

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 30520091152242

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于实时荧光定量 PCR 平台白血病中融合
基因及基因突变检测方法的建立

Leukemia fusion genes and gene mutation detection methods
based on real-time quantitative PCR platform

赵晓明

指导教师姓名: 李庆阁 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

| | |
|--|-----------|
| 目 录 | |
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 3 |
| 第一章 绪论 | 5 |
| 第一节 白血病的研究历史 | 5 |
| 第二节 白血病发病机理及分子遗传学基础 | 6 |
| 2.1 正常造血过程..... | 6 |
| 2.2 白血病的发病原因..... | 7 |
| 2.3 白血病的分子细胞遗传学..... | 8 |
| 第三节 白血病的诊断 | 9 |
| 3.1 形态学诊断..... | 9 |
| 3.2 免疫学诊断..... | 11 |
| 3.3 细胞遗传学分型..... | 11 |
| 3.4 MIC 分型 | 11 |
| 3.5 WHO 分型 | 12 |
| 第四节 基于实时荧光定量 PCR 的检测方法 | 13 |
| 4.1 实时荧光定量 PCR 简介 | 13 |
| 4.2 实时 PCR 定量分析 | 15 |
| 第五节 本论文提出、内容及意义 | 17 |
| 参考文献 | 19 |
| 第二章 白血病中十种高频 <i>MLL</i> 融合基因的检测 | 21 |
| 第一节 引言 | 21 |
| 1.1 <i>MLL</i> 融合基因的简介 | 21 |
| 1.2 十种 <i>MLL</i> 融合基因 | 23 |
| 1.3 检测 <i>MLL</i> 融合基因的意义 | 24 |
| 1.4 目前检测 <i>MLL</i> 融合基因的方法 | 25 |
| 1.5 本课题的理论依据、意义和规划..... | 26 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 第二节 材料与方法 | 27 |
| 2.1 临床标本和细胞系 | 27 |
| 2.2 总 RNA 提取和逆转录 | 28 |
| 2.3 引物和探针设计 | 28 |
| 2.4 阳性质粒的构建 | 31 |
| 2.5 引物稀释和探针配置 | 33 |
| 2.6 引物筛选和单重实时 PCR 体系的建立 | 33 |
| 2.7 多重实时 PCR 体系的建立 | 34 |
| 2.8 多重实时 PCR 体系检测临床样品 | 35 |
| 第三节 结果与分析 | 36 |
| 3.1 单重实时 PCR 体系 | 36 |
| 3.2 多重实时 PCR 体系的建立 | 37 |
| 3.3 临床标本检测 | 40 |
| 第四节 讨论 | 42 |
| 参考文献 | 44 |
| 第三章 <i>c-kit</i> 基因突变的检测 | 47 |
| 第一节 引言 | 47 |
| 1.1 <i>c-kit</i> 简介 | 47 |
| 1.2 检测 <i>c-kit</i> 突变的方法 | 49 |
| 1.3 课题的提出 | 51 |
| 第二节 材料与方法 | 52 |
| 2.1 临床标本和细胞系 | 52 |
| 2.2 仪器与试剂 | 52 |
| 2.3 阳性质粒构建 | 53 |
| 2.4 引物探针合成 | 53 |
| 2.5 PCR 体系优化 | 54 |
| 2.6 PCR 体系选择性考察及临床标本的检测 | 55 |
| 第三节 结果 | 55 |
| 3.1 PCR 体系优化 | 55 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| 3.2 PCR 体系选择性考察 | 60 |
| 3.3 病人标本检测 | 62 |
| 第四节 讨论 | 65 |
| 参考文献 | 69 |
| 硕士期间发表交流论文 | 71 |
| 致谢..... | 72 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Abstract(In Chinese) | 1 |
| Abstract(In English) | 3 |
| Chapter I Introduction | 5 |
| Section I The history of leukemia | 5 |
| Section II Pathogenesis and molecular genetic basis of Leukemia | 6 |
| 2.1 The process of normal hematopoiesis..... | 6 |
| 2.2 The etiology of leukemia | 7 |
| 2.3 Molecular cytogenetics of leukemia | 8 |
| Section III Diagnosis of leukemia | 9 |
| 3.1 Morphologic diagnosis..... | 9 |
| 3.2 Immunological diagnosis | 11 |
| 3.3 Cytogenetic diagnosis | 11 |
| 3.4 MIC classification..... | 11 |
| 3.5 WHO classification..... | 12 |
