

BCR-ABL 融合基因核酸检测试剂的研发及临床应用*

付朝泓, 李 艳, 童永清, 陈占国 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

摘要:目的 研发同时检测多种 BCR-ABL 融合基因类型的试剂并建立相对应的荧光定量检测方法, 同时进行临床标本检测。方法 检索 GeneBank 等生物信息数据库, 获得 BCR-ABL 基因可能的融合亚型, 对亚型之间的序列进行比对并设计 BCR-ABL 融合基因特异性引物, 从而应用质粒建立新的荧光定量体系。收集武汉大学人民医院 2014 年 1 月 1 日~11 月 31 日住院部确诊为初发白血病患者 30 例, 其中慢性髓细胞白血病 15 例, 急性淋巴细胞白血病 15 例, 另同时收集体检中心健康对照 20 例。应用新建立体系、商品试剂盒及直接测序法进行 BCR-ABL 融合基因的检测。结果 新建荧光定量 PCR 体系准确度验证结果阳性符合率为 100%, 阴性符合率为 100%; 特异性验证结果各干扰项检测均为阴性; 可检测 11 种融合基因类型。对 BCR-ABL 融合基因亚型 e13a2, e14a2 和 e1a2 的检测新方法阳性符合率为 100% (10/10), 阴性符合率为 100% (5/5)。对稀有融合基因亚型 e19a2 检测新方法检测阳性率 100% (2/2), 商品试剂盒检测阳性率为 0% (0/2)。新方法直接测序法相比阳性符合率为 100% (16/16), 阴性符合率为 100% (14/14)。结论 以研发的 BCR-ABL 融合基因检测试剂而建立的荧光定量方法检测 BCR-ABL 融合基因与测序结果符合率为 100%, 是一种快速、可靠的检测方法, 可应用于临床。

关键词: BCR-ABL; 融合基因; 荧光定量; 白血病

中图分类号: Q789 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)06-052-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.015

Development and Clinical Application of A Novel Nucleic Acid Detection Reagent for BCR-ABL Fusion Gene

FU Chao-hong, LI Yan, TONG Yong-qing, CHEN Zhan-guo

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: **Objective** To develop and measure the type of BCR-ABL fusion genes and established the detection method of the fluorescent quantitative polymerase chain reaction and detect the clinical samples by new method. **Methods** The subtype of BCR-ABL fusion gene would be obtained by bio information databases and compared differently among them. The specific primer of BCR-ABL fusion gene were designed and the new system of fluorescent quantitative testing were created using plasmid. Collected 30 leukemia cases of inpatient department of Renmin Hospital of Wuhan University from January to November 2014, including 15 cases of chronic myeloid leukemia and 15 cases of acute lymphoblastic leukemia. Used new method, commercialized kit and direct sequencing to test clinical samples. **Results** The negative result and the positive result of new PCR system were all 100%. The detecting result of disturbance term was negative on side of specificity. The new method could screen 11 subtypes of BCR-ABL fusion gene. The negative result and the positive result of e13a2, e14a2 and e1a2 accorded with commercialized kit were 100% (10/10), 100% (5/5), respectively. The positive result of e19a2 be different with commercialized kit were 100% (2/2), 0% (0/2), respectively. The negative result and the positive result of subtypes of BCR-ABL fusion gene accorded with direct sequencing were 100% (16/16), 100% (14/14), respectively. **Conclusions** The testing result of new method was compared accuracy reaching 100% with the data of direct sequencing. This detecting method is quick, effective and reliable and would be applied clinical.

Keywords: BCR-ABL; fusion gene; fluorescent quantitative; leukemia

BCR-ABL 融合基因基础致病机制是融合基因形成的蛋白引起酪氨酸激酶活性增强而引起的^[1]。在慢性髓细胞白血病(CML)和急性淋巴细胞白血病(ALL)中都能发现 Ph⁺染色体和 BCR-ABL 融合基因, 据现有报道 BCR-ABL 融合基因类型多达 19 种, 现有的检测方法对融合基因的检测大多是单类型检测或检测类型过少^[2], 相对检测时间长、成本高。本研究拟对 BCR-ABL 融合基因

