

白血病 BCR-ABL融合基因逆转录 PCR 检测中的实验因素探讨^①

李 巍^② 杜传书

(中山医科大学医学遗传教研室; 广州, 510089)

摘 要 建立白血病中费城 (Ph)染色体上独特的 bcr-abl融合基因的逆转录 PCR(RT-PCR)快速检测方法。利用正交设计原理优化逆转录反应条件,探讨该法中引物设计和嵌套式 PCR对检测灵敏度的影响,利用扩增产物所含限制性酶切位点进行产物特异性鉴定。运用此法检测 12例慢性粒细胞白血病,除 1例阴性外,其余 11例阳性标本含不同类型 (b3a2, b2a2, B1a2) bcr-abl mRNA。讨论了用于临床标本检测中应考虑的问题。

主题词 白血病 遗传学; 融合蛋白质类, bcr-abl分离和提纯; 聚合酶链反应

中图分类号 R 733.7

临床上,检测费城 (Ph)染色体可作为慢粒 (CM L)和急淋 (ALL)等白血病分型诊断依据,疗效评价、微小残余病的检测及预后评估的可靠指标。

Ph的形成是由于 9和 22号染色体的相互易位引起。在分子水平上,表现为 9号染色体上的 c-abl原癌基因易位到 22号染色体的 bcr区形成 bcr-abl融合基因,转录后形成的 bcr-abl mRNA常以 3种形式 (b3a2, b2a2, B1a2)单独或同时存在,其中 b3a2和 b2a2主要在 CM L中存在, B1a2主要在 ALL中出现^[1]。常规 Ph染色体检查需时长,检测灵敏度较低,应用逆转录 (RT)-PCR法检测 bcr-abl基因以代替传统的 Ph染色体检查,更具临床价值。本文探讨了检测 bcr-abl融合基因的 RT-PCR法的有关实验影响因素和临床应用分析。

1 材料与方 法

1.1 标本采集

CM L患者 12例为实验对象,健康体检者 4例

作阴性对照。K562细胞株为 b3a2型阳性对照。分别采集 4 mL外周血进行实验。

1.2 RNA的提取

外周血总 RNA的提取按参考文献^[2]稍加改良。

1.3 引物序列

扩增 bcr-abl基因的 6种引物序列参照文献^[1],见表 1,均在加拿大合成,PCR扩增产物大小及所含酶切位点见表 2。

表 1 bcr-abl融合基因 RT-PCR引物序列

引物名称	外显子部位	碱基序列 (5'→3')
A	b2	CTC CAG ACT GTC CAC AGC ATT CCG
B	B1	CGC ATG TTC CGG GAC AAA AGC
C	a2	TCA CTG GCT CCA GCG AGA TC
D	a2	CAG ACC CTG AGG CTC AAA GTC AGA
H	b2	CAG AAG CTT CTC CCT GAC ATC CCA
I	a1	CGA TGG TTC GCT TGG CGC AAA

表 2 PCR扩增产物大小及所含酶切位点

扩增引物	PCR产物大小 (bp)			酶切位点	
	b3a2	b2a2	B1a2	b3a2	b2a2
AC	218	143	-	<i>Hinf</i> I	-
BD	-	-	246	-	-
IC	200	200	200	<i>Pvu</i> II	<i>Pvu</i> II
AD	165	90	-	<i>Hinf</i> I	-
HC	276	201	-	<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I
				<i>Hinf</i> I, <i>Hind</i> III	

1.4 RT-PCR反应

按正交设计原理对 RT 反应的条件进行优化(见 2.2)。PCR 反应参照文献 [1] 进行。50 μ L PCR 反应体系中含 RT 反应液 10 μ L, 每种引物浓度为 25 pmol, 2 mmol/L dNTP 5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, Taq 酶 2 U 热循环条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 90 s 循环 35 次。在嵌套式 PCR 中, 第一次 PCR 用 HC 引物, 取扩增产物 1 μ L 进行第二次 PCR, 引物用 AD, 反应条件与第一次相同。取 10 μ L PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳后 EB 染色鉴定, 或取 5 μ L PCR 产物于 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳后, 经银染显色鉴定。