| Section IV Detection methods based on Real-time quantitative PCR | 13 |
| 4.1 Introduction of Real-time quantitative PCR | 13 |
| 4.2 Real-time PCR quantitative analysis | 15 |
| Section V Proposal of the thesis | 17 |
| References | 19 |
| Chapter II Efficient detection of 10 types of high frequent <i>MLL</i> fusion genes by Real-time PCR | 21 |
| Section I Introduction | 21 |
| 1.1 The overview of the <i>MLL</i> fusion genes..... | 21 |
| 1.2 Ten <i>MLL</i> fusion genes | 23 |
| 1.3 Significance of <i>MLL</i> fusion genes detection | 24 |
| 1.4 Methods of <i>MLL</i> fusion genes detection | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5 The theoretical basis and planning of the thesis..... | 26 |
| Section II Materials and methods..... | 27 |
| 2.1 Clinical samples and cell lines..... | 27 |
| 2.2 Total RNA extraction and reverse transcription..... | 28 |
| 2.3 The design of primers and probes..... | 28 |
| 2.4 Construction of the positive plasmids..... | 31 |
| 2.5 Primers dilution and probes preparation..... | 33 |
| 2.6 Primer screening and single real-time PCR system establishment..... | 33 |
| 2.7 Establishment of multiple real-time PCR system..... | 34 |
| 2.8 Multiple real-time PCR system used for detection of clinical samples... | 35 |
| Section III Results and analysis..... | 36 |
| 3.1 Establishment of single real-time PCR system..... | 36 |
| 3.2 Establishment of multiple real-time PCR system..... | 37 |
| 3.3 Detection of clinical samples..... | 40 |
| Section IV Discussion..... | 42 |
| References..... | 44 |
| Chapter III Detection of <i>c-kit</i> gene mutations..... | 47 |
| Section I Introduction..... | 47 |
| 1.1 The overview of <i>c-kit</i> | 47 |
| 1.2 Methods of <i>c-kit</i> mutation detection..... | 49 |
| 1.3 Proposed subject..... | 51 |
| Section II Materials and methods..... | 52 |
| 2.1 Clinical samples and cell lines..... | 52 |
| 2.2 Instruments and reagents..... | 52 |
| 2.3 Construction of the positive plasmids..... | 53 |
| 2.4 Synthesis of primers and probes..... | 53 |
| 2.5 PCR system optimization..... | 54 |
| 2.6 The selectives of PCR system and detection of clinical samples..... | 55 |
| Section III Results..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1 PCR system optimization..... | 55 |
| 3.2 The selective of PCR system | 60 |
| 3.3 Detection of patient samples..... | 62 |
| Section IV Discussion | 65 |
| References..... | 69 |
| Publications included in this thesis..... | 71 |
| Acknowledgement..... | 72 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

