



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101665834 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200910182571.0

(22) 申请日 2009.09.16

(73) 专利权人 郑骏年

地址 江苏省徐州市淮海西路 89 号徐州医学院附属医院

(72) 发明人 郑骏年 顾峰 裴冬生 马萍

陈菲菲 底洁卉 张宝福 徐为李望

(74) 专利代理机构 徐州市三联专利事务所

32220

代理人 周爱芳

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1451964 A, 2003.10.29, 权利要求 1-3、5.

CN 101105496 A, 2008.01.16, 全文.

Schluter C. The cell

proliferation-associated antigen of antibody ki67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.《Journal of Cell Biology》. 1993, 第 123 卷 (第 3 期), 第 513-522 页.

常建兰. p53、malat1、ki-67 和  $\beta$ -catenin 基因 mRNA 检测在大肠癌分子诊断中的意义.《世界华人消化杂志》. 2008, 第 16 卷 (第 34 期), 第 3849-3854 页第 1 节.

审查员 刘芳

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

Ki67mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种 Ki67 mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒;属生物技术领域。为一种检测肿瘤增殖相关基因 Ki67 mRNA 的实时荧光定量逆转录聚合酶链反应试剂盒。该试剂盒对样品中存在的 Ki67 mRNA 通过逆转录 (RT) 得到 cDNA,再结合实时荧光定量 PCR 检测技术,通过设计的特异性引物和探针精确量检测标本中 Ki67 mRNA 的表达量。该试剂盒可以用于临床检测肿瘤患者外周血、淋巴结、骨髓、手术切除组织、细胞株等标本中 Ki67 mRNA 表达。有益效果是:采用了 PCR 扩增技术,使得检测 Ki67 mRNA 的敏感性大大提高,能保证在极少的标本中获得足够的信息。荧光探针的应用,使得检测的特异性大大提高,能有效降低常规 PCR 扩增的假阳性率。

1. 一种 Ki67mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒,其特征是:含有逆转录 RT 反应液、莫洛尼氏鼠白血病病毒 M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂 Rnasin、聚合酶链 PCR 反应液、耐热 DNA 聚合酶 Taq、标准品、阴性对照和阳性对照;聚合酶链 PCR 反应液中含有聚合酶链反应缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、扩增 Ki67 cDNA 所用上游引物、下游引物、荧光探针;扩增用上游引物序列为:5'-GGGAAAGTAGGTGTGAAAGAAGAG-3';扩增用下游引物序列为:5'-ATCTGCTTTGGAGACTCCTTAAAC-3';探针为荧光探针,其序列为:5'-FAM-CCTAGCAGTCGGCAAGTTCACACGG-TAMRA-3'。

2. 如权利要求 1 所述的 Ki67mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒,其特征是:逆转录 RT 反应液中含有寡聚 dT<sub>15-18</sub>、dNTPs、DEPC-H<sub>2</sub>O。

3. 如权利要求 1 所述的 Ki67mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒,其特征是:标准品序列为:

```
GGGAAAGTAG GTGTGAAAGA AGAGCTCCTA GCAGTCGGCA
AGTTCACACG GACGTCAGGG GAGACCACGC ACACGCACAG
AGAGCCAGCA GGAGATGGCA AGAGCATCAG AACGTTTAAG
GAGTCTCCAA AGCAGAT。
```

4. 如权利要求 1 所述的 Ki67mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒,其特征是:阴性对照为无 Ki67mRNA 的 RNA 样品,阳性对照为含有 Ki67mRNA 的 RNA 样品。

## Ki67mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属生物技术领域,具体是一种 Ki67mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒。通过逆转录 (RT) 样品 mRNA 得到 cDNA,再结合实时荧光定量 PCR 检测技术,精确定量检测标本中人 Ki67mRNA 表达量的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 恶性肿瘤转移是临床治疗的一大难题,也是恶性肿瘤致死的一个重要原因。能否及早发现转移并作出诊断,对肿瘤患者的预后判断、治疗方案制定、生存率提高,以及医疗卫生事业的发展均有重要的意义。

