

多重 RT-PCR 联合毛细管电泳法检测 *BCR-ABL* 融合基因

吕晓楠¹, 叶辉铭^{1,2}, 顾龙¹, 曾骥孟¹

(1. 厦门大学药学院转化医学中心 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学附属中山医院临检中心 福建 厦门 361004)

摘要:目的 建立多重逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)联合毛细管电泳法检测 *BCR-ABL* 融合基因,以期应用于慢性粒细胞白血病(CML)辅助诊断。方法 采用重叠延伸法构建 *BCR-ABL* 融合基因阳性模板,设计并优化检测 *BCR-ABL* 融合基因的多重 RT-PCR 联合毛细管电泳体系,对检测体系进行初步的性能评估。结果 多重 RT-PCR 技术检测 *BCR-ABL* 融合基因(*e1a2*、*e13a2* 和 *e14a2*)的最低检测限在 102~103 拷贝/ μL ; 50 例临床确诊 CML 的患者应用该法检测 *BCR-ABL* 融合基因的阳性率为 86.0%,其中 *e13a2* 型(20.0%) *e14a2* 型(66.0%); 本方法与骨髓细胞培养染色体核型分析相比,阳性符合率为 97.6%,阴性符合率为 75.0%,总符合率为 94.0%,2 种方法具有较高的一致性($Kappa = 0.765, P > 0.05$)。结论 成功建立检测 *BCR-ABL* 融合基因的多重 RT-PCR 联合毛细管电泳方法。该方法操作简单快捷、特异性好、灵敏度高,适合于临床上 CML 的辅助诊断和分子分型。

关键词: *BCR-ABL* 融合基因; 慢性粒细胞白血病; 多重 RT-PCR; 毛细管电泳

Detection of *BCR-ABL* fusion gene by multiplex RT-PCR combining with capillary electrophoresis LÜ Xiaonan¹, YE Huiming^{1,2}, GU Long¹, ZENG Jimeng¹. (1. Translational Medicine Research Center, School of Pharmaceutical Science, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Fujian Xiamen 361004, China)

Abstract: Objective To establish a method for detecting *BCR-ABL* fusion gene by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and to provide a useful tool for chronic myeloid leukemia (CML) auxiliary diagnosis. **Methods** The construction of *BCR-ABL* fusion gene as positive template was made by overlap extension method. The method of multiplex RT-PCR combining with capillary electrophoresis was designed and optimized. Its primary performance was evaluated. **Results** The lower detection limit for *BCR-ABL* fusion gene (*e1a2*, *e13a2* and *e14a2*) by multiplex RT-PCR was 102-103 copies/ μL . The positive rate of this method to detect 50 CML patients was 86.0% (*e13a2*: 20.0% and *e14a2*: 66.0%). Compared with the results of chromosome karyotype analysis, the positive coincidence rate was 97.6%, and the negative coincidence rate was 75.0%. The 2 methods have high consistency ($Kappa = 0.765, P > 0.05$). **Conclusions** The method of multiplex RT-PCR combining with capillary electrophoresis to detect *BCR-ABL* fusion gene is simple and rapid with good specificity and sensitivity and is very suitable for the clinical detection of CML.

Key words: *BCR-ABL* fusion gene; Chronic myeloid leukemia; Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction; Capillary electrophoresis

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是第一个将染色体异常与特定的肿瘤类型联系在一起的恶性血液性疾病,占成人白血病的 15%,在我国年发病率为 0.36/10 万人^[1]。超

过 95% 以上的 CML 患者由于染色质异常产生基因融合(如 *BCR-ABL*),染色体显带分析为 t(9; 22)(q34; q11),即费城染色体(philadelphia chromosome, Ph)^[2]。融合基因编码一种酪氨酸激酶,

注:吕晓楠与叶辉铭对本研究具有同等贡献并列第一作者。

基金项目:福建省自然科学基金计划资助项目(2012J01414);厦门市科技局计划项目资助课题(3502Z20113013)

