

急性白血病 *MLL* 融合基因新检测方法的建立和应用

赵晓明, 王航¹, 李志鹏², 鹿全意^{1*}, 李庆阁^{2*}

厦门大学药学院, 福建厦门, 361005; ¹厦门大学附属中山医院血液科, 福建厦门, 361004; ²厦门大学生命科学学院, 福建厦门, 361005

摘要 本研究旨在建立一种快速检测急性白血病中常见 *MLL* 融合基因的方法。针对 10 种最常见的 *MLL* 融合基因, 首先通过检索文献及数据库, 确定已报道的所有融合形式并据此设计引物和探针。其次, 以构建的 16 个阳性质粒和阴性细胞系建立和优化多重实时 PCR 检测体系。最后, 利用所收集的 54 份白血病标本对该体系进行临床评估, 并对检出的阳性标本进行测序验证。结果: 该体系可对所有阳性质粒进行有效检测, 且灵敏度均可达 10 个拷贝。在 54 份标本中, 检出 *MLL-AF4*、*MLL-AF9*、*MLL-AF10*、*MLL-ELL* 4 种类型的融合基因, 对阳性标本进行测序, 测序结果与检测结果一致。结论: 本研究建立了一种筛查 *MLL* 融合基因的多重实时 PCR 方法, 能够对发生率约占 *MLL* 融合类型 90% 的 10 种融合基因进行检测。该体系具有快速、灵敏、特异、可靠的优点, 将有助于临床上 *MLL* 融合基因阳性患者的诊断和管理。

关键词 实时 PCR; 白血病; *MLL* 融合基因

中图分类号 R733.71

文献标识码 A

Establishment and Application of A Novel Method for Detecting *MLL* Fusion Genes of Acute Leukemia

ZHAO Xiao-Ming, WANG Hang¹, LI Zhi-Peng², LU Quan-Yi^{1*}, LI Qing-Ge^{2*}

School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China; ¹Department of Hematology, Xiamen University Zhongshan Hospital, Xiamen 361004, Fujian Province, China; ²School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

* Co-corresponding Authors: LI Qing-Ge, Professor. Tel: (0592) 2187363. E-mail: qgli@xmu.edu.cn; LU Quan-Yi, Senior Physician, Professor. Tel: (0592) 2292032. E-mail: luquanyi@xmu.edu.cn

Abstract This study was aimed to establish an efficient method to detect 10 common *MLL* fusion genes in patients with acute leukemia. Firstly, the relevant references and databases were searched to thoroughly investigate all fusion breakpoints; the primers and probes were designed according to nearly all the involved fusion types of gene. Then the multiplex real-time PCR system was established and optimized by using the established 16 positive plasmids and negative cell lines. Finally, the detection system was clinically evaluated by means of collected 54 samples of leukemia. The results indicated that the established detection system could efficiently detect all positive plasmids with sensitivity to 10 copies. Four kinds of fusion gene types such as *MLL-AF4*, *MLL-AF9*, *MLL-AF10*, *MLL-ELL* could be detected in 54 samples, the sequencing of positive samples showed consistency of sequencing results with detection results. It is concluded that a novel multiplex real-time PCR detection method is established which can detect 10 common *MLL* fusion genes covering about 90% of the cases harboring *MLL* fusions. This method is fast, sensitive, specific and reliable, and should be an useful clinical tool for identification and management of leukemia patients with *MLL* fusions.

Key words real-time PCR; leukemia; *MLL* fusion gene

J Exp Hematol 2012; 20(4): 852-856

MLL (mixed-lineage leukemia or myeloid-lymphoid leukemia) 基因, 又称 *HRX*、*HTRX1*、*ALL-1* 或 *TRX1* 基因, 位于 11 号染色体长臂 2 区 3 带 (11q23), 最早由 Ziemin-Van Der Poel 等^[1] 在 1991 年克隆。*MLL* 基因是造血过程调控的一个关键基因, 其异常与白血病的发病密切相关。根据 Meyer 等^[2] 所作的统计, *MLL* 基因重排至少有 104 种, 而已鉴定出的 *MLL* 融合基因高达 64 种。伴有 *MLL*

融合基因的白血病大多恶性程度高, 对化疗不敏感, 缓解率低。因此, 对急性白血病进行 *MLL* 融合基因的检测对于白血病患者的治疗方案选择、残留病灶检测和预后判断具有重要意义。

