

间充质干细胞端粒酶催化亚基 RT-qPCR 方法的建立*

陈晓菲, 李慧婷, 董莹莹, 曹译丹, 付欣悦, 刘明月, 张瑞瑞, 王艳辉,
王新乐, 崔梦姝, 张峒, 庞琳**, 饶春明**

(北京昭衍药物检定研究有限公司, 北京 102605)

摘要 目的: 建立一种简便、高效的端粒酶活性检测方法, 用于评价间充质干细胞产品的成瘤性风险。**方法:** 针对端粒酶催化亚基 (*TERT*) 的保守结构域设计特异性引物和探针, 并对 *TERT* 基因的引物和探针进行优化筛选, 同时设置内参基因的引物和探针, 在一个反应体系内使用双色荧光探针进行多重定量 PCR 反应, 建立 RT-qPCR 探针法。应用该法对人间充质干细胞中是否表达 *TERT* 基因来间接判断细胞中是否存在端粒酶活性。**结果:** 该方法可稳定特异地检测到阳性对照细胞 293T/17 的 *TERT* 基因, Ct 平均值为 23.96, RSD 为 1.5%。内参基因 *GAPDH* 均可以正常检出, Ct 平均值为 14.13, RSD 为 1.3%。阴性对照细胞 MRC-5 内参基因 *GAPDH* 可以正常检出, Ct 平均值为 12.81, RSD 为 0.46%, *TERT* 基因未检出, 该细胞端粒酶活性为阴性。人间充质干细胞 HMSC 内参基因 *GAPDH* 可以正常检出, Ct 平均值为 13.01, RSD 为 3.8%, *TERT* 基因未检出, 人间充质干细胞 HMSC 的端粒酶活性为阴性。**结论:** 本研究建立的 RT-qPCR 探针法重复性好, 特异性高, 能够准确检测端粒酶阳性细胞催化亚基 mRNA 的转录。可用于间充质干细胞的端粒酶活性分析, 间接评估间充质干细胞成瘤性风险。

关键词: 荧光定量 RT-PCR 探针法; 端粒酶催化亚基; 端粒酶活性; 干细胞; 成瘤性

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2025)01-20-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1333

Establishment of RT-qPCR method for telomerase catalytic subunits of mesenchymal stem cells*

CHEN Xiao-fei, LI Hui-ting, DONG Ying-ying, CAO Yi-dan, FU Xin-yue,
LIU Ming-yue, ZHANG Rui-rui, WANG Yan-hui, WANG Xin-yue, CUI Meng-shan,
ZHANG Tong, PANG Lin**, RAO Chun-ming**

(JOINN pharmaceutical Quality Research and Testing(Beijing)Co., Ltd., Beijing 102605, China)

Abstract Objective: To establish a simple and efficient method for detecting telomerase activity for evaluating tumorigenic risk of cell products. **Methods:** Specific primers and probes were designed for the conserved domain of telomerase catalytic subunit (*TERT*), and the primers and probes of *TERT* gene were optimized and screened,

* 北京市科技计划课题: 基因修饰免疫细胞和基因治疗药物质量控制关键技术与服务平台建设 (Z221100007922015)

** 通信作者 饶春明 Tel:(010)67869966; E-mail: raochunming@joinn-lab.com

庞琳 Tel:(010)67869966; E-mail: panglin@joinn-lab.com

第一作者 Tel:(010)67869966; E-mail: chenxiaofei@joinn-lab.com

and the primers and probes of internal reference genes were set up. Multiple quantitative PCR reaction was performed using two-color fluorescent probes in a reaction system, and RT-qPCR probe method was established. The expression of *TERT* gene in human mesenchymal stem cells HMSC was used to determine whether telomerase activity existed in the cells indirectly. **Results:** *TERT* gene of 293T/17 positive control cells could be stably and specifically detected by this method, with a mean Ct value of 23.96 and a RSD of 1.5. The internal reference gene *GAPDH* could be detected successfully, the mean Ct value was 14.13, the RSD was 1.3%. The reference gene *GAPDH* in MRC-5 could be detected in negative control cells, the mean Ct value was 12.81, the RSD was 0.46%, the *TERT* gene was not detected, and the telomerase activity was negative. The reference gene *GAPDH* in HMSC could be detected, the Ct mean value was 13.01, and the RSD was 3.8%, whereas, the telomerase activity of HMSC was negative. **Conclusion:** The real-time fluorescent quantitative RT-qPCR probe method established in this study can accurately detect the expression of catalytic subunit mRNA in telomerase positive cells with good repeatability and high specificity. It can be used to analyze telomerase activity of stem cells and indirectly evaluate tumorigenic risk of cell products derived from stem cells.

Keywords: fluorescent quantitative RT-PCR probe method; telomerase reverse transcriptase; telomerase activity; stem cell; tumorigenicity

端粒酶是一种核糖核蛋白复合物,主要由端粒酶 RNA 亚基(hTR)、端粒酶催化亚基(telomerase reverse transcriptase, *TERT*)和端粒酶相关协助蛋白 3 个部分组成^[1-2]。端粒酶与细胞死亡和癌变之间有着密切的关系^[3]。通常在人类正常体细胞中无法检测到端粒酶活性,而在 85%~95% 的肿瘤细胞和具有自我更新能力的干细胞中均可以检测到端粒酶活性^[4-6]。

在首次开展临床试验前,需要根据干细胞产品的生物学特性、临床拟用药途径等因素,评估干细胞产品的成瘤性和/或致瘤性风险,其中端粒酶活性检测是评价干细胞产品成瘤性的体外实验之一^[7-8]。因此可以通过干细胞的端粒酶活性水平来评估细胞产品的成瘤性风险^[9-11]。