2 结 果

2.1 mRNA 的完整性及冻存方法的影响

mRNA 的完整性是检测成功的关键。由于 mRNA 易降解, RNA 提取中, 尽量做到新鲜标本快速低温处理, 处理中防止 RNA 酶的作用, 处理时间越短越好, 甚至宁愿牺牲纯度来保证 mRNA 的完整性。本文所用简易细胞总 RNA 提取方法全部抽提时间仅需 2 h 左右, 较常规应用的异硫氰酸胍法缩短约 2 h。经实验验证, 提取的 RNA 用 DEPC 水溶解后于 -20 $^{\circ}$ C 保存至多可用两周; 加入 RNasin 1 U/ μ L 可用半年以上; 最好在获得 RNA 后即进行逆转录反应, 以 cDNA 形式 -20 $^{\circ}$ C 保存至少可用 1 年。

2.2 逆转录反应条件的优化

按四因素二水平正交设计原理对 RT 反应的 4 个主要影响因素 K562 细胞总 RNA 模板、引物 C、dNTP、AMV (Promega 公司产品) 在两种不同浓度下进行 A~H 8 组实验(表 3), 反应体系含 RNasin

(Promega 公司产品) 40 U, 总反应体积 40 μ L, 反应在 42 $^{\circ}$ C 保温 1 h

表 3 RT 反应条件的正交设计试验

因 素	A	B	C	D	E	F	G	H
RNA(μ g)	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0
引物 C (pmol)	25	25	50	50	25	25	50	50
dNTP(mmol/L)	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	0.5
AMV (U)	5	10	10	5	10	5	5	10

以 PCR 扩增产物 EB 染色亮度为评价依据。结果表明 H 试验的扩增带最亮, B, C, E 组试验中扩增带亮度相对较浅(图 1)。

2.3 方法的灵敏度

将 1 μ g K562 细胞总 RNA 用正常人总 RNA 按 1:9 比例, 系列稀释至 1:10⁶ 水平, 分别用 AC 引物进行 RT-PCR(图 2 左) 和用 HC, AD 引物进行套迭 PCR(图 2 右)。结果表明, 用 AC 引物可检出至 1:10⁴ 稀释水平; 用 HC 引物可检出至 1:10⁵ 稀释水平, 再用 AD 引物进行嵌套式 PCR, 可检出至 1:10⁶ 稀释水平。

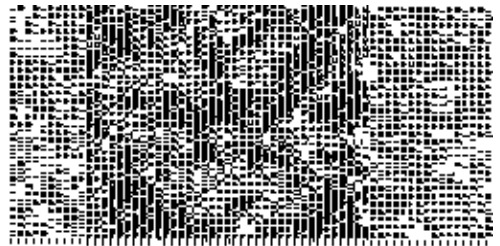
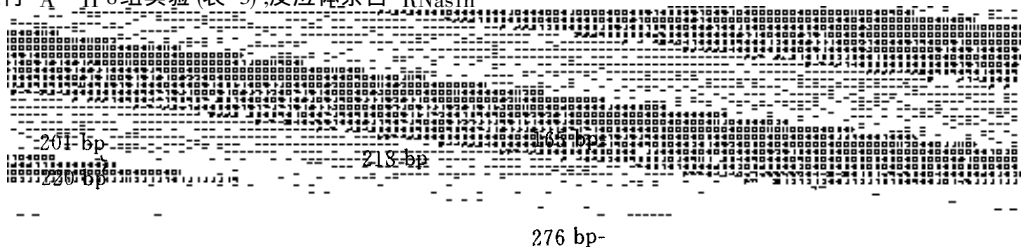


