

• 综 述 •

荧光定量 PCR 技术在基因治疗药物组织分布研究中的应用

王 欣, 周晓冰, 苗玉发, 沈连忠, 李 波 *

中国药品生物制品检定所 国家药物安全评价监测中心, 北京 100176

摘 要 介绍应用荧光定量 PCR 技术对基因治疗药物组织分布研究的实验方法。从以下几个方面, 即定量 PCR 技术原理、实验设计思路、各种检测方法的比较来说明这一问题。其中, 可以使用的检测方法包括紫外定量法和引入内参基因法, 后者又可以分为外标法和内标法。充分对比了这些方法的优缺点, 并结合本实验室的研究现状, 介绍了本监测中心在选用外标法进行研究时所取得的一些成果和实验经验。

关键词 荧光定量 PCR; 基因治疗; 组织分布; 实验方法

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 04-0284-03

Application of real-time quantitative PCR technology in the biodistribution research of gene therapy biopharmaceuticals

WANG Xin, ZHOU Xiao-bing, MIAO Yu-fa, SHEN Lian-zhong, LI Bo

National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, National Center for Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China

Abstract The paper focuses on the test methodology of applying real-time PCR to gene therapy drug biodistribution research. It is illuminated from three aspects containing real-time PCR elements, examination design and various methods comparing. Test results can be detected by ultraviolet and internal control gene method composing of external standard and internal reference techniques. The advantage and deficiency of these methods are fully discussed in this paper, as well as some successful and experimental experiences are reported in the research using external standard method.

Key words real-time quantitative PCR; gene therapy; biodistribution research; experimental methods

基因治疗药物是一类比较新的和研究较热的生物制品类药物。它的结构形式分成 2 类: 一类是直接裸露的治疗性 DNA 或 RNA 序列, 一类是以基因缺陷型和 / 或复制缺陷型病毒为载体, 通过向其中插入启动子和要表达的基因序列, 而得到的一种重组病毒。多数的基因治疗药物为后一种。国际指导原则文件^[1]中推荐使用的已经过临床验证的安全载体包括: 1) 复制型载体, γ -逆转录病毒和慢病毒; 2) 非复制型载体, 腺病毒、腺相关病毒、单纯疱疹病毒-1 型、痘病毒和副粘病毒。这类重组药物可以借助病毒载体感染人体的天然途径, 主动吸附并感染宿主细胞膜, 转导成功效率高, 进入人体后表达为一段治疗性蛋白, 通过人体的自身免疫系统反应来发挥治疗作用。

基因治疗药物的安全性评价研究中, 除去常规

的一般毒性研究外, 还包括一类非常重要的也是比较特殊的研究内容——组织分布研究。该项研究目的是寻找药物进入体内以后会到达哪些组织器官, 分布数量多少, 在一些重要的生命 / 生理器官和生殖系统内有无分布, 是否存在复制与整合特性, 以及在给药结束后伴随时间延长的代谢消除趋势, 这是生物分布研究的核心问题。除此之外, 我们还希望通过直接测定药物在各脏器组织中的分布量, 来达到预期的目标, 即在治疗性靶器官中, 药物分布量很高, 能够更好的发挥治疗作用; 在非治疗性靶器官中, 药物分布量较低, 减少药物在体内蓄积和降低不良反应发生风险; 以及伴随时间延长, 脏器中剩余多少药物是安全的并可以忽略不计。这些对指导临床合理用药, 以及更好的设计给药方案, 也有非常大的指导意义。因此, 基于基因治疗药物的