作者简介:吕晓楠,女,1987 年生,硕士,主要研究方向为分子诊断。

通讯作者:曾骥孟,联系电话:0592-2187226。

诱导多种致癌性的信号通路,这是 CML 发病的主要分子机制之一。因 *BCR* 和 *ABL* 基因断裂点不同,产生多种多样的融合形式,临床上最常见的是 *e1a2*、*e13a2* 和 *e14a2*^[2]。CML 的治疗方案也多是针对 Ph 阳性细胞系或 *BCR-ABL* 蛋白本身进行的,例如利用靶向药物伊马替尼(Imatinib)来抑制 *BCR-ABL* 通路^[3]。因此 *BCR-ABL* 融合基因的检测对于 CML 的分型诊断、分子机制研究以及治疗方案选择、预后判断等都有着重要意义。

目前融合基因的检测方法主要有染色体核型分析、荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)以及逆转录聚合酶链反应(reverse transcription PCR, RT-PCR)等。染色体核型分析虽是临床上常规检测手段,但对样本和技术要求高,检测灵敏度低,尤其对于微小染色体易位难以检测出,故临床上通常还需要分子生物学等手段来进一步验证^[4]。FISH 虽可清晰的辨认各染色体结构异常,但价格昂贵,操作繁琐,假阳性率较高(>10%),且当 Ph 阳性细胞数 <10% 时即不

适用^[5]。相对于前两者,PCR 扩增法对于样本要求不高,且具有检测快速,敏感度高等优点。因此,我们拟采用 RT-PCR 联合毛细管电泳技术一次性检测 *BCR-ABL* 融合基因多种融合形式(如 *e1a2*、*e13a2*、*e14a2*),以期建立一种快速、简单、有效的检测方法,用以 CML 辅助诊断、分型、预后判断以及疗效评价等。

材料和方法

一、对象

血液样本均来源于厦门大学附属中山医院,其中融合基因阳性模板构建样本来自体检中心健康体检者,研究病例来自血液科 2010 年至 2013 年住院的 CML 患者 50 例,男 34 例,女 16 例,年龄 15~85 岁,全部病例经过临床血象、骨髓象等形态学检测初步确诊,且均进行了染色体核型分析,诊断标准参照血液病诊断及疗效标准,具体见表 1^[6-8]。正常对照组为 18 名健康体检者,男 10 名,女 8 名,年龄 18~70 岁。

表 1 CML 的诊断标准

CML	形态学	免疫学	遗传学	分子生物学
技术	组织化学染色等	流式免疫表型诊断等	染色体核型分析	PCR 法等
标准	骨髓粒细胞为主显著增殖,嗜酸和碱粒细胞增多	CD10 ⁺ , CD19 ⁺ , CD13 ⁺ , CD34 ⁺ 等	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL 阳性

二、方法

1. 血液样本 RNA 提取和 cDNA 模板第一链合成 CML 患者及体检者外周抗凝全血 5mL,采集后尽快进行 RNA 抽提,以防时间过长或反复冻融后损坏 RNA 的品质。设备为 MagCoreHF16 全自动核酸抽提仪及其配套全血 RNA 抽提试剂盒(厦门芮宝生医股份公司),操作严格按仪器和试剂盒说明书;并用 TransScript cDNA 第一链合成试剂盒(北京全式金公司)进行反转录后,将 cDNA 模板分装,置于 -20℃ 保存备用。

2. *BCR-ABL* 融合基因阳性模板构建 采用重叠延伸 PCR 法^[9]构建 *BCR-ABL* 的 3 种融合形式,作为阳性对照品。遵循其原理步骤,我们以正常血液 cDNA(无 *BCR-ABL* 融合基因)为模板,采用 TransGen 高保真酶热启动酶 FastPfu(北京全式金公司),首先分别扩增 *ABL* 和 *BCR* 基因,产物进

行 2% 琼脂糖凝胶电泳、对目的片段切胶、用胶回收试剂盒(上海生工)回收,再以 2 种回收的产物为模板(保持使用量均等)在同 1 个 PCR 反应体系里进行融合扩增。每个目标产物设置 2 个平行,1 个阴性对照,阴性对照里不加模板,以检测 PCR 体系中的试剂是否被污染。将回收的 PCR 产物连接到 TransGen pEASY-Blunt 载体,转化大肠杆菌感受态细胞,挑选单克隆进行测序验证。