[0003] 目前,肿瘤转移的诊断主要依靠影像学(如 X 光片、CT、磁共振、PET 等)和病理学检查。但影像学检查发现的病灶,通常要达到一定大小才能够被仪器分辨,且无法定性。而通过病理形态判断细胞恶变与否,则一定要取到合适的检测标本,且要具有相当数量的可观察到的肿瘤细胞存在。因此,影像学和病理学检查均难以在肿瘤转移的早期实现准确诊断。

[0004] 研究表明,血行转移是肿瘤扩散的主要途径之一,因此在患者外周血中进行肿瘤细胞的基因表达检测是了解肿瘤转移的有效方法。但是肿瘤转移早期,血液中的肿瘤细胞数量极少,因此外周血中微量肿瘤细胞检测,必须满足高灵敏度的检测方法和特异性的肿瘤生物学标记 2 个条件,才能从血液大量的细胞中检测到极其微量的肿瘤细胞,从而达到早期诊断目的。

[0005] 1983 年 Mullis 发明了聚合酶链式反应 (PCR)。由于该项技术具有简便快速、特异性和灵敏度高、重复性好等突出优点,因此被广泛应用于基础研究和临床诊断。1991 年 Smith 等首次应用 PCR 技术检测到血循环中存在转移的癌细胞,其后 PCR 技术被广泛用于微转移研究。近年来,RT-PCR 法已被用于淋巴结、血液中微量癌细胞特殊 mRNA 检测,并显示出较高的灵敏性,是目前微转移检测有效的方法之一。使用较多的还有巢式 PCR (nest-PCR),它是使用两套以上的引物进行扩增,目的在于增高 DNA 的特异性。应用巢式 PCR 检测技术已能够在外周血、淋巴结或骨髓中早期测定出数量很少的循环癌细胞。但是这些传统 PCR 技术在应用中存在着不能对肿瘤细胞特殊 mRNA 进行准确定量,以及操作过程中易污染而使得假阳性率高等缺点,因此不能够满足实际需要,使其应用受到限制。随着 Taqman 实时荧光定量 PCR 技术的出现,人们可以真正做到对 PCR 样本中微量 mRNA 的精确定量,而且由于特异性荧光探针杂交技术的应用,使得被检测基因的特异性大大提高。

[0006] Taqman 实时荧光定量 RT-PCR 技术是 1996 年美国 PE 公司发明的一种高灵敏度 PCR 试验方法。其技术原理是在 PCR 的反应体系中加入一条带有双荧光标记的探针,该探针能与模板核酸发生特异性杂交。探针的 5' 端标记荧光报告基团 FAM (6-羧基荧光素,荧光发射值在 518nm 处),3' 端标记荧光淬灭基团 TAMRA (6-羧基四甲基罗丹明,荧光发射值在 582nm 处)。探针结构完整时,5' 端 FAM 所发出的荧光被 3' 端 TAMRA 所吸收,不出现荧光信号的变化。随着 PCR 反应的进行,当合成的新链移动到探针结合的位置时,Taq 聚合酶

将探针切断,探针的完整性遭到破坏,3'端的淬灭作用被解除,5'端的FAM荧光信号被释放出来。PCR每复制一个核苷酸片段,就有一个探针被切断,同时一个荧光信号被释放出来,产物与荧光信号产生一对一的对应关系。随着产物的增加,荧光信号亦随之增强,当信号增强到某一阈值时(根据荧光信号基线的平均值和平均标准差,计算出99.7%的置信度大于平均值的荧光值,即为阈值),此时的循环次数即循环阈值Ct(cycle threshold, Ct)被记录下来。该循环参数Ct和PCR体系中起始模板数的对数之间有严格的线性关系。利用不同梯度的阳性定量标准模板扩增的Ct值和该阳性定量标准的模板数经过对数拟合制成标准曲线,再根据待测样品的Ct值就可以准确的确定起始模板的数量,因此根据PCR产物的荧光强度即可计算出初始模板的数量。实时荧光定量PCR具有特异性强、灵敏度高、定量准确、操作安全等优点,使用该方法扩增肿瘤组织特异性mRNA来检测微转移,是一种高灵敏度、高特异性、操作简便的方法,现已在检测外周血微量肿瘤细胞中尝试。