图 1 逆转录反应正交设计试验



M 1 2 3 4 5 6 7 8

1 2 3 4 5 6 7 8

图 2 bcr-abl 基因 RT-PCR(左) 和嵌套式 RT-PCR(右) 灵敏度试验

M 1 kb Marker, 1 K562 细胞, 2~7 K562 细胞系列稀释至 1:10~1:10⁶, 8 正常细胞

2.4 PCR产物特异性鉴定

图 3 示经 AC, BD 引物两种不同 PCR 反应, 可分别得到 b3a2 (218 bp), b2a2 (143 bp), B1a2 (246 bp) 3 种不同类型。若用 AD 对引物可扩增出 b3a2 (165 bp) 和 b2a2 (90 bp) 两种片段。根据 PCR 产物所含限制性酶切位点的特性, 酶切后可对产物特异性进行快速鉴定, 避免探针杂交鉴定的繁杂操作。如 b3a2 型经 AC 引物扩增后出现的 218 bp 扩增带中含有一个 *Hinf* I 酶切位点, 酶切后得到 49 bp 和 169 bp 两条带 (图 3 第 2 泳道)。

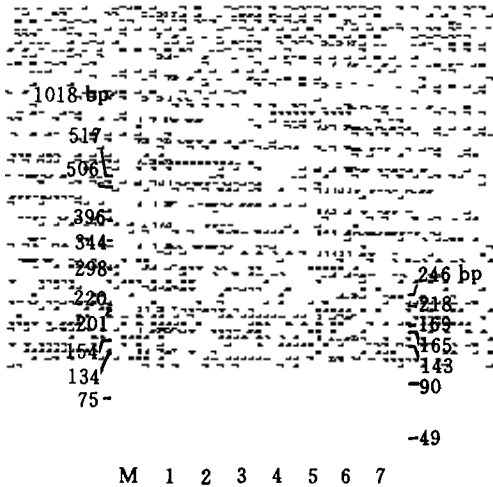


图 3 *bcr-abl* 基因 RT-PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定

M 1 kb Marker, 1 K562 细胞 AC 扩增带, 2 AC 扩增带 218 bp 的 *Hinf* I 酶切, 3 b3a2- b2a2 型 AC 扩增带, 4 b2a2 型 AC 扩增带, 5 b1a2 型 BD 扩增带, 6 b3a2- b2a2 型 AD 扩增带, 7 b3a2 型 AC 扩增带

2.5 CML 病人 *bcr-abl* 基因的 RT-PCR 检测结果

应用本法检测 12 例 CML 的 *bcr-abl* mRNA 的结果, 除 1 例阴性外 (该例为干扰素治疗后, 用 AC 引物作 RT-PCR), 其余均为阳性, 阳性率为 91.7%。其中 b3a2 型 6 例, b2a2 型 3 例, b3a2- b2a2 型 1 例, b3a2- B1a2 型 1 例。

3 讨论

RT-PCR 反应成功的关键因素是 mRNA 的质量和 RT 反应条件, 从而决定了 PCR 模板的可靠性。利用正交设计法对 RT 反应条件优化, 可起到事半功倍的效果。

用 HC 引物单次 PCR 可检测 10 pg RNA 水平, 本室建立的 RNA 提取方法得率为 3~5 pg 细胞, 即能检出 2~3 个恶性细胞。嵌套式 PCR 可进一步提高检测灵敏度和特异性。灵敏度还与引物设计有关。HC 引物灵敏度较 AC 引物高 10 倍, 较 Southern 分子杂交法 (10^{-2}) 高 1 000 倍, 较 Ph 染色体检查 (10^{-1}) 高 10 000 倍^[3]。白血病细胞起源于多潜能造血干细胞, 治疗前体内一般含 10^{12} 个白血病细胞, 治疗后, 体内白血病细胞数大约 ($1-10$) $\times 10^0$ 个, 此时外周血恶性细胞含量大大超出本实验的最低检出限。有助于微小残余病的检测。因此, 为简便起见, 临床标本检测中, 用 HC 引物可不考虑用嵌套式 PCR。