目前关于端粒酶活性的检测方法主要分为直接检测法和间接检测法 2 类^[12]。1994 年 Kim 等^[13]建立了端粒重复片段扩增(telomeric repeat amplification protocol, TRAP)检测法。TRAP 法通过 PCR 技术对端粒酶合成的端粒的 DNA 进行扩增,该方法应用广泛,且提高了端粒酶活性检测的灵敏度^[14-17]。为简化操作步骤,许多改良 TRAP 法被报道^[12]。如 TRAP-ELISA 法^[18]、TRAP-HPA 法^[19]和 TRAP 银染法等^[12]。*TERT* 是端粒酶逆转录酶,其表达与端粒酶活性水平具有相关性^[20]。因此可以通过检测 *TERT* 基因的 mRNA 或蛋白表达来间接检测端粒酶活性^[12]。

本研究使用 RT-qPCR 技术,通过设计 *TERT*

基因片段特异性引物和探针并优化提取和扩增条件,建立了一种间接评价端粒酶活性的方法。该方法使用双色荧光探针分别检测 *TERT* 基因和内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)的 mRNA,具有良好的重复性。

1 仪器与材料

1.1 实验细胞

MRC-5 细胞(人胚肺来源二倍体细胞, CCL-171, 购自 ATCC 公司)、293T/17 细胞[SV40T 转化的人胚肾细胞(亚系),购自国家生物医学实验细胞资源库]、HeLa 细胞[人宫颈癌细胞, CCL-2, 购自 ATCC 公司]、HMSC 细胞(人脐带间充质干细胞, PCS-500-010, 购自 ATCC 公司)。细胞培养条件为 37 °C, 5% CO₂。

1.2 主要试剂及仪器

提取试剂盒为市面上 4 种品牌的柱式法核酸提取试剂盒,分别为 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit(9767)(购于宝日医生物技术有限公司)、TIANamp Virus RNA Kit(DP315-R)(购于天根生化科技有限公司)、TIANamp Virus DNA/RNA Kit(DP315)(购于天根生化科技有限公司); FastPure® Viral DNA/RNA Mini Kit Pro(RC323)(购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司),随机编号为 A、B、C、D。逆转录试剂盒 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(gDNA digester plus)购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司 AceQ Universal U+ Probe Master Mix V2(Q513)购于南京诺唯赞生物科技股份有

限公司。根据NCBI收录的 *TERT* 基因(AB085628.1)和 *GAPDH* 基因(NC060936.1)的CDS序列,参照引物和探针的设计原则,使用SnapGene软件设计1对 *GAPDH* 基因定量引物与探针(*GAPDH*-F1/R1/P1)作为内参基因;设计6对 *TERT* 基因定量引物与探针(*TERT*-F1/R1/P1至 *TERT*-F6/R6/P6)。每对扩增产物长度约为

100 bp。定量引物及探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, *TERT* 质粒对照品由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。见表1。DNA稀释液购自北京擎科生物科技股份有限公司荧光定量PCR仪(7500和Quant Studio5)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。PCR扩增仪(T100)购于BIO-RAD公司。

表1 引物、探针和质粒信息

Tab. 1 Information of primers, probes and plasmid

名称 (name)	核酸序列 (nucleotide sequence)
<i>TERT</i> -F1	AGGCTCGTGGAGACCATCTTT
<i>TERT</i> -R1	TCCCAAGCAGCTCCAGAAACA
<i>TERT</i> -P1	FAM-CTGCCCCAGCGCTACTGGCAAAT-BHQ1
<i>TERT</i> -F2	TGACGTGGAAGATGAGCGT
<i>TERT</i> -R2	ATCAGCCAGTGCAGGAACCTT
<i>TERT</i> -P2	FAM-AGAGCACCGTCTGCGTGAGGAGAT-BHQ1
<i>TERT</i> -F3	CATTCTGCTCAAGCTGACTC
<i>TERT</i> -R3	CCAGGATGGTCTTGAAGTCTG
<i>TERT</i> -P3	FAM-CTCAGGACAGCCCAGACGCAGC-BHQ1
<i>TERT</i> -F4	AGCACTTCCTCTACTCCTCAGG
<i>TERT</i> -R4	GGCTGGAACCCAGAAAGAT
<i>TERT</i> -P4	FAM-ACAAGGAGCAGCTGCGGCCCTCCTT-BHQ1
<i>TERT</i> -F5	TCTFCGACGTCTTCTACGCTT
<i>TERT</i> -R5	GAAATCATCCACCAAACGCAGG
<i>TERT</i> -P5	FAM-TCAGGGGCAAGTCTACGTCCAGTGCCA-BHQ1
<i>TERT</i> -F6	TTCTCAGCTATGCCCGGAC
<i>TERT</i> -R6	GCTGTGACACTTCAGCCGCA
<i>TERT</i> -P6	FAM-CACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGA-BHQ1
<i>GAPDH</i> -F1	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
<i>GAPDH</i> -R1	ACCACCCTGTGCTGTAGCCAA
<i>GAPDH</i> -P1	VIC-ACCACCTCTCCACCTTTGACGCT-BHQ1
<i>TERT</i> 质粒对照品 (<i>TERT</i> plasmid control substance)	TGCTGCGTGTGCGGGCCAGGACCCGCCGCTGAGCTGTACTTTTGTCAAGGTGGATGTGACGGGGCCGTACGAC ACCATCCCCAGGACAGGCTCACGGAGTCTATCGCCAGCATCATCAAACCCAGAACACGTACTGCGTGCCTCG GTATGCCGTGCTCCAGAAGGCCGCCATGGGCACGTCCGCAAGGCCCTTCAAGAGCCACGTCTCTACCTTGACAG ACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTCGTGGCTCACCTGCAGGAGACCAGCCGCTGAGGGATGCCGTCGTCATCG AGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGGCCAGCAGTGGCCTCTTCGACGTCTTCTACGCTTATGTGCCACCACGCCG TGCCGATCAGGGGCAAGTCTACGTCCAGTCCAGGGGATCCCGCAGGGCTCCATCTCTCCAGCTGCTCTGCA GCCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAAGCTGTTTGGCGGGATTGCGCGGACGGGCTGCTCCTCGCTTTGGTGG ATGATTTCTTGTGGTGACACCTCACCTCACCCAGCGGAAAACCTTCTCAGCTATGCCCGGACCTCCATCAGAGC CAGTCTCACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTCCGAAACTCTTTGGGGTCTTGGCGCTGAA GTGTCACAGCCTGTTTCTGGATTTGCAGGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGCACCAACATCTACAAGATCCTCCT GCTGCAGCGCTACAGGTTTACCGCATGTGTGCTGCAGCTCCCATTTTCATCAG

