

卢天宇, 高虹, 杨博超, 等. 基于微滴式数字 PCR 技术对猪内源逆转录病毒拷贝数的检测方法的建立及应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 90-97.

Lu TY, Gao H, Yang BC, et al. Establishment and application of a droplet digital PCR-based method for measuring PERV copy number in the porcine genome [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 90-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 014

基于微滴式数字 PCR 技术对猪内源逆转录病毒拷贝数的检测方法的建立及应用

卢天宇, 高虹, 杨博超, 于佳楠, 徐亚新, 王若琳, 秦川*

(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, 国家卫生健康委员会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, 北京 100021)

【摘要】 目的 利用微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 技术, 对猪基因组中猪内源逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 拷贝数测定方法进行优化, 建立 PERV 拷贝数的检测方法。方法 采用 TaqMan 探针双重 ddPCR 方法, 分别以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 和转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFR) 为内参基因, 确定对 PERV 拷贝数检测反应最适合退火温度和反应循环数。另外, 通过对浓度梯度稀释的标准品质粒和猪细胞基因组进行检测, 以确定最适模板浓度。采用 ddPCR 和 qPCR 两种方法测定来自猪源细胞系和巴马小型猪组织中 PERV 的拷贝数, 比较两种检测方法的稳定性。结果 基于 ddPCR 技术检测 PERV 拷贝数的最适退火温度为 59.9℃, 最佳反应循环数为 50; 模板基因组的最适浓度在 1.25~7.5 ng; 检测同一样品来源基因组中 PERV 的拷贝数的变异系数在 0.44%~8.29%。结论 本研究建立了基于 ddPCR 技术的 PERV 拷贝数的检测方法并系统的探索了最佳实验条件, 与传统的 qPCR 相比, 该方法具有更高的准确性和可重复性, 为异种移植研究中供体动物基因组 PERV 拷贝数的测定提供了灵敏的方法和可靠依据。

【关键词】 微滴式数字 PCR; 猪内源逆转录病毒; 拷贝数; 绝对定量

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 09-0090-08

Establishment and application of a droplet digital PCR-based method for measuring PERV copy number in the porcine genome

LU Tianyu, GAO Hong, YANG Bochao, YU Jianan, XU Yaxin, WANG Ruolin, QIN Chuan*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To optimize the experimental conditions for the determination of porcine endogenous retrovirus (PERV) copy number in the porcine genome using a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) technique. **Methods** TaqMan probe duplex-ddPCR was used to determine the copy number of PERV, glyceraldehyde 3-

【基金项目】 中国医学科学院医学创新工程重大协同创新项目 (2017-I2M-2-005)。

【作者简介】 卢天宇 (1989—) 女, 助理研究员, 研究方向: 基因编辑动物模型的制备。E-mail: tianyu.lu890316@163.com

【通信作者】 秦川 (1959—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: chuanqin@vip.sina.com

phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and transferrin receptor protein 1 (*TFRC*) were adopted as the internal reference genes. To determine the optimal annealing temperature and PCR cycle number, we compared multiple conditions. In addition, the suitable range of template amount was estimated by examining the serially diluted plasmid and the pig cell genome. Genomic DNA isolated from pig cell lines or Bama minipig tissue was used to determine the copy number of PERV using ddPCR-and quantitative PCR-based method, which demonstrated the repeatability of different method. **Results** The optimal annealing temperature for the ddPCR-based method to measure PERV copy number was 59.9°C, and the optimal number of PCR cycles was 50. The suitable template genome concentration ranged from 1.25 to 7.5 ng. The variation of coefficients for PERV copy number in the porcine genome ranged from 0.44% to 8.29%. **Conclusions** A method for analyzing the PERV copy number based on the ddPCR technique was established, which improved the accuracy and repeatability compared with a traditional quantitative PCR-based detection approach. This method provides a sensitive approach and is a reliable basis for the determination of PERV copy number in donor animal genomes for xenotransplantation studies.

【Keywords】 droplet digital PCR; porcine endogenous retrovirus; copy number; absolute quantification

在临床实践中,可供移植用的人类组织器官目前仍面临严重的短缺问题,使用源自猪的细胞、组织或器官进行异种移植,是解决该问题的潜在途径之一^[1]。猪内源逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)是一种 C 型逆转录病毒,在进化过程中以前病毒 DNA 的形式被整合在猪基因组中^[2]。目前 PERV 对于体内人类细胞的感染风险尚不确定,而供体猪不能通过无特定病原体培育、早期断奶或胚胎移植等方式消除 PERV,从而造成了异种移植的潜在生物安全隐患^[3]。因此,精确的测定 PERV 在供体动物中的拷贝数,以预测 PERV 的感染风险,对于异种移植的临床研究及应用具有重要的意义。