3. 引物设计 *BCR* 基因以其在 NCBI 中的登录号 NM_004327 上的 mRNA 序列为准,*ABL* 基因则以文献中常见的登录号 X16416 上的 mRNA 序列为准。扩增所需引物(表 2、表 3)的设计均通过软件 Primer Premier v 5.00 进行,并经 BLAST 比对确认其特异性。设计好的引物由上海生工合成,回来后稀释,分装成多管保存在 -20℃,避免反复冻融。

表 2 构建阳性模板的引物设计

融合形式	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度(bp)
e1a2	BCR-P-F1	CAGCCCTACCAGAGCATC	724
	BCR-R1-ABL	TGGCCGCTGAAGGGCTTCTGCGTCTCCATGGAAGG	468
	BCR-F1-ABL	CCTCCATGGAGACGCAGAAGCCCTTCAGCGGCCA	291
	ABL-P-R	GCGTGATGTAGTTGCTTGGGAC	
e13a2	BCR-P-F2	CCGGGAGCAGCAGAAGAAGT	398
	BCR-R2-ABL	TGGCCGCTGAAGGGCTTCTTCCTTATTGATGCTCAGCGG	142
	BCR-F2-ABL	CCGCTGACCATCAATAAGGAAGAAGCCCTTCAGCGGCCA	295
	ABL-P-R	GCGTGATGTAGTTGCTTGGGAC	
e14a2	BCR-P-F2	CCGGGAGCAGCAGAAGAAGT	473
	BCR-R3-ABL1	TGGCCGCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCTTAAATCCAGTGG	217
	BCR-F3-ABL1	CCACTGGATTTAGCAGCAGTTCAAAAAGCCCTTCAGCGGCCA	297
	ABL-P-R	GCGTGATGTAGTTGCTTGGGAC	

注: F 为上游引物 R 为下游引物

表 3 检测融合基因的多重引物设计

质粒	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度(bp)
e1a2	BCR-F1	TTTGAGGATTGCGGAGGC	413
	ABL-R	GGTCCAGCGAGAAGGTTT	
e13a2/e14a2	BCR-F2	GGAGCAGCAGAAGAAGTGTT	290/215
	ABL-R	GGTCCAGCGAGAAGGTTT	

注: F 为上游引物 R 为下游引物

4. 多重 RT-PCR 联合毛细管电泳检测体系的建立与优化 初始反应体系: 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, 2.5 mmol Mg²⁺ 2 μL, 2.5 mmol dNTPs 2 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL, 5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.4 μL, cDNA 模板 5 μL, 加双蒸水, 补足反应总体积为 25 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 1 min; 95 °C 30 s, 66 ~ 61 °C 30 s (每个循环降低 1 °C), 72 °C 20 s, 5 个循环; 95 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 20 s, 25 个循环。影响多重 RT-PCR 反应的因素很多^[10], 如退火温度、酶用量、引物对的浓度等。本研究采用了退火温度 Touchdown 的 PCR 反应程序^[11], 故在此不再进行退火温度的优化, 主要对后两种影响因素进行了条件实验, 在其它参数不变的情况下, 依次改变 1 个参数: (1) 优化酶用量: 从 1.0 ~ 2.5 U, 每梯度相差 0.5 U; (2) 引物浓度: 从 0.08 ~ 0.2 μmol/L, 每浓度梯度相差 0.04 μmol/L。通过考察是否有引物二聚体产生、存在特异引物等选择最佳反应体系。检测体

系采用了毛细管电泳检测 (BIOptic's Qsep100 DNA-CE, 台湾)^[12], 使用的是熔融态成型的二氧化硅毛细管柱, 内径 75 μL, 柱长 150 mm, 缓冲液为 Mops-Tris (pH 值 7.55)。上样体积 0.5 μL, 25 °C 下 4 kV 15 s 电动进样, 8 kV 恒压电泳, 在 590 nm 处检测激光诱导的溴化乙锭的发射波长。