高灵敏度实验条件下, 需特别遵循严格操作以防止因样品间的污染造成的假阳性^[4]。PCR 检测阴性 (至少两次不同试验验证, 同时以最低检出限的阳性标本作对照), 只能说明外周血白血病细胞含量低于该检出限, 不能排除含极微量白血病细胞的可能。假阴性结果主要与 RNA 的质量和 RT 反应成败有关, 这必须用 *c-abl* mRNA 的 IC 扩增带作为内对照加以监控。另外假阴性还来自含非典型拼接方式的 *bcr-abl* mRNA 的标本, 如 c3a2 型^[5]。非特异性扩增带有时易与特异带混淆, 尤其两者长度相近又未经杂交证实时, 更难在普通琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上区别。我们试用过 AD 对引物 (与其它作者^[6]报道的方法所用引物相同) 进行扩增, 本实验条件下, 有时在正常人 DNA 或 RNA 标本中也见一 90 bp 左右的非特异扩增带 (已排除样品污染的可能), 在阳性标本中还出现一 75 bp 大小的非特异带 (见图 3 第 6 孔), 这可能与引物的设计和反应条件有关。因此用于临床标本检测中, 必须经杂交证实, 从而限制了其推广应用。但用 AC 或 HC 引物未见此现象。此外, 由于总 RNA 提取中难免受到少量 DNA 的污染, 因此引物的设计应在不同的外显子上, 间隔有较长的内含子序列, 以区分源于 DNA 或 mRNA 的扩增。

据报道, 约 90% 的 CML 具有典型的 Ph 染色体, 5% 左右的 CML 有变异型 Ph, 其余 5% 的 CML 中, 经 PCR 多可检出 *bcr-abl*(+)。另约 20% 的成人或 5% 的小儿 ALL, 5% 左右的急粒 (AML) 也可检出 Ph 染色体^[7]。本文结果大致相符。CML 中 b3a2, b2a2 和 B1a2 型可同时或单独存在, Ph(+) ALL 中除 B1a2 型外, 也可出现 b3a2 或 b2a2 型。因此在对 CML 或 ALL 等的 *bcr-abl* 基因分型中, 常规应使用两套引物 (如本试验中的 HC 和 BD 两对引物) 经

PCR反应来鉴定.

本法在 RNA 的提取、PCR 的双温循环条件、RT 反应条件优化、灵敏度的提高、产物的特异性鉴定等方面作了改进,可达到快速检测的目的. 该法的灵敏度、特异性和可靠性适用于临床标本的检测.

参 考 文 献

- 1 Kunieda Y, Okabe M, Kurosawa M, *et al.* Chronic myeloid leukemia presenting ALL-type BCR/ABL transcript. *Ann Hematol*, 1994, 69: 189
- 2 Gough N M. Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells. *Anal Biochem*, 1988, 173: 93
- 3 Roth M S, Antin J H, Bingham E L, *et al.* Detection of Philadelphia chromosome positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1989, 74: 882
- 4 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, 339: 237
- 5 Saglio G, Guerassio A, Rosso C, *et al.* New type of bcr/abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1990, 76: 1819
- 6 Dobrovic A, Trainor K J, Morley A A. Detection of the molecular abnormality in chronic myelogenous leukemia by use of the polymerase chain reaction. *Blood*, 1988, 72: 2063
- 7 Cross N C P, Melo J V, Lin F, *et al.* An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders. *Leukemia*, 1994, 8(1): 186

(1996-06-17收稿 1996-11-15修回)

EXPERIMENTAL STUDY ON THE DETECTION OF BCR-ABL FUSION GENE IN LEUKEMIAS BY RT-PCR

Li Wei Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

A rapid reverse transcriptase-transcribed PCR (RT-PCR) was established to detect different types (b3a2, b2a2, B1a2) of bcr-abl fusion mRNAs in leukemias. The RT reaction conditions were optimized by orthogonal design. To improve the sensitivity and specificity, we used different primers and nested RT-PCR for amplification. The specific PCR products were identified according to their restriction enzymatic sites with the use of restriction enzymes in replace of probe hybridization. Using these method for the detection of 12 cases of chronic myeloid leukemia, 11 cases were found to be presenting different types of bcr-abl mRNA. We also provided some considerations for clinical applications.

Subject headings leukemia/genetics; fusion proteins, bcr-abl/isolation and purification; polymerase chain reaction