2 方法与结果

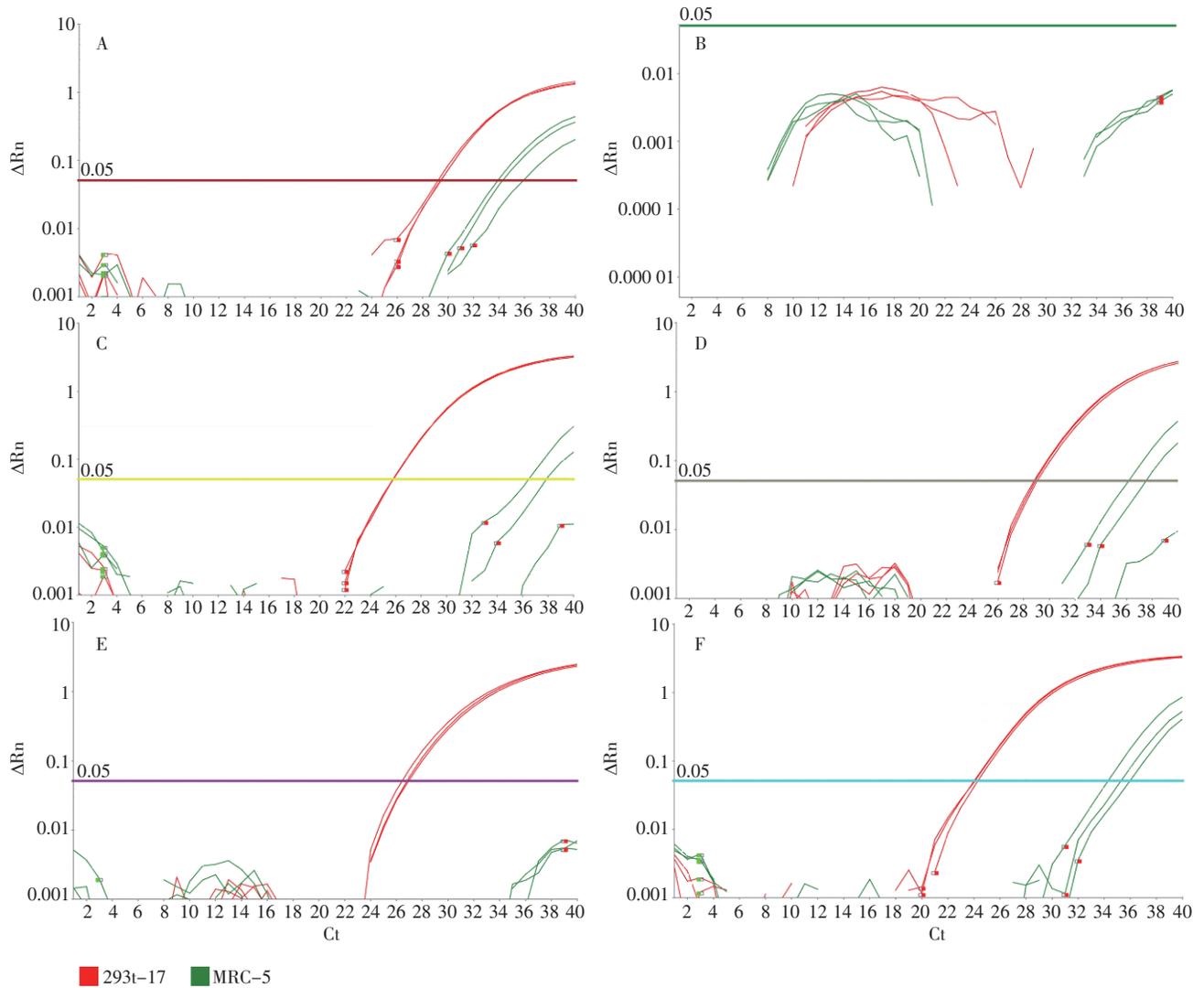
2.1 引物探针对筛选

使用端粒酶阳性细胞系293T/17细胞和端粒酶阴性细胞系MRC-5细胞的cDNA为模板。分别使用6套不同的 *TERT* 基因的引物探针对(*TERT*-F1/R1/P1、*TERT*-F2/R2/P2、*TERT*-F3/R3/P3、*TERT*-F4/R4/

P4、*TERT*-F5/R5/P5、*TERT*-F6/R6/P6)与内参引物探针对(*GAPDH*-F1/R1/P1)混合进行扩增,比较不同引物探针检测 *TERT* 基因的效率(图1、表2)。检测方法流程为cDNA 5 μ L(cDNA总量约为4 μ g), AceQ Universal U+Probe Master Mix V2 15 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹的 *TERT* 定量引物各0.8 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹的 *TERT* 探

针 0.4 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *GAPDH* 定量引物各 0.8 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *GAPDH* 探针 0.4 μL , 加入 ddH₂O 至

