

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

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

摘要 目的 以降落式 PCR 和单链构型多态性 SSCP 方法检测淋巴细胞白血病单克隆 T 细胞受体 酷基因重排。探讨其在淋巴细胞白血病诊断中的价值。方法 盐析法提取淋巴细胞白血病患者外周血白细胞 DNA，袁 CR-酷基因重排通用引物和降落式 PCR 扩增基因重排分别采用琼脂糖凝胶电泳和 SSCP 和 DNA 直接测序方法检测 PCR 扩增产物。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。结果 琼脂糖电泳中袁 8 例 T 淋巴细胞白血病中有 15 例，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。DNA 直接测序证实扩增产物为 TCR-酷基因重排。阳性对照模板占 1% 以上时可得到阳性扩增结果。结论 TCR-酷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。袁用于 T 淋巴细胞白血病的辅助诊断。

关键词 聚合酶链反应；多态现象；单链构象；基因重排；酷 T 细胞抗原受体；白血病；袁淋巴细胞

中图分类号 R394.2; R733.7 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2004)02-0188-04

Touch-down PCR and single-strand conformation polymorphism for detecting clonal T cell receptor 酷 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 酷 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-酷 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-酷 gene rearrangement, and the sensitivity of touch-down PCR was 1%. Conclusion Consensus primers for studying TCR-酷 gene rearrangement in combination with touch-down PCR can effectively amplify the clonal TCR-酷 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

目前袁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袁。对于疑难病例的诊断及化疗后细胞移植术后微小病变残留的检测等袁。本实验选用 T 细胞受体 酷 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 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。

收稿日期 2003-10-11

基金项目 广东省科技计划项目 滥 30101 宽

Supported by Science and Technology Project of Guangdong Province 滥 30101 宽

作者简介 韩西群 滥 971- 宽 第一军医大学在读博士研究生袁 医师袁 电话 滥 20-61363263 袁 mail: hanxiquan@fimmu.com

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。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 滥 CD3 滥 CD4 滥 CD7 滥 CD8 为主的为 T 淋巴细胞白血病以表达 CD10 滥 CD19 滥 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，袁 淋巴细胞白血病外周血标本 4 例。袁 Jurkat 细胞 滥 淋巴细胞株 滥 Raji 细胞 滥 淋巴细胞株 滥。由第一军医大学细胞生物学教研室提供袁培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640。上述淋巴细胞在 37 益 滥 % CO₂ 滥 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 的方法为：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，再加入 16 ml 预冷的 0.1% Triton-100，混匀，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，0.1% SDS 及 10 mg/ml 的蛋白酶 K，16 ml，55℃ 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 μl 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，用分光光度计检测 DNA 浓度，并将浓度调整至 200~600 ng/μl 之间。

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 μl，反应条件为：94℃ 预变性 5 min，4℃ 30 s，5℃ 45 s，2℃ 45 s，5 个循环，终延伸 72℃ 10 min。扩增产物为 268 bp DNA 片段。

1.3.2 降落式 PCR 检测 TCR-酪基因重排 选用 TCR-酪受体基因重排通用引物，上游引物序列为 5'-CCAGGAGGGAAAGGCCACAG-3'，下游引物序列为 5'-CCTGTGACAACAAGTGTGT-3'。引物由上海博亚公司合成。PCR 反应体系包括：Buffer 2.0 μl，[KCl 1 nmol/l，(NH₄)₂SO₄ 8 nmol/l，Tris-HCl 10 nmol/l，MgCl₂ 1.2 μl，各 10 mmol/l 的 dNTP 0.4 μl，aquaDNA 多聚酶 1 U，DNA 模板 1 μl (300 ng/μl)，加水至 20 μl。反应条件为：94℃ 预变性 5 min，4℃ 30 s，5℃ 45 s，2℃ 45 s，5 个循环，4℃ 30 s，5℃ 45 s，2℃ 45 s，5 个循环，终延伸为 72℃ 10 min。扩增产物为 268 bp DNA 片段。

1.3.3 PCR 灵敏度实验 将 Jurkat 细胞 DNA 浓度调整至 300 ng/μl，反应增生性淋巴组织 DNA 浓度为 300 ng/μl，与混合 Jurkat 细胞 DNA 所占的比例分别为 100%、50%、25%、15%、10%、5%、2.5%、1%。降落式 PCR 条件同上。