传统检测 PERV 拷贝数通常使用 Southern blot^[4]、荧光原位杂交^[5]以及定量 PCR(quantitative PCR, qPCR)^[6-7]等方法,不同的方法对 PERV 的拷贝数测定结果有所差异^[8]。其中,最常使用的 qPCR 方法在每次检测时都必须进行标准曲线的制备,而单次所能够检测样品数较少,加之 PERV 在不同来源的猪基因组中的拷贝数变化较大^[9],扩增效率很难保证一致,易造成检测结果的准确性低和重复性差。

数字 PCR 作为新兴的技术,越来越广泛的用于核酸样品的分析,例如基因表达的检测^[10]、病毒拷贝数的分析和绝对定量分析^[11-13]以及拷贝数变异分析^[14]等。相比于 qPCR 技术,使用数字 PCR 技术进行绝对定量分析不依赖于引物扩增效率,不需要使用标准品,可以直接测定出样品中目标基因的拷贝数,极大地减少了技术干扰,是真正意义上的绝对定量^[15]。而微滴式数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)则是通过微滴发生油将整个反应体

系分割成多个反应微滴,再在单个微滴内进行独立的 PCR 扩增,通过读取荧光信号确定阳性微滴和阴性微滴,根据泊松分布的原理推算目标基因的拷贝数^[16-17]。

本研究采用双重荧光 TaqMan 探针,分别以猪 *GAPDH* 和 *TFRC* 作为内参基因,通过对于退火温度、反应循环数以及检测样本量等参数进行了系统的优化,建立了基于 ddPCR 技术的 PERV 拷贝数检测方法。通过与基于 qPCR 检测方法的比较,我们展示了所建立的 PERV 拷贝数检测新方法具有更高的灵敏度和更好重复性,为异种移植研究中 PERV 拷贝数的检测提供更好的技术和参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒标准品

将猪 *GAPDH* 基因(3430~4294 bp)、*TFRC* 基因(1200~1947 bp)和 PERV 的 *pol* 基因(3344~4115 bp),长度分别为 730、665 和 748 bp 的 DNA 片段,克隆到 pEASY(3929 bp)载体上,获得 pEASY-*GAPDH*、pEASY-*TFRC* 和 pEASY-*pol* 质粒。紫外分光光度计测定标准品质粒的浓度而计算拷贝数,通过 10 倍梯度稀释,获得 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 和 1 copies/ μ L 的浓度梯度稀释的质粒标准品。

1.1.2 猪基因组 DNA

本研究中采用的猪基因组 DNA 样品,分别是来自 2 个猪胚胎成纤维细胞(porcine embryonic fibroblasts, PEF)、猪的肾表皮细胞系 PK15 以及来自 3 个不同个体的巴马小型猪的肺部组织,按照基因组提取试剂盒说明书获得细胞和组织基因组。

1.2 主要试剂与仪器

基因组提取试剂盒(全式金,中国);用于 qPCR 的 TB Green Mix (TaKaRa 公司,中国);微滴生成油、微滴读取油、ddPCR 的反应液、微滴生成卡(Bio-Rad,美国);MseI 内切酶(NEB,中国);96 孔板(ABI,美国);Nano Drop 紫外分光光度(赛默飞,美国);QX20TM Droplet Digital PCR 系统(Bio-Rad,美国,包括微滴发生仪、微滴分析仪和热膜封口仪);CFX 定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国);T100 梯度 PCR 仪(Bio-Rad,美国);引物和探针均由北京六合华大合成,具体信息见表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 微滴数字 PCR

(1) 基因组酶切:500 ng 基因组采用 5 U MseI 限制性内切酶,37℃ 水浴 2 h。

(2) 微滴生成:配制 20 μ L 反应体系(其中包含反应液 mix 10 μ L,引物各 900 nmol/L,探针各 250 nmol/L,标准质粒或 MseI 酶切后的基因组 1 μ L,补充水至 20 μ L)加入微滴反应卡中。在微滴反应卡加入 70 μ L 微滴生成油,发生卡胶垫盖好后,将微滴发生卡放在微滴生成仪中生成微滴。

(3) PCR 扩增:将生成的微滴转移到 96 孔板中,用 PX1 进行膜热封后,96 孔板放在 PCR 仪上进行扩增。反应参为 95℃ 10 min;94℃ 30 s,退火温度 1 min,40~50 个循环;98℃ 10 min,所有步骤升温速度均为 2℃/s。

(4) 微滴读取:扩增反应结束后,将 96 孔板放入 QX200 微滴分析仪中,采用 Quantsoft 软件进行微滴读取。

1.3.2 qPCR 反应体系和条件

本实验中 qPCR 的反应体系为 25 μ L(TB Green mix 12.5 μ L、10 μ mol/L PCR 引物各 1 μ L、模板 DNA 约 100 ng、补充水至 25 μ L)。PCR 反应条件为 95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环。