30 μL 。扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光信号, 共 40 个循环。



A. *TERT*-F1/R1/P1 B. *TERT*-F2/R2/P2 C. *TERT*-F3/R3/P3 D. *TERT*-F4/R4/P4 E. *TERT*-F5/R5/P5 F. *TERT*-F6/R6/P6
图 1 *TERT* 基因引物与探针优化实验的扩增曲线

Fig. 1 Amplification curves of *TERT* gene in primer and probe optimization tests

表 2 *TERT* 基因引物与探针优化 Ct 值

Tab. 2 Ct values of amplification of *TERT* gene in primer and probe optimization

<i>TERT</i> 引物探针名称 (<i>TERT</i> priming target name)	293T/17		MRC-5	
	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)
<i>TERT</i> -F1/R1/P1	29.33 ± 0.14	15.65 ± 0.14	34.66 ± 1.05	13.57 ± 0.02
<i>TERT</i> -F2/R2/P2	Undet	15.41 ± 0.08	Undet	13.47 ± 0.19
<i>TERT</i> -F3/R3/P3	25.78 ± 0.02	15.43 ± 0.09	37.14 ± 0.93	13.39 ± 0.03
<i>TERT</i> -F4/R4/P4	28.92 ± 0.14	15.44 ± 0.14	36.80 ± 0.90	13.40 ± 0.05
<i>TERT</i> -F5/R5/P5	26.70 ± 0.26	15.39 ± 0.02	Undet	13.37 ± 0.06
<i>TERT</i> -F6/R6/P6	27.20 ± 0.13	15.73 ± 0.14	38.41 ± 1.00	13.77 ± 0.22

注 (note): Undet. 无 Ct 值 (no Ct value)

293T/17 细胞和 MRC-5 细胞使用 6 套混合的引物探针均可以稳定检出 *GAPDH* 基因表达(表 2)。293T/17 细胞使用 *TERT-F2/R2/P2* 引物探针无法检测到 *TERT* 基因表达,说明该引物探针不适合本检测方法(图 1-B)。293T/17 细胞使用 *TERT-F1/R1/P1*, *TERT-F3/R3/P3*, *TERT-F4/R4/P4*, *TERT-F6/R6/P6* 引物探针均能够检测到 *TERT* 基因表达, Ct 值在 25.76 至 29.42 范围内,但是 MRC-5 细胞使用这 4 组引物和探针会产生非特异性扩增曲线,表明这 4 组引物探针可能产生了非特异性扩增,不适合该方法(图 1-A, C, D, F)。使用 *TERT-F5/R5/P5* 引物探针检测端粒酶阳性对照细胞 293T/17 的 *TERT* 基因有明显的扩增曲线, Ct 值在 26.40 至 26.91 范围内,同时阴性对照 MRC-5 细胞 *TERT* 基因无明显扩增曲线。综上,从扩增效率上和检测特异性上分析, *TERT-F5/R5/P5* 引物探针特异性更好,适用于细胞样品 *TERT* 基因表达产物 mRNA 的检测(图 1-E)。

2.2 端粒酶活性检测方法的优化

2.2.1 核酸提取试剂盒筛选

取细胞数为 1×10^6 cells 的细胞悬液 1 mL, $2\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 立即使用或置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。分别使用 4 种核酸提取试剂盒(A、B、C、D)提取 293T/17 细胞的总 RNA。具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。使用 NanoDrop 对抽提的 RNA 进行浓度和纯度(A_{260}/A_{280})检测。从总体积 50 μL 中取 RNA 模板 3 μL 进行逆转录。以 cDNA 为模板, 使用内参引物探针对 *GAPDH-F1/R1/P1* 和 *TERT-F5/R5/P5* 引物探针对混合后进行扩增, 通过荧光定量 PCR, 比较不同核酸提取试剂盒对 *TERT* 基因提取效率的影响, 选择最合适的核酸提取试剂盒。荧光定量 PCR 步骤同“2.1”项。

通过荧光定量 RT-PCR 检测结果显示, *GAPDH* 基因和 *TERT* 基因均能够检测到明显的扩增曲线, *TERT* 基因检测为阳性, Ct 值在 24.74 至 29.86 范围内(如表 3 所示)。其中试剂盒 A、B、C 和 D 提取 RNA 后检测的 *TERT* 基因的 Ct 值均值分别为 24.80、26.38、29.62 和 25.39。A、B、D 这 3 种试剂盒提取效率相似, 优于试剂盒 C。本检测方法可使用 A、B 和 D 任意 1 种试剂盒提取 RNA, 在本研究中, 选择了试剂盒 A 进行了后续方法建立。

2.2.2 反应条件优化

分别使用不同浓度(100、200、300、400、

500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的上下游引物和不同浓度(50、100、150、200、250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的探针, 对 293T/17 细胞样品和 MRC-5 细胞样品进行 *TERT* 基因的检测。使用内参引物探针对 *GAPDH-F1/R1/P1* 和 *TERT-F5/R5/P5* 引物探针对混合后进行扩增, RT-qPCR 步骤同“2.1”项。

表 3 不同试剂盒检测的 *TERT* 基因和 *GAPDH* 基因 Ct 值

Tab. 3 Ct values of *TERT* gene and *GAPDH* gene detected by different kits

试剂盒 (kit)	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)
A	24.80 \pm 0.06	15.20 \pm 0.05
B	26.38 \pm 0.03	16.44 \pm 0.07
C	29.62 \pm 0.22	17.27 \pm 0.05
D	25.39 \pm 0.08	15.43 \pm 0.03

注(note): TaKaRa(9767) 试剂盒、天根(DP315-R) 试剂盒、天根(DP315) 试剂盒和诺唯赞(RC323) 试剂盒以 A、B、C、D 随机指代, 指代顺序与试剂盒名称在文中出现顺序无关(TaKaRa(9767) kit, TIANGEN(DP315-R) kit, TIANGEN(DP315) kit, and Vazyme(RC323) kit are randomly referred to as A, B, C, and D. The order of reference is independent of the order in which the kit names appear in the text)

