

实时定量 RT-PCR 检测急性早幼粒细胞白血病 PML-RAR α 融合基因方法的建立*

赵 威¹, 邱广斌², 张继红^{1△} (1. 中国医科大学盛京医院血液病治疗中心血液研究室, 辽宁沈阳 110022; 2. 中国人民解放军第二零二医院检验科, 辽宁沈阳 110003)

【摘要】 目的 建立用实时定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测急性早幼粒细胞白血病 (APL) PML-RAR α mRNA 的方法。**方法** 制备目的基因 PML-RAR α 的 RNA 标准品及管家基因 β -actin 的 RNA 标准品。然后将目的基因 PML-RAR α 和管家基因 β -actin 的标准品梯度稀释作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应, 制作标准曲线。利用成功构建的两个标准曲线测定 APL 患者的目的基因 PML-RAR α 与管家基因 β -actin 的相对值, 分析不同状态患者的微小残留病 (MRD) 水平是否有差别, 从而指导临床的治疗。**结果** 用本研究建立的实时定量 RT-PCR 方法可检测出 10~5 μ g NB4 细胞 cDNA 中的 PML-RAR α 融合基因, 其重复性的循环域值 (Ct 值), 管间、批间变异系数 (CV) 分别为 2.2%、4.0%。**结论** 本研究所建立的实时定量 RT-PCR 方法灵敏度高、重复性好。应用本法检测急性早幼粒细胞白血病 PML-RAR α 融合基因表达水平的改变, 有助于监测白血病微小残留病, 评价疗效及判断预后。

【关键词】 急性早幼粒细胞白血病; 实时定量逆转录聚合酶链反应; PML-RAR α 融合基因; 微小残留病
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.14.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)14-1669-03

Methods of testing acute promyelocytic leukemia PML-RAR α fusion gene by real-time quantitative RT-PCR ZHAO Wei¹, QIU Guang-bin², ZHANG Ji-hong^{1△} (1. Department of Hematology Laboratory, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110022, China; 2. Department of Clinical Laboratory, No. 202 Hospital of PLA, Shenyang, Liaoning 110003, China)

【Abstract】 Objective To set up the method of testing acute promyelocytic leukemia (APL) PML-RAR α fusion gene by Real-time Quantitative RT-PCR. **Methods** We prepared RNA standards of the target gene of PML-RAR α and the house-keeping gene of β -actin respectively, and then prepared serial dilutions of PML-RAR α gene and house-keeping gene β -actin followed by real-time fluorescent quantitative PCR reaction, based on which standard curves were plotted. Using these two standard curves, we tested the relative levels of PML-RAR α and β -actin genes and analyzed whether minimal residual disease (MRD) levels from patients at different states have discrepancy. **Results** Using the method of real-time quantitative RT-PCR we set up in this study, we could test PML-RAR α fusion gene from 10~5 μ g cDNA of NB4 cells and the corresponding repetitive Ct values. Coefficients of variation (CV) between tubes and between batches were 2.2% and 4.0% respectively. **Conclusion** The method of real-time quantitative RT-PCR we set up in this study has high sensitivity and good reproducibility. In addition, this method has great significance in monitoring MRD and evaluating efficacy and prognosis by testing APL PML-RAR α fusion gene.

【Key words】 acute promyelocytic leukemia; real-time quantitative RT-PCR; PML-RAR α fusion gene; minimal residual disease

急性早幼粒细胞白血病 (APL) 具有特异性的染色体易位 t(15;17) 易位, 使 17 号染色体上的 RAR α 基因与 15 号染色体上 PML 基因融合, 产生融合基因 PML-RAR α 。应用实时定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术检测 PML-RAR α 融合基因, 实现了从定性到定量的飞跃, 自动化程度高, 因而其应用也越来越广泛。本研究建立这一方法作为 APL 临床诊断, 评估微小残留病 (MRD) 和判断其预后的手段。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清购自 GIBCOBRL 公司, Trizol, MgCl₂、10 × RT Buffer、RNase Free dH₂O、dNTP Mixture、RNase Inhibitor、Oligo dT-Adaptor Primer、Taq DNA 聚合酶、5 × RT Buffer 均购自大连宝生物工程有 限 公 司。

1.2 主要仪器 罗氏 (Roche) 公司 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪; 美国 BioRad 公司 Gel Doc1000 紫外图像分析系统和

配套分析软件及 Gene Amp5700 Sequence Detector 定量 PCR 扩增仪及配套分析系统和配套分析软件; 德国 Eppendorf 公司 5417R 高速冷冻离心机及 PowerPac3000 型电泳仪等。