[0007] Ki67基因是一细胞增殖基因,编码细胞增殖必需的DNA结合蛋白,Ki67蛋白是目前临床病理使用最广泛的肿瘤增殖病理标志。Ki67蛋白在几乎所有的肿瘤中高表达,而在肝、肾、脑、心肌、胃肠、外周血单核细胞及淋巴细胞等正常细胞中不表达。因此检测肿瘤患者外周血、淋巴结、骨髓标本中有无Ki67mRNA表达,可以诊断肿瘤有无转移。

## 发明内容

[0008] 本发明提供一种Ki67mRNA实时荧光定量RT-PCR检测试剂盒,用于肿瘤增殖相关基因Ki67mRNA的实时荧光定量逆转录聚合酶链反应RT-PCR检测。

[0009] 本发明是以如下技术方案实现的:试剂盒含有逆转录RT反应液、莫洛尼氏鼠白血病病毒M-MLV逆转录酶、RNA酶抑制剂Rnasin、聚合酶链PCR反应液、耐热DNA聚合酶Taq、标准品、阴性对照和阳性对照。

[0010] 其中RT反应液中含有寡聚(dT)<sub>15-18</sub>、dNTPs、DEPC-H<sub>2</sub>O。

[0011] 其中PCR反应液中含有PCR缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、扩增用上游引物、扩增用下游引物、检测用荧光探针。

[0012] 扩增用上游引物序列为:5'-GGGAAAGTAGGTGTGAAAGAAGAG-3'。

[0013] 扩增用下游引物序列为:5'-ATCTGCTTTGGAGACTCCTTAAAC-3'。

[0014] 检测用荧光探针序列为:5'-FAM-CCTAGCAGTCGGCAAGTTCACACGG-TAMRA-3'。

[0015] 标准品序列为:

[0016] GGGAAAGTAG GTGTGAAAGA AGAGCTCCTA GCAGTCGGCA

[0017] AGTTCACACG GACGTCAGGG GAGACCACGC ACACGCACAG

[0018] AGAGCCAGCA GGAGATGGCA AGAGCATCAG AACGTTTAAAG

[0019] GAGTCTCCAA AGCAGAT

[0020] 对照品分阴性对照和阳性对照,其中阴性对照为无Ki67mRNA的RNA样品,阳性对照为含有Ki67mRNA的RNA样品。

[0021] 本试剂盒应保存于-20℃,尽量减少反复冻融。

[0022] 本发明的有益效果是:建立了利用Taqman技术检测Ki67mRNA的方法。由于本方法采用了PCR扩增技术,使得检测Ki67mRNA的敏感性大大提高,能保证在极少的标本中获得足够的信息。由于荧光探针的应用,使得检测的特异性大大提高,能有效降低常规PCR扩

增的假阳性率。本方法所设计的引物、探针以及检查结果,可以为荧光定量 PCR 检测试剂盒的开发提供可靠的依据。

#### 附图说明

- [0023] 图 1 为 RNA 总提取结果
- [0024] 图 2 为 Ki67 的 PCR 扩增结果
- [0025] 图 3 为 Ki67 重组质粒的 PCR 鉴定结果
- [0026] 图 4 为 Ki67 测序结果
- [0027] 图 5 为实时荧光定量 RT-PCR 扩增动力曲线
- [0028] 图 6 为实时荧光定量 RT-PCR 标准曲线

#### 具体实施方式

[0029] 下面结合实施例对本发明进一步说明。但应明确,本文上述说明以及下述实施例仅是用作举例说明,并不构成对本发明范围的限制。

[0030] 实施例 1Ki67mRNA 荧光定量 PCR 检测标准品的制备

[0031] 1 引物与探针的设计和合成

[0032] 拟扩增的 Ki67 基因标准品序列为 Ki67 基因第 13 外显子区 3470-3606 碱基。以 Ki67 全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号 NM002417) 为模板设计引物和探针。