2.2.2.1 最佳引物浓度优化 使用 293T/17 细胞为模板, 固定 *TERT* 和 *GAPDH* 2 个基因的探针终浓度为 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 比较上下游引物终浓度在 100、200、300、400、500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ct 值。如表 4 所示, *GAPDH* 基因均能够稳定检出。 *TERT* 基因的上下游引物终浓度为 100、200、300、400、500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Ct 值分别为 25.71、25.67、25.70、25.77、25.95。其中引物浓度在 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Ct 值最低, 提示在该引物浓度时扩增效率相对其他浓度较高。本研究中上下游引物浓度选择 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为目的浓度。

2.2.2.2 最佳探针浓度优化 使用 293T/17 细胞为模板, 固定 *TERT* 和 *GAPDH* 2 个基因的引物终浓度为 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 比较探针终浓度在 50、100、150、200、250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ct 值。如表 5 所示, *GAPDH* 基因均能够稳定检出。 *TERT* 基因的探针终浓度为 50、100、150、200、250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Ct 值分别为 27.22、26.92、26.89、26.84、26.87。其中探针浓度在 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Ct 值最低, 提示在该探针浓度时扩增效率相对其他浓度较高。本研究中上下游探针浓度选择 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为目的浓度。

表 4 不同引物浓度检测的 *TERT* 基因和 *GAPDH* 基因 Ct 值

Tab. 4 Ct values of *TERT* gene and *GAPDH* gene detected by different primer concentrations

引物浓度 (primer concentration)	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)
100 nmol · L ⁻¹	25.71 ± 0.05	15.95 ± 0.04
200 nmol · L ⁻¹	25.67 ± 0.16	16.31 ± 0.12
300 nmol · L ⁻¹	25.70 ± 0.02	16.60 ± 0.08
400 nmol · L ⁻¹	25.77 ± 0.02	16.81 ± 0.04
500 nmol · L ⁻¹	25.95 ± 0.12	16.95 ± 0.02

 表 5 不同探针浓度检测的 *TERT* 基因和 *GAPDH* 基因 Ct 值

Tab. 5 Ct values of *TERT* gene and *GAPDH* gene detected by different probe concentrations

探针浓度 (probe concentration)	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)
50 nmol · L ⁻¹	27.22 ± 0.07	16.97 ± 0.03
100 nmol · L ⁻¹	26.92 ± 0.11	16.06 ± 0.09
150 nmol · L ⁻¹	26.89 ± 0.07	15.76 ± 0.04
200 nmol · L ⁻¹	26.84 ± 0.03	15.53 ± 0.06
250 nmol · L ⁻¹	26.87 ± 0.08	15.43 ± 0.11

2.2.3 试验有效性判定标准

(1) 阳性对照内参基因 Ct 值在 14 ± 3, *TERT* 基因 Ct 值在 25 ± 3。(2) 阴性对照内参基因 Ct 值在 14 ± 3, *TERT* 基因无 Ct 值或无明显扩增曲线。(3) 无模板对照内参基因和 *TERT* 基因均无 Ct 值或无明显扩增曲线。

2.2.4 待测样品判定标准

(1) 待测样品内参基因 Ct 值在 14 ± 3, *TERT* 基因 Ct ≤ 35 且有明显扩增曲线, 则样品端粒酶活性为阳性。(2) 待测样品内参基因 Ct 值在 14 ± 3, *TERT* 基因无 Ct 值或无明显扩增曲线, 则样品端粒酶活性为阴性。(3) 待测样品内参基因 Ct 值在 14 ± 3, *TERT* 基因在临界值 35 < Ct < 40, 复检若 Ct ≥ 40, 则为阴性; 复检若 35 < Ct < 40, 则为阳性。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性验证

检测 2 种 *TERT* 特异性样品 (HeLa 细胞和 293T/17 细胞) 和 2 种 *TERT* 非特异性样品 (HMSC 细胞和 MRC5 细胞), 同时检测无模板对照 (NTC) 样品。采用优化后的反应体系进行检测, 每个样本重复检测 3 次。考察分析方法的专属性。优化后的反应体系为: AceQ Universal U+ Probe Master Mix V2 15 μL,

10 μmol · L⁻¹ 的 *TERT* 定量引物 (F5/R5) 各 0.6 μL, 10 μmol · L⁻¹ 的 *TERT* 探针 (P5) 0.6 μL, 10 μmol · L⁻¹ 的 *GAPDH* 定量引物 (F1/R1) 各 0.6 μL, 10 μmol · L⁻¹ 的 *GAPDH* 探针 0.6 μL, 模板 5 μL, 加入 ddH₂O 至 30 μL。反应程序为 95 °C, 10 min; 95 °C, 5 s, 60 °C, 1 min, 60 °C 采集荧光信号, 共 45 个循环。

结果如表 6 所示, HeLa 细胞与 293T/17 细胞样品 *GAPDH* 基因 Ct 值在 14 ± 3, *TERT* 基因 Ct ≤ 35 且有明显扩增曲线, 表明端粒酶活性为阳性。HMSC 与 MRC-5 细胞样品 *GAPDH* 基因 Ct 值在 14 ± 3, *TERT* 基因无 Ct 值或无明显扩增曲线, 表明端粒酶活性为阴性。因此, 该检测方法具有良好的专属性。

表 6 专属性检测结果

Tab. 6 Specific detection results

细胞名称 (cell name)	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)
HeLa	30.10 ± 0.21	14.06 ± 0.08
293T/17	26.23 ± 0.21	15.07 ± 0.13
HMSC	Undet	14.20 ± 0.04
MRC-5	Undet	13.62 ± 0.06
NTC	Undet	Undet