检测试剂进行研发并建立荧光定量检测方法, 增加检测类型, 缩短检测时间, 降低检测成本。

1 材料与方法

1.1 研究对象 研究对象来自武汉大学人民医院 2014 年 1 月 1 日~11 月 31 日住院部确诊为初发白血病患者 30 例, 其中男性 19 例, 女性 11 例, 年龄 8~76 (56±17.9) 岁。所有白血病患者均经骨髓细胞形态学、细胞遗传学和组化染色等确诊为白

* 作者简介: 付朝泓 (1978-), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 分子诊断。

通讯作者: 李 艳, E-mail: yanlitf1120@163.com。

血病。白血病诊断标准参照法国、美国 and 英国急性白血病的分型诊断标准(FBA)分型,其中慢性髓细胞白血病 15 例,急性淋巴细胞白血病 15 例。同时取体检中心 20 例健康人群作为对照。

1.2 试剂与仪器 仪器为 ABI9700 基因扩增仪、ABI3130 测序仪和测序所用配套试剂(美国 Applied Biosystem 公司),RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),逆转录 cDNA 提取试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司),荧光定量仪(美国 Applied Biosystem 公司),全自动凝胶成像及分析系统(英国 SYNGENE 公司)。

1.3 新荧光定量体系的建立

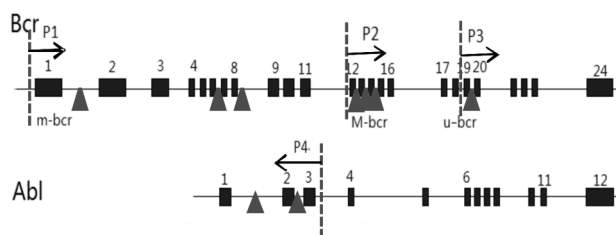
1.3.1 融合基因数据库检索:在 Gene Bank, Gene Cards 及 E. coli Genome Database 数据库中检索并下载 BCR, ABL 及 BCR-ABL 融合基因参考序列,使用 Clustal 对序列进行分析。

1.3.2 引物设计:根据 BCR 和 ABL 基因断裂位点和现有报道的融合类型(见表 1)综合设计,根据引物配对的各种组合在软件和 NCBI 上进行验证和筛选,最终设计可检测 11 种融合基因亚型的引物组合,见图 1,图 2。

表 1 已报道的 BCR-ABL 融合形式

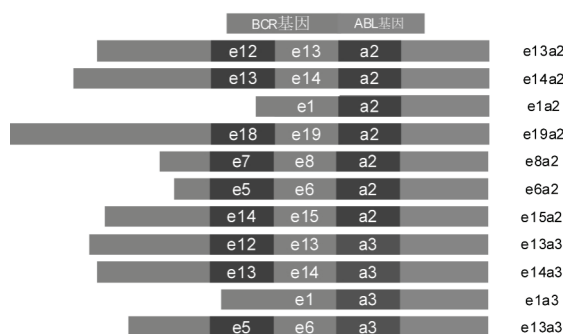
融合形式	BCR 断裂点	ABL 断裂点	GeneBank NO	参考文献
e13a2	e13 和 e14 之间	a2 和 a3 之间	131467.1	[3]
e14a2	e14 和 e15 之间	a2 和 a3 之间	AJ131466.1	[4]
e1a2	e1 和 e2 之间	a2 和 a3 之间	AF113911.1	[3]
e19a2	e19 和 e20 之间	a2 和 a3 之间	AM491363.1	[4]
e18a2	e18 和 e19 之间	a2 和 a3 之间	EU394716.1	[5]
e8a2	e8 和 e9 之间	a2 和 a3 之间	AB069693.1	[6]
e6a2	e6 和 e7 之间	a2 和 a3 之间	AM491362.1	[4]
e15a2	e15 和 e16 之间	a2 和 a3 之间	AF321981.1	[7]
e13a3	e13 和 e14 之间	a3 和 a4 之间	AM491359.1	[4]
e14a3	e14 和 e15 之间	a3 和 a4 之间	AM491360.1	[4]
e1a3	e1 和 e2 之间	a3 和 a4 之间	S72479.1	[8]
e6a3	e6 和 e7 之间	a3 和 a4 之间	无	[9]
e18a3	e18 和 e19 之间	a3 和 a4 之间	AF487522.1	Unpublished
e14a4	e14 和 e15 之间	a4 和 a5 之间	DQ898315.1	[10]
e13a4	e13 和 e14 之间	a4 和 a5 之间	DQ898314.1	[10]
e1a4	e1 和 e2 之间	a4 和 a5 之间	DQ898313.1	[10]
e14a5	e14 和 e15 之间	a5 和 a6 之间	DQ912590.1	[10]
e13a5	e13 和 e14 之间	a5 和 a6 之间	DQ912589.1	[10]
e1a5	e1 和 e2 之间	a5 和 a6 之间	DQ912588.1	[10]

