

张丽丽,陆佳涵,薛婧,等. 艾滋病模型中关键指标 SIV DNA 绝对定量微滴式数字 PCR 技术的创新应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 27-30,53.

Zhang LL, Lu JH, Xue J, et al. The establishment and application of an absolute quantitative method for analyzing SIV DNA via droplet digital PCR [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 27-30,53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.05.005

艾滋病模型中关键指标 SIV DNA 绝对定量微滴式数字 PCR 技术的创新应用

张丽丽,陆佳涵,薛婧,丛喆*,魏强*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫健委人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 建立微滴式数字 PCR 技术(droplet digital PCR, ddPCR)作为关键指标,实现精准检测艾滋病动物模型中细胞及组织中 SIV DNA 载量,用于储存库隐匿病毒实时动态评估。**方法** 根据成熟的 qPCR 方法,对微滴式 dPCR 的反应条件进行了优化,确定最适退火温度;通过对 10 倍系列稀释 pGEM-SIV_{gag477} 质粒标准品的检测,确定 ddPCR 检测范围。并通过对若干 DNA 样品的多次检测,判断该检测方法的稳定性。**结果** ddPCR 的退火温度为 60℃;检测范围是 0.3~3.96×10⁴ copies/μL;微滴式 dPCR 与 qPCR 有良好的相关性,相关系数 $r=0.9981$ 。**结论** 本研究建立了基于微滴式 dPCR 的 SIV 病毒 DNA 的绝对定量方法,可有效的对细胞和组织中病毒储存库样本中病毒 DNA 载量进行动态绝对定量,极大提高了模型应用评价的准确度。

【关键词】 微滴式数字 PCR;猴免疫缺陷病毒;DNA;绝对定量

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 05-0027-04

The establishment and application of an absolute quantitative method for analyzing SIV DNA via droplet digital PCR

ZHANG Lili, LU Jiahuan, XUE Jing, CONG Zhe*, WEI Qiang*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a sensitive droplet digital PCR (ddPCR) assay for measuring the proviral DNA load in PBMCs (peripheral blood mononuclear cell) and tissues from SIV-infected animals. **Methods** According to the standard qPCR method, we first optimized the annealing temperature of the droplet dPCR, and then determined the detection range of the ddPCR. This was followed by correlation analysis of ddPCR and qPCR via detection of the 10-fold

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(2017-I2M-1-014);十三五传染病科技重大专项(2017ZX10304402,2018ZX10101001,2018ZX10301103);国家自然科学基金(81971944)。

【作者简介】 张丽丽(1994—),女,硕士研究生,从事实验动物病毒学研究工作。E-mail: xqlz0415@163.com

【通信作者】 丛喆(1972—),女,副主任医师,从事实验动物病毒学和模型研究工作。E-mail: congz@cnilas.org

魏强(1964—),男,研究员,博士生导师,研究方向:实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@cnilas.org * 共同通信作者

serially diluted pGEM-SIVgag477. We repeatedly tested 7 DNA samples extracted from PBMCs of SIV-infected monkeys to study the repeatability of the method . **Results** The annealing temperature of the ddPCR was determined to be 60°C and the detection range was 0.3~3.96 × 10⁴ copies/μL. The correlation coefficient of ddPCR and qPCR was in the range of 0.9981. **Conclusions** We established an absolute quantitative method for SIV DNA analysis based on droplet dPCR. This method can be used to accurately quantify the proviral DNA load and represents an effective technique for the measurement of viral reservoirs in SIV research.

【Keywords】 droplet digital PCR; SIV; DNA; absolute quantification

SIV 感染恒河猴后,猴体内可产生持续性感染并形成病毒的储存库,与 HIV 感染人的过程极其类似^[1]。清除储存库的策略研究是当前艾滋病研究中的热点,因此准确评估病毒储存库的大小就显得非常重要。目前常用的病毒储存库的定量检测方法是实时荧光定量 PCR,即 qPCR,该方法通过标准曲线计算出样本中的病毒 DNA 拷贝数,实现相对意义上的“绝对定量”^[2]。数字 PCR (digital PCR, dPCR)是近年来发展成熟起来的新技术,相比于 qPCR 定量不需要依赖标准品,能直接检测出样品中的拷贝数,实现真正意义上的绝对定量^[3]。

