



## 降落式PCR和SSCP 检测淋巴细胞白血病单克隆T细胞受体 $\gamma$ 基因重排

目前,淋巴细胞白血病的诊断主要依据骨髓细胞形态学和流式细胞术,但分子生物学技术正越来越多地应用于淋巴细胞白血病方面的研究[1],并用于疑难病例的诊断及化疗、干细胞移植术后微小病变残留的检测等[2]。本实验选用T细胞受体(TCR)- $\gamma$ 基因重排通用引物,对淋巴细胞白血病进行检测,结合单链构型多态性分析(SSCP),探讨基因重排检测在淋巴细胞白血病研究中的应用价值。

### 1 材料和方法

#### 1.1 标本

由南方医院血液病实验室收集,为做完流式细胞术后剩余的血液标本。根据骨髓象及流式细胞术的结果,病态主细胞群表达以CD2、CD3、CD4、CD7、CD8为主的为T淋巴细胞白血病;以表达CD10、CD19、CD20为主的为B淋巴细胞白血病。本组实验中收集T淋巴细胞白血病外周血标本18例,B淋巴细胞白血病外周血标本4例。Jurkat细胞(T淋巴细胞株)、Raji细胞(B淋巴细胞株)由第一军医大学细胞生物学教研室提供。培养基为含10%胎牛血清的RPMI1640。上述淋巴细胞在37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养。

#### 1.2 DNA模板提取

采用盐析法提取外周血标本DNA。方法为:取每份血标本2 ml,分别加入16 ml冷蒸馏水混匀,裂解红细胞,离心去除上清。加入16 ml预冷的0.1% Triton-100,混匀,以使白细胞胞膜穿孔。离心去除上清后,加入0.8 ml细胞裂解液、40  $\mu$ l的10% SDS及10 mg/ml的蛋白酶K 16 ml,37℃孵育过夜。加入6.0 mol/L的NaCl 0.7 ml剧烈振荡20 s,以析出蛋白质。离心后取上清,加入2倍体积的冷乙醇沉淀DNA,70%的乙醇洗2次后加入50  $\mu$ l TE缓冲液溶解。Jurkat细胞和Raji细胞DNA则采用标准的酚-氯仿法抽提。分光光度计检测DNA浓度,将浓度调整至200~600 ng/ $\mu$ l之间。4℃保存待用。

#### 1.3 PCR

1.3.1 DNA模板质量检测 所有提取的DNA模板均用 $\beta$ -globin引物扩增,以检测DNA模板是否降解而无法用于实验。将无法用该引物扩增的样品去除。 $\beta$ -globin上游引物序列为:5'-CAACTTCATCCACG TTCACC-3';下游引物序列为:5'-GAAGAGCCAA GGACAGGTAC -3'。反应体系为20  $\mu$ l,反应条件为:94℃预变性5 min;94℃ 30s、55℃ 45 s、72℃ 45 s,35个循环;终延伸72℃ 10 min,4℃终止。扩增产物为268 bp DNA片段。

1.3.2 降落式PCR检测TCR- $\gamma$ 基因重排 选用TCR- $\gamma$ 受体基因重排通用引物,上游引物序列为:V $\gamma$  I 5'-CCAGGAGGGGAAGGCCCCACAG-3';下游引物引物序列为:J1/2 5'-CCTGTGACAACAAGTGTGT -3'。引物由上海博亚公司合成。20  $\mu$ l PCR反应体系包括:10 $\times$ buffer 2.0  $\mu$ l[KCl 1 nmol/ $\mu$ l,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 nmol/ $\mu$ l,Tris·HCl 10 nmol/ $\mu$ l,pH 9.0,NP-40],25 mmol/L的MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ l,4种各10 mmol/L的dNTP 0.4  $\mu$ l,上、下游引物各1  $\mu$ l(10 pmol),TaqDNA多聚酶1 U,DNA模板1  $\mu$ l(300 ng/ $\mu$ l),加水至20  $\mu$ l。反应条件为:94℃预变性5 min;94℃ 30 s、60℃ 45 s、72℃ 45 s,5个循环;94℃ 30 s、56℃ 45

s、72 °C 45 s, 5个循环; 94 °C 30 s、52 °C 45 s、72 °C 45 s, 25个循环; 终延伸为72 °C 10 min, 4 °C 终止。