基金项目: 厦门大学医学院博士点基金项目基金资助

* 共同通讯作者: 李庆阁, 教授。电话: (0592) 2187363。E-mail: qgli@xmu.edu.cn; 鹿全意, 教授、主任医师。电话: (0592) - 2292032。

E-mail: luquanyi@xmu.edu.cn

2012-02-06 收稿; 2012-03-12 接受

目前,检测 MLL 融合基因的方法有荧光原位杂交^[4-6]、RT-PCR(逆转录-PCR)^[7]、实时荧光定量 PCR^[8]等。但是这些方法均存在一定的不足,如操作繁琐、耗时,需要对 PCR 产物进行后处理易造成模板的污染,检测的 MLL 融合基因数量较少等等。本研究探讨一种基于实时荧光 PCR 的方法,能够同时筛查发生频率较高的 10 种 MLL 融合基因,而且操作简便,结果判读简便,可应用于急性白血病的疗效评价、疾病检测和复发风险的判断。

材料和方法

病例和细胞系

2008 年 7 月至 2010 年 1 月,在厦门大学附属中山医院共收集 54 份急性白血病患者的骨髓或外周血标本。全部病例经骨髓形态学及免疫分型分析,符合白血病的诊断标准,并采用标准 G 显带方法进行核型分析,其中急性髓系白血病(AML)41 例,分别为 2 例 M1,18 例 M2,7 例 M3,2 例 M4,12 例 M5;急性淋巴细胞白血病(ALL)13 例。阴性对照包括正常健康人外周血标本和 HL-60 细胞系(购自美国 ATCC)。

RNA 提取和逆转录

RNA 提取 采用 RNAPrep pure Blood Kit(北京天根生化科技有限公司产品)提取患者标本或阴性对照的总 RNA,用 ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer(Nanodrop Technologies, USA)测量 $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$ 据此判断总 RNA 的浓度和质量。

逆转录 以总 RNA(1 μg)为模板,采用随机引物(Toyobo,日本)和 MMLV 逆转录酶(上海生工生物工程技术服务有限公司)进行逆转录,将所得到的 cDNA(20 μl)用 ddH₂O(80 μl)进行稀释(相当于 10 ng/ μl RNA),冻存于 -20℃ 备用。

靶基因的选择

根据 Meyer 等的最新统计^[2],最常见的 MLL 融合基因有: MLL-AF4、MLL-AF9、MLL-ENL、MLL-AF10、MLL-AF6、MLL-ELL、MLL-AF1P、MLL-AF17、MLL-SEPT6、MLL-AF1Q。本研究选择以上 10 种融合基因作为检测对象,大约可覆盖 MLL 融合基因阳性病例的 90%。另外,采用 GUSB 基因(Homo sapiens glucuronidase, beta)作为内控基因,用于指示检测体系的 PCR 扩增成功与否。

引物及探针设计

针对 10 种 MLL 融合基因,首先充分检索相关文献

及数据库,确定已报道的断裂点的位置,并基于此确定了检测引物和检测探针的位置(图 1)。针对 GUSB 基因设计的引物扩增区域跨越了 1 个较大的内含子,可避免对 RNA 模板中少量残留 DNA 进行扩增(图 1)。

探针采用双链置换探针^[9,10],每条探针包括正链和负链,正链 5'端标记荧光基团(如 HEX,ROX, FAM 或 CY5)且 3'端修饰 PO₄ 或者 NH₂,负链 3'端标记淬灭基团(如 Dabycl)。使用时正链和负链以 1:1.5 比例(摩尔比)掺杂,以正链浓度作为探针的浓度。所有引物探针均利用 Primer Premier V 5.00 设计,并委托上海生工生物工程有限公司合成。

阳性质粒的构建

以 HL-60 cDNA 为模板,利用重叠延伸法^[11,12]获得融合基因的片段,产物经电泳回收后,连接到 pMD18-T 载体(大连宝生物工程有限公司)转化大肠杆菌(DH5 α)感受态细胞,挑选菌液 PCR 为阳性的单克隆进行测序验证。对于序列正确的单克隆,在扩大培养后采用质粒提取试剂盒(Omega 公司, USA)获取阳性质粒。共构建了 16 个质粒,包括: MLL-AF4 (ex11-ex4)、MLL-AF9 (ex11-ex4)、MLL-AF9 (ex11-ex5)、MLL-ENL (ex11-ex2)、MLL-ENL (ex11-ex6)、MLL-ENL (ex11-ex7)、MLL-AF6 (ex11-ex2)、MLL-AF10 (ex11-ex6)、MLL-AF10 (ex11-ex15)、MLL-ELL (ex11-ex2)、MLL-SEPT6 (ex11-ex2)、MLL-AF17 (ex11-ex7)、MLL-AF17 (ex11-ex11)、MLL-AF1P (ex11-ex2)、MLL-AF1P (ex11-ex12)、MLL-AF1Q (ex11-ex2)。