1.3.3 核酸的提取:将采集的患者的 EDTA 抗凝骨髓血标本用 TRIZOL 法提取 RNA 后,用 RNA 逆转录试剂合成 cDNA,操作过程参照试剂盒使用说明书,然后-80℃保存备用。所构建的质粒用质粒提取试剂盒提取 DNA,超微量核酸分析仪测定 DNA 含量,然后-80℃保存备用。



P1, P2, P3 为正向引物; P4 为反向引物; ▲ 为主要断裂位点。

图 1 融合基因引物设计方案



e 代表 BCR 基因外显子简称; a 代表 ABL 基因外显子简称。

图 2 根据引物方案可以检测的融合基因的形式

1.3.4 质粒的构建:用 PGM-T 载体和 ABL, e13a2, e14a2, e19a2, e1a2 的 DNA 片段做连接反应后,导入到 DH5a 感受态大肠埃希菌中,通过蓝白斑筛选挑选出阳性质粒,再通过测序验证后,-80℃保存备用,目的片段载体的导入见图 3。

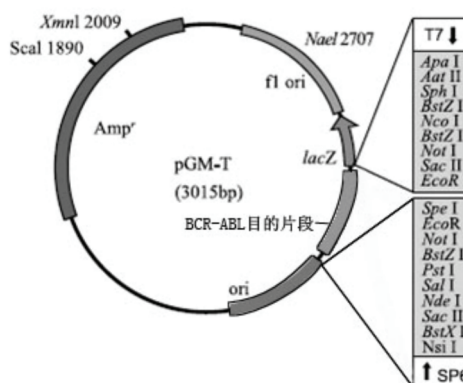


图 3 BCR-ABL 目的片段载体导入图

1.3.5 融合基因的测序:采用 MBI Fermentas 2 × PCR mix 反应液进行 PCR 扩增融合基因。PCR 扩增条件:94℃ 3 min; 94℃ 20 s, 57℃ 30 s, 72℃ 10 s, 共 35 个循环;最后 72℃ 10 min。PCR 结束后,将 PCR 产物进行 2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中切下阳性条带后,用胶回收试剂盒回收 DNA,经过测序反应和纯化后在 ABI3130 测序仪上进行测序,在 NCBI 网站上 BLAST 比对测序结果,分析融合基因的类型。

1.3.6 融合基因的荧光定量检测:用 TaKaRa 的试剂在荧光定量仪上进行检测,两步法的条件:94℃ 10 min, 94℃ 30 s, 62℃ 45 s, 共 45 个循环,

62℃收集荧光信号。根据 CT 值来分析检测结果。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计数资料比较采用 McNemar 卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

试剂盒	可检测 BCR-ABL 融合基因亚型	试剂厂商
白血病相关融合基因检测试剂盒(荧光 RT-PCR 法)	e13a2, e14a2, e1a2	中国上海源奇生物科技有限公司
Leukemia-FG8 试剂盒	e13a2, e14a2, e1a2	中国北京思尔成生物技术有限公司
检测白血病 BCR/ABL 融合基因相对表达量试剂盒	e13a2, e14a2	中国武汉艾迪康医学检验所有限公司
ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit	e1a2	德国 QIAGEN 公司

2.2 新荧光定量体系调整结果 对荧光定量 PCR 体系中的温度及反应步骤进行探索, 以找到具有特异性的最合适的反应体系, 温度梯度结果表明 62℃ 后 F2R 的非特异性条带消失, 62℃ 作为共用的荧光定量退火温度, 见图 4。通过对体系中各反应液浓度的调整表明最合适镁离子终浓度为 4 mmol/L, 最合适探针与引物终浓度比例为 1 : 2,