1.3 标准品的制备

1.3.1 细胞系 人急性早幼粒细胞白血病细胞株 (NB4) 细胞 (引自上海瑞金医院血液研究所) 常规培养。

1.3.2 单个核细胞的分离及总 RNA 提取 取培养的 NB4 细胞 5 × 10⁶ 个, 采用 Trizol 试剂并按试剂操作说明书提取总 RNA, 经紫外分光光度计测定浓度后, -80 °C 保存备用。

1.3.3 引物的设计和合成 PML-RAR α 融合基因形成过程中, RAR α 上的断裂点总是位于第 2 个内含子内, 但是 PML 上的断裂点存在很多变异, 主要集中在 3 个断裂点丛集区 (bcr)。bcr1 在第 6 个内含子内, 形成长型转录本 (L)。断裂点 bcr3 在 PML 第 3 个内含子内, 产生短型转录本 (S); 而 bcr2 断裂点位于第 6 外显子内形成变异型转录本 (V)。这 3 种转录本分别

* 基金项目: 沈阳市科技局科学技术项目资助项目 (F10-218-1-00)。△ 通讯作者, E-mail: zhangjh1@sj-hospital.org。

占 70%(L), 20%(S) 和 10%(V)。本研究参照了国外文献^[1] 设计了 L 型 PML-RAR α 融合基因引物序列, 应用 β -actin 作为内对照, 具体序列如下。

PML-RAR α 融合基因, 上游引物 P6 : 5'-GTCTTCCTGC-CCAACAGC AAC-3'(190bp); 下游引物 R1: 5'-CTCACAG-GC GCTGACCCCATAGT-3'。 β -actin, 上游引物: 5'-AACGGC TCCGGCATGTGCAA-3'(117bp); 下游引物: 5'-CTTCTGAC-CCATGCCACCA-3'。

1.3.4 cDNA 合成及扩增 取 1 μ g 上述总 RNA, 采用 cDNA 合成试剂盒进行逆转录反应, 20 μ L 体系的组成如下: 随机引物(Oligo dT 0.5 μ g/ μ L) 1 μ L, 5 \times buffer 4 μ L, RNA 酶抑制剂 (20 U/ μ L) 1 μ L, 10 mmol/L dNTP Mix 2 μ L, 逆转录酶 (MMULV) 1 μ L。反应条件 37 $^{\circ}$ C 5 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min。

取上述 cDNA 2 μ L 作为模板, 分别以 PML-RAR α 融合基因及管家基因 β -actin 上下游引物为模板进行 PCR 反应。25 μ L 体系包括 10 \times buffer 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 上下游引物均为 1 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 6 min。分别获得目的基因 PML-RAR α 及管家基因 β -actin 的标准品。

用紫外分光光度计测 NB4 细胞的 cDNA 的浓度后, 取 1 μ g 的 cDNA 依次进行 10 倍的梯度稀释, 分装为 1 μ g, 10⁻¹ μ g, 10⁻² μ g, 10⁻³ μ g, 10⁻⁴ μ g, 10⁻⁵ μ g 作为各自的标准品(在 NB4 细胞中 1 μ g 的 cDNA 包含 10⁴ 拷贝的 PML-RAR α 基因)。

1.3.5 标准曲线的构建 将目的基因 PML-RAR α 和管家基因 β -actin 的标准品一系列梯度稀释作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应, 制作标准曲线。将各个标准品的起始拷贝数取对数为横坐标, 其所对应的循环阈值(cycle threshold, Ct 值) 作为纵坐标, 即可做出相应的标准曲线。

2 结 果

2.1 方法的特异性 反应结束后, 仪器自动进行溶解曲线分析, 如图 1。从图中可以看出, 各反应管出现的峰完全重合, 无引物二聚体等非特异行扩增, 保证了方法的特异性。

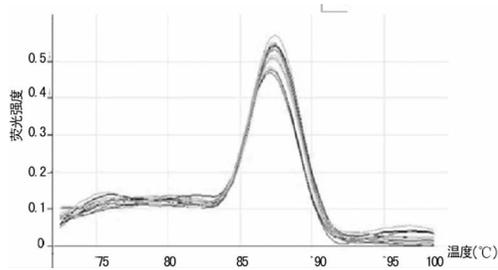


图 1 仪器自动分析该反应的溶解曲线

2.2 方法的灵敏度 对培养的 1 μ g NB4 细胞的 cDNA, 进行 10 倍梯度稀释, 分别用建立的荧光定量 RT-PCR 作检测, 可得到 Ct 值, 其检测 PML-RAR α 融合基因的灵敏度达 1.0⁻⁵ μ g cDNA, 由此制作出标准曲线的相关性, 相关系数为 0.997。如图 2。将各个患者样本的平均 Ct 值, 代入相应的标准曲线, 就可求出 PML-RAR α 基因和 β -actin 的拷贝数。校正的 PML-RAR α 转录水平(Dose N) = (PML-RAR α 的拷贝数/ β -actin 的拷贝数) \times 10⁵^[2]。取扩增后某患者体系进行琼脂糖凝胶电泳, 分离出条带, 然后在紫外核酸检测仪中观察电泳结果, 如图 3。