[0033] 标准品 PCR 上游引物序列为 :5' -GGGAAAAGTAGGTGTGAAAGAAGAG-3', 下游引物序列为 :5' -ATCTGCTTTGGAGACTCCTTAAAC-3', 均由上海 Invitrogen 公司合成。

[0034] 探针序列为 :5' -FAM-CCTAGCAGTCGGCAAGTTCACACGG-TAMRA-3', 探针 5' 端标记荧光报告基团 FAM(6-carboxy-fluorescein, 美国 ABI 公司), 3' 端标记荧光淬灭基团 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine, 美国 ABI 公司)。

[0035] 2 细胞与细胞培养

[0036] 膀胱癌细胞 (Biu-87)、肾癌细胞 (Ketr-3), 购自中国科学院上海细胞库。Biu-87 细胞、Ketr-3 细胞均在 5% CO<sub>2</sub> 和 37°C 的条件下, 在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中贴壁生长。细胞融合度达 90% 左右时用含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的胰酶消化液消化后传代。

[0037] 3RT-PCR

[0038] 收集细胞提取总 RNA (见图 1), 取 1.5u1 RNA, 用 RT-PCR 试剂盒 (AccessRT-PCR System, 美国 Promega 公司), 以 25u1 总反应体积进行逆转录。反应条件 :48°C 45 分钟逆转录, 94°C 5 分钟变性, 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分钟进行 28 个循环扩增, 最后于 72°C 延伸 7 分钟后置 4°C。

[0039] PCR 反应结束后, 取 PCR 反应产物 10 μ 1, 加入上样缓冲液 2 μ 1, 充分混匀后在 2.0% 琼脂糖凝胶电泳槽齿孔中, 50v 恒压电泳 40min, 在紫外线下观察, 可看到与目的片段大小一致的约 137bp 的电泳条带 (见图 2)。

[0040] 4 纯化目的片段并插入 T 载体

[0041] PCR 产物的纯化使用美国 Promega 公司的 PCR 产物纯化试剂盒 (Wizard SVGel and PCR Clean-Up System), 操作步骤按说明书进行。将 PCR 纯化产物与 pGEM-T Easy

Vector 在 T4DNA Ligase 作用下 4℃ 连接过夜。将连接产物转化 DH5a 感受态细胞,涂 LB 平板 (含氨苄青霉素),37℃ 倒置培养过夜。挑取平板中单克隆菌落放入 5ml LB 培养基中,摇菌 10 小时;使用美国 Promega 公司小量质粒提取试剂盒 (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System) 进行质粒小量提取,操作步骤按说明书进行,获得重组质粒 DNA, -20℃ 保存。

[0042] 5 鉴定并测序

[0043] 取 2 μl 质粒作为模板行 PCR,其反应条件同前;PCR 产物行 2% 的琼脂糖凝胶电泳,观察目的条带,可见与目的片段大小一致的约 137bp 的电泳条带,见图 3;正确的送上海英骏 (Invitrogen) 公司测序,见图 4。测序结果证明与 Genbank 中查找的基因序列完全一致,同源率为 100%,证明序列克隆正确。说明目的基因已被克隆入 T 载体中,该重组质粒可用作荧光定量 PCR 的阳性定量标准模板。

[0044] 6 质粒 OD 值测定

[0045] 吸取提取的质粒原液 2 μl,加入 58 μl 双蒸水做 30 倍稀释,放入紫外分光光度计中检测。将检测的质粒浓度 (μg/μl) 根据下面的公式换算成 copies/μl。用无核酶水将质粒分别稀释成  $10^7$ copies/μl、 $10^6$ copies/μl、 $10^5$ copies/μl、 $10^4$ copies/μl、 $10^3$ copies/μl、 $10^2$ copies/μl、 $10^1$ copies/μl 不同浓度,放入紫外分光光度计中检测,检测结果见表 1。表 1 中的  $OD_{260}/OD_{280}$  比值均在 1.7 ~ 2.0 之间,说明所得的质粒 DNA 纯度较好,可以下一步使用。质粒浓度计算公式:

[0046] 拷贝数 (copies/μl) =  $(6.023 \times 10^{23} [\text{copies/mol}] \times \text{浓度} [\text{g}/\mu\text{l}]) / \text{MW} [\text{g/mol}]$   
 MW (分子量) = 碱基数目 [bp] × 660 dalton/bp (双链 DNA)

[0047] 表 1 质粒浓度测定结果

[0048]

测定次数	pGEM-T-Ki67 质粒	
	浓度 (μg/μl)	$OD_{260}/OD_{280}$ 比值
第一次	0.0052	1.93
第二次	0.0052	1.95
第三次	0.0052	1.96

[0049] 实施例 2 Ki67mRNA 荧光定量 PCR 检测标准曲线的建立

[0050] 为了得到 Ki67mRNA 绝对定量值,本发明中实时荧光定量 PCR 检测采用外标准曲线定量的方法,将克隆的阳性标准模板按  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ copies/ul 梯度稀释,加于不同的反应管中。

[0051] 反应体系如下:

[0052]	PCR Master Mix	10 μl
[0053]	Assay Mix (含引物和探针)	1 μl
[0054]	cDNA diluted in RNase-free water	9 μl
[0055]	总体积	20 μl

[0056] 反应条件如下：

[0057] 95°C 10min 1cycle

[0058]

95°C	15s	}	40cycle
60°C	60s		

[0059] 反应结束后在计算机上得到定量 PCR 扩增动力曲线（见图 5）及定量标准曲线（见图 6），可见各梯度之间间隔的 Ct 值相等，并在一条直线上，标准曲线的斜率为 -3.2233 (Ki67)，与理想斜率 -3.322 (-1/1g2) 非常接近，相关系数为 0.9979，提示误差较小，可信度较高。

[0060] 实施例 3Ki67mRNA 荧光定量 PCR 检测的方法学评价

[0061] 为了检测 Ki67mRNA 荧光定量 PCR 方法的可重复性和灵敏度，本发明采用重复性实验和灵敏度实验进行评价。

[0062] 1 重复性试验

[0063] 1.1 批间重复试验：分别用  $10^6$ 、 $10^4$ 、 $10^2$ copies/ $\mu$ l 的质粒标准品在不同批次 PCR 反应中进行扩增，观察其 Ct 值变化程度，用变异系数 (CV) 来表示，是反映 PCR 重复性指标之一（将同一浓度的质粒样本在不同时间重复测定 5 次），结果见表 2。

[0064] 表 2 批间重复试验结果

pGEM-T-Ki67 质粒			
	浓度 (copies/ $\mu$ l)	$\bar{x} \pm s$	CV
[0065]	$10^6$	$21.78 \pm 1.13$	5.19 %
	$10^4$	$27.80 \pm 1.66$	5.97 %
	$10^2$	$32.61 \pm 1.84$	5.64 %

[0066] 1.2 批内重复试验：分别用  $10^6$ 、 $10^4$ 、 $10^2$ copies/ $\mu$ l 的质粒标准品在同一次 PCR 反应中进行扩增，观察其 Ct 值变化程度，用变异系数 (CV) 来表示，是反映 PCR 重复性指标之一（将同一份质粒样本平行测定 5 次），结果见表 3。

[0067] 表 3 批内重复试验结果

pGEM-T-Ki67 质粒			
	浓度 (copies/ $\mu$ l)	$\bar{x} \pm s$	CV
[0068]	$10^6$	$21.53 \pm 0.79$	3.67 %
[0069]	$10^4$	$27.42 \pm 0.79$	2.88 %
	$10^2$	$32.93 \pm 1.03$	3.95 %

[0070] 表 2 和表 3 的结果显示，批内和批间 CV 值均在 10% 以下，提示该方法的重复性好。

[0071] 2 灵敏度试验

[0072] 2.1 将质粒稀释成  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、5、 $10^0$ copies/ul 浓度进行荧光定量 PCR 检测，根据不同浓度的标本检出率得出其灵敏度，检测结果见表 4。