白血病是造血系统的恶性疾病，随着科学技术的发展，白血病的研究也由形态学步入到分子生物学。研究发现白血病的发生是多因素、多基因、多阶段的复杂的生物学现象。引起白血病最为常见的原因是染色体异常(通常形成融合基因)及基因突变，其中很多融合基因或者基因突变可作为分子标记物，用于预后判断、治疗方案的选择、微小残留病的监控及靶向治疗。本论文基于实时荧光定量 PCR 平台，建立了两种方法，一种用于检测融合基因，一种用于检测基因突变，以期可以用于临床辅助治疗或诊断。

第一章 绪论

本章回顾了白血病发现及研究历史，介绍了白血病的分子遗传学基础及各种分型诊断方法。除此之外对实时荧光定量 PCR 也做了概述，基于实时荧光定量 PCR 平台的优势提出本论文的研究内容及其意义。

第二章 白血病中十种高频 *MLL* 融合基因的检测

在 2008 年 WHO(世界卫生组织)分类系统中，伴有 *11q23/MLL* 异常的 AML (acute myeloid leukemia, 急性髓细胞白血病) 被单独分为 AML 的一个亚型。研究发现涉及 *MLL* 的融合基因多达 85 种。本章中，我们采用实时荧光定量 PCR 平台结合双链置换探针，设计了三管反应体系，检测发生频率最高的十种融合基因。利用构建的阳性质粒对其灵敏度进行考察，检测体系能够检测低至 10 拷贝的模板。此后利用 54 份临床标本对检测体系进行临床验证，共检出 7 份阳性标本，与测序结果一致。证明了该检测方法的可用性。

第三章 *c-kit* 基因突变的检测

本章主要研究在 CBF -AML (Core binding factor acute myeloid leukemia, 核心结合因子急性髓系白血病) 中出现频率很高的 *c-kit* 的突变。CBF-AML 病人一般伴有良好的预后，但 *c-kit* 基因的突变会逆转这种情况，所以需对 *c-kit* 突变进行检测以采取相应的治疗方案。我们采用一种新型改良的杂交探针结合探针熔解曲线的方法对其进行检测。所建立方法能够检测 *c-kit* exon17 上的绝大部分热点突变。利用阳性质粒考察该检测方法的选择性，除一个热点突变检测到 10%外，其余均能达到 5%。对 12 例 CBF-AML 标本进行检测，共有 5 例阳性，稍高于报

道的发生频率，对此 12 例病人测序，测序结果与检测结果相符。该体系具有灵敏度高、特异性好、检测全面、方便直观等特点，可作为临床诊断的辅助方案。

关键词：白血病；实时定量 PCR；探针熔解法

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Leukemia is a malignant disease of the hematopoietic system. With the scientific and technological development, the research of leukemia enters into the molecular biology from morphology. Studies find that the occurrence of leukemia is a multi-factor, multi-gene, multi-stage complex biological phenomena. Chromosomal abnormalities (usually formation of fusion genes) and gene mutations are common in leukemia. The fusion genes or gene mutations can be used as molecular markers for prognosis, treatment, monitoring of minimal residual disease and targeted therapy. This thesis was based on real-time quantitative PCR platform and established two detection methods, one for detection fusion genes, the other for detection of gene mutation. Our methods could be used to assist the clinical treatment or diagnosis.

In chapter one, we reviewed the background of leukemia, the molecular genetic basis of leukemia and a variety of genotyping diagnostic methods. In addition, we also did an overview about real-time quantitative PCR. Based on the advantages of real-time quantitative PCR platform, we put forward the content and significance of this thesis.

In chapter two, we studied the *MLL* fusion genes. According to 2008 WHO (World Health Organization) classification system, AML (acute myeloid leukemia) accompanied by 11q23/*MLL* abnormalities were classified into a special subtype of AML. Previous studies showed that about 85 kinds of fusion genes involved in *MLL* gene. We used real-time quantitative PCR platform combined with double-strand displacement probe, designed three reactions to detect ten fusion genes which occurred most frequently. Constructed positive plasmids were used to study the sensitivities of our method and the detection system could detect at least 10 copies of the templates. After analysis of 54 clinical samples to validate the detection system and found 7 positive samples which were consistent with the sequencing results. So we proved that the method was good for detection the ten fusion genes (*MLL-AF4*, *MLL-AF9*, *MLL-ENL*, *MLL-AF10*, *MLL-AF6*, *MLL-ELL*, *MLL-AF1p*, *MLL-AF17*,

MLL-SEPT6, *MLL-AF1q*).

In chapter three, we established a method to detect *c-kit* (cellular homolog of the feline sarcoma viral oncogene v-kit) mutations. *c-kit* mutations occurred frequently in the CBF-AML (Core binding factor acute myeloid leukemia). CBF-AML patients are generally associated with good prognosis, but the *c-kit* gene mutations will reverse this situation, so it is important to detect *c-kit* mutations in order to take appropriate treatment programs. A new type of modified hybridization probes were designed and probe melting curve method was used for *c-kit* mutations detection. The established method was able to detect the vast majority of hotspot mutations in *c-kit* exon17. Constructed positive plasmids were used to study the selectivity of the method, in addition to one hotspot mutation was detected by 10%, the rest were able to achieve 5%. 12 cases of CBF-of AML samples were tested and a total of 5 positive cases were found, slightly higher than the reported frequency. We also sequenced these 12 patients samples and sequencing results consistent with the test results. The system showed high sensitivity, high specificity, convenient and intuitive features. So it could be used as a clinical assistant method.