2.3 方法的重复性 本研究对 10⁴ 基因拷贝数的模板分别做 5 个反应管检测。比较同一次反应不同反应管间的批内变异

及重复 5 次检测比较不同时间的反应结果的批间变异。检测到该浓度同一次反应不同反应管的 Ct 值分别为: 21.5、22.5、21.8、21.2、22.1; 不同时间检测的 Ct 值为: 21.2、21.6、20.3、23.0、22.7。批内变异系数为 2.2%, 批间变异系数为 4.0%。这说明本方法重复性均好。

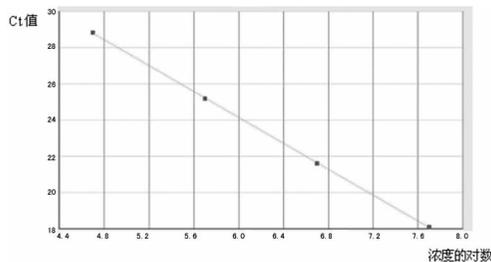
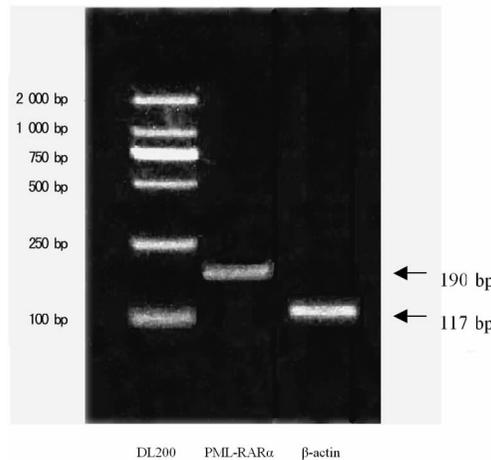


图 2 PML-RAR α 基因标准曲线



注: DL2000, 即用型 DL2000 DNA Marker PML-RAR α , 目的基因 β -actin, 内参基因。

图 3 患者 APL PML-RAR α 融合基因(190 bp)及 β -actin(117 bp) 电泳图谱

3 讨 论

随着白血病治疗方法的进展, 使急性白血病的完全缓解 (CR) 率明显提高, 其生存期也明显延长。但众多的急性白血病常在数年内复发而死亡, 主要原因是在临床和血液学完全缓解后, 体内仍有微量残留白血病细胞 (MRLC), 约 10⁶ ~ 10⁸ 个, 用传统的形态学方法无法检测到, 这些残存的细胞即成为白血病复发的根源, 此称为 MRD。如何早期准确地诊断 MRD, 防治白血病复发, 是当今治疗白血病的重点。本研究的目的是建立急性早幼粒细胞白血病 PML-RAR α 融合基因的检测方法。实时定量 RT-PCR 是在普通 PCR 反应中加入能与 PCR 产物结合的荧光探针或荧光染料, 使之荧光信号随着扩增产物的增加而成比例增长, 仪器实时检测每一个循环结束后的荧光强度, 通过与标准曲线对比得出定量结果。可以直接检测目的基因的起始数量, 从而动态监测融合基因水平^[3]。试验所应用的 SYBR green I 是一种能与双链 DNA 结合的荧光染料, 游离时几乎没有荧光信号。而 PCR 进行过程中, 它能结合到扩增产物双链 DNA 的小沟中, 荧光强度大大增强。实验中产生的非特异性双链 DNA (如引物二聚体) 也会和染料结合产生荧光信号, 其产生的干扰可通过溶解曲线分析得到解决。只要有合适的引物就可实现目的基因的实时荧光定量 PCR (RQ-PCR)^[4]。较之序列特异性荧光探针, 它无需探针设计, 大大简化了实验难度, 且价格便宜, 是一种值得推荐的荧光定量 PCR

技术。国外文献报道,用荧光定量 PCR 方法重复 40 次反应,其 Ct 值的变异系数为 1.6%。本实验管间、批间变异系数分别为 2.2% 和 4.0%,与国外研究结果其相近。说明本方法重复性均好。本研究建立实时定量 RT-PCR 检测急性早幼粒细胞白血病融合基因,同时检测同一标本的融合基因及管家基因,不必考虑 RNA 提取及逆转录过程中的差异,以校正拷贝数(PML-RAR α 的拷贝数/ β -actin的拷贝数) $\times 10^5$ 表示,使用管家基因 β -actin 对结果进行标化,更具科学性。