5. 多重 RT-PCR 联合毛细管电泳检测体系的性能评估 (1) 灵敏度分析: 将构建的阳性模板 (e1a2、e13a2 和 e14a2) 质粒均进行 10 倍梯度稀释, 即稀释成 100 ~ 107 拷贝/μL, 8 个浓度梯度, 在优化的 PCR 条件下进行反应, 分析该方法最低检测拷贝。每个浓度梯度作 2 个平行反应, 每次实验均设置 1 个阴性对照 (以灭菌超纯水为模板); (2) 特异性分析: 检测 18 名健康体检者外周血融合基因, 观察此方法的特异性; (3) 模拟分析: 将构建成功的 BCR-ABL 融合模板 (e1a2、e13a2、e14a2, 105 拷贝/μL) 分别与正常人血液

cDNA(50 ng/μL) 进行混合,模拟自建方法检测临床阳性样本的情况。

6. 多重 RT-PCR 体系检测临床样本的 *BCR-ABL* 融合基因 用自建的多重 RT-PCR 结合毛细管电泳技术平行检测 50 例 CML 患者患者。

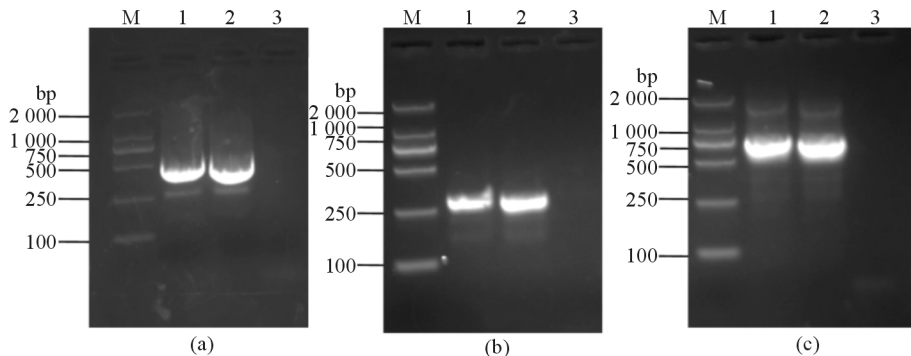
三、统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。采用 McNemar 检验和一致性检验分析,评价建立的多重 RT-PCR 法的阳性率以及与荧光定量 PCR 法结果总符合率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

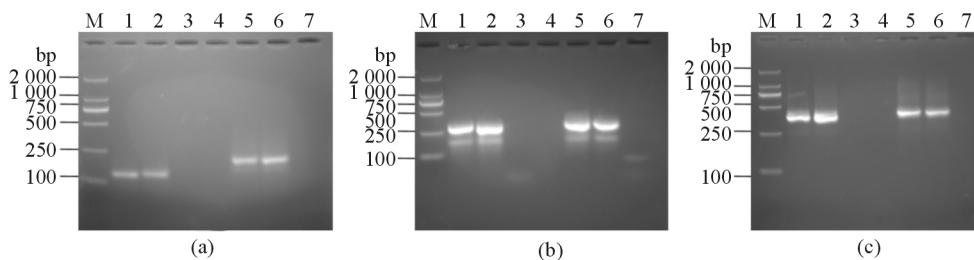
一、成功构建 *BCR-ABL* 融合基因阳性模板

通过重叠延伸法,第 1 次 PCR 分别得到扩增产物 *BCR-1/2/3*(468/142/217 bp) 和 *ABL-1/2/3*(291/295/297 bp),第 2 次融合扩增 PCR 反应得到 *BCR-ABL* 基因的 3 种融合形式,即 *e1a2*(724bp),*e13a2*(398bp),*e14a2*(473bp)。2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 1、2。以超纯水作为阴性对照。



注:(a) *BCR-1*(468 bp);(b) *ABL-1*(291 bp);(c) 由 a 和 b 2 个基因片段融合形成 *e1a2*(724 bp);M 为 Marker(DL2000,Takara),图上方数字表示泳道,每个目的片段做 2 个平行,3 为阴性对照

图 1 融合形式 *e1a2* 模板构建电泳图



注:(a) 扩增的 2 个不同大小的 *BCR-2/3*(142/217 bp);(b) 扩增的 2 个不同大小产物 *ABL-2/3*(295/297 bp);(c) 由 a 和 b 2 个基因片段融合形成 *e13a2*(398 bp) 和 *e14a2*(473 bp);M 为 Marker(DL2000,Takara) 图上方数字表示泳道,每个目的片段做 2 个平行,3、7 为阴性对照