[0073] 表 4. 不同浓度质粒的检测值

[0074]	质粒浓度	pGEM-T-Ki67
	(个/ml)	质粒起始拷贝数 (copies)
	$10^4$	$1.52 \times 10^4$
	$10^3$	$1.39 \times 10^3$
	$10^2$	$1.26 \times 10^2$
	$10^1$	$0.95 \times 10^1$
	5 个	$6.97 \times 10^0$
	$10^0$	未检出

[0075] 2.2 将含有  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、5 个 /ml 肾癌 Ketr3 细胞株的混合细胞悬液以及健康人单个核细胞悬液进行荧光定量 PCR 检测，检测结果如表 5

[0076] 表 5. 含不同浓度的 Ketr3 细胞株的混合细胞悬液 Ki67mRNA 表达

[0077]	细胞浓度	Ki67mRNA
	(个/ml)	起始拷贝数 (copies)
	$10^4$	$1.7 \times 10^5$
	$10^3$	$2.1 \times 10^4$
[0078]	$10^2$	$1.1 \times 10^3$
	$10^1$	$2.8 \times 10^2$
	5 个	$2.4 \times 10^1$
	正常健康人单个核细胞	未检出

[0079] 表 4 和表 5 的结果显示，检测灵敏度为 5copies/ul，检测下限为 5 个细胞 /ml，提示该方法灵敏度高。

[0080] Ki67 序列表.txt

[0081] 人 Ki67 基因启动子序列表

[0082] SEQUENCE LISTING

[0083] <110> 郑骏年顾峰裴冬生马萍陈菲菲底洁卉张宝福徐为李望



- [0084] <120>Ki67mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒
- [0085] <130>
- [0086] <160>4
- [0087] <210>1
- [0088] <211>137
- [0089] <212>DNA
- [0090] <213> 人 (human)
- [0091] <400>
- [0092] GGGAAAGTAG GTGTGAAAGA AGAGCTCCTA GCAGTCGGCA AGTTCACACG 60
- [0093] GACGTCAGGG GAGACCACGC ACACGCACAG AGAGCCAGCA GGAGATGGCA 120
- [0094] AGAGCATCAG AACGTTTAAG GAGTCTCCAA AGCAGAT 137
- [0095] <210>2
- [0096] <211>25
- [0097] <212>DNA
- [0098] <213> 荧光探针
- [0099] <400>
- [0100] CCTAGCAGTC GGCAAGTTCA CACGG 25
- [0101] <210>3
- [0102] <211>24
- [0103] <212>DNA
- [0104] <213> 引物
- [0105] <400>
- [0106] GGGAAAGTAG GTGTGAAAGA AGAG 24
- [0107] <210>4
- [0108] <211>24
- [0109] <212>DNA
- [0110] <213> 引物
- [0111] <400>
- [0112] ATCTGCTTTG GAGACTCCTT AAAC 24