收稿日期: 2010-04-11

作者简介: 王 欣 (1980—), 硕士研究生, 从事新药体内体外毒性研究。Tel: (010) 67876252 或 67872233-8209

* 通讯作者 李 波, 研究员, 博士生导师, 从事新药非临床有效性和毒性评价研究, Tel: (010) 67872233-8204

结构特点,非常适宜采用荧光定量 PCR 技术中的绝对定量法开展此类研究和检测。

1 荧光定量 PCR 技术的原理

荧光定量 PCR 技术是在对 PCR 循环扩增理论深刻理解的基础上诞生的,是能够对待测样本中的起始模板数进行精确定量的先进的实验方法。该项技术的原理是在 PCR 扩增进入指数增长期时,产物的量满足计算方程 $N=N_0 \times (1+E)^n$, 其中 N =产物量, N_0 =起始模板数量, E =扩增效率, n =循环数;在扩增效率接近 100% 时,即 $E \rightarrow 1$ 时,该方程可以变化成 $N=N_0 \times 2^n$, 此时产物生成量与循环数成对数关系,这是准确定量的前提,即在指数扩增期进行准确定量的原理。荧光定量 PCR 技术是将荧光元素与扩增循环过程有机的结合起来,利用荧光信号的变化来实时监测整个扩增循环过程并进行记录,从而实现精确定量。其中, Taqman 探针法是一种灵敏度高,定量准确的实验技术,定量下限可以达到 1 copy / μL , 所以在生物分布研究中广泛采用该方法。实验原理是,利用软件对扩增的目的基因片段设计一对引物和带荧光标记的探针序列。探针位置在两引物之间,可以与其间的目的基因片段互补结合,探针两端都标记荧光基团,一个为发射基团,一个为淬灭基团。在未水解前,发射基团发出的荧光恰好为淬灭基团吸收,所以仪器不能接收并计算荧光信号。PCR 开始后,目的基因 DNA 双链在高温下解旋成单链,这时探针便与其中的一条链互补结合。随着 DNA 扩增反应的延伸,当 DNA 聚合酶到达探针部位时,探针在酶的作用下被水解掉,发光基团便解脱出来发出荧光信号,仪器接受信号并完成一次记录。荧光定量 PCR 技术就是根据这一原理来实现精准定量的。

据此,可以设计并合成一条插入扩增片段的基因序列,并对其拷贝数进行精确定量,将这段基因序列作为标准品使用。对标准品原液进行倍比梯度稀释,制作成一系列浓度的标准品溶液,复孔上样并进行扩增反应。反应结束后,仪器会自动分析拟合出一条标准曲线。便可应用该曲线对未知样本进行测定。实验中所提取的 DNA 样本,是同时含有动物基因组和目的基因组的混合溶液。所以,设计的引物 / 探针序列要有较高的特异性,特别是当动物基因组与目的基因组存在部分序列相同的情况时,设计引物 / 探针的特异性尤为重要。这种情况下,可以使用 MGB 探针代替 Taqman 探针,该探针

的淬灭端结合的是一短基因序列,称为小沟结合体,而不是一个淬灭荧光集团。MGB 探针实验原理与 Taqman 探针原理相同。

2 不同实验方法的设计思路

生物分布研究中通常选择小鼠为实验动物。给药完毕后,分别在不同时间点解剖部分动物并摘取各脏器组织,然后提取 DNA 进行测定。各种因素的影响,包括不同脏器组织的细胞密度不同,摘取组织块大小不同、DNA 提取效率不同等,会导致提取同样体积的 DNA 样本并不来源于同样数目的细胞。因此,为了对比各样本中分布目的基因的差异,就必须将所有样本的 DNA 量都校正至相同水平才可以。其中一种校正方法是:在测定前,先用紫外法对所有样本进行定量,然后利用 DNA 提取液将各样本浓度都稀释至相同,再进行测定。这样得到的结果形式是 target gene copies / ng genome。该方法是各项指导原则^[1-3]中都推荐采用的研究方法。但是,该方法存在定量不够准确,检测前样本校正工作繁重,容易造成交叉污染的缺点。因此,对该方法进行改进,尝试采用另一种定量方法也是很有必要的。

另一种校正方法是通过使用内参基因,通常选用小鼠管家基因作为内参,其基因数正比于小鼠细胞数。通过对管家基因的直接定量实现对样本中小鼠细胞的间接定量,从而达到校正样本间差异的目的。将各样本都统一至单细胞水平后,再比较其中分布目的基因拷贝数的差异,得到的测定结果形式是 target gene copies / cell。常用的内参基因有 18SrRNA、GAPDH 和 β -actin 基因^[4]。该方法可以大大提高定量的准确性,并不会带来样本间的交叉污染。这需要对样本中的 2 个基因组,即目的基因和内参基因都进行定量。如何实现这种双重定量呢?首先,荧光定量 PCR 允许采用多重定量的手段,即在一个管内同时加入 2 对引物和 2 条探针,仪器通过探针末端标记不同的荧光基团对信号加以识别和记录,通过一次 PCR 反应实现对 2 个基因组的同时定量。当在同管内加入 2 对引物和 2 条探针时,反应过程中,2 对引物因互相干扰并争取底物而产生竞争性抑制,导致各自的扩增效率都下降。所以,在实验前需要反复摸索合适的引物浓度和扩增条件,提高各自的扩增效率并使二者接近,这样才可以准确定量。该方法是在同管内进行,因而也称作内标法。