图 2 融合形式 *e13a2* 和 *e14a2* 模板构建电泳图

二、多重 RT-PCR 联合毛细管电泳检测体系的建立与优化

分别设置的 1.0~2.5 U 的酶用量梯度以及 0.08~0.2 μmol/L 的引物浓度梯度结果显示 *BCR-ABL* 融合基因 PCR 体系中最佳酶和引物用量分别为 0.2 μL 和 0.3 μL。因此,建立的多重 RT-PCR 最佳反应体系为:10 PCR 缓冲液 2.5 μL,2.5 mmol Mg²⁺ 2 μL,2.5 mmol dNTPs 2 μL,10 μmol/L 上下游共 3 条引物各 0.3 μL,5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.2 μL,构建的阳性模板 cDNA 5 μL,加双蒸水,补足反应总体积为 25 μL。PCR 扩增产物分别进行毛细管电泳结果与 2% 琼脂糖电泳,电泳结果一致,但毛细管电泳能够准确的计

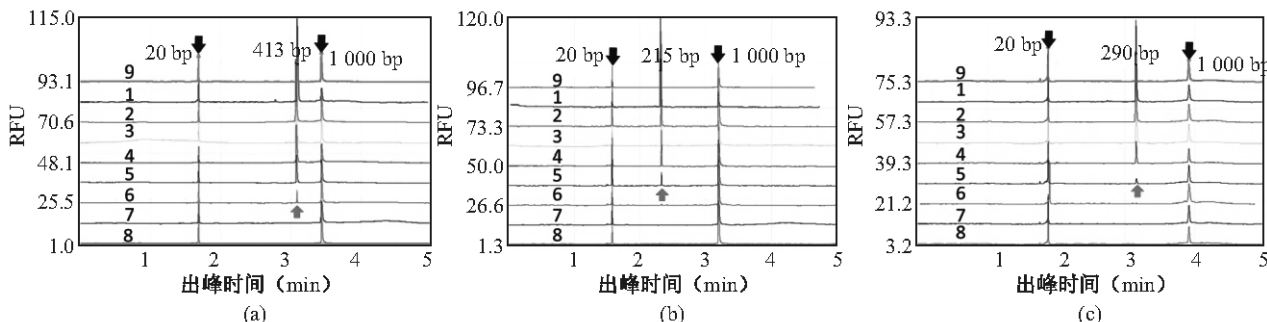
算出产物长度,进样量少,操作自动化,方便临床大批量样本快速、准确、直观的检测。

三、检测性能评价

1. 灵敏度分析 将 *e1a2*、*e13a2* 和 *e14a2* 3 种模板以 10 倍梯度稀释,系列稀释样本检测结果见图 3。*e1a2* 本法的最低检测限为 102 拷贝/μL,*e13a2* 和 *e14a2* 均为 103 拷贝/μL。

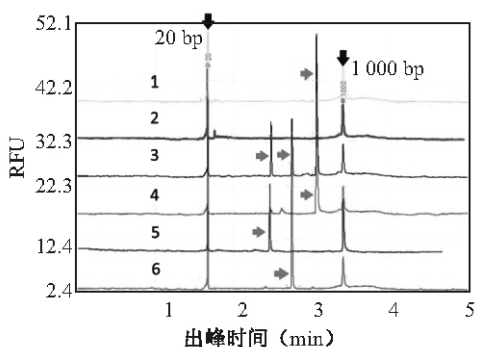
2. 特异性分析 18 名健康体检者外周血标本中均未检测到 *BCR-ABL* 融合基因,表明本具有良好的特异性。

3. 模拟分析 阳性模板与正常人血液混合后的模拟样本检测结果如图 4,3~6 号混合标本电泳出现的条带与预期一致,正常血液无阳性电泳结果。



注: (a)、(b)、(c) 分别表示 e1a2(413 bp)、e13a2(215 bp)、e14a2(290 bp) 3 种模板不同浓度梯度的色谱图; 向下箭头表示 Marker(20 bp、1 000 bp); 向上箭头表示目的片段; 图中数字 1~8 表示 3 种质粒模板量以 107~100 拷贝/ μ L 梯度稀释结果; 9 表示空白对照