Key words: Leukemia; Real-time quantitative PCR; Probe melting curves

第一章 绪论

第一节 白血病研究历史

白血病是造血系统的恶性疾病，又称“血癌”^[1]。白血病是一类造血干细胞异常克隆的恶性疾病。血细胞因基因异常失去进一步分化成熟的能力而停滞在细胞发育的不同阶段，并在骨髓和其他造血组织中大量增生，浸润其他器官和组织。大量增生的非正常血细胞使正常造血受抑制，临床表现为贫血、出血、感染及肝脾淋巴结肿大等症状。白血病最先为苏格兰的 John Hughes Bennett 及德国的 Rudolf Virchow 所描述，Rudolf Virchow 用德语将病例描述为 Leukämie，而这个词的形成源于两个希腊字母，leukos (λευκός)，是英语 "white"，而 aima (αίμα)，是英语 "blood" 的意思，因而 leukemia 即白血病的意思^[2]。Bennet 的 “Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood” 文章^[3]与 Virchow 的 “Weisses blut” 的文章所报道的病例有相似的地方，2 例患者均出现进行性乏力，血细胞增多，巨脾等症状，当时诊断为白细胞增多症，但按当今标准来判别的话，Bennett 和 Virchow 的病例分别属于慢性髓性细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病。1877 年，血液涂片标本的使用^[4]，使血细胞的细胞核、细胞质和其它组分首次得到明确区分；其后显微镜技术的不断进步，血细胞染色技术进一步发展，开创了血液形态学的新纪元。Ehrlich 根据血细胞对酸性染料或碱性染料亲和力的不同而确定了各种类型的血细胞，并分为两大类：髓性细胞（粒细胞）和淋巴细胞（非粒细胞）^[5,6]，相应的白血病分为髓系细胞白血病和淋巴细胞白血病两种，Ehrlich 出色的工作促进了白血病的研究向组织化学方向发展。随着对白血病机理研究的深入，1976 年法国（Franch）、美国（American）和英国（Britain）等三国血细胞形态学专家讨论并制订了关于急性白血病的分型诊断标准，简称“FAB”分型^[7]，并经过修订^[8]，据此标准，可将白血病分为急性白血病及慢性白血病。急性白血病包括，急性非淋巴细胞白血病分成 M0-M7 共八个亚型；急性淋巴细胞白血病则可依此标准分成 L1-L3 三型。慢性白血病分为淋巴细胞白血病，粒细胞白血病，粒-单核细胞白血病及单核细胞白血病。随着免疫学及细胞遗传学技术的发展，1986 年 MIC 协作组提出了

MIC 分型法^[9, 10]即利用形态学 (morphology, M)、免疫学 (immunology, I)、细胞遗传学 (cytogenetics, C) 综合分型。该分型法以形态学为基础, 免疫学和细胞遗传学作为补充且相互结合使分型更趋精确。随着分子遗传学和分子生物学 (molecular biology, M) 研究的不断拓宽, 研究显示染色体核型变化与基因异常密切相关, 并在急性白血病发病机理的研究及新型治疗手段的靶向疗法等方面呈现令人瞩目的前景。国际血液学家及血液病理学家于 2001 年 3 月里昂会议上提出的造血和淋巴组织肿瘤的 WHO 分类法^[11], 应用 MICM 分类技术力求反映疾病本质, 成为国际上一种新的分类标准。