1.3.3 PCR灵敏度实验 将Jurkat细胞DNA浓度调整至300 ng/ $\mu$ l, 与反应增生性淋巴组织DNA(浓度为300 ng/ $\mu$ l) 倍比混合, 使Jurkat细胞DNA所占的比例分别为100%、50%、10%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.1%。降落式PCR条件同上。

#### 1.4 琼脂糖凝胶电泳

6  $\mu$ l PCR扩增产物与0.5  $\mu$ l 加样缓冲液混匀, 加样于2%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)中。在0.5 $\times$ TBE缓冲液、80 V(8 V/cm) 电压条件下电泳40 min。紫外光下观察并用凝胶成像系统成像。

#### 1.5 SSCP

6  $\mu$ l PCR产物与6  $\mu$ l 变性上样缓冲液(95%甲酰胺、0.25%二甲苯腈、0.05%溴酚蓝及20 mmol/L EDTA)混合, 96 °C热水浴变性10 min, 立即置于冰上冷却。将10  $\mu$ l 变性样品加样于8%非变性聚丙烯酰胺凝胶加样孔中(凝胶体积为6.0 cm $\times$ 8.0 cm $\times$ 0.1 cm), 在1 $\times$ TBE缓冲液、90 V电压、室温条件下电泳3 h。银染后可见光下观察并用凝胶成像系统成像。

#### 1.6 DNA测序

选取部分在琼脂凝胶电泳阳性的标本, 进行50  $\mu$ l的PCR反应。纯化后, 采用双脱氧链终止法直接测序。

## 2 结果

### 2.1 琼脂糖凝胶电泳

本实验中的22例血样标本及两株细胞经 $\beta$ -globin 引物扩增, 均得到约268 bp的DNA片段, 证实标本可以用于PCR实验。用TCR- $\gamma$ 通用引物扩增, 并经2%琼脂糖凝胶电泳(图1, 为部分标本, 未显示B淋巴细胞阳性标本)显示: Jurkat细胞为阳性; Raji细胞为阴性; 18例T淋巴细胞白血病中有15例呈阳性(83%), 4例B淋巴细胞白血病中有2例为阳性(50%)。

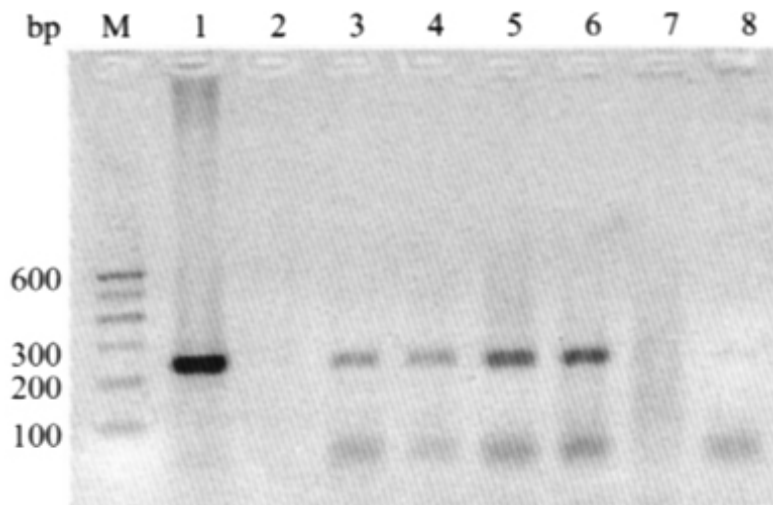


图1 PCR扩增淋巴细胞白血病TCR- $\gamma$ 基因重排的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified TCR- $\gamma$  gene rearrangements from a lymphoid leukemia patient

M: Marker; Lane 1: Positive control (Jurkat cell line); Lane 2: Negative control (Raji cell line); Lanes 3-6, 8: T lymphoid leukemia; Lane 7: B lymphoid leukemia