1.4 琼脂糖凝胶电泳

6 μl PCR 扩增产物与 0.5 μl 加样缓冲液混匀，加样于 2% 琼脂糖凝胶，溴化乙锭染色，0.5 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 μl PCR 产物与 6 μl 变性上样缓冲液（5% 甲酰胺、2.5% 二甲苯腈、0.05% 溴酚蓝及 20 mmol/L EDTA）混合，65℃ 热水浴变性 10 min，立即置于冰上冷却，将 10 μl 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 × 0.5 cm × 0.1 cm，置于 1× TBE 缓冲液，0 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

选取部分在琼脂糖凝胶电泳阳性的标本进行 50 μl 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。通用引物扩增，并经 2% 琼脂糖凝胶电泳，图 1 为部分标本显示 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 例 B 淋巴细胞白血病中有 2 例为阳性。

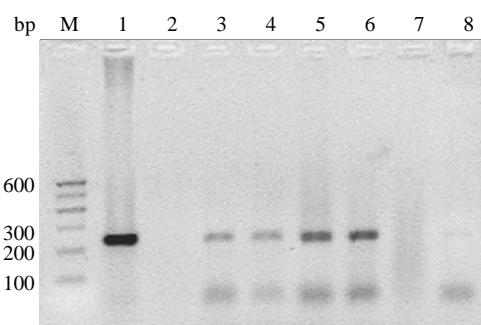


图 1 PCR 扩增淋巴细胞白血病 TCR-酪基因重排的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified TCR-酪 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。

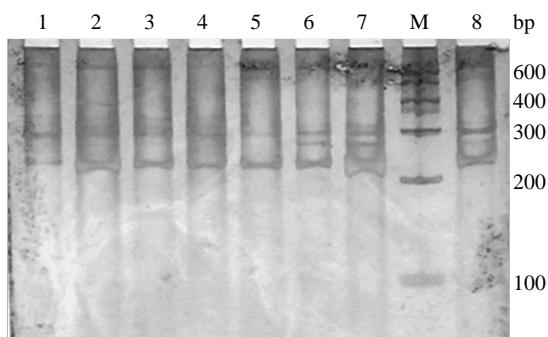


图 2 PCR 扩增淋巴细胞白血病 TCR-γ 基因重排的 SSCP 分析

Fig.2 SSCP analysis of PCR-amplified TCR-γ 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 敏感度实验

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。当 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。

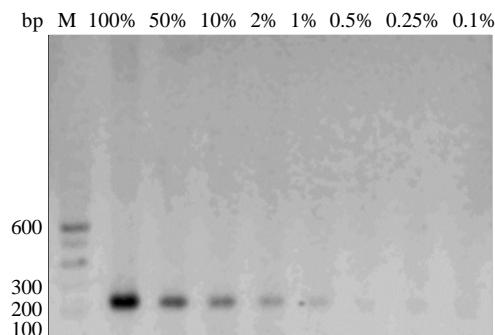


图 3 降落式 PCR 敏感性分析用于琼脂糖电泳

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 细胞及 1 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-γ 基因重排，序列大小介于 230~240 bp 之间。

3 讨论

TCR-γ 基因重排发生在 T 细胞分化早期。无论 T 细胞最终表型是 T 细胞还是 γδ T 细胞，其基因组中均发生并保留 TCR-γ 的 V-J 基因重排。再加上 γδ T 细胞中的 V 区及 J 区基因片段较少，且无 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-γ 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-γ 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。T 淋巴细胞在分化过程中发生的 γ 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-γ 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，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，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。这可能与实验中所采用的 PCR 产物检测方法有关。

由于 TCR-γ 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-γ 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。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-γ 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，不能形成条带。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，本实验中采用高压电泳，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。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-γ 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-γ 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。

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

参考文献院

- 咱暂 Macintyre EA, Delabesse E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies咱暂Semin Hematol, 1999, 36(4): 373-89.
- 咱暂 Gebhard S, Benhatar J, Bricod C, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of T-cell lymphoma in paraffin-embedded bone marrow biopsies: a comparative study咱暂Histopathology, 2001, 38 (1): 37-44.
- 咱暂 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咱暂Blood, 1994, 84(2): 574-81.
- 咱暂 Strominger JL. Developmental biology of T cell receptors 咱暂Science, 1989, 26, 244(4907): 943-50.
- 咱暂 Zhu D, Kadin ME, Samosuk M. Detection of clonal T-cell receptor-gamma gene rearrangement by PCR/temporal temperature gradient gel electrophoresis咱暂Am J Clin Pathol, 2001, 116(4): 527-34.