本研究依托 Bio-Rad 公司微滴式 dPCR (ddPCR)技术平台,建立了 SIV DNA 载量的绝对定量方法,并对微滴式 dPCR 用于 SIV DNA 检测的范围及准确性进行评估,以期病毒储存库的定量提供可靠的技术保障。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒标准品

所用 pGEM-SIVgag477 质粒,是将 SIVmac251 病毒 RNA gag 基因上 1360~1837 之间长度为 477 bp 的片段克隆到 pGEM T 载体上构建而成,由中国医学科学院医学实验动物研究所艾滋病课题组制备并保存^[4]。对该质粒进行 10 倍系列稀释,取浓度分别是 1、10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷copies/μL 的 8 个标准品进行本研究,同时设置 PCR 水为阴性对照 (Neg)。

1.1.2 样本

本研究中所用 7 份 DNA 样本均是从 SIV 感染猴外周血 PBMC 中提取,对应编号依次是 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7。

1.2 主要试剂与仪器

试剂盒为病毒核酸提取使用 QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN, 51306); TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher, 4369016)用

于实时荧光定量 PCR,微滴式 dPCR 中用到的 ddPCR™ Droplet Reader oil (Bio-Rad, 1863004)、Droplet Generation Oil for Probes (Bio-Rad, 1863005)、ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad, 1863023)。引物和探针由 invitrogen 公司合成 (表 1),加水稀释至 10 μmol/L 备用^[5]。

表 1 微滴式 dPCR 检测 SIV DNA 载量所使用的引物和探针
Table 1 Primer and probe sequences for the quantification of SIV DNA detected by droplet dPCR

引物及探针 Primer and Probe	序列 (5'-3') Sequence
gag 91 Forward primer	GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC
gag 91 Reverse primer	CAAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT
pSHIVgag91-1	FAM-ACCTGCCATTAAGCCCGA-MGB

1.3 实验方法

1.3.1 微滴式 dPCR 实验

主要实验步骤如下:首先配制 20 μL 定量反应体系 (混合液 10 μL,900 nmol/L 的引物 1.8 μL,250 nmol/L 的探针 0.5 μL,5.0 μL 的 DNA 模板,补充水至 20 μL),然后将其加入到 DG8 cartridge 中间一排的 8 个孔内,在最底下一排 8 个孔中各加入 70 μL 微滴生成油 (DG Oil),盖上胶垫,开始生成微滴。微滴生成于 cartridge 最上面一排孔内,将生成的油滴转移到 96 孔板中,封膜后进行 PCR 反应,最后用 QuantaSoft 软件进行数据读取。微滴式 dPCR 反应条件:95°C 10 min (×1),95°C 30 s (×40),60°C 1 min (×40),98°C 10 min (×1)。

1.3.2 退火温度的优化

本研究中,根据 qPCR 的退火温度,选择 57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C 六个温度进行实验,优化 ddPCR 的退火温度。模板选择使用 10⁴ 的 pGEM-SIVgag477 质粒标准品,将扩增拷贝数最高的温度确定为最佳的退火温度。

1.4 统计学方法

利用 QX200 Droplet Digital System 提供的 Quantasoft 软件进行 ddPCR 反应的图像处理, graphpad 进行显著性差异分析。

2 结果

2.1 微滴式 dPCR 信号识别

本研究中,所有反应的微滴生成正常,单个反应的总微滴数均超过 10000(图 1a),最高是 17626,最低是 13264,目标分子的分布符合泊松分布的统计学原理^[6],保证了后续分析结果的可靠性和准确性。图 1b 中红色为阈值线,阴性反应峰与阳性反应峰明显分开,该方法可准确检测出阴性微滴数与阳性微滴数。

2.2 微滴式 dPCR 反应退火温度的优化

ddPCR 退火温度在 57℃~62℃ 之间均能检测到荧光信号。57℃、62℃ 所得拷贝数较低,分别为 (346 ± 19.23) copies/ μL 和 (345 ± 3.68) copies/ μL , 58℃~61℃ 测得的拷贝数比较高且接近,60℃ 时拷贝数最高,为 (460 ± 16.97) copies/ μL , 因此 60℃ 为反应最适退火温度(图 2)。

2.3 10 倍系列稀释 pGEM-SIVgag477 质粒标准品微滴式 dPCR、qPCR 检测结果及两种方法的相关性评估

pGEM-SIVgag477 质粒 ddPCR 检测的一维散点图显示, 10^7 copies/ μL 标准品为全阳性微滴,无阴性微滴(图 3a),超出了检测上限;从 10^6 ~ 10^1 copies/ μL 的标准品, ddPCR 的检测值在 $0.3 \sim 3.96 \times 10^4$ copies/ μL 时, qPCR 与 ddPCR 测定结果线性关系良