通过实时定量 RT-PCR 监测 PML-RAR α 转录本水平的变化,可以预测急性早幼粒细胞白血病患者的治疗反应,定量白血病细胞的残余数量和预测复发,这比细胞遗传学检查早数月^[5-6]。总之,实时定量 RT-PCR 是一种快速、准确和高度敏感的实验方法,它不仅能够检测到微小残留病灶的存在,更重要的是,通过动态监测 PML-RAR α 转录本水平及其变化,可以预测急性早幼粒细胞白血病患者的治疗反应,定量白血病细胞的残余数量和预测复发,这比定性 PCR 检测具有更为重要的临床意义。该方法的建立可以对患者的融合基因拷贝数实行绝对定量,从而成为指导个体化治疗、预防复发和提高患者生存率的重要手段。并且,以 PML-RAR α 融合基因的检测方法为基础,进一步建立其他常见白血病融合基因的检测方法,扩大本技术应用的范围。

参考文献

[1] Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N, et al. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-

time RT-PCR[J]. *Leukemia*, 2000, 14(2): 324-328.

[2] Gu BW, Hu J, Xu L, et al. Feasibility and clinical significance of realtime quantitative RT-PCR assay of PML-RAR α fusion transcript in patients with acute promyelocytic leukemia[J]. *Hematol J*, 2001, 2(5): 330-340.

[3] Diverio D, Rossi V, Avvisati G, et al. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptionpolymerase chain reaction analysis of the PML/RAR alpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial [J]. *Blood*, 1998, 92(3): 784-789.

[4] VanderVelden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects[J]. *Leukemia*, 2003, 17(6): 1013-1034.

[5] Merx K, Muller MC, Kreil S, et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cylogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha[J]. *Leukemia*, 2002, 16(9): 1579-1583.

[6] Hochhaus A. Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia patients [J]. *Best Pract Res Clin Hematol*, 2002, 15(1): 159-178.

(收稿日期:2011-03-18)

(上接第 1668 页)

分别为亚胺培南 30.5%, 头孢他啶 20.3%, 环丙沙星 (23.9%)^[5], 低于海南地区。提示铜绿假单胞菌耐药有着明显的区域性,与各地区、各医院临床上用药习惯不同使得铜绿假单胞菌抗生素选择压力不同有关。因此应严格控制第三代头孢菌素、亚胺培南等的使用,特别是不规则的预防性用药,以减少其诱导耐药的产生。有意思的是,本研究中发现,2010 年铜绿假单胞菌耐药率较 2009 年普遍下降,这与医院感染控制科实时监控铜绿假单胞菌感染及耐药情况,及时通报临床医生,从而使临床医生限制该类抗生素使用的适用证,特别限制不规范的预防性用药密切相关。

本研究显示,铜绿假单胞菌对头孢唑林、呋喃妥因、四环素、头孢替坦、氨苄西林等耐药率均高达 95% 以上,对厄他培南天然耐药,临床治疗不应选用。对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦耐药率相对较低,加用酶抑制剂的复方型抗菌药物耐药率更低,提示可能与超广谱 β -内酰胺酶的产生有关。氨基糖苷类抗菌药如庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星耐药率最低,这可能与本院临床一般不单用该药物作为抗感染的一线治疗有关。总体来说,2009~2010 年铜绿假单胞菌耐药率较 2007~2008 年明显升高,且总体耐药水平高,几乎对所有细菌均可耐药,应及时寻求合理的抗菌治疗方案。有研究表明,当亚胺培南与环丙沙星和阿米卡星或者头孢他啶与环丙沙星和阿米卡星联用,对细菌的抑制作用明显^[6]。Heyland 等^[7]认为,对于难治性革兰阴性菌(如假单胞菌、不动杆菌和多重耐药的革兰阴性菌等)引起的感染,早期足量的联合治疗有较好的效果。提示联合治疗作为抗铜绿假单胞菌感染的首选方案,而哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、环丙沙星、亚胺培南等,联合阿米卡星为较优化的组

合治疗方案。

参考文献

[1] 孙景勇,倪语星,汪复,等. 2007 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2009, 9(3): 192-195.

[2] 张祎博,倪语星,孙景勇,等. 2009 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2010, 10(6): 436-440.

[3] 魏树全,赵子文,钟维农,等. 泛耐药铜绿假单胞菌肺炎危险因素病例对照研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(6): 673-676.

[4] Jayakumar S, Appalaraju B. Prevalence of multi and pan drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* with respect to ESBL and MBL in a tertiary care hospital[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2007, 50(4): 922-925.

[5] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2010, 9(5): 325-334.

[6] 魏树全. 泛耐药铜绿假单胞菌体外耐药模型构建及其耐药机制的研究[D]. 广州: 广州医学院, 2009.

[7] Heyland DK, Dodek P, Muscedere J, et al. Randomized trial of combination versus monotherapy for the empiric treatment of suspected ventilator-associated pneumonia [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(3): 737-744.

(收稿日期:2011-04-12)