渊上接 187 页冤

2 结果

查明共有 7 266 种编码组合袁根据肿瘤的定义渊国际疾病分类渊CD冤组合的规则袁确定其中有 6 461 种错误的组合袁占现有组合的 88.91% 遥核对 8 243 份原始病案后发现有 5 293 份病案编码不正确袁占全部病案的 64.21% 遥ICD 编码规则规定描述一个肿瘤诊断袁必须以 C 码作主要编码袁同时必须有一个 M 码作附加编码袁缺一不可遥在本次调查中 371 例无 C 码或 M 码遥在编码录入过程中袁没有明确 M 码与 C 码的从属关系袁当同时录入多个肿瘤诊断时袁 C 码与 M 码之间关系易混淆遥这类情况在本次调查中有 3 507 例遥肿瘤的发生是有其组织学基础的袁CD 对 C 码与 M 码的组合也有相关 咨袁而在本次调查中有 678 例 206 种 C 码与 M 码的组合违反上述规则袁如院 40.2 M8800/3 遥另有违反 ICD 编码原则袁将非肿瘤部位编码与 M 码编配袁院 22.1 M8140/3 遥 75.0 M9370/3 遥

3 讨论

由于肿瘤编码对编码员医学知识和专业技能要求较高袁而编码员队伍中非临床义务人员占相当比例袁故有必要采取更先进的技术手段辅助编码工作咱暂遥

基于肿瘤发生机制咱暂和 ICD 本身编码原则的限制袁 C 码与 M 码的组合数量是有限的袁其质量是可控的遥现阶段可行的改进方法有渊编辑电子词典时袁改变现行的 C 码袁 I 码单列条目的方式袁使用由 C 码

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

咱暂 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咱暂J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 490-4.

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

咱暂 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咱暂Leukemia, 1997, 11(12): 2192-9.

咱暂 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咱暂Diagn Mol Pathol, 2002, 11 (2): 67-74.

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

与 M 码共同构成的条目袁在诊断编码形成前防止错码的发生遥渊冤增加疾病分类编目程序中的 C 码 M 码提示功能袁在编码录入过程中袁控制编码错误的发生遥渊设计编码核查软件袁对已形成的编码准确性进行检验袁并督促编码员及时纠正错码遥

目前 叶疾病和有关健康问题的统计分类渊CD-10冤的军标电子词典已基本编辑完成袁预计很快在全军推广袁故对编码员的培训和完善系统工具袁已成当务之急遥

参考文献院

- 咱暂 卫生部卫生信息统计中心, 北京协和医院国际疾病分类中心. 疾病和有关健康问题统计分类渊CD-10冤咱暂北京院人民卫生出版社, 1997. 2-5.
- 咱暂 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic disease of the hematopoietic and lymphoid tissues 咨暂 In: Sabin LH. World Health Organization international histological classification of tumors 咨暂 New York: Berlin (in press).
- 咱暂 卫生部卫生统计信息中心, 北京协和医院世界卫生组织疾病分类合作中心. 国际疾病分类渊CD-10冤应用指导手册咱暂北京院中国协和医科大学出版社, 2001. 8-12.
- 咱暂 刘海一, 何连德. 疾病诊断和手术操作名称与代码标准应用指南 咨暂北京院人民军医出版社, 1999. 6-9.
- 咱暂 陈子琏, 曾国山, 张惠君. 人体结构学咱暂北京院科学出版社, 2001. 1-4.
- 咱暂 李甘地, 来茂德, 杨光华. 病理学咱暂北京院人民卫生出版社, 2001. 108-11.

责任编辑 隋金星冤