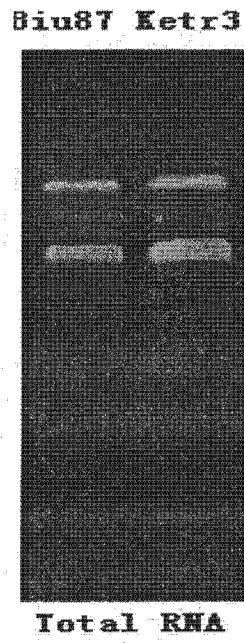


图 1

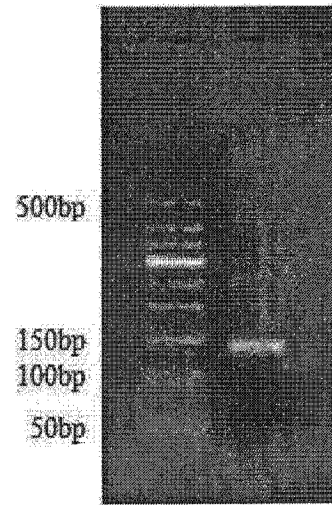


图 2

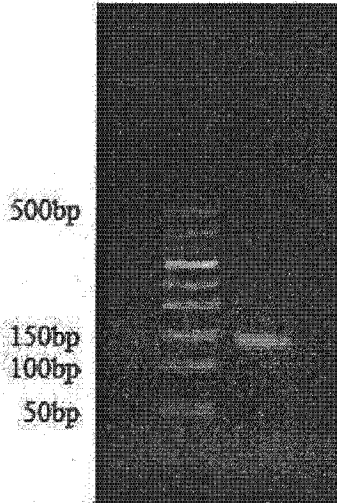


图 3