1.3.3 ddPCR 退火温度的优化

选择 63.0℃、61.9℃、60.9℃、59.9℃、58.6℃、57.5℃ 6 个温度,进行退火和延伸温度的优化。以 10^4 copies/ μ L 的 3 个质粒标准品以及 1.25 ng 的 PEF 10#基因组为模板,确定最佳退火温度。

1.4 统计学方法

使用 Quantasoft 软件对 ddPCR 数据进行图像处理 and 结果分析,本研究中所有涉及的 ddPCR 反应微滴生成数均在 10000~15000,符合 ddPCR 泊松分布

的统计学原理,保证了后续分析结果的准确性。采用 GraphPad 进行数据统计和差异分析,结果用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,三组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 微滴数字 PCR 退火温度的优化

以 10^4 copies/ μ L 的标准品为模板,分别在 63.0℃、61.9℃、60.9℃、59.9℃、58.6℃、57.5℃ 6 个退火温度下进行 PCR 反应,结果显示 pEASY-GAPDH、pEASY-TFRC 和 pEASY-pol 标准品在这 6 个温度条件下均能检测到荧光信号,在不同退火温度下没有显著差别(图 1A 和表 2)。

以 63.0℃、61.9℃、60.9℃、59.9℃、58.6℃、57.5℃ 为退火和延伸温度,PEF 基因组作为模板,分别以 GAPDH 和 TFRC 为内参基因进行 ddPCR 检测。如一维散点图所示,pol 基因、GAPDH 基因和 TFRC 基因分别在 59.9℃~61.9℃、57.5℃~63.0℃、57.5℃~60.9℃ 进行退火和延伸温度适合(图 1B 和 1C)。综上,本研究选用 59.9℃ 作为后续 ddPCR 反应的最佳退火和延伸温度。

表 1 检测 PERV 拷贝数所用的引物和探针序列

引物及探针 Primer and probe	序列(5'-3') Sequence
Primer Pol1-FW	CGACTGCCCAAGGGTTCAA
Primer Pol2-RV	TCTCTCTGCAAATCTGGGCC
Probe Pol ^[18]	/56FAM/CACGTACTGGAGGAGGGT CACCTG/BHQ1
Primer pig_GAPDH_FW	CGCGATCTAATGTTCTCTTTC
Primer pig_GAPDH_RV	TTCCTCCGACCTTCACCAT
Probe pig_GAPDH	/5HEX/ CAGCCGGCTCCCTGAGACAC/BHQ2
TFRC-Taqman-FW	TTCCCTCAAACACCTCGCTTA
TFRC-Taqman-RV	TGGTATCCAATCCCTTTGACAAC
pTFRC-probe1	/5HEX/TTTGGGCAGACCTCAAATA CTGTGTCT/BHQ2

表 2 标准品质粒在不同退火温度下 ddPCR 检测的拷贝数
Table 2 Copy numbers of standard plasmids detected by ddPCR at different annealing temperatures

退火温度(℃) Annealing temperature	拷贝数(10^3 copies/ μ L) Copy numbers		
	pol	GAPDH	TFRC
63.0	4.86	5.30	4.80
61.9	4.76	5.50	4.90
60.9	4.86	5.24	4.78
59.9	4.98	5.44	4.84
58.6	4.38	5.46	4.78
57.5	4.80	5.52	4.64