好, $r = 0.9981$, 提示该检测方法可靠。1 copies/ μL 标准品用 qPCR 方法未检出(见图 3b), ddPCR 方法也大部分显示阴性,虽然个别孔检测出数值,但明显偏离线性曲线,因此也判定为阴性(见表 2)。

2.4 样本检测

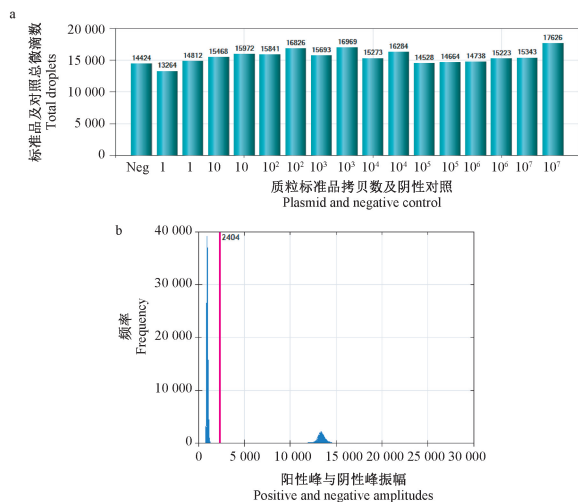
分别使用 ddPCR 及 qPCR 两种方法检测了 7 份 SIV 感染猴 PBMC 的 DNA 样本。ddPCR 检测样本的 CV 值介于 1.34%~16.13% 之间,随着拷贝数减少变异系数逐渐增大。但 (1.7 ± 0.14) copies/ μL 以上的样本检测变异系数均低于 10%, 显示了良好的稳定性。S6、S7 的检测结果均小于 1 copies/ μL , CV 值均大于 15%(见表 3)。

3 讨论

艾滋病毒感染机体后形成的病毒储存库,是目前艾滋病治疗中的最大障碍。如何准确评估病毒储存库的大小就显得尤为迫切。第三代 PCR 技术——数字 PCR 自问世以来,就被寄予厚望。不同于现阶段被广泛应用的实时荧光定量 PCR 技术,它能够直接计算出待检样本的拷贝数,不依赖 Ct 值及标准曲线,实现了真正意义上的绝对定量。尤其近年来在突破了样品分配的瓶颈后,其在生物医药领域的应用越来越广泛,包括拷贝数变异分析^[7]、复杂样本基因表达检测^[8]以及病毒拷贝数检测^[9]等。

本研究中,我们尝试建立了微滴式 dPCR 方法,用于定量检测 SIV DNA 拷贝数。结果显示在 0.3 copies/ μL 到 3.96×10^4 copies/ μL 的范围内,能够实现有效扩增,线性关系良好。与 qPCR 相比,灵敏度基本保持一致。但随着样本拷贝数的降低,微滴式 dPCR 检测结果变异度也还是明显加大,检测结果不太稳定。如果样本拷贝数超出检测上限,也不能实现有效扩增,需要对其进行稀释后再检测。ddPCR 的检测范围过窄,可能和该技术需要对样本进行极限稀释有关。

另外,本研究还发现,现阶段微滴式 dPCR 实验过程稍显繁琐,对操作人员的技术要求较高。例如整个操作过程需要多次转板易造成样本的损失;加样产生微小气泡妨碍油滴生成,继而导致 PCR 无法正常扩增。这些操作可能限制了该技术的普及和大规模使用。但作为一项新兴技术,微滴式 dPCR 还是给艾滋病研究带来了很大的惊喜,对艾滋病毒储存库更真实准确地定量检测,将对清除储存库策略研究、抗艾滋病疫苗及药物研究提供有效的技术保障。



注: a: ddPCR 10 倍系列稀释 pGEM-SIVgag477 质粒标准品总微滴数生成柱状图; b: 不同浓度下检测结果直方图。

图 1 总微滴数生成柱状图及检测结果直方图

Note. a, histogram of total droplet number for pGEM-SIVgag477.

b, histogram of test results for different concentrations.

