

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

韩西群¹ 袁宗利¹ 袁贺莉¹ 袁陆地² 袁赵彤¹ 第一军医大学¹ 病理学教研室袁细胞生物学教研室袁广东广州 510515 冤

摘要目的 以降落式 PCR 和单链构型多态性 SSCP 冤方法检测淋巴细胞白血病单克隆 T 细胞受体 TCR 酌基因重排袁探讨其在淋巴细胞白血病诊断中的价值遥 方法 盐析法提取淋巴细胞白血病患者外周血白细胞 DNA 袁 PCR 酌基因重排通用引物和降落式 PCR 扩增基因重排遥 分别采用琼脂糖凝胶电泳尧 SSCP 和 DNA 直接测序方法检测 PCR 扩增产物遥 阳性细胞系 DNA 模板与反应增生性淋巴组织 DNA 按不同比例混合后扩增袁检测降落式 PCR 的灵敏度遥 结果 琼脂糖电泳中袁 8 例 T 淋巴细胞白血病中有 15 例尧 例 B 淋巴细胞白血病中有 2 例为阳性袁阳性标本经 SSCP 进一步分析袁呈不连续条带遥 DNA 直接测序证实扩增产物为 TCR 酌基因重排遥 阳性对照模板占 1% 以上时可得到阳性扩增结果遥 结论 TCR 酌基因重排通用引物结合降落式 PCR 可有效扩增 T 淋巴细胞白血病基因重排袁可用于 T 淋巴细胞白血病的辅助诊断遥

关键词 聚合酶链反应 多态现象 单链构象 酌基因重排 酌链 T 细胞抗原受体 白血病 淋巴细胞
中图分类号 R394.2; R733.7 文献标识码 冤 文章编号 1000-2588(2004)02-0188-04

Touch-down PCR and single-strand conformation polymorphism for detecting clonal T cell receptor 酌 gene rearrangement in lymphoid leukemia

HAN Xi-qun¹, QI Zong-li¹, HE Li¹, LU Di², ZHAO Tong¹

¹Department of Pathology, ²Department of Cell Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the value of detecting clonal T cell receptor 酌 TCR 酌 gene rearrangement with touch-down PCR and single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) in the diagnosis of lymphoid leukemia. Methods The DNA of peripheral blood leucocytes from lymphoid leukemia patients were extracted for amplification of the TCR 酌 gene rearrangement with the consensus primers and touch-down PCR. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, direct DNA sequencing and SSCP analysis. The positive control cell line DNA was mixed in different proportions with the DNA extracted from reactive lymphoid tissue to test the sensitivity of the touch-down PCR. Results Fifteen of 18 T lymphoid leukemia and 2 of the 4 B lymphoid leukemia patients were identified to be positive by agarose electrophoresis. The positive PCR products were further analyzed by SSCP analysis, which showed discrete bands. Direct DNA sequencing confirmed the clones to be TCR 酌 gene rearrangement, and the sensitivity of touch-down PCR was 1%. Conclusion Consensus primers for studying TCR 酌 gene rearrangement in combination with touch-down PCR can effectively amplify the clonal TCR 酌 gene rearrangement in T lymphoid leukemia.

Key words: polymerase chain reaction; polymorphism, single-stranded conformational; gene rearrangement, gamma-chain T-cell antigen receptor; leukemia, lymphocytic

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袁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遥 袁并用于疑难病例的诊断及化疗尧 细胞移植术后微小病变残留的检测等遥 本实验选用 T 细胞受体 TCR 酌基因重排通用引物袁对淋巴细胞白血病进行检测袁结合单链构型多态性分析 SSCP 冤袁探讨基因重排检测在淋巴细胞白血病研究中的应用价值遥

1 材料和方法

1.1 标本

由南方医院血液病实验室收集袁为做完流式细胞术后剩余的血液标本遥 根据骨髓象及流式细胞术的结果袁病态主细胞群表达以 CD2尧 D3尧 D4尧 D7尧 D8 为主的为 T 淋巴细胞白血病曰以表达 CD10尧 D19尧 CD20 为主的为 B 淋巴细胞白血病遥 本组实验中收集 T 淋巴细胞白血病外周血标本 18 例袁淋巴细胞白血病外周血标本 4 例遥 Jurkat 细胞渊淋巴细胞株冤尧 Raji 细胞渊淋巴细胞株冤由第一军医大学细胞生物学教研室提供遥 培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 遥 上述淋巴细胞在 37 益尧 尧 饱和湿度培养箱中培养遥

1.2 DNA 模板提取

收稿日期 2003-10-11

基金项目 广东省科技计划项目 30101 冤

Supported by Science and Technology Project of Guangdong Province 30101 冤

作者简介 韩西群 1971- 冤男袁第一军医大学在读博士研究生袁医师袁电话 20-61363263 袁 e-mail: hanxiqun@fimmu.com

采用盐析法提取外周血标本 DNA 方法为取每份血样标本 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 混匀离心使白细胞膜穿孔离心去除上清后加入 0.8 ml 细胞裂解液 0.1% 的 10% SDS 及 10 mg/ml 的蛋白酶 K 16 ml 7 益孵育过夜加入 6.0 mol/L 的 NaCl 0.7 ml 剧烈振荡 20 s 离心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 滋 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/滋 之间 4 益保存待用

1.3 PCR

1.3.1 DNA 模板质量检测 所有提取的 DNA 模板均用 β globin 引物扩增检测 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 β 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 滋 反应条件为 94 益预变性 5 min 94 益 30s 95 益 45 s 92 益 45 s 5 个循环 92 益 10 min 92 益 终止 扩增产物为 268 bp DNA 片段