实时 PCR 反应

检测体系包括 3 个实时 PCR 反应,每个反应体系包括 1 \times SSP 缓冲液(16 mmol/L (NH₄)₂SO₄、67 mmol/L Tris-HCl、0.01% Tween 20 (W/V), pH 8.8) 4 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTPs、0.08 $\mu\text{mol/L}$ 各加尾引物、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 通用引物、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 各融合基因探针、0.04 $\mu\text{mol/L}$ GUSB 基因探针、1 U TaqHS(大连宝生物工程有限公司产品),质粒或 cDNA(10 ng/ μl) 5 μl ,用 ddH₂O 补足至 25 μl 。

实时 PCR 反应引入 touchdown^[13] 程序以提高特异性,在 CFX96 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司产品)上按以下条件进行 PCR: 95℃ 3 min; 95℃ 20 s, 65℃ 1 min (每经 1 个循环降低 1℃), 72℃ 1 min, 共 10 循环; 95℃ 20 s, 56℃ 20 s (采集 FAM/HEX/ROX/CY5 荧光), 72℃ 1 min, 共 40 个

循环。

结 果

检测体系的设计

将 10 种 *MLL* 融合基因分配到 3 个实时 PCR 反应中,并在每个反应中加入 1 个内控基因(*GUSB*) ,如图 1 所示。反应 1 含有 *MLL-AF4*、*MLL-AF6*、*MLL-AF9* 和 *GUSB* 内控;反应 2 含有 *MLL-ELL*、*MLL-AF10*、*MLL-ENL* 和 *GUSB* 内控;反应 3 含有 *MLL-*

SEPT6、*MLL-AF17*、*MLL-AF1Q*、*MLL-AF1P* 和 *GUSB* 内控。

反应 1 和反应 2 的 6 种融合基因发生频率最高,通过 1 轮 PCR 即可确定融合基因的类型。以 *MLL-AF4* 为例,其检测探针有 *MLL* 基因上的 HEX 标记探针和 *AF4* 基因上的 FAM 标记探针(图 1),因此相应阳性标本将在反应 1 中显示为 HEX、FAM 和 CY5 共 3 个信号,其中 CY5 信号为内控基因的信号。