图 3 灵敏度分析电泳结果



注: 向下箭头表示 Marker(20 bp、1 000 bp); 向上箭头表示扩增片段; 图中数字 4、5、6 分别表示和正常血液 cDNA 混合下的 e1a2(413bp)、e13a2(215bp)、e14a2(290bp) 模板扩增; 3 表示在正常血液环境下的 3 种融合形式共混合扩增; 2 表示正常血液 cDNA 扩增(阴性对照); 1 表示空白对照

图 4 模拟血液环境中检测到的 e1a2、e13a2、e14a2 毛细管电泳图

四、临床样本检测

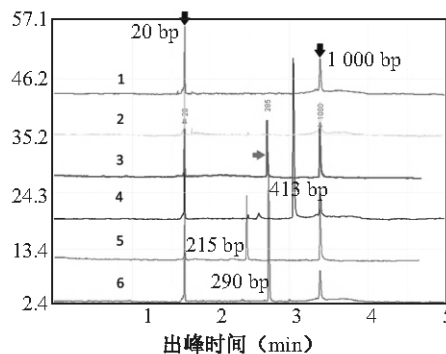
应用自建的多重 RT-PCR 联合毛细管电泳方法对 50 例 CML 的患者外周血进行融合基因检测 *BCR-ABL* 融合基因阳性率为 86.0% (43/50), 其中 e13a2 型 20.0%、e14a2 型 66.0% 阳性率较低与本组病例中包括 6 例复诊者有关。与骨髓细胞培养染色体核型分析比较, 本方法检测 *BCR-ABL* 融合基因的阳性符合率为 97.6% (41/42), 阴性符合率为 75.0% (6/8), 总符合率为 94.0% (47/50) 2 种方法具有较高的一致性 ($Kappa = 0.765, P > 0.05$) (表 4)。

以 1 例 CML 患者为例, 其检测结果见图 5。患者的电泳结果与 e14a2 阳性对照模板处于一个位置, 即表示此 CML 患者存在 *BCR-ABL* 融合基因的 e14a2 融合形式。检测中以正常血液为阴性对照, 确保此方法特异性; 以构建的阳性模板为阳性对照; 以超纯水做模板为空白对照, 以排除试剂污染。

表 4 2 种方法检测 *BCR-ABL* 融合基因结果比较

多重 RT-PCR 法	染色体核型分析		合计
	阳性	阴性	
阳性	41	2	43
阴性	1	6	7
合计	42	8	50

注: 配对四格表资料采用 McNemar 检验 $\chi^2 = 0, P > 0.05, Kappa = 0.765$



注: 向下箭头表示 Marker(20 bp、1 000 bp); 向上箭头表示目的片段; 图中数字 1 表示以超纯水为模板(空白对照); 2 表示正常人血液 cDNA 扩增结果(阴性对照); 3 表示患者血液 cDNA 模板扩增结果; 4、5、6 表示 e1a2(413 bp)、e13a2(215 bp)、e14a2(290 bp) 阳性模板扩增(阳性对照)

图 5 检测患者样本融合基因的色谱图

讨论

目前, 临床实验室进行白血病诊断分型需要联合通过形态学(morphology, M)、免疫学(immunology, I)、细胞遗传学(cytogenetics, C)和分子生物学(molecular biology, M)检查, 即 MICM 分型系统。就 CML 而言, 由于超过 95% 患者具有费城染色体, 故细胞遗传学方法如核型分析即为初始判断 CML 的常规手段。然而, 这个方法样本要求