### 2.2 SSCP

将所有在琼脂糖电泳中阳性的标本, 用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳做SSCP分析, 均出现不连续条带。图2中最前面的为双链DNA条带, 介于230~240 bp之间, 其后为两条解链后形成的单链DNA条带。

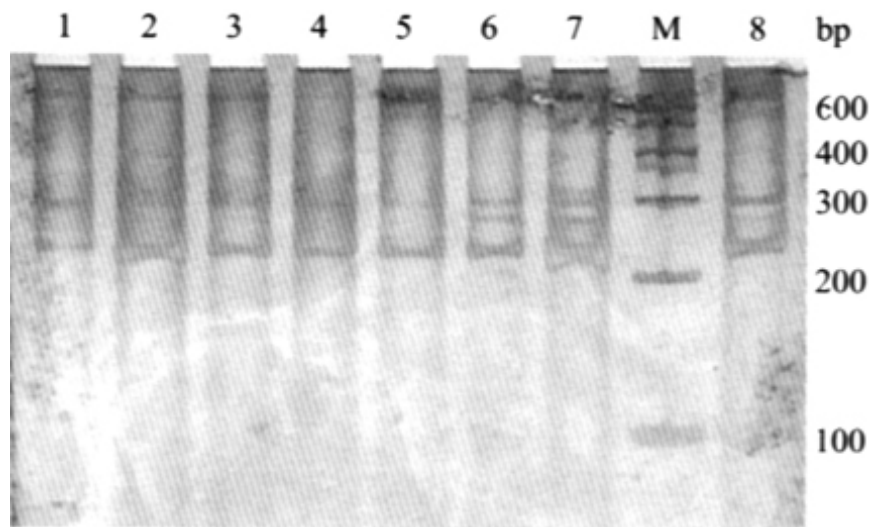


图2 PCR扩增淋巴细胞白血病TCR- $\gamma$ 基因重排的SSCP分析

Fig.2 SSCP analysis of PCR-amplified TCR- $\gamma$  gene rearrangements from a lymphoid leukemia patient

M: Marker; Lane 1: Positive control (Jurkat cell line); Lanes 2-6: T lymphoid leukemia; Lanes 7, 8: B lymphoid leukemia

### 2.3 PCR灵敏度实验

在琼脂糖电泳中，扩增产物条带亮度随着Jurkat 细胞DNA模板的减少而减弱。Jurkat 细胞DNA占 1% 时，扩增产物仍可见到条带，少于1%则无法见到条带(图3)。

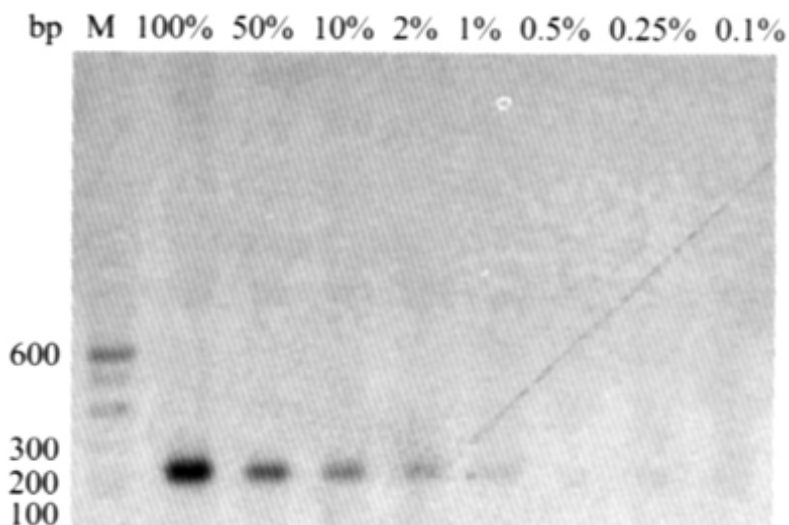


图3 降落式PCR敏感性分析用于琼脂糖电泳

Fig.3 Sensitivity analysis of the touch-down PCR in agarose gel electrophoresis  
The numbers on the top indicate the percentage of Jurkat cell line DNA