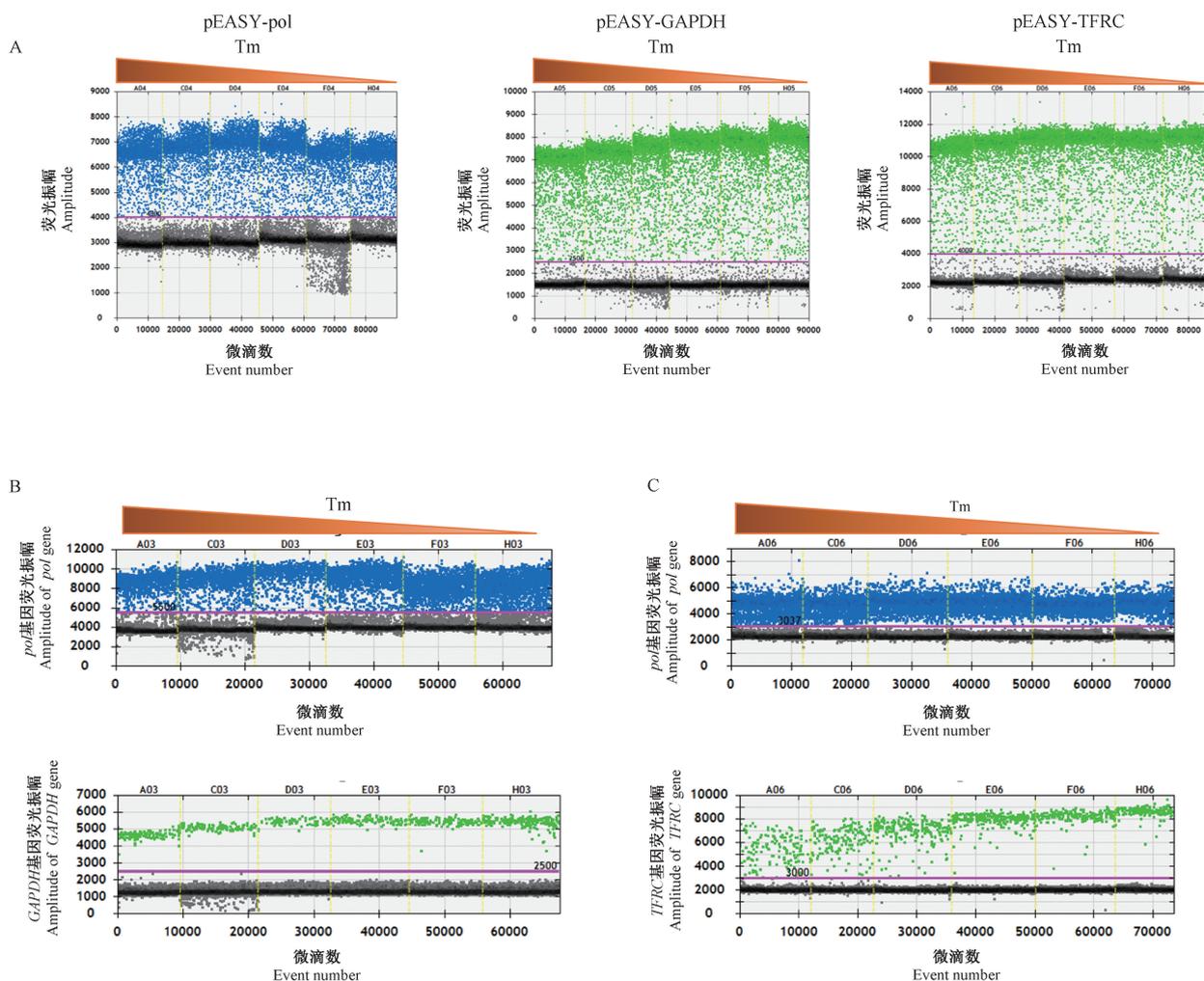
2.2 微滴数字 PCR 循环数的优化

根据 Bio-Rad 官方建议, ddPCR 反应扩增循环数应为 40 个,但在以基因组为模板对退火温度优化时, PERV *pol* 基因扩增后的阴、阳微滴较难分开(图 1B 和 1C),易造成结果分析的偏差。因此,本研究通过提高 PCR 扩增循环数来优化这一反应条件。实验分别采用 40、45 和 50 个扩增循环对 PEF 的基因组模板进行 PCR 扩增。结果显示,扩增循环数的提高对于微滴生成并没有显著影响(图 2A)。但是,随着扩增循环数的增加, *pol* 基因扩增微滴的阴、阳性信号逐渐分开(图 2B)。因此,本研究确定 50

个扩增循环作为后续 ddPCR 检测的反应条件。

2.3 ddPCR 检测范围的确定

本研究将 3 个基因的标准品质粒进行 10 倍浓度梯度稀释,对不同浓度的标准品分别进行 ddPCR 检测。结果显示,随着标准品浓度降低,阳性微滴数减少,3 个基因的标准品以 10^6 copies/ μ L 为模板进行 PCR 扩增产生的微滴全部为阳性微滴,超出了检测上限;以 1 copy/ μ L 的标准品为模板进行 PCR 扩增后,所产生的微滴中并未检测到阳性微滴(图 3A)。采用 ddPCR 检测标准品的拷贝数与紫外分光光度计测定的 DNA 拷贝数,在检测范围内具有良



注: A:质粒标准品为模板;B:PEF 基因组为模板 *GAPDH* 为内参基因;C:PEF 基因组为模板 *TFRC* 为内参基因在不同退火温度下进行 ddPCR 检测。Tm 从左向右依次为 63.0℃、61.9℃、60.9℃、59.9℃、58.6℃和 57.5℃。

图 1 不同退火温度下 ddPCR 扩增一维散点图

Note. A, Standard plasmids as template. B, DNA isolated from PEF as template and *GAPDH* as reference gene. C, DNA isolated from PEF as template and *TFRC* as reference gene were measured by ddPCR at different annealing temperatures at different annealing temperatures. Tm is 63.0℃, 61.9℃, 60.9℃, 59.9℃, 58.6℃ and 57.5℃ from left to right.