高,灵敏度低(一般在 5% 以上),无法检测到细微的染色体易位(约占所有患者的 5%)^[13],故临床上还需要辅助手段来进一步验证。

早期检测融合基因的 PCR 法常将多重 PCR 与巢式 PCR 结合,该类方法灵敏度($10^{-4} \sim 10^{-5}$)高,在微小残留性疾病的监测上具有重要意义^[4,14],但是由于进行 2 次 PCR 反应很容易造成污染导致假阳性,且操作相对繁琐、费时。荧光定量 PCR 技术具有可定量,自动化程度较高,灵敏度高等优点,在一些大型医疗应用上较广泛,但目前用于白血病 *BCR-ABL* 融合基因分析的荧光 PCR 法多为单项目检测,检测仪器昂贵和试剂的成本高也限制了其临床应用。本研究的目的在于建立一种快速、简单、成本低且能有效检测 *BCR-ABL* 融合基因的方法,主要用以作为临床早期判断费城染色体的辅助手段。本研究设计的检测体系只需在 1 个 PCR 反应管里,即可同时检测多种 *BCR-ABL* 融合基因亚型,操作更加方便,且极大的降低了试剂成本。此外,本研究采用毛细管电泳作为检测系统,自动化程度高,可一次性快速检测大批量的样本,样本量消耗少(进样量最小为 0.5 μL),能同时生成电泳图以及色谱图,通过分析软件可直接读出样本扩增长度,若结合自动判读程序,可直接判断出具体的 *BCR-ABL* 融合基因亚型。本法可在 3 h 内完成从标本核酸提取到电泳出结果,给出检测报告,完全满足临床检测要求。初步的性能分析显示建立的 PCR 法其检测灵敏度高、特异性好;模拟样本显示其具有多重检测能力,可 1 次性检测出临床上多种融合亚型共存的患者;与骨髓细胞染色体核型分析一致性好。

费城染色体的形成即是位于 9 号染色体上 q34 区的 *ABL* 基因 3 端断裂片段连接到 22 号染色体上 q11 区的 *BCR* 基因 5 端断裂处,融合形成新型基因 *BCR-ABL*。*BCR* 和 *ABL* 基因断裂点并不止一种,故会产生不同的融合形式,最常见的就是 *ABL* 基因内含子 1 和 *BCR* 基因内含子 1、13 或者 14 位置断裂后融合形成的转录子 *e1a2*、*e13a2* 或 *e14a2*。其中 *e1a2* 编码 190-kD 蛋白 P190, *e13a2* 和 *e14a2* 编码 1 种 210-kD 蛋白,即 P210,这 2 种融合形式在 CML 细胞中以 1 种存在或共存(5%)^[2]。这些融合形式编码的融合蛋白都是一种酪氨酸激酶,但因其结构的差异使得它们在临床特征,对药物的反应性以及预后方面并不相似,因此清晰的区分各融合形式对于药物选择以

及疗效评价方面都具有重要意义。染色体核型分析技术虽可辨别出染色体异常现象,但却并不清楚具体异常,PCR 法则可针对不同的融合模板进行引物设计来具体区分。融合模板通常可从细胞或质粒中获得,但一种阳性细胞系只对应一种融合形式,故多种融合模板检测需要足够的细胞系,这无疑增加了实验的成本。因此,本研究采用了重叠 PCR 法来构建融合基因阳性模板(*e1a2*、*e13a2* 和 *e14a2*),其原理见图 6。它的特点就是在 2 条基因连接处的引物设计中添加了能够与对方基因互补配对的碱基序列尾巴,从而通过碱基互补配对原则将两条基因连接起来,且连接处无添加额外碱基。所以构建融合基因模板的引物设计尤为重要,根据这 3 种融合形式(*e1a2*、*e13a2* 和 *e14a2*)具体的融合点,才能获得准确的融合模板。根据本研究的方案,可设计出各种可能融合模式的检测方法,用于 CML 分子发病机制研究。