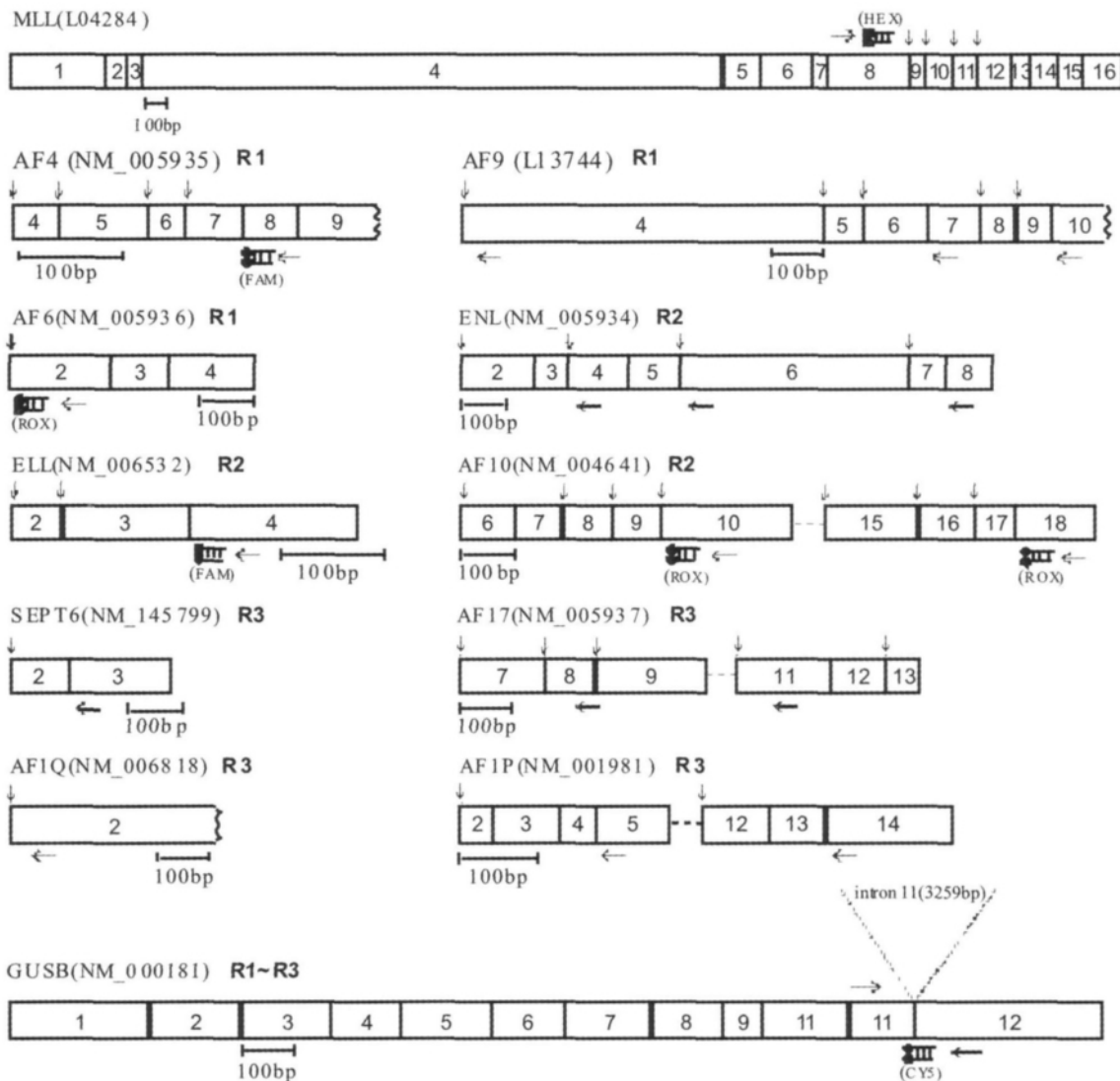


Figure 1. Schematic diagram of multiplex qPCR system. Vertical arrows indicate the positions of breakpoints for the 10 *MLL* fusion genes, while horizontal arrows indicate the positions of primers. The displacing probes were fluorescence labeled with FAM, HEX, ROX and CY5, respectively. R1 - R3 indicate the reaction numbers.

反应 3 的 4 种融合基因发生频率相对较低,因此只在 *MLL* 基因上设计 HEX 探针,而在 *MLL* 伙伴基因上未设计探针。根据这种设计,这 4 种融合基因的阳性标本将均在反应 3 显示为 HEX 和 CY5 两个信号,而具体基因类型还需要第 2 轮 PCR 来确认。在第二轮 PCR 中,采用 4 个单重 PCR 反应分别扩增这 4 种融合基因,然后根据荧光信号出现的反应管即可判断具体的基因类型。

根据以上设计,可以确定出临床标本检测的判断标准,即如何根据荧光信号来推测融合基因的存在与否及其类型,具体如附表所示。

检测体系的优化

首先,以阳性质粒(10^5 拷贝)为模板,通过单重 PCR 确认所有引物和探针的可用性;其次,将单重 PCR 组合成 3 个多重 PCR 反应。反应 1 共有 8 条加尾引物、1 条通用引物和 4 条探针;反应 2 共有 8 条加尾引物、1 条通用引物和 5 条探针;反应 3 共有 9 条加尾引物、1 条通用引物和 2 条探针(图 1)。

多重 PCR 反应条件的优化包括特异性优化和灵敏度优化。本研究主要对引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、Taq 酶用量、反应程序进行优化。在最终确定的条件下(参见材料和方法),HL-60 细胞系及正常健康人 cDNA 均只有 CY5 信号,显示出高度的特异性。同时,对所构建的阳性质粒进行 10 倍梯度稀释($10^7 - 10^1$ 拷贝)并作为模板。结果表明,所有质粒的灵敏度均可达 10 个拷贝。典型结果如图 2A 所示。