注 (note): Undet. 无 Ct 值 (no Ct value)

2.3.2 耐用性验证

为验证该检测方法的耐用性, 选用不同实时荧光定量 PCR 仪分别对阳性对照 (293T/17)、阴性对照 (MRC-5)、待测样品 (HMSC) 和无模板对照 (NTC) 进行检测, 验证该检测方法的仪器耐用性。RT-qPCR 步骤同“2.3.1”项。

仪器耐用性检测结果见表 7, ABI 7500 和 QuantStudio 5 对各样品的检测结果无明显差异。阳性对照 *TERT* 基因 Ct 值分别为 25.95 ± 0.08 和 25.10 ± 0.08。待测样品 HMSC 结果为阴性。因此, 当仪器存在一定变化时, 该检测方法的检测结果无明显变化。

2.3.3 线性及灵敏度验证

将稀释至 1 × 10¹⁰ copies · μL⁻¹ 的 *TERT* 质粒对照品溶液进行倍比稀释 (稀释液为 DNA 稀释液), 取 1 × 10² ~ 1 × 10⁶ copies · μL⁻¹ 质粒对照品溶液作为标准曲线各点, 灵敏度对照样品质量浓度为 1 × 10 copies · μL⁻¹, 对该检测方法的线性及灵敏度参数进行验证。RT-qPCR 步骤同“2.3.1”。结果如图 2 所示, 该检测方法的扩增效率为 92.31%。标

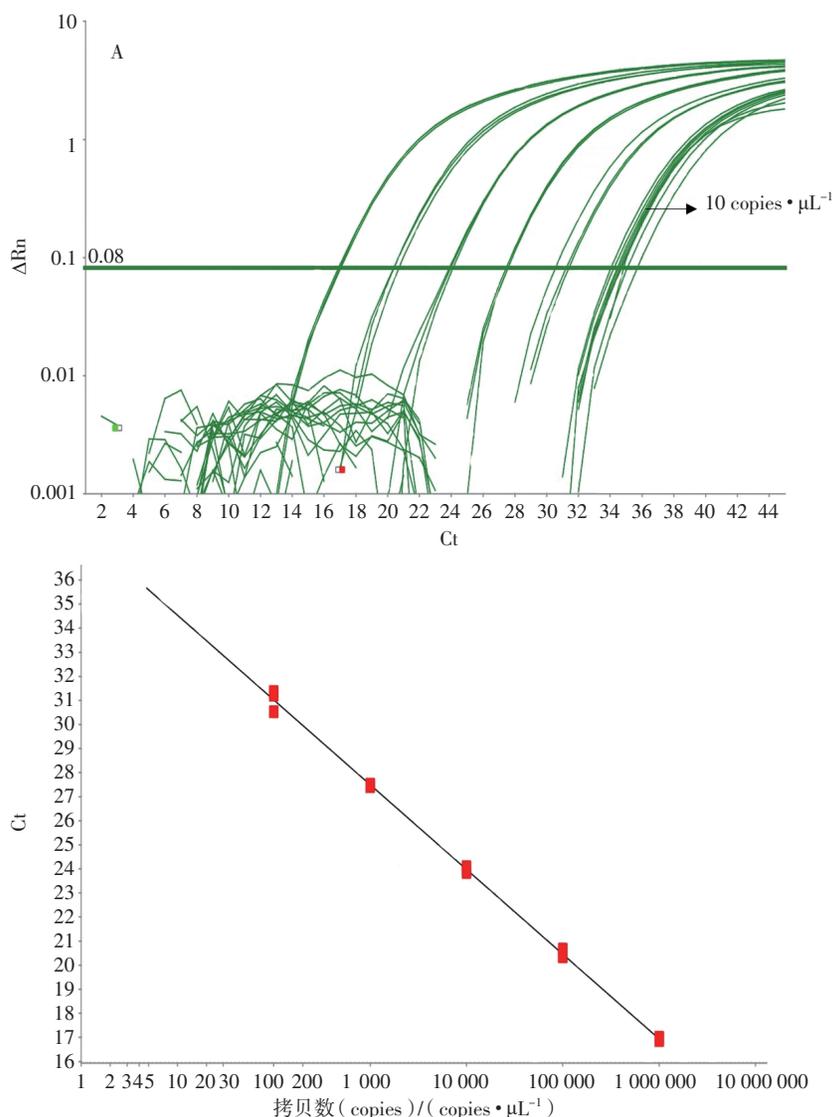
表 7 仪器耐用性验证结果

Tab. 7 Results of instrument durability verification

名称 (name)	仪器 (instrument)	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)
阳性对照 (positive control)	ABI 7500 QuantStudio 5	25.95 ± 0.08 25.10 ± 0.08	14.43 ± 0.06 15.03 ± 0.11
阴性对照 (negative control)	ABI 7500 QuantStudio 5	Undet Undet	14.31 ± 0.03 14.67 ± 0.10
待测样品 (sample)	ABI 7500 QuantStudio 5	Undet Undet	13.63 ± 0.02 14.16 ± 0.06
无模板对照 (no template control)	ABI 7500 QuantStudio 5	Undet Undet	Undet Undet

注 (note): Undet. 无 Ct 值 (no Ct value)

准曲线样品 R^2 可达 0.999, 10 个重复的灵敏度样品均可以被检测到。因此, 该检测方法在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系, 并且灵敏度较高, 可达 $10 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。



A. *TERT* 质粒对照品扩增曲线 (*TERT* plasmid control product amplification curve) B. *TERT* 质粒对照品标准曲线 (*TERT* plasmid control standard curve)