Figure 1 One-dimensional scatter plot of ddPCR at different annealing temperatures

好的相关性, *pol* 基因 $r^2 = 0.992$, $P < 0.001$ 、*GAPDH* 基因 $r^2 = 0.9976$, $P < 0.0001$ 、*TFRC* 基因 $r^2 = 0.996$, $P < 0.001$ (图 3B)。

本研究将 PEF 基因组按照 107.5、5、2.5、1.25 和 0.625 ng 为模板进行 ddPCR。样本以 10 ng 基因组为模板, 阳性微滴数超过了总微滴数的 90%(图 3C)。随着基因组模板浓度的降低, 检测结果的变异系数提高(图 3D)。因此在满足 ddPCR 反应不超过检测上限的基础上, 提高模板量能够提高结果的准确性。检测 PERV 拷贝数时, 采用基因组模板在 1.25~7.5 ng 进行 PERV 拷贝数的检测为宜。

2.4 样本检测

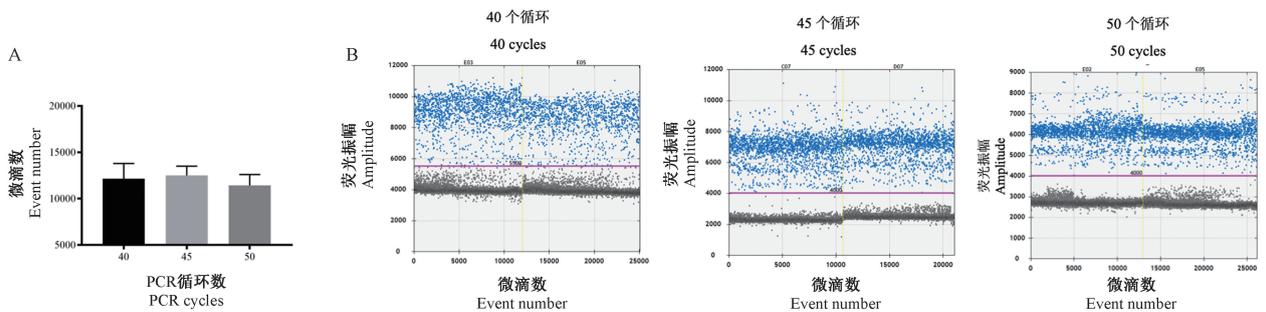
对来自 3 个细胞和 3 个肺组织的基因组样本, 采用 ddPCR 和 qPCR 两种方法进行 PERV 拷贝数的检测。结果显示, ddPCR 检测 PERV 拷贝数结果的变异系数在 0.44%~8.29% 之间, 显著低于同一样本 qPCR 检测结果的变异系数, 显示了 ddPCR 检

测结果具有良好的稳定性(表 3)。

3 讨论

随着免疫抑制药物研究和基因修饰供体动物的快速发展, 将猪源器官异种移植到非人灵长类动物模型后, 移植物可以存活数月甚至数年^[19-21], 异种移植是否可应用于临床也被不断的讨论。但是, 体外研究发现 PERV 可以感染人源细胞^[22-23], 因此猪源组织器官异种移植到人体存在生物安全风险。从当前猪到非人灵长类模型的研究结果, 对供体猪体内 PERV 活性进行实时监测可以提前预测并防范该风险^[24]。因此, 对 PERV 拷贝的精确检测对于异种移植的临床应用具有重要的意义。

本研究采用 ddPCR 技术对猪基因组中 PERV 拷贝数的进行检测。与传统的 qPCR 方法相比, 检测结果具有更好的稳定性和重复性, 所需的被检测样本量也仅是 qPCR 方法所需的 1/10~1/20, 更适



注: A: 不同 PCR 循环数下 ddPCR 产生的总液滴数; B: 不同扩增循环数下 *pol* 基因扩增的一维散点图。

图 2 ddPCR 反应循环数优化

Note. A, Events produced at different PCR cycle number. B, One-dimensional scatter plot of *pol* gene at different PCR cycle number.