2.1 常用试剂盒可检测 BCR-ABL 融合基因亚型 见表 2。常用荧光检测试剂盒可检测 BCR-ABL 融合基因类型多为 e13a2, e14a2, e1a2 或是单基因亚型检测。

最合适引物终浓度为 0.2 μmol/L, 62℃ 为二步法的最合适温度, 见图 5。

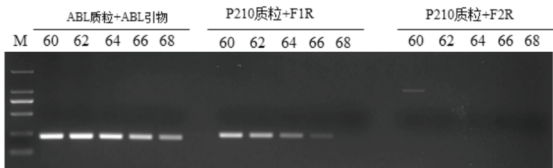


图 4 温度调整结果图

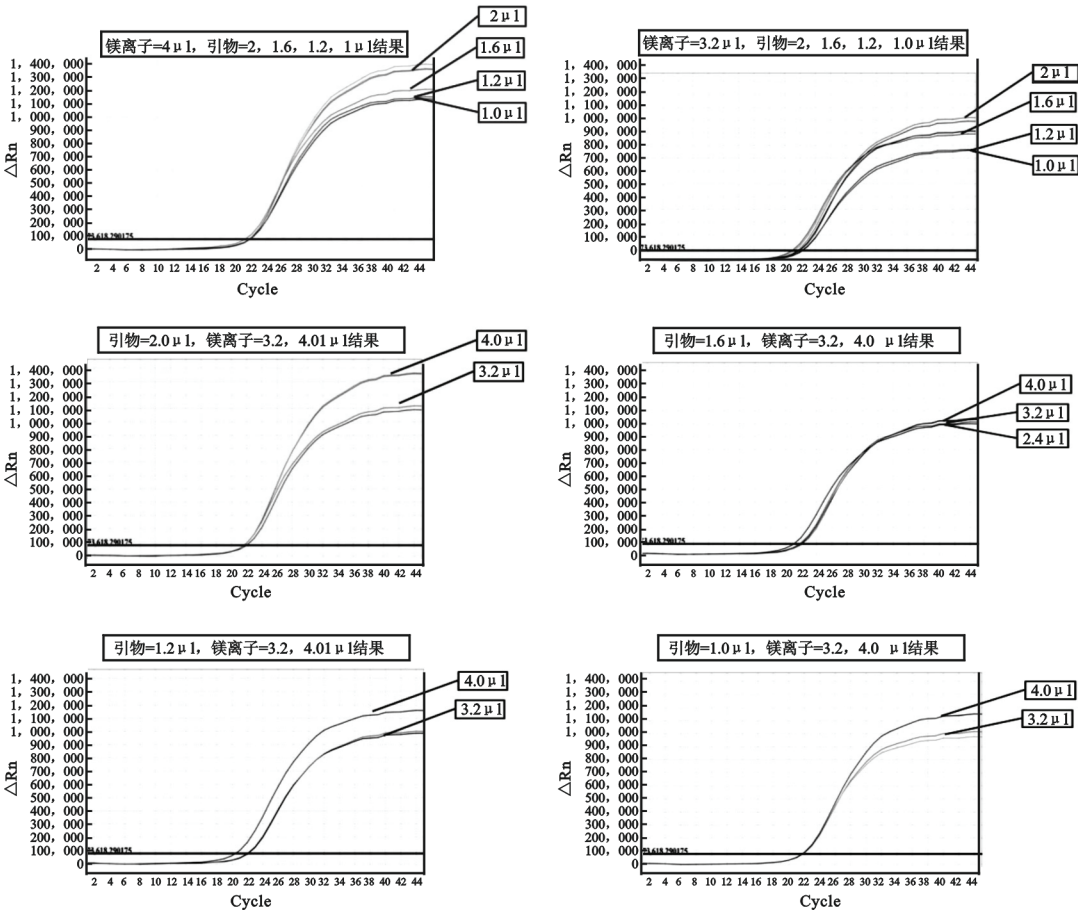


图 5 荧光定量体系中各反应液终浓度调整图

2.3 应用新荧光定量体系对临床标本进行检测结果 20 例健康对照没有检测出 BCR-ABL 融合基因, BCR-ABL 融合基因荧光定量 PCR 方法具有很好的特异性。慢性粒细胞白血病 BCR-ABL 融合基因检出率为 100% (15/15), 急性淋巴细胞白血