检测体系的临床评估

为了考察该检测体系的可靠性,本研究利用该体系检测了 54 份白血病标本,结果共检出 7 份 *MLL* 融

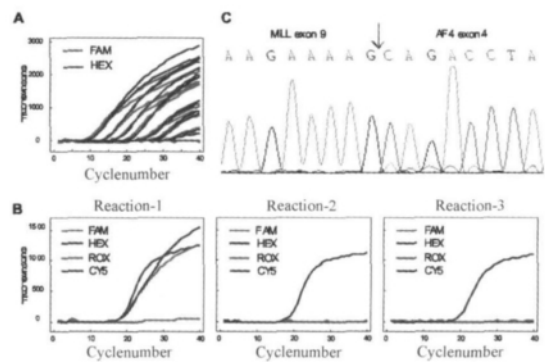


Figure 2. Representative results of multiplex qPCR system, using *MLL-AF4* as an example. A: amplification curves of *MLL-AF4* (ex11-ex4) plasmids, which were serially 10-fold diluted ranging from 10^7 to 10 copies. B: amplification curves of a leukemia patient sample. The results showed that there were FAM, HEX and CY5 signals in Reaction-1, indicating the presence of *MLL-AF4* fusion gene. C: sequencing results of the amplicon from the patient, confirming the presence of *MLL-AF4* fusion gene. The arrow points to the breakpoint.

合基因阳性患者,包括 *MLL-AF4* (3 例 ALL)、*MLL-AF9* (2 例 AML)、*MLL-AF10* (1 例 ALL)、*MLL-ELL* (1 例 ALL)。所有 7 例阳性标本均进行了测序验证,测序结果均与实时 PCR 检测结果一致。

典型结果如图 2B 所示。该患者的 3 个反应管均有 CY5 信号,表明 cDNA 模板是可用的,且 PCR 扩增体系是有效的。此外,第 1 个反应管还有 FAM 和 HEX 信号,根据判断标准(附表),该患者应为 *MLL-AF4* 阳性。测序结果(图 2C)进一步证明了这一点。

统计并分析了 54 个病例的核型分析结果表明,

Table. Interpretive criterion of fluorescence signals in RT-qPCR assay

	Fluorescence signal			Type of fusion	Dose it need second PCR?
	Reaction1	Reaction2	Reaction3		
A.	CY5	CY5	CY5	Negative	no
B.	CY5 & HEX	CY5	CY5	<i>MLL-AF9</i>	no
	CY5 & HEX & FAM	CY5	CY5	<i>MLL-AF4</i>	no
	CY5 & HEX & ROX	CY5	CY5	<i>MLL-AF6</i>	no
	CY5	CY5 & HEX	CY5	<i>MLL-ENL</i>	no
	CY5	CY5 & HEX & FAM	CY5	<i>MLL-ELL</i>	no
	CY5	CY5 & HEX & ROX	CY5	<i>MLL-AF10</i>	no
	CY5	CY5	CY5 & HEX	<i>MLL-AF17; MLL-SEPT6; MLL-AF1P; MLL-AF1Q</i>	yes

在 7 例阳性标本中,有 2 例没有核型分析结果;有 2 例为正常核型(1 例 *MLL-AF4*, 1 例 *MLL-AF9*);有 3 例为异常核型,其中 1 例 *MLL-AF4* 和 1 例 *MLL-AF9* 的核型与预期一致,另 1 例 *MLL-AF10* 对应的核型为 *der(3)t(3;?)*,与预期不一致。*MLL-AF10* 涉及到复杂的染色体重排过程,因此很容易被核型分析所漏检^[14]; *MLL-AF9* 中 *AF9* 基因位于染色体末端,导致对应的异常核型不易被核型分析所检出^[15]。在 47 例阴性标本中,有 24 例患者未作核型分析或者核型分析失败,共有 23 例有核型分析结果;在这 23 例中,并未发现涉及到 11q23 的染色体异常。总的来说,本检测体系检出了 3 例被核型分析所漏检的融合基因,而核型分析并未检出本检测体系所漏检的染色体异常,可见本检测体系是核型分析的一种补充手段。