第二节 白血病发病机理及分子遗传学基础

2.1 正常造血过程

人出生之后, 造血过程 (hematopoiesis) 就在骨髓中持续地进行。造血过程主要依赖于骨髓中的造血干细胞 (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) 进行, 造血干细胞是指具有自我更新和多系分化成各种成熟血细胞潜能的细胞。造血干细胞数量稀少, 10 万~100 万个骨髓细胞中才存在 1 个, 其生存、增殖、分化受骨髓造血微环境的影响。人类造血干细胞首先出现于妊娠 19 天的胚胎期, 卵黄囊、体蒂和绒毛膜等胚外组织均存在 HSCs, 此过程称为卵黄囊造血期。卵黄囊造血期终止于 2 个半月的胚胎, 此后造血由胎肝所代替, 称为胎肝造血期。胎肝造血期衰退开始于胎儿第 6 个月, 出生时终止, 由骨髓造血代替。胎儿出生后, 骨髓成为造血干细胞的主要来源, 骨髓成为终生造血器官^[12]。

胎儿发育过程中, 造血干细胞增殖分化产生多能造血祖细胞, 后者进一步增殖分化产生淋巴系干细胞和髓系干细胞, 后者又可分化为髓系干细胞及红母细胞。随后四者朝不同方向分化。淋系共同祖细胞增殖分化产生 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞和淋系来源的树突状细胞; 髓系共同祖细胞增殖分化产生粒-单核系干细胞、巨核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和髓系来源的树突状细胞。在此之后, 粒-单核系干细胞进一步发育为嗜中性粒细胞和单核细胞, 红母细胞分化为红细胞, 巨核细胞进一步发育为红细胞和血小板, 最终形成一个完整的血细胞系统。具体分化过程如图 1 所示。

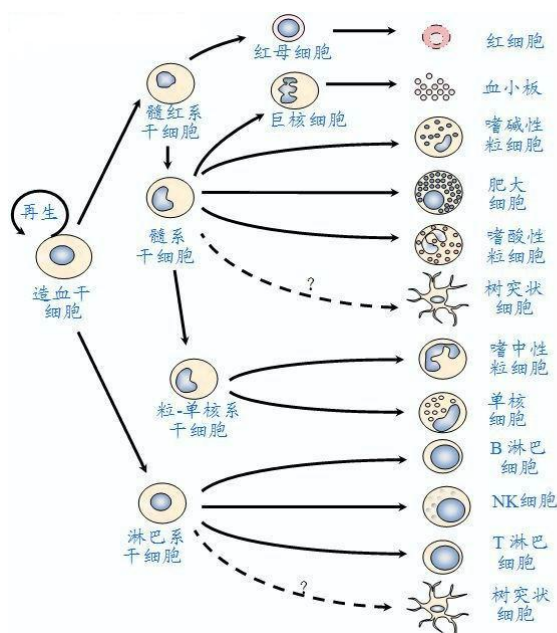


Figure 1. The differentiation process of hematopoietic stem cells. Derived from the web site of ibioo.

2.2 白血病的发病原因

癌症（cancer）是由于控制细胞生长增殖的机制失常而引起的疾病，表现为细胞恶性增殖。作为血癌的白血病（leukemia）也不例外。白血病是一类造血干细胞恶性克隆性疾病，白血病细胞增殖失控、分化障碍、凋亡受阻，而停止在细胞发育的不同阶段。在骨髓和其他造血组织中白血病细胞大量增生累积，并浸润其他组织和器官，而正常造血受抑制。

随着现代生物科学技术的进步与发展，人们开始在细胞及分子水平对白血病的发生进行重新认识。白血病与其他肿瘤相似，其发生是多因素、多基因、多阶段的复杂的生物学现象，但其最终的原因是，生物体本身的遗传物质发生了改变，而遗传物质的改变作为内因，离不开外部环境——即外因的影响。目前大多数学说普遍认同，白血病的发生是由环境因素与细胞遗传物质相互作用引起的。环境因素主要包括，化学物质（如苯及其相关化合物），电离辐射（如 X 射线）等^[12]。作为内源的遗传物质的改变则主要指 DNA 损伤所引起的原癌基因突变或过度表达及抑癌基因的失活，这样就导致基因产物的质和量发生异常，从而导致正常细胞发生不可逆的异常增殖或分化，最终表现为肿瘤的发生。具体而言，白血病的发生在分子机制上可以做如下描述：在造血干细胞逐次分化成熟的过程

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