1.3.2 降落式 PCR 检测 TCR- α 基因重排 选用 TCR- α 受体基因重排通用引物上游引物序列为 5'-CCAGGAGGGGAAGGCCACACAG-3' 下游引物引物序列为 5'-CCTGTGACAACAAGTGTGT-3' 引物由上海博亚公司合成 20 滋 PCR 反应体系包括 10 滋 Buffer 2.0 滋 [KCl 1 nmol/滋 (NH₄)₂SO₄ 8 nmol/滋 Tris-HCl 10 nmol/滋 H₂O 9.0 滋 P-40] 5 mmol/L 的 MgCl₂ 1.2 滋 各种 10 mmol/L 的 dNTP 0.4 滋 上游下游引物各 1 滋 (10 pmol) TaqDNA 多聚酶 1 U 模板 1 滋 (300 ng/滋) 加水至 20 滋 反应条件为 94 益预变性 5 min 94 益 30 s 90 益 45 s 92 益 45 s 5 个循环 94 益 30 s 96 益 45 s 92 益 45 s 5 个循环 92 益 10 min 92 益 终止

1.3.3 PCR 灵敏度实验 将 Jurkat 细胞 DNA 浓度调整至 300 ng/滋 与反应增生性淋巴组织 DNA 浓度为 300 ng/滋 混合使 Jurkat 细胞 DNA 所占的比例分别为 100% 90% 80% 70% 60% 50% 40% 30% 20% 10% 降落式 PCR 条件同上

1.4 琼脂糖凝胶电泳

6 滋 PCR 扩增产物与 0.5 滋 加样缓冲液混匀加样于 2% 琼脂糖凝胶溴化乙锭液中在 0.5 伊 BE 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 滋 PCR 产物与 6 滋 变性上样缓冲液 5% 甲酰胺 0.25% 二甲苯腈 0.05% 溴酚蓝及 20 mmol/L EDTA 混合液 6 益热水浴变性 10 min 立即置于冰上冷却将 10 滋 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 伊 0.8 cm 伊 1.1 cm 在 1 伊 BE 缓冲液 80 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 滋 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 β globin 引物扩增均得到约 268 bp 的 DNA 片段证实标本可以用于 PCR 实验通用 TCR- α 通用引物扩增并经 2% 琼脂糖凝胶电泳 1 滋 部分标本显示 B 淋巴细胞阳性标本显示 Jurkat 细胞为阳性 Raji 细胞为阴性 8 例 T 淋巴细胞白血病中有 15 例呈阳性 3% 2 例 B 淋巴细胞白血病中有 2 例为阳性 0% 2 例

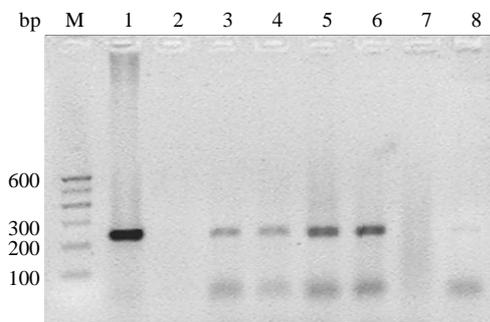


图 1 PCR 扩增淋巴细胞白血病 TCR- α 基因重排的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified TCR- α 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: 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

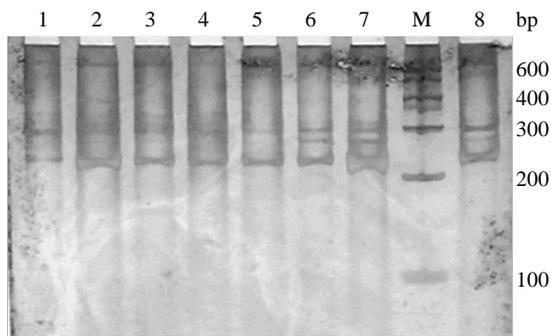


图 2 PCR 扩增淋巴细胞白血病 TCR- α 基因重排的 SSCP分析

Fig.2 SSCP analysis of PCR-amplified TCR- α 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。

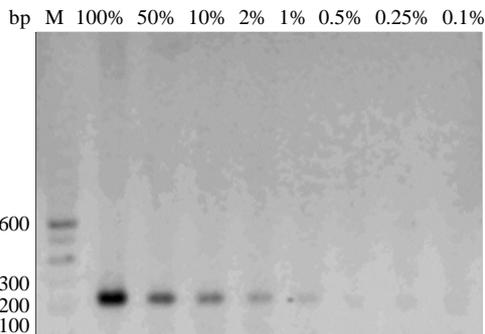


图 3 降落式 PCR 敏感性分析用于琼脂糖电泳

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 5 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- α 基因重排。序列大小介于 230~240 bp 之间。

3 讨论

TCR- α 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- α 的 V-J 基因重排。再加上 α 受体基因中的 V 区及 J 区基因片段较少。而 D 区基因因此其组合的多样性也相对较少。可用较少的引物进行

基因重排检测。多项实验表明 TCR- α 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。

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。本实验使用的 TCR- α 通用引物上游引物可以和 V 区的 9 个基因片段中的 8 个片段结合。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 α 受体基因重排绝大多数发生在 V 区和 J1/2 基因片段之间。因此采用 TCR- α 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。本实验中 PCR 通用性很好。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。这可能与实验中所采用的 PCR 产物检测方法有关。

由于 TCR- α 受体基因重排中没有 D 区基因片段参与。其连接多样性相对较少。不同 TCR- α 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。容易造成假阳性。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- α 基因重排的检测。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。适用于临床常规检测。与标准的 SSCP 不同。本实验中采用高电压。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。但仍能较好地单克隆基因重排和多克隆基因重排区分。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。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- α 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- α 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。常有基因的野型重排现象。与文献报道情况类似。

