条件下进行 PCR 扩增. 我们固定延伸温度为 60^[10], 考察了不同检测温度 (53, 50, 45) 对实时荧光 PCR 定量的影响. 结果显示, 只有当检测温度设为 45 时, 不同浓度下荧光强度随 PCR 循环数的改变才能真正符合定量 PCR 扩增规律 (图 5). 即在一定的循环数之间, 荧光强度呈现指数级改变. 在高循环数时则趋于平台, 并且起始浓度越高, 荧光信号进入指数增长阶段时所需的 PCR 循环数 (C_T) 就越少. 这是由于检测温度较高时, 未参与反应的 PP 的荧光不能完全被猝灭, 从而干扰了定量. 同时实验中还发现, 引物二聚体的信号在 40 个循环之后产生. 并在此以后, 模板量与其相应的 C_T 值不再呈线性关系. 因此, 我们选择 40 为最大循环数. 经过优化的

实时 PCR 扩增条件为: 95 3 min, 1 个循环, 94 0 s, 45 3 s, 轮流 40 个循环.

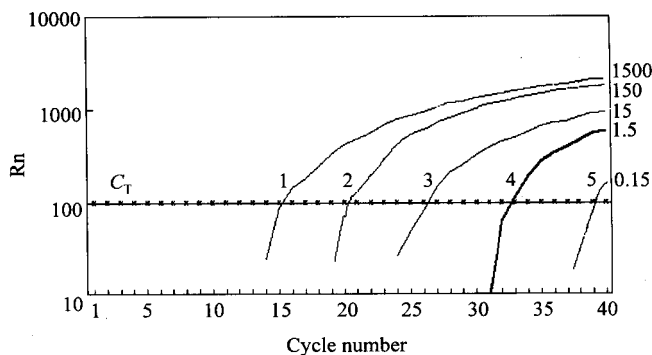


图 5 DSP 检测 R5 (amol/ μL) 的实时扩增曲线

Figure 5 Amplification plots using DSP for quantitative assay of R5 (amol/ μL)

2.7 定量检测

在优化的实时荧光 PCR 条件下, 将 R5 进行 10 倍量的连续稀释, 取 6 个浓度, 范围分别在 0.15 ~ 1.50 $\times 10^4$ amol/ μL 之间, 用 DSP 进行实时定量 PCR 检测. 结果显示, 在 0.15 ~ 1.50 $\times 10^3$ amol/ μL 范围之间, R5 的浓度与其对应的 C_T 值有良好的线性关系 (图 6), 线性相关系数 R^2 为 0.9992; 灵敏度为 0.15 amol/ μL .

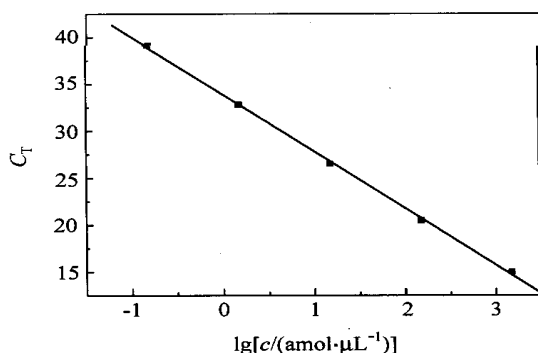


图 6 DSP 的 TRAP 法检测 R5 的标准曲线

Figure 6 Standard curve for detection of R5 using the DSP by TRAP assay

3 结论

在分子灯标的基础上, Whitcombe 等^[15,16]开发出了蝎形引物, 将杂交检测模式由分子间杂交转化为了分子内杂交, 使其更适用于 PCR 产物的快速检测. 但它没有摆脱分子灯标及 TaqMan 探针的固有局限, 即属于双标记探针, 这不仅为探针的设计与合成带来了一定的困难, 同时也极大地增加了实验成本. 为此, Solinas 等^[17]在蝎形引物的基础上又进行了改进, 开发出了单标记的复合式蝎形引物.

由于端粒酶延伸产物结构的特殊性,我们选择复合式蝎形引物对其进行实时定量检测的同时,在原有复合式蝎形引物结构的基础上,将PCR阻断剂由聚六乙二醇(HEG)改为价廉的 C_3 基团,并采用非荧光猝灭剂(DABCYL)标记猝灭探针,以降低背景.改进后的DSP实时定量PCR技术将PCR敏感性和探针的特异性相结合,能够准确、特异、敏感地对合成的端粒酶延伸产物进行定量分析,无须额外检测步骤,克服了现有检测方法存在的操作繁琐、交叉污染以及放射性危害等不足.该方法的建立为临床端粒酶活性的检测奠定了良好的基础.

本文为“纪念柳大纲先生诞辰一百周年”征文

References

- 1 Granger, M. P.; Wright, W. E.; Shay, J. W. *Crit. Rev. Oncology/ Hematology* **2002**, 41, 29.
- 2 Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science* **1994**, 266, 2011.
- 3 Hirose, M.; Abe-Hashimoto, J.; Ogura, K.; Tahara, H.; Ide, T.; Yoshimura, T. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1997**, 123, 337.
- 4 Gelmini, S.; Caldini, A.; Becherini, L.; Capaccioli, S.; Pazzagli, M.; Orlando, C. *Clin. Chem.* **1998**, 44, 2133.
- 5 Uehara, H.; Nardone, G.; Nazarenko, I.; Hohman, R. J. *Biotechniques* **1999**, 26, 552.
- 6 Szatmari, I.; Tokes, S.; Dunn, C. B.; Bardos, T. J.; Aradi, J. *Anal. Biochem.* **2000**, 282, 80.
- 7 Xu, S.; He, M.; Yu, H.; Cai, X.; Tan, X.; Lu, B.; Shu, B. *Anal. Biochem.* **2001**, 299, 188.
- 8 Kong, D.-M.; Gu, L.; Shen, H.-X.; Mi, H.-F. *Acta Chim. Sinica* **2003**, 61, 755. (in Chinese).
(孔德明, 古珑, 沈含熙, 宓怀凤, 化学学报, **2003**, 61, 755.)
- 9 Kong, D.-M.; Shen, H.-X. *Chin. J. Chem.* **2003**, 21, 556.
- 10 Kim, N. W.; Wu, F. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2595.
- 11 Hultdin, M.; Grönlund, E.; Norrback, K. F.; Eriksson Lindström, E.; Just, T.; Roos, G. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3651.
- 12 <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/form1.cgi>
- 13 Fang, X. H.; Li, J. J.; Perlette, J.; Tan, W. H.; Wang, K. M. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 747A.
- 14 Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303.
- 15 Whitcombe, D.; Theaker, J.; Guy, S. P.; Brown, T.; Little, S. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 804.
- 16 Thelwell, N.; Millington, S.; Solinas, A.; Booth, J.; Brown, T. *Nucleic Acid Res.* **2000**, 28, 3752.
- 17 Solinas, A.; Brown, L. J.; McKeen, C.; Mellor, J. M.; Nicol, J. T. G.; Thelwell, N.; Brown, T. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, e96.

(A0309243 PAN, B. F.; FAN, Y. Y.)