讨 论

随着细胞分子生物学的发展, *MLL* 融合基因对白血病预后及诊断意义也越来越明确。因而对 *MLL* 融合基因的检测方法也有了新的要求。目前核型分析是一种重要的常规筛查手段,一旦检出 *t(11q23)* 异常,即可推测为 *MLL* 融合基因阳性,但是核型分析灵敏度低、操作繁琐、检测周期长,需要 1-2 周才能出结果。对于染色体的微小易位、小片段缺失、重复和倒位,核型分析容易发生漏检。此外,有些学者对 *MLL* 融合基因检测选用 FISH 结合巢式 PCR 的方法^[6,16]。该检测方法将两种方法进行有机的结合, FISH 方法用来判断是否存在 *MLL* 融合基因,巢式 PCR 用于融合基因的分型,因而能够对 *MLL* 融合基因进行全面的筛查,但该方法周期长,操作繁琐,而且需要对 PCR 产物进行后处理,容易产生模板污染。

本研究建立了多重实时 PCR 检测体系的新方法,其优势在于以下几点:第一,检测全面。大部分融合基因都具有不止一种融合形式,有的融合基因甚至有超过 10 种融合形式。比如 *MLL-ENL* 的 2 个基因均具有多个断裂点,跨越的区域均接近 1 000 bp,这对检测的全面性提出了挑战。此外,自从 1998 年 Pallisgaard 等^[7]的方法报道以来,在不少融合基因中发现了新的融合形式,我们通过检索文献和数据库对 10 个融合基因的各种融合形式进行了全面调研,在此基础上设计引物和探针,以避免或减少漏检的出现。第二,检测灵敏度高。通过构建的阳性质粒验证,检测灵敏度最低可达 10 个拷贝数。第三,结果判读简便,操作时间短。通过实时观察 3

个反应中的荧光信号,就可以对融合基因的类型进行判断。除去机器运行 2 h,手工操作时间大约 30 min,大大缩短了检测时间。总体而言,本研究所建立的方法可以对 *MLL* 融合基因中发生频率高的 10 种融合类型进行筛查,涵盖发生频率约 90% 的融合类型,因而可以作为临床及实验中对病人标本进行筛查的手段,也可作为核型分析及 FISH 方法的一种有力的补充手段,用于 *MLL* 融合基因的具体分型。此外,一旦患者检测为阳性,本方法也可进一步用于融合基因的定量分析和微小残留病监控。

参 考 文 献

- Ziemin-Van Der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, et al. Identification of a gene, *MLL*, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88(23): 10735
- Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, et al. New insights to the *MLL* recombinome of acute leukemias. *Leukemia*, 2009; 23(8): 1490-1499
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 2002; 100(7): 2292-2302
- Van der Burg M, Beverloo H, Langerak A, et al. Rapid and sensitive detection of all types of *MLL* gene translocations with a single FISH probe set. *Leukemia*, 1999; 13(12): 2107
- 刘旭平,李承文,秦爽,等. 常规细胞遗传学分析和荧光原位杂交方法检测白血病 11q23/*MLL* 基因重排. *中国实验血液学杂志*, 2006; 13(5): 798-803
- 陈伟红,陈成坚,汪明春,等. 混合系白血病基因重排的检测方法及其临床意义. *中国实验血液学杂志*, 2007; 15(1): 20-24
- Pallisgaard N, Hokland P, Riisshoj DC, et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood*, 1998; 92(2): 574-588
- Jansen M, van der Velden V, van Dongen J. Efficient and easy detection of *MLL-AF4*, *MLL-AF9* and *MLL-ENL* fusion gene transcripts by multiplex real-time quantitative RT-PCR in TaqMan and LightCycler. *Leukemia*, 2005; 19(11): 2016-2018
- Li Q, Luan G, Guo Q, et al. A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization. *Nucleic Acids Res*, 2002; 30(2): e5-e5
- Cheng J, Zhang Y, Li Q. Real-time PCR genotyping using displacing probes. *Nucleic Acids Res*, 2004; 32(7): e61-e61
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16(15): 7351-7367
- Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc*, 2007; 2(4): 924-932
- Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*, 2008; 3(9): 1452-1456
- Van Limbergen H, Poppe B, Janssens A, et al. Molecular cytogenetic analysis of 10; 11 rearrangements in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2002; 16(3): 344-351
- Andreasson P, Höglund M, Bekassy AN, et al. Cytogenetic and FISH studies of a single center consecutive series of 152 childhood acute lymphoblastic leukemias. *Eur J Haematol*, 2000; 65: 40-51
- 何军,陈子兴,薛永权,等. *MLL* 基因重排急性白血病患儿的临床和生物学特点研究. *中华血液学杂志*, 2005; 26(8): 477-480