病检出率为 6.7% (1/15)。16 例 BCR-ABL 融合基因阳性病例中 e13a2 融合形式 2 例, e14a2 融合形式 13 例, e1a2 融合形式 1 例, e19a2 融合形式 0 例。

2.4 荧光定量 PCR 与测序法检测敏感度比较

与测序法相比荧光定量 PCR 融合基因检出阳性符合率为 100% (16/16), 阴性符合率为 100% (14/14), 总符合率为 100% (30/30), 结果具有一致性, 见表 3。

表 3 两种方法检测临床标本 BCR-ABL 融合基因结果

荧光定量法	直接测序法		合计
	+	-	
+	16	0	16
-	0	14	14
合计	16	14	30

注: 配对四格表资料采用 McNemar 检验, $P>0.05$ 。

2.5 新方法和源奇公司试剂盒检测样本结果比见表 4。新方法和源奇公司白血病相关融合基因检测试剂盒(荧光 RT-PCR 法)同时检测一批样本, 结果对 e13a2, e14a2 和 e1a2 类型的检测阳性符合率为 100%, 对 e19a2 类型的检测源奇公司试剂盒检测为阴性。

表 4 新方法和源奇公司试剂盒检测样本结果比 (n)

方 法	标本类型				阴性样本 (n=5)
	e13a2 (n=3)	e14a2 (n=5)	e1a2 (n=2)	e19a2 (n=2)	
新方法检测阳性	3	5	2	2	0
源奇试剂盒检测阳性	3	5	2	0	0

3 讨论 近年来, 在分子水平的各个层次都有 BCR-ABL 融合基因检测方法, 包括检测金标准 DNA 直接测序法、基因组 DNA 水平 Southern Blot, RNA 水平逆转录聚合酶链式反应法、染色体水平荧光原位杂交技术、蛋白水平 Western Blot 等。在 PCR 技术平台基础上发展了实时荧光 PCR、巢式 PCR、巢式荧光实时 PCR 等高灵敏度技术。基于 PCR 技术平台为基础的荧光实时定量 PCR 借助荧光信号来检测 PCR 产物, 通过荧光染料或荧光标记的特异性探针, 对 PCR 产物进行标记跟踪, 利用荧光信号来实时检测整个 PCR 进程, 通过标准曲线对模板进行定量分析, 具有较高的敏感度^[11]。

在现有常用的 BCR-ABL 融合基因检测试剂盒中对融合基因的检测多为 e13a2, e14a2 和 e1a2 三种亚型, 或为单项检测, 而现有已报道的 BCR-ABL 融合类型至少有 19 种。本研究利用荧光实时定量 PCR 原理, 建立新的 BCR-ABL PCR 体系, 针对不同的融合形式设计特异性的引物, 在同一个反应体系中可检测出 11 种 BCR-ABL 融合基因亚型。在本研究新建方法中采用相同 PCR 体系进行

标准曲线的绘制和内参样品测定, 质粒标准品采用 3 复孔均值绘制标准曲线, 避免体系和加样的不同而产生的影响, 该方法重复性好, 灵敏度高, 有很好的直线相关性。与同类型商品试剂盒进行比对检测结果表明, 对已知 BCR-ABL 融合基因亚型的检测中结果具有一致性, 对不常见融合基因亚型检测中商品试剂盒检测结果为阴性, 而本研究可检测出阳性结果, 具有明显优势。

本研究通过新建立的 BCR-ABL 融合基因荧光定量 PCR 体系对 15 例临床慢性粒细胞白血病患者、15 例临床急性淋巴细胞白血病患者骨髓标本进行检测, 同时进行相对应的测序检测。结果表明本方法检测 BCR-ABL 融合基因亚型符合率为 100%, 两种方法具有较高的一致性。两种方法对 BCR-ABL 融合基因检测的敏感度差异无统计学意义 ($P>0.05$), 与相关报道有所不同^[12], 可能的原因为初发 BCR-ABL 融合基因阳性白血病患者骨髓中 BCR-ABL 融合基因浓度较高, 对荧光定量法和测序法检出率都高, 另外样本例数过少也是敏感性没有差异的原因之一。