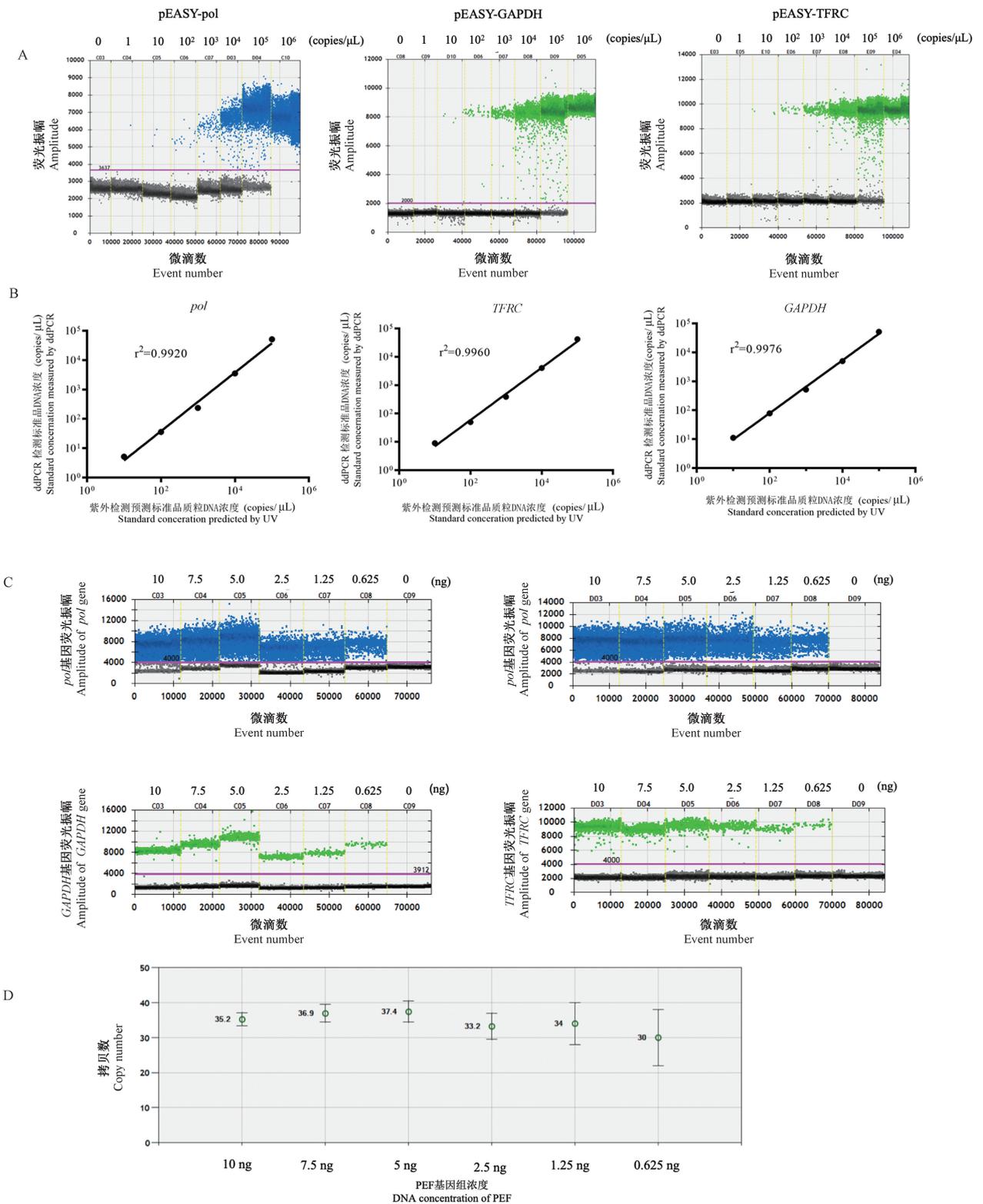
Figure 2 Optimization of ddPCR cycle number

表 3 ddPCR 和 qPCR 测定不同来源猪基因组中 PERV 的拷贝数($\bar{x} \pm s$)
Table 3 PERV copy numbers in pig genome detected by ddPCR and qPCR

样品 Samples	微滴式数字 PCR (copies/ μ L) ddPCR				荧光定量 PCR (copies/ μ L) qPCR			
	<i>GAPDH</i> 为内参 <i>GAPDH</i> as reference gene		<i>TFRC</i> 为内参 <i>TFRC</i> as reference gene		<i>GAPDH</i> 为内参 <i>GAPDH</i> as reference gene		<i>TFRC</i> 为内参 <i>TFRC</i> as reference gene	
	拷贝数 Copy number	变异系数 Coefficient of variation	拷贝数 Copy number	变异系数 Coefficient of variation	拷贝数 Copy number	变异系数 Coefficient of variation	拷贝数 Copy number	变异系数 Coefficient of variation
PEF 6#	32.50 \pm 0.14	0.44%	33.25 \pm 2.76	8.29%	67.53 \pm 13.43	19.89%	24.38 \pm 4.06	16.66%
PEF 10#	33.17 \pm 1.42	4.27%	32.87 \pm 1.03	3.12%	210.44 \pm 63.70	30.27%	52.00 \pm 12.67	24.37%
PK15	59.10 \pm 3.87	6.65%	57.60 \pm 0.66	1.14%	175.75 \pm 32.26	18.41%	78.70 \pm 2.65	3.37%
肺 1# Lung 1#	41.07 \pm 0.93	2.26%	28.83 \pm 0.71	2.46%	49.52 \pm 5.92	11.95%	32.58 \pm 3.76	11.54%
肺 2# Lung 2#	40.37 \pm 0.31	0.76%	32.60 \pm 0.56	1.71%	69.10 \pm 7.76	11.24%	42.33 \pm 3.11	7.35%
肺 3# Lung 3#	39.50 \pm 2.02	5.12%	32.40 \pm 1.18	3.64%	64.68 \pm 9.23	14.27%	40.88 \pm 2.65	6.63%