Figure 1 Histogram of total droplet number and histogram of test results

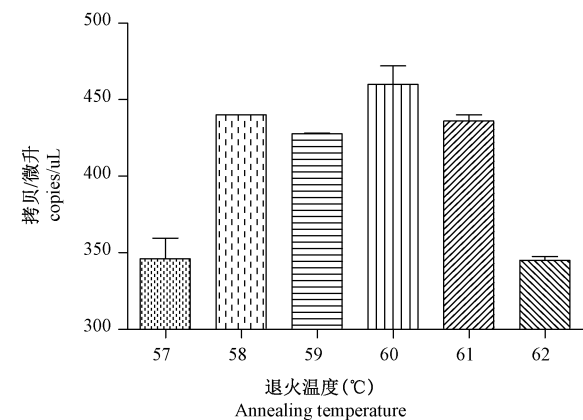
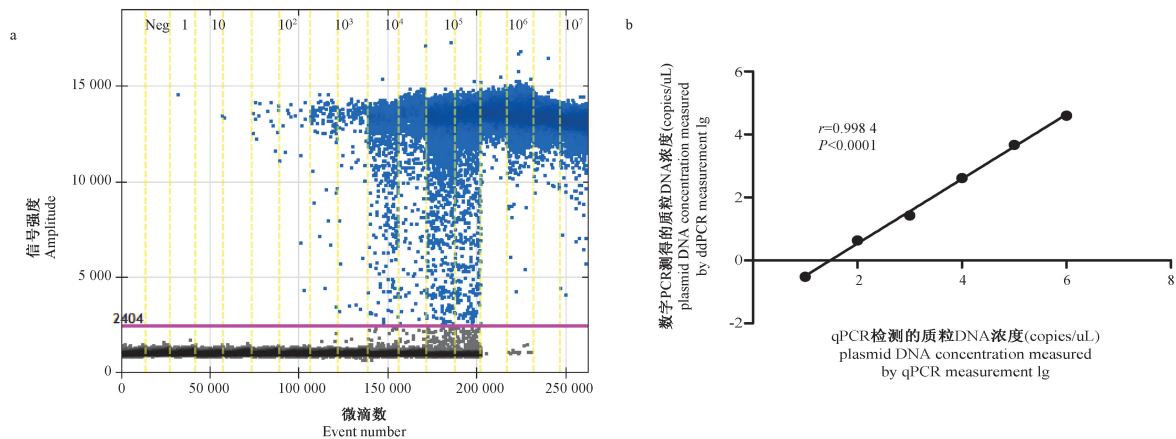


图 2 ddPCR 不同退火温度下测定 pGEM-SIVgag477 质粒的拷贝数结果
Figure 2 Copy numbers of pGEM-SIVgag477 detected by ddPCR at different annealing temperatures

表 2 10 倍系列稀释 pGEM-SIVgag477 质粒标准品 qPCR 及 ddPCR 检测结果
Table 2 10-fold serial dilution output of pGEM-SIVgag477 detected by ddPCR and qPCR

质粒 (copies/μL)	qPCR	ddPCR 检测 (copies/μL) ($\bar{x}\pm s$) ddPCR measured
Neg	-	No call
1	-	-
10	+	0.3±0.03
10 ²	+	4.34±0.59
10 ³	+	27.00±2.55
10 ⁴	+	416.53±8.60
10 ⁵	+	4696±101.8
10 ⁶	+	39600±7920
10 ⁷	+	No call

注:“No call”:超出了检测范围;“-”:检测结果为阴性。
Note. “No call”, The test results were beyond the detection range. “-”, The test result was negative



注:a; 10 倍系列稀释 pGEM-SIVgag477 质粒标准品 ddPCR 扩增一维散点图;b: ddPCR、qPCR 两种检测方法相关性评估。

图 3 标准品扩增一维散点图及不同检测方法相关性评估

Note: a, One-dimensional scatter plot of pGEM-SIVgag477 detected by ddPCR. b, liner correlation analysis of ddPCR and qPCR.