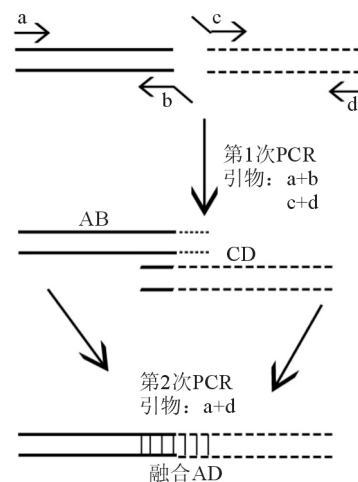


图 6 重叠延伸 PCR 法原理

本法在 CML 诊断分型、药物选择上具有实际应用价值,但在微小残留性疾病的监测上还有待进一步研究。课题组正不断搜集各类、各期 CML 样本,包括典型和非典型的,初/复诊、复发型等。在后续工作中,将以所构建的各融合基因(*e1a2*、*e13a2*、*e14a2*)模板稳定转染到阴性 HL-60 细胞系中,与正常血液混合后采用本方法定性、定量检测每 mL 血液中的异常细胞数,为本方法在微小残留性疾病的分析和检测监测上提供进一步的性能评价。此外,费城染色体虽是 CML 的标志,存在于 95% 以上的 CML 患者中,但在急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL),急性髓性细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者中也有显著的发生率。其中 *e1a2* 主要存在于

70% Ph + ALL 以及少数 CML、AML 细胞中^[15], e13a2 和 e14a2 则主要存在于 95% 以上的 CML 和 25% 以上的 Ph + ALL 细胞中^[16]。因此,本研究建立的多重 RT-PCR 方法同样也适用于 BCR-ABL 阳性的 ALL 以及 AML 患者的早期诊断。总之,本研究建立了一种快速、简便、价廉的多重 RT-PCR 检测 BCR-ABL 融合基因常见亚型的方法,该方法适合临床上 CML 的辅助诊断、分子分型和治疗方案选择。

参 考 文 献

[1] Faggiano A , Mansueto G , Ferolla P , et al. Diagnostic and prognostic implications of the World Health Organization classification of neuroendocrine tumors [J]. J Endocrinol Invest ,2008 ,31(3) : 216-223.

[2] Quintás-Cardama A , Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia [J]. Blood ,2009 ,113(8) : 1619-1630.

[3] An X , Tiwari AK , Sun Y , et al. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review [J]. Leuk Res ,2010 ,34(10) : 1255-1268.

[4] Garcés-Eisele J. Molecular biology strategies to detect residual disease [J]. Hematology ,2012 ,17 (Suppl 1) : S66-S68.

[5] Zhou RL , Mo YX , Lan M , et al. Detection of BCR/ABL fusion gene by fluorescence in situ hybridization and its clinical application [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2011 ,19(5) : 1283-1288.

[6] 陈 哲,金敏威,陈 颖,等. 慢性粒细胞白血病急变期细胞形态学、细胞遗传学、分子生物学及免疫学表型特征分析探讨 [J]. 中国优生与遗传杂志 ,2010 ,30(4) : 33-34.

[7] 胡 敏. 244 例髓细胞白血病 FAB 分型与 WHO

分型关系及其意义 [J]. 检验医学 ,2007 ,22 (2) : 132-135.

[8] 张之南,沈 娣. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社,1998: 219-228.

[9] Heckman KL , Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension [J]. Nat Protoc ,2007 ,2(4) : 924-932.

[10] Sint D , Raso L , Traugott M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success [J]. Methods Ecol Evol ,2012 ,3 (5) : 898-905.

[11] Korbie DJ , Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification [J]. Nat Protoc ,2008 ,3(9) : 1452-1456.

[12] Kerékgyártó M , Kerekes T , Tsai E , et al. Light-emitting diode induced fluorescence (LED-IF) detection design for a pen-shaped cartridge based single capillary electrophoresis system [J]. Electrophoresis ,2012 ,33(17) : 2752-2758.

[13] Vardiman JW , Thiele J , Arber DA , et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes [J]. Blood ,2009 ,114(5) : 937-951.

[14] 孟文彤,贾永前,刘 霆,等. 两种巢式 PCR 检测慢性粒细胞白血病患者骨髓移植后微小残留病的比较[J]. 检验医学 2004 ,19(6) : 497-500.

[15] Cilloni D , Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL [J]. Clin Can Res ,2012 ,18(4) : 930-937.

[16] Burmeister T , Reinhardt R. A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR-ABL fusion transcripts [J]. Leuk Res ,2008 ,32(4) : 579-585.

(收稿日期:2013-07-15)

(本文编辑:范基农)



微 笑
是 永 远 的 介 绍 信