与之相应的另一种研究思路是,将2个基因组分开进行定量,即在2个管内分别做目的基因和内参基因定量,此法称作外标法。相对内标法,外标法就简单许多。应用外标法进行测定时,必须要验证当对样本中的一个基因组扩增时,存在的另一基因组对其扩增效率无影响。提取的DNA样本中,大多数为小鼠基因组DNA,目的基因数量比较少,不同样本中的小鼠基因组的DNA数量差别非常大。譬如,在对目的基因扩增时,需要考察存在不同数量的小鼠基因组的反应体系中,浓度在 $10^2 \sim 10^7$ 范围内波动时,对目的基因的扩增效率有无影响。同样,对内参基因进行扩增时,也要考察存在不同数量目的基因的情况下对其扩增效率有无影响。这是应用外标法进行定量的前提。若在高浓度下存在影响,需要将样本适当稀释后再进行测定。PCR这种复杂的化学反应,同管内反应条件最一致,管间差异较大。那么,内标法与外标法在定量的准确度上是否一致呢?许多人都在此问题上进行了研究,Claudia^[5]应用Taqman探针技术对人神经细胞瘤中MYCN基因拷贝数进行测定,分别应用内标法和外标法对同一样本进行测定。将2种测定方法所得到的结果进行线性回归分析后,回归系数 $r=0.987$,数据有很好的相似性。Karl-Anton^[6]应用绝对定量法测定bcr/abl⁺基因的拷贝数,选择 β -actin基因作为内参基因,将双重反应测定结果与单一反应测定结果进行回归比对,发现2种方法的实验结果有很好的相似性。Kenneth^[7]利用数学模型,从理论上推算出内标与外标法在检测结果的准确性上是一致的。据此,我们认为内标法与外标法的检测结果有等效性。

根据以上结论,笔者在研究中尝试采用外标绝对定量法对样本进行测定。选择小鼠管家基因 β -actin作为内参基因, β -actin基因与小鼠基因组比值为2:1,每个细胞中有一套小鼠基因组。因此,通过对样本中 β -actin基因定量间接实现了对其细胞数目的定量。对扩增的目的基因和内参基因分别设计引物和探针,并在2个管内分别对它们进行扩增。将2个数值相除,就可以得到最终结果。将不同样本都统一至单细胞水平,再比较其中分布目的基因的不同,才是有意义的结果。实验中,首先对样本中目的基因拷贝数进行测定,若该样本中无药物分布,则不需要再测定它的内参基因拷贝数。对末次给药后第一次和第二次解剖时间点的所有组织

样本都进行测定,若检测结果显示,在某一个脏器的所有样本中均没有检出药物分布,基本可以确定药物在该脏器无分布,那么在以后时间点采集的该脏器样本均不再进行测定。

3 结语

基因治疗药物的组织分布研究是其安全性评价研究中一项非常重要的研究内容,也是检测技术含量较高的一项科研实验内容。美国FDA和OECD都有针对这类研究的专门指导原则文件,我国目前还没有。笔者在研究中,未按照指导原则推荐的方法进行实验,而是尝试性的采用外标绝对定量法进行测定。改进后的方法可以提高检测准确性,并能很好的克服这类研究中因检测样本数量庞大而导致的工作程序繁复和容易造成污染的问题。因此,外标绝对定量法是一种科学性与实用性兼顾的研究策略。目前,推荐使用的安全载体数量有限,而且结构明确,相信通过设计合理的引物/探针序列,可以实现一些药物的研究中使用内标法进行测定,这将是以后研究的关注点和需要解决的问题。

参考文献

- [1] EMA. Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors [EB/OL]. (2006-11-16) [2010-03-13]. <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/swp/27397405enfin.pdf>.
- [2] FDA Centre for Biologics Evaluation and Research. Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications [S]. 2007.
- [3] *Gene Therapy Clinical Trials-Observing Subjects for Delayed Adverse Events*. FDA Centre for Biologics Evaluation and Research [S]. 2006.
- [4] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, 3 (7): 1-11.
- [5] Raggi C C, Bagnoni L, Tonini G P. Real-Time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplification in human neuroblastoma with the Taqman Detection System [J]. *Clin Chem*, 1999, 45 (11): 1918-1924.
- [6] Kreuzer K A, Bohn A, Lupberger J. Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-Dimethylaminophenylazo) benzoic acid as a Dark Quencher Dye [J]. *Clin Chem*, 2001, 47 (3): 486-490.
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Method*, 2001, 25: 402-408.