Figure 3 One-dimensional scatter plot and liner correlation analysis

表 3 ddPCR 及 qPCR 测定 SIV 感染猴 PBMC 中 total DNA 拷贝数结果
Table 3 The results of DNA samples detected by ddPCR and qPCR separately

样本编号 Sample ID	微滴式 dPCR (copies/μL) ddPCR		荧光定量 PCR (copies/μL) qPCR	
	平均值±标准($\bar{x}\pm s$) Mean±SD	变异系数 CV (%) Coefficient of Variance	平均值±标准差($\bar{x}\pm s$) Mean±SD	变异系数 CV (%) Coefficient of Variance
S1	9583.00±128.00	1.34	288913.00±20870.00	7.20
S2	843.00±52.40	6.22	23548.00±526.00	2.23
S3	167.80±16.01	9.54	5744.00±354.70	6.18
S4	13.60±0.98	7.20	762.20±11.10	1.46
S5	1.70±0.14	8.32	107.90±8.60	7.97
S6	0.31±0.05	16.13	15.02±0.03	0.20
S7	0.36±0.06	15.71	-	N/A

注:“-”:检测结果为阴性;N/A:无数据。
Note. “-”, The test result is negative, N/A, no data.

- 研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2004.
- [9] 陶伟伟, 肖东, 吴浩然, 等. 基于药对探讨中药复方越鞠丸抗抑郁作用配伍规律 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(9): 1314-1320.
- [10] 陈婷婷, 刘雅芳. 基于数据挖掘技术的中国古代抑郁症医案用药规律分析 [J]. 中医药学报, 2016, 44(3): 16-20.
- [11] 赵艳青, 滕晶, 杨洪军. 基于数据挖掘的现代中医药治疗抑郁症用药规律分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 2042-2046.
- [12] 郑丽莉. 芎归六君子汤对实验性大鼠冠心病的治疗作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(1): 23-27, 55.
- [13] 黄志勇, 田广永, 曹玲, 等. 藻本内酯上调 miR-181b 减轻氧化低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞炎症损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 18-23.
- [14] 徐丽丽, 汪小燕, 张奕, 等. 丁苯酞抗抑郁作用的研究 [J]. 宜春学院学报, 2016, 38(3): 23-27.
- [15] 曹姗, 刘永刚, 董辉, 等. 丁苯酞注射液改善症状性颅内动脉狭窄病人的抑郁状态 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(5): 484-487.
- [16] 吴迎春. 丁苯酞胶囊联合氟西汀对卒中后抑郁患者的疗效及神经功能缺损的影响 [J]. 中国医学创新, 2016, 13(34): 108-111.
- [17] 杨江胜, 王达鹏, 高志强, 等. 丁苯酞软胶囊联合曲唑酮治疗缺血性卒中后抑郁的效果评价 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(21): 2557-2558.
- [18] 任荔. PACAP 介导的越鞠丸快速起效抗抑郁机制及相关物质基础研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [19] Gorinski N, Bijata M, Prasad S, et al. Attenuated palmitoylation of serotonin receptor 5-HT1A affects receptor function and contributes to depression-like behaviors [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3924.
- [20] Fernandez SP, Broussot L, Marti F, et al. Mesopontine cholinergic inputs to midbrain dopamine neurons drive stress-induced depressive-like behaviors [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4449.
- [21] Kupfer DJ, Frank E, Phillips ML. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives [J]. Lancet, 2012, 379(9820): 1045-1055.
- [22] Connolly KR, Thase ME. Emerging drugs for major depressive disorder [J]. Expert Opin Emerging Drugs, 2012, 17(1): 105-126.

[收稿日期]2019-08-12

(上接第 30 页)

参考文献:

- [1] Archin NM, Margolis DM. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir [J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(1): 29-35.
- [2] 田星, 张春玉. 数字 PCR 技术概述 [J]. 国际遗传学杂志, 2017, 40(3): 141-144, 164.
- [3] 李春勇. 数字 PCR 技术原理及应用 [J]. 生物技术世界, 2014, (11): 10-13.
- [4] 丛喆, 李兆忠, 魏强, 等. SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 测定猴免疫缺陷病毒 (SIV) RNA 拷贝数方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4): 271-275.
- [5] 许琰, 冯育芳, 王卫, 等. TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 法检测 SIV/SHIV 病毒 RNA 拷贝数方法的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(2): 92-95.
- [6] Morisset D, Stebih D, Milavec M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62583.
- [7] Qin J, Jones RC, Ramakrishnan R. Studying copy number variations using a nanofluidic platform [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(18): e116.
- [8] Barrett AN, McDonnell TC, Chan KC, et al. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia [J]. Clin Chem, 2012, 58(6): 1026-1032.
- [9] Henrich TJ, Gallien S, Li JZ, et al. Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR [J]. J Virol Methods, 2012, 186(1-2): 68-72.

[收稿日期]2019-11-21