### 2.4 DNA测序

选取Jurkat细胞、4例T淋巴细胞白血病及1例B淋巴细胞白血病PCR产物测序，测序结果与网上对比，证实均为TCR- $\gamma$ 基因重排。序列大小介于230~240 bp之间。

TCR- $\gamma$ 基因重排发生在T细胞分化早期。无论T细胞最终表型是 $\alpha\beta$ 还是 $\gamma\delta$ ，其基因组中均发生并保留TCR- $\gamma$ 的V-J基因重排[3]；再加上 $\gamma$ 受体基因中的V区及J区基因片段较少，无D区基因，因此，其组合的多样性也相对较少[4]，可用较少的引物进行基因重排检测。多项实验表明，TCR- $\gamma$ 基因重排是检测T细胞恶性肿瘤单克隆基因重排最实用的指标[5]。

目前，在检测T细胞单克隆基因重排实验中，往往在同一PCR反应中使用多对引物，操作复杂且费用较高，不适于临床常规检测[6]。本实验使用的TCR- $\gamma$ 通用引物，上游引物可以和V $\gamma$  I区的9个基因片段中的8个片段结合(一假基因片段除外)，下游引物可以与J1和J2两个基因片段结合。而T淋巴细胞在分化过程中发生的 $\gamma$ 受体基因重排，绝大多数发生在V $\gamma$  I和J1/2基因片段之间。因此，采用TCR- $\gamma$ 通用引物可检测到绝大多数T细胞基因重排。与常规PCR有所不同，降落式PCR首先使用较高的退火温度，可以减少非特异性扩增；随后采用较低的退火温度，提高扩增效率[7]。本实验中PCR通用性很好，但灵敏度只能达到约 $10^{-2}$ ，与国外报道的 $10^{-5}$ 之间尚有很大的差距[8]。这可能与实验中所采用的PCR产物检测方法有关。

由于TCR- $\gamma$ 受体基因重排中没有D区基因片段参与，故其连接多样性相对较少，不同TCR- $\gamma$ 基因重排扩增产物碱基数相差不多或完全相同。一般情况下，该基因重排的PCR产物用琼脂糖凝胶电泳无法分开，单克隆与反应性增生性的多克隆淋巴细胞的扩增产物不易区分，易造成假阳性[9]。SSCP最早用于基因点突变的检测，这种方法不仅可依据产物碱基数目，也可以依据碱基序列将不同DNA片段分开，因此也适用于TCR- $\gamma$ 基因重排的检测[10]。单克隆基因重排PCR产物在SSCP电泳中为数条不连续条带，多克隆基因重排则呈弥散状，不形成条带。同温度梯度电泳和凝胶梯度电泳相比较，SSCP所需设备简单，操作简便，较适于临床常规检测。与标准的SSCP不同，本实验中采用高压(90 v)，并在室温条件下进行电泳，减少了电泳所需时间和所要求的条件，但仍能较好地将单克隆基因重排和多克隆基因重排区分开。该方法的不足之处是无法区分不同克隆之间的细微差别，不同克隆在电泳中的位置较为一致。但经DNA测序证实，不同标本扩增出的为不同克隆。若要对PCR产物进行更细微的区分则可采用标准SSCP或温度梯度凝胶电泳、变性梯度凝胶电泳等。

15例T淋巴细胞白血病及2例B淋巴细胞白血病中检测到TCR- $\gamma$ 单克隆基因重排。在琼脂糖凝胶电泳及SSCP电泳中出现230~240 bp的扩增产物，其大小与网上比对分析引物的结果一致。实验中4例B淋巴细胞白血病中有2例出现TCR- $\gamma$ 受体单克隆基因重排，均为急性淋巴细胞白血病。说明在分化早期的淋巴细胞恶性肿瘤中，常有基因的“异型重排”现象，与文献报道情况类似[11]。