总之, 本研究通过对特异性引物的设计, 应用多重 PCR 荧光定量的形式, 针对 BCR-ABL 融合基因进行检测, 增加了检测形式, 缩短了检测时间, 降低了检测费用, 可应用于临床。另一方面, 本研究中临床标本例数过少, 没有其它稀有融合形式临床标本, 将加大临床标本的收集, 完善检测体系, 更好地应用于临床。

参考文献:

- [1] 谷红丽, 王 进, 秦正红, 等. 慢性粒细胞白血病 BCR-ABL 融合类型的研究及其临床意义[J]. 苏州大学学报(医学版), 2012, 32(1): 84-88.
Gu HL, Wang J, Qin ZH, et al. Types of BCR-ABL fusion gene in chronic myeloid leukemia and its clinical significance [J]. Suzhou University Journal of Medical Science, 2012, 32(1): 84-88.
- [2] 赵晶晶, 王 颖, 张文伟, 等. 使用 Taqman 技术监测慢性粒细胞白血病患者微小残留病灶[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(4): 239-244.
Zhao JJ, Wang Y, Zhang WW, et al. Detection of minimal residual in chronic myelocytic leukemia (CML) patients by Taqman technique[J]. J Mol Diagn Ther, 2014, 6(4): 239-244.
- [3] Burmeister T, Maurer J, Aivado M, et al. Quality assurance in RT-PCR-based BCR/ABL diagnostics-results of an interlaboratory test and a standardization approach[J]. Leukemia, 2000, 14(10): 1850-1856.
- [4] Burmeister T, Reinhardt R. A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR-ABL fusion transcripts[J].

(下转 59 页)

(上接 55 页)Leuk Res,2008,32(4):579-585.

- [5] 秦亚涛,刘艳荣,李金兰,等. 两例 ph 染色体阳性慢性粒细胞白血病患者具有少见型 bcr/abl 融合基因[J]. 中华血液学杂志,2004,25(7):409-412.
Qin YZ, Liu YR, Li JL, et al. Two ph chromosome positive chronic myelogenous leukemia patients with rare bcr/abl fusion gene[J]. Chin J Hematol,2004,25(7):409-412.
- [6] Sugimoto T, Ijima K, Hisatomi H, et al. Second case of CML with aberrant BCR-ABL fusion transcript (e8/a2) with insertion of an inverted ABL intron 1b sequence[J]. Am J Hematol,2004,77(2):164-166.
- [7] Moreno MP, Cortinas MM, Bonomi R, et al. A novel BCR-ABL fusion transcript (e15a2) in 2 patients with atypical chronic myeloproliferative syndrome [J]. Blood,2001,97(11):3668-3669.
- [8] Iwata S, Mizutani S, Nakazawa S, et al. Heterogeneity of the breakpoint in the ABL gene in cases with BCR/ABL transcript lacking ABL exon a2[J]. Leukemia, 1994,8(10):1696-1702.
- [9] Link-Lenczowska D, Sacha T, Zawada M, et al. Atypical BCR-ABL transcripts in patients with chronic my-

eloid leukemia--the scheme for the diagnosis and monitoring of minimal residual disease[J]. Przegl Lek, 2014,71(5):258-262.

- [10] Volpe G, Cignetti A, Panuzzo C, et al. Alternative BCR/ABL splice variants in Philadelphia chromosome-positive leukemias result in novel tumor-specific fusion proteins that may represent potential targets for immunotherapy approaches[J]. Cancer Res,2007,67(11):5300-5307.
- [11] 刘青. 荧光定量分型 PCR 法与直接测序法检测 HBV-DNA 水平的应用价值比较[J]. 中外医疗, 2014(30):34-35.
Liu Q. Comparison of the application value of real-time genotyping and quantitative PCR with that of direct sequencing for HBV-DNA detection[J]. China & Foreign Medical Treatment,2014(30):34-35.
- [12] Stankov K, Mihajlovic D, Stanimirov B, et al. Quantitative real time-polymerase chain reaction method in Bcr-Abl translocation diagnostics [J]. J BUON, 2010,15(2):318-322.

收稿日期:2015-03-11

修回日期:2015-04-31