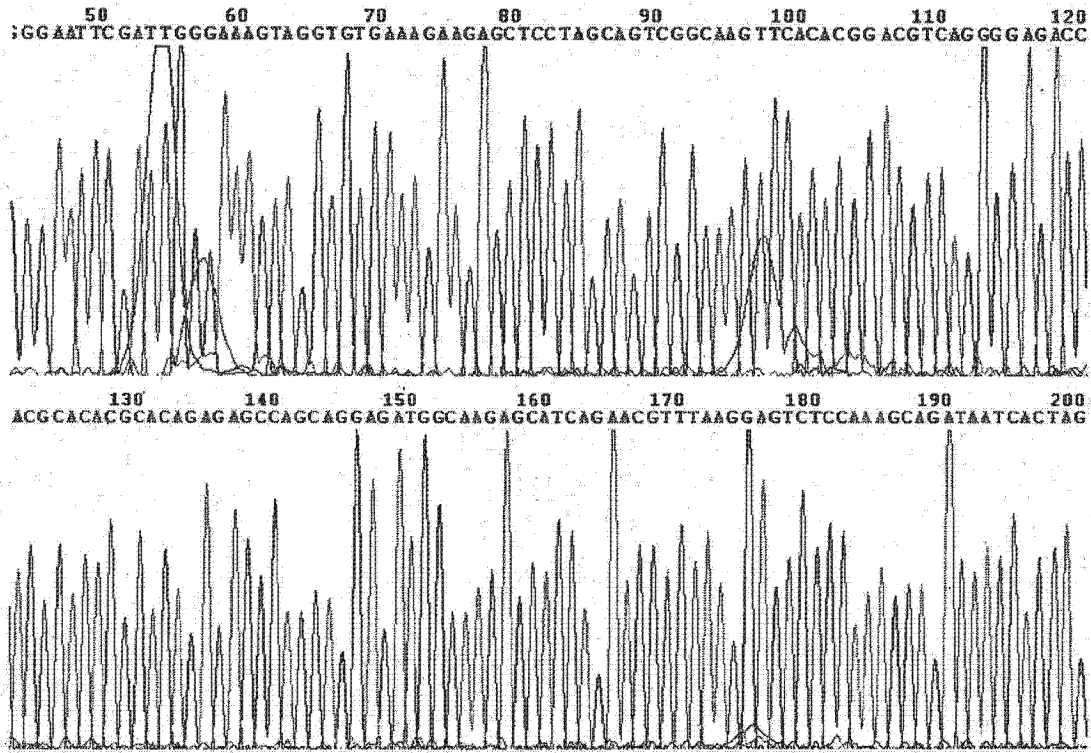


图 4

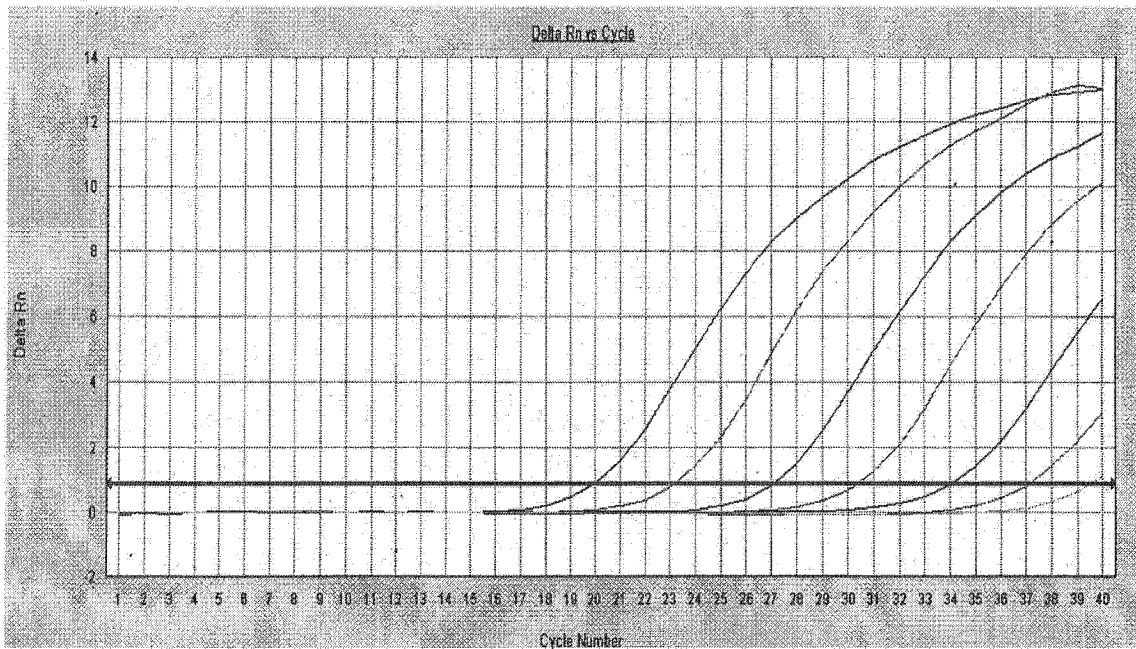


图 5

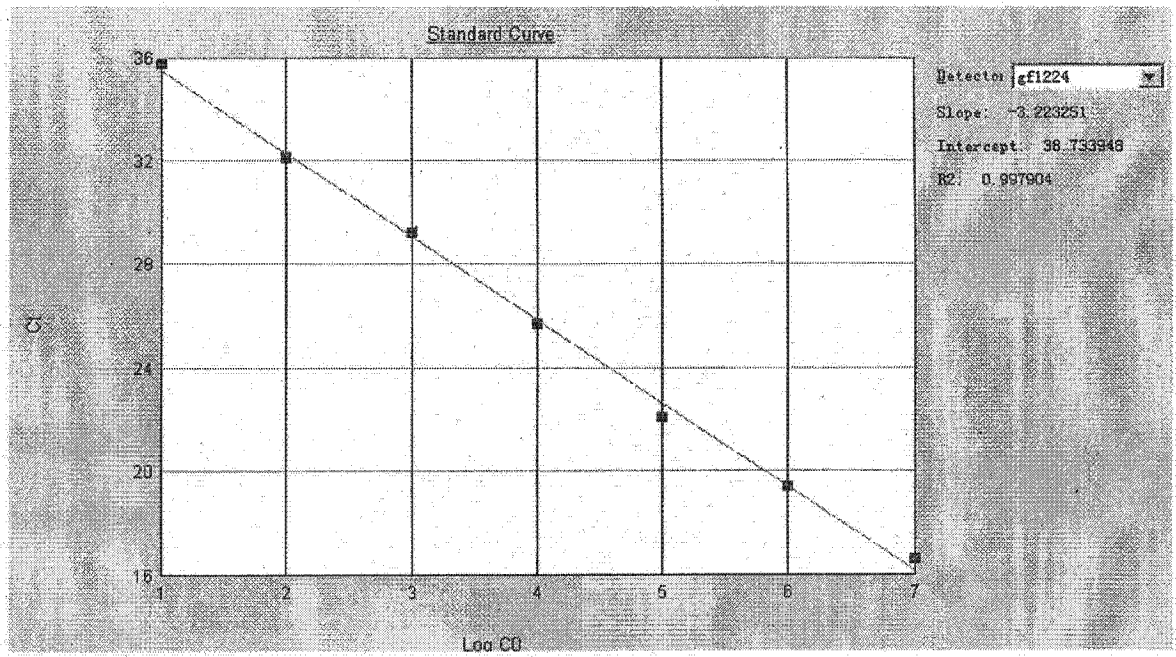


图 6