图 2 线性及灵敏度验证结果

Fig. 2 Results of linearity and sensitivity validation

2.3.4 批间重复性验证

在3次实验中检测293T/17细胞、MRC-5细胞和供试品HMSC细胞的 *TERT* 基因及其内参基因 *GAPDH*。3次重复检测,3种细胞的内参基因 *GAPDH* 均有明显的扩增曲线, Ct 值在 12.34 至 14.68 范围内。其中 293T/17 细胞的内参基因 Ct 平均值为 14.13, RSD 为 1.3%; MRC-5 细胞的内参基因 Ct 平

均值为 12.81, RSD 为 0.46%; HMSC 细胞的内参基因 Ct 平均值为 13.01, RSD 为 3.8%。阴性对照细胞 MRC-5 和供试品 HMSC 细胞均未检测到 *TERT* 基因, 阳性对照细胞 293T/17 经过 3 次重复检测均稳定的检出 *TERT* 基因, 且 Ct 值平均值为 23.96, RSD 为 1.5%, 说明本方法检测 *TERT* 基因的重复性良好 (表 8)。

表 8 重复性验证数据

Tab. 8 Repeatable validation data

编号 (No.)	293T-17		MRC-5		HMSC	
	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)	<i>TERT</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>TERT</i> gene)	<i>GAPDH</i> 基因 Ct 值 (Ct value of <i>GAPDH</i> gene)
1	24.36 ± 0.23	14.34 ± 0.29	Undet	12.87 ± 0.27	Undet	13.34 ± 0.14
2	23.86 ± 0.02	13.99 ± 0.09	Undet	12.81 ± 0.15	Undet	13.24 ± 0.29
3	23.65 ± 0.27	14.07 ± 0.16	Undet	12.75 ± 0.11	Undet	12.44 ± 0.05
平均 (average)	23.96 ± 0.36	14.13 ± 0.18	/	12.81 ± 0.06	/	13.01 ± 0.49
RSD/%	1.5	1.3	/	0.46	/	3.8

注 (note): Undet. 无 Ct 值 (no Ct value)

3 讨论

研究表明, *TERT* 基因在正常细胞中几乎不表达, 但是在大多数类型的肿瘤细胞中表达^[21]。陶志华等^[22]利用 RT-qPCR 技术对 26 例前列腺癌组织和 30 例良性前列腺增生组织的 *TERT* 基因进行检测发现: 26 例前列腺癌组织中有 19 例 (73%) 可以检测到 *TERT* 基因; 30 份良性前列腺增生组织中 *TERT* 基因表达均为阴性。此外, *TERT* 基因的表达还与膀胱癌、肝癌、胶质瘤和乳腺癌等的发展具有相关性^[23-26]。

干细胞是具有多种分化潜能、自我更新能力和高度增殖能力的细胞^[27]。有些干细胞类型具有端粒酶活性, 如胚胎干细胞和诱导多能干细胞, 以及某些早期代次的成体干细胞。通过对干细胞端粒酶活性进行检测可以评价干细胞来源产品的质量, 减少临床应用中的成瘤性风险^[9]。人间充质干细胞的 (hMSCs) 端粒酶活性研究结果不一致, 有报道 hMSCs 端粒酶呈阳性^[28], 也有报道呈阴性^[29-30]。Pittenger 等^[28]研究表明, hMSCs 在 12 代内仍具有端粒酶活性, 但是在他的研究中, 典型的阴性对照细胞 (人成纤维细胞) 也呈端粒酶阳性。Zimmerman 等^[29]在 hMSCs 中没能检测到显著水平的端粒酶, 这表明 hMSCs 端

粒酶活性或者为阴性, 或者低于 TRAP-ELISA 法的检出限。李静远等^[30]使用 TRAP 法检测了骨髓间充质 hMSCs 的端粒酶活性, 结果为阴性。虽然关于干细胞端粒酶活性的研究结果存在差异, 但干细胞端粒酶活性与其成瘤性之间的相关性是被普遍认可的^[31]。张彦等^[10]测定了淋巴母细胞的端粒酶活性, 并通过体内外成瘤实验证明了端粒酶活性与细胞成瘤性之间具有相关性。因此通过分析干细胞制剂的端粒酶活性从而对其成瘤性进行评估是干细胞安全性分析中非常重要的一环。

本研究针对 *TERT* 基因建立一种 RT-qPCR 检测方法。该方法对 *TERT* 基因的引物和探针进行优化, 在一个反应内使用双色荧光探针法进行多重定量 PCR 反应, 可稳定特异地检测到阳性对照细胞 293T/17 的 *TERT* 基因的转录, 重复性良好。因此, 本研究建立的方法可应用于干细胞库或干细胞产品端粒酶催化亚基转录水平的检测, 进而定性细胞产品的端粒酶活性。

综上所述, 本研究建立的 RT-qPCR 法可以有效地检测端粒酶催化亚基的转录水平。该方法操作简单, 特异性良好, 可作为干细胞样品端粒酶活性的间接检测方法, 有助于体外评价干细胞的成瘤性。