注: 数据来自 3 次独立重复试验。

Note. Data came from three independent replicates.



注: A: 浓度梯度稀释的标准品为模板扩增一维散点图; B: 质粒标准品进行 ddPCR 检测的线相关性; C: 浓度梯度稀释 PEF 基因组为模板扩增一维散点图; D: 不同基因组浓度下 PERV 检测拷贝数。

图 3 ddPCR 对于 PERV 拷贝数的检测范围

Note. A, One-dimensional scatter plot of standard plasmids at different template concentration. B, Liner correlation analysis of ddPCR and standard plasmids concentration measured by UV measurement. C, One-dimensional scatter plot of PEF genome at different template concentration. D, PERV copy numbers of PEF detected by ddPCR at different template concentration.

Figure 3 Range of template for PERV copy number detected by ddPCR

操作中,微滴生成后,需将微滴转移到其他模块中进行扩增和检测。在转移过程中可能造成液体的损失,从而导致目标分子定量的低估^[25]。因此,本研究中我们采用 TaqMan 荧光探针双重微滴的方法,在同一微滴内对内参基因和目标基因进行绝对定量,从而规避了 ddPCR 的这一缺点。其次,ddPCR 结果分析时确保阴性和阳性微滴的划分对于结果的准确性也非常重要,保证引物及探针的序列特异性和控制模板检测范围是控制这一因素的重要条件^[26]。但是,PERV 是作为前病毒被插入在猪基因组中,即使是高度保守的 *pol* 基因也含有点突变,且基因组中 PERV 的拷贝数较高,因此在 ddPCR 结果分析过程中微滴出现了“下雨”现象。为了解决这一问题,本研究中在选择特异性较好的引物和探针的条件下,还提高了 PCR 的循环数,从而提高了阳性微滴荧光的振幅,解决了阳性微滴的识别,提高了结果的准确性。这一结果也为采用 ddPCR 技术进行拷贝数变异分析时,优化检测条件提供了可行的方向。

在 ddPCR 中选择适合的内参基因,对于检测结果的准确性和稳定性具有重要的影响。*GAPDH* 和 *TFRC* 基因是猪基因组中的单拷贝基因^[27],在本研究中被选做内参基因。结果显示,在 3 个细胞来源的样品中,分别采用两个不同的内参基因,PERV 拷贝数检测显示了良好的一致性,在后续的研究中可以作为 PERV 拷贝数检测的候选内参基因。但是在组织样品检测中,*GAPDH* 和 *TFRC* 分别作为内参基因后所得到的结果略有差异。我们推测可能是由于组织样本中含有多种类型的细胞,尤其是存在大量血细胞,而造成了这一差异^[8]。因此,在后续研究中,从组织样本分离单一类型的细胞进行 PERV 拷贝数的检测有可能提高检测结果的准确性。

综上所述,本研究建立了基于 ddPCR 技术对 PERV 拷贝数的检测方法,为异种移植供体动物中 PERV 的监测提供了可靠的方法,对于异种移植的临床研究具有重要的意义。

参考文献:

[1] Lu T, Yang B, Wang R, et al. Xenotransplantation: current status in preclinical research [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 3060.

[2] 张芸飞, 李鹏, 黄利华, 等. PERV 病毒在异种移植中的感染风险及预防对策 [J]. *生命科学研究*, 2019, 23(2): 162-167.

[3] Fishman JA, Scobie L, Takeuchi Y. Xenotransplantation-associated infectious risk: a WHO consultation [J]. *Xenotransplantation*, 2012, 19(2): 72-81.

[4] Patience C, Switzer WM, Takeuchi Y, et al. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species [J]. *J Virol*, 2001, 75(6): 2771-2775.

[5] Lee JH, Webb GC, Allen RD, et al. Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs [J]. *J Virol*, 2002, 76(11): 5548-5556.

[6] Garkavenko O, Wynyard S, Nathu D, et al. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics from a designated pathogen-free herd [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(2): 590-593.