本实验在TCR- $\gamma$ 通用引物、PCR循环条件、PCR扩增产物检测方法等方面做了探索，对将基因重排检测应用于淋巴细胞白血病诊断有一定意义。

#### 参考文献：

- [1]Macintyre EA, Delabesse E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies[J]. *Semin Hematol*, 1999, 36(4): 373-89.
- [2]Gebhard S, Benhattar J, Bricod C, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of T-cell lymphoma in paraffin-embedded bone marrow biopsies: a comparative study[J]. *Histopathology*, 2001, 38(1): 37-44.
- [3]Kneba M, Bolz I, Linke B, et al. Characterization of clone-specific rearrangement T-cell receptor gamma-chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing[J]. *Blood*, 1994, 84(2): 574-81.
- [4]Strominger JL. Developmental biology of T cell receptors[J]. *Science*, 1989, 26, 244(4907): 943-50.
- [5]Zhu D, Kadin ME, Samoszuk M. Detection of clonal T-cell receptor- gamma gene rearrangement by PCR/temporal temperature gradient gel electrophoresis[J]. *Am J Clin Pathol*, 2001, 116(4): 527-34.
- [6]Fodinger M, Buchmayer H, Schwarzingler I, et al. Multiplex PCR for rapid detection of T-cell receptor-gamma chain gene rearrangements in patients with lymphoproliferative diseases[J]. *Br J Haematol*, 1996, 94(1): 136-9.

[7]Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, et al. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(2): 490-4.

[8]Wack A, Montagna D, Dellabona P, et al. An improved PCR-hetero- duplex method permits high-sensitivity detection of clonal expansions in complex T cell populations[J]. *J Immunol Methods*, 1996, 196(2): 181-92.

[9]Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations[J]. *Leukemia*, 1997, 11(12): 2192-9.

[10]Crisi GM, Emanuel JR, Johnson C, et al. Semireannealing, single- stranded conformational polymorphism: a novel and effective tool for the diagnosis of T-cell locality[J]. *Diagn Mol Pathol*, 2002, 11(2): 67-74.

[11]Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, et al. Gene rearrangement in B- and T- lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction[J]. *Blood*, 1991, 78(1): 192-6.

#### 参考文献:

[1]Macintyre EA, Delabesse E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies[J]. *Semin Hematol*, 1999, 36(4): 373-89.

[2]Gebhard S, Benhattar J, Bricod C, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of T-cell lymphoma in paraffin-embedded bone marrow biopsies: a comparative study[J]. *Histopathology*, 2001, 38(1): 37-44.

[3]Kneba M, Bolz I, Linke B, et al. Characterization of clone-specific rearrangement T-cell receptor gamma-chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing[J]. *Blood*, 1994, 84(2): 574-81.

[4]Strominger JL. Developmental biology of T cell receptors[J]. *Science*, 1989, 26, 244(4907): 943-50.

[5]Zhu D, Kadin ME, Samoszuk M. Detection of clonal T-cell receptor- gamma gene rearrangement by PCR/temporal temperature gradient gel electrophoresis[J]. *Am J Clin Pathol*, 2001, 116(4): 527-34.

[6]Fodinger M, Buchmayer H, Schwarzingler I, et al. Multiplex PCR for rapid detection of T-cell receptor-gamma chain gene rearrangements in patients with lymphoproliferative diseases[J]. *Br J Haematol*, 1996, 94(1): 136-9.

[7]Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, et al. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(2): 490-4.

[8]Wack A, Montagna D, Dellabona P, et al. An improved PCR-hetero- duplex method permits high-sensitivity detection of clonal expansions in complex T cell populations[J]. *J Immunol Methods*, 1996, 196(2): 181-92.

[9]Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations[J]. *Leukemia*, 1997, 11(12): 2192-9.

[10]Crisi GM, Emanuel JR, Johnson C, et al. Semireannealing, single- stranded conformational polymorphism: a novel and effective tool for the diagnosis of T-cell

locality[J]. Diagn Mol Pathol, 2002, 11(2): 67-74.

[11]Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, et al. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction[J]. Blood, 1991, 78(1): 192-6.

---

[回结果列表](#)