参考文献

- [1] ZHANG X, LOU X, XIA F. Advances in the detection of telomerase activity using isothermal amplification [J]. *Theranostics*, 2017, 7(7): 1847
- [2] BLACKBURN EH. Structure and function of telomeres [J]. *Nature*, 1991, 350(6319): 569
- [3] HOLT SE, SHAY JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 180(1): 10
- [4] SMITH EM, PENDLEBURY DF, NANDAKUMAR J. Structural biology of telomeres and telomerase [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(1): 61
- [5] SHAY JW, WRIGHT WE. Role of telomeres and telomerase in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 21 (6): 349
- [6] HONG B, ZU Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends [J]. *Theranostics*, 2013, 3(6): 377
- [7] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则 (试行) [EB/OL]. (2023-04-27) [2024-11-28]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfacaa7804aca84d648edb83b10c40b>
NMPA. Technical Guidelines for Pharmaceutical Research and Evaluation of Human Stem Cell Products (Trial) [EB/OL]. (2023-04-27) [2024-11-28]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfacaa7804aca84d648edb83b10c40b>
- [8] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 人源干细胞及衍生细胞治疗产品临床技术指导原则 (试行) [EB/OL]. (2023-06-26) <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfacaa7804aca84d648edb83b10c40b>
NMPA. Clinical Guidelines for Human Stem Cells and Derived Cell Therapy Products (Trial) [EB/OL]. (2023-06-26) <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfacaa7804aca84d648edb83b10c40b>
- [9] 龚光明, 秦洁, 陈宗德, 等 . 干细胞的端粒酶活性研究进展 [J]. *医学综述*, 2004, 10 (2): 78
GONG GM, QIN J, CHEN ZD, *et al.* Research progress on telomerase activity of stem cells [J]. *Med Recapit*, 2004, 10(2): 78
- [10] 张彦, 冯哲玲, 熊建军, 等 . 淋巴瘤细胞端粒酶活性和成瘤性的关系 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2 (3): 156
ZHANG Y, FENG ZL, XIONG JJ, *et al.* The relationship of telomerase activity and tumorigenesis of lymphoblastoid cell lines [J]. *J Mol Diagn Ther*, 2010, 2(3): 156
- [11] NINGARHARI M, GARUSO S, HIRSCH TZ, *et al.* Telomere length is key to hepatocellular carcinoma diversity and telomerase addiction is an actionable therapeutic target [J]. *J Hepatol*, 2020, 74(5): 1155
- [12] 张敏, 奚耕思, 周艳妮 . 端粒酶活性检测的几种方法 [J]. *细胞生物学杂志*, 2004, 26 (1): 68
ZHANG M, XI GS, ZHOU YN. Detection methods for telomerase activity [J]. *Chin J Cell Biol*, 2004, 26(1): 68
- [13] KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5193): 2011
- [14] WISMAN GBA, HOLLEMA H, HELDER MN, *et al.* Telomerase in relation to expression of p53, c-Myc and estrogen receptor in ovarian tumours [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(5): 1451
- [15] SHENG WY, CHIEN YL, WANG TCV. The dual role of protein kinase C in the regulation of telomerase activity in human lymphocytes [J]. *FEBS Letters*, 2003, 540(1-3): 91
- [16] ACHI MV, RAVINDRANATH N, DYM M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(2): 591
- [17] XU J, YANG X. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64(3): 770
- [18] 黄克智, 聂大年, 尹松梅, 等 . 白血病 HL-60、HL-60A 细胞 Cyclin D1、hTERT 表达和端粒酶活性及意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19 (4): 911
HUANG KZ, NIE DN, YIN SM, *et al.* Cyclin D1, hTERT expression and telomerase activity in HL-60 and HL-60A cell lines and their significance [J]. *J Exp Hematol*, 2011, 19(4):911
- [19] HIROSE M, ABE-HASHIMOTO J, OGURA K, *et al.* A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, 123(6): 337
- [20] ZUO QP, LIU SK, LI ZJ, *et al.* NF-kappaB p65 modulates the telomerase reverse transcriptase in the HepG hepatoma cell line [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 672(1-3): 113
- [21] ZHAO X, ZHANG C, LE Z, *et al.* Telomerase reverse transcriptase interference synergistically promotes tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand induced oral squamous cell carcinoma apoptosis and suppresses proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1283
- [22] 陶志华, 张诗颜, 陈俐丽, 等 . 实时荧光定量 RT-PCR 法检测前列腺癌组织中端粒酶 hTERT mRNA 表达及意义 [C] // 2007 年浙江省医学检验学学术年会论文汇编 . 2007
TAO ZH, ZHANG SY, CHEN LL, *et al.* Real-time fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect telomerase hTERT mRNA expression in prostate cancer tissues and its significance [C] // 2007 Zhejiang Province medical laboratory academic annual conference papers. 2007
- [23] LI G, SHEN J, CAO J, *et al.* Alternative splicing of human telomerase reverse transcriptase in gliomas and its modulation mediated by CX-5461 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 78
- [24] KUMAGAI M, MIZUKOSHI E, TAMAI T, *et al.* Immune response to human telomerase reverse transcriptase-derived helper T cell

- epitopes in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Liver Int*, 2018, 38(9): 1635
- [25] PAVANELLO S, CARTA A, MASTRANGELO G, *et al.* Relationship between telomere length, genetic traits and environmental/occupational exposures in bladder cancer risk by structural equation modelling [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 15(1): 5
- [26] PISCUOGLIO S, NG CK, MURRAY M, *et al.* Massively parallel sequencing of phyllodes tumours of the breast reveals actionable mutations, and *TERT* promoter hotspot mutations and *TERT* gene amplification as likely drivers of progression [J]. *J Pathol*, 2016, 238(4): 508
- [27] VAN DER KOOY D, WEISS S. Why stem cells? [J]. *Science*, 2000, 287(5457): 1439
- [28] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143
- [29] ZIMMERMANN S, VOSS M, KAISER S, *et al.* Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells [J]. *Leukemia*, 2003, 17(6): 1146
- [30] 李静远, 来晓瑜, 罗依, 等. 人骨髓间充质干细胞端粒酶活性的表达 [J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2004, 33 (6): 481
LI JY, LAI XY, LUO Y, *et al.* Telomerase activity of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2004, 33(6): 492
- [31] 胡宜, 程鹏, 刘云会. 骨髓间充质干细胞应用的风险: 促瘤及成瘤性 [J]. *解剖科学进展*, 2011, 17 (5): 492
HU Y, CHENG P, LIU YH. Risks in the application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tumor enhancement and tumorigenesis [J]. *Prog Anat Sci*, 2011, 17(5): 492
- (本文于 2024 年 12 月 12 日收到)