[7] Mang R, Maas J, Chen X, et al. Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(8): 1829-1834.

[8] Denner J. How active are porcine endogenous retroviruses (PERVs)? [J]. *Viruses*, 2016, 8(8): 215.

[9] Fiebig U, Fischer K, Bahr A, et al. Porcine endogenous retroviruses: Quantification of the copy number in cell lines, pig breeds, and organs [J]. *Xenotransplantation*, 2018, 25(4): e12445.

[10] Takahashi K, Yan IK, Kim C, et al. Analysis of extracellular RNA by digital PCR [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 129.

[11] Strain MC, Lada SM, Luong T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e55943.

[12] Huang JT, Liu YJ, Wang J, et al. Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 290-296.

[13] 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.

[14] Abyzov A, Mariani J, Palejev D, et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2012, 492(7429): 438-442.

[15] Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances [J]. *Clin Chem*, 2013, 59(11): 1670-1672.

[16] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22): 8604-8610.

[17] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 1003-1005.

[18] Yang L, Güell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs) [J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1101-1104.

[19] Längin M, Mayr T, Reichart B, et al. Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation [J]. *Nature*, 2018, 564(7736): 430-433.

- [20] Watanabe H, Ariyoshi Y, Pomposelli T, et al. Intra-bone bone marrow transplantation from hCD47 transgenic pigs to baboons prolongs chimerism to >60 days and promotes increased porcine lung transplant survival [J]. *Xenotransplantation*, 2020, 27(1): e12552.
- [21] Kim SC, Mathews DV, Breeden CP, et al. Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion [J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(8): 2174-2185.
- [22] Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs [J]. *Nat Med*, 1997, 3(3): 282-286.
- [23] Specke V, Rubant S, Denner J. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses [J]. *Virology*, 2001, 285(2): 177-180.
- [24] Lopata K, Wojdas E, Nowak R, et al. Porcine endogenous retrovirus (PERV)-molecular structure and replication strategy in the context of retroviral infection risk of human cells [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 730.
- [25] 李慧调, 潘建章, 方群. 数字 PCR 技术的发展及应用 [J]. *化学进展*, 2020, 32(5): 581-593.
- [26] Bell AD, Usher CL, McCarroll SA. Analyzing copy number variation with droplet digital PCR [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1768: 143-160.
- [27] 房国锋, 王守栋, 曾勇庆, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测转基因猪外源基因整合拷贝数 [J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(1): 90-94, 107.

[收稿日期]2020-12-01

阿尔茨海默病 5XFAD 小鼠模型尿液中外泌体 microRNA 的表达谱分析

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种难治且不可逆的神经退行性疾病, 发病机制尚不明确。因此, 在淀粉样蛋白- β 斑块 ($A\beta$ 斑块) 沉积之前识别候选生物标志物对于早期干预 AD 具有重要意义。中国医学科学院医学实验动物研究所病理平台课题组的研究人员, 通过测定早期 AD 小鼠模型尿液外泌体中 microRNA (miRNA), 寻找可以早期诊断 AD 的标志物。

本文选用 $A\beta$ 斑块形成前期的 1 月龄 5XFAD 小鼠模型及其同窝对照组, 采用生物信息学的方法, 对小鼠尿液中外泌体的 miRNA 进行差异表达分析。同时, 对筛选出的差异表达基因进行了 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路分析、GO (Gene Ontology) 富集分析。差异基因分析结果显示存在 48 个差异表达 miRNA (18 个上调、30 个下调), 包括: mmu-miR-27b、mmu-miR-150、mmu-miR-34a-5p、mmu-miR-221、mmu-miR-336b-3p、mmu-miR-196b-5p、mmu-miR-339-3p 和 mmu-miR-721 等; GO 功能富集分析表明, 差异表达的 miRNA 主要与负调控神经元投射和突触后模相关的细胞内过程相关, 并可能与调控阿尔茨海默病进展的特定 DNA 相结合影响生理功能, 上述结论通过 ddPCR (droplet digital PCR) 实验进行验证。

作者对筛选出的 miRNA 与进行相关功能蛋白的网络分析, 发现线粒体氧化链相关蛋白 (细胞色素 c)、凋亡调节蛋白 (Bcl-2)、自噬和代谢相关蛋白 (Sirt1)、转化生长因子 (Tgfb) 等功能蛋白与候选 miRNA 相关, 其中 Tgfb 蛋白与 $A\beta$ 的生成相关。

综上所述: 5XFAD 小鼠模型尿液中外泌体 miRNA 在 $A\beta$ 斑块沉积前存在表达差异, 是潜在的诊断早期 AD 的非侵袭性生物标志物, 对于早期干预 AD 具有重要意义。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2021, 3: 233-242; <https://doi.org/10.1002/ame2.12175>)。