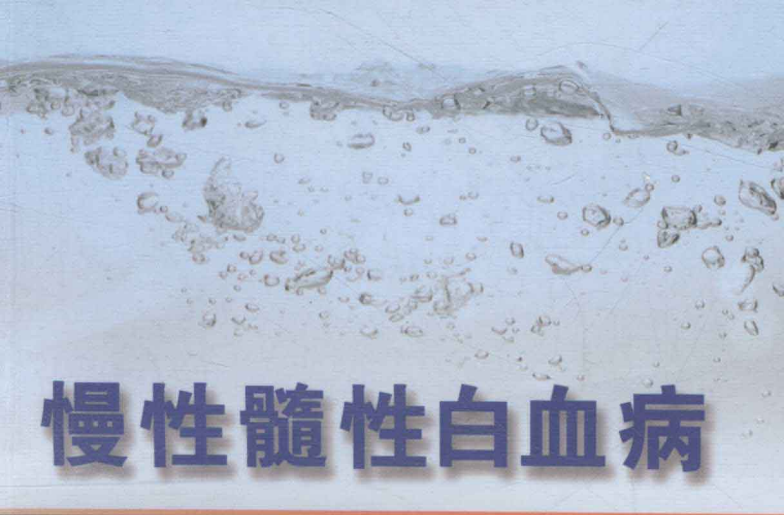




慢性髓性白血病

分子监测手册

编著 秦亚溱 主鸿鹄

顾问 黄晓军



人民卫生出版社

慢性髓性白血病

分子监测手册

编著 秦亚溱 主鸿鹄
顾问 黄晓军

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

慢性髓性白血病分子监测手册 / 秦亚溱, 主鸿鹄编著.
—北京: 人民卫生出版社, 2013

ISBN 978-7-117-17453-4

I. ①慢… II. ①秦…②主… III. ①慢性白血病—髓性白血病—卫生监测—手册 IV. ①R733.7-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 111052 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

慢性髓性白血病分子监测手册

编 著: 秦亚溱 主鸿鹄

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 潮河印业有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/32 印张: 2.5

字 数: 40 千字

版 次: 2013 年 6 月第 1 版 2013 年 6 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-17453-4/R·17454

定价(含光盘): 30.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

序

实时定量 PCR 已经成为血液恶性肿瘤分子诊断和监测的主流技术。该技术具有敏感度高、特异性强以及能够真正定量起始模板量的特点，目前已经成为血液恶性肿瘤临床中不可或缺的手段，尤其在个体化治疗过程中起到关键作用。因此有必要对该技术在国内进行推广和普及。

目前国内多个实验室相继开展了分子检测项目，但是由于各个实验室没有统一的操作规范和流程，有些检测结果的可信度尚待提高，不同实验室间以及国内与国际实验室间的结果尚难以直接比较。这些问题在国际及国内多中心临床研究中尤为突出。因此，有必要在国内实验室推广建立标准化的操作规范和操作方案，推动实时定量 PCR 的标准化并与国际接轨。

北京大学血液病研究所多年来致力于实验室规范化及国际化工作。2012 年通过与国际参比实验室比对成功获得了将 BCR-ABL mRNA

水平转换为国际标准的转换系数。最近三年,通过开展 CML 分子检测国内室间比对项目,促进了参与实验室的检测水平准确性的整体提高。为了达到检测稳定这一更高目标,提高国内实验室的检测水平,我们将本中心 BCR-ABL mRNA 的定量检测及 ABL 点突变检测的标准化实验方案出版,为国内兄弟单位提供一个实用性强的 PCR 技术手册,供同行们参考。

本书的作者从事 PCR 技术的临床转化研究 10 余年,积累了丰富的实际经验。希望通过本书的出版,促进国内血液病分子检测技术的整体发展,推动其在临床中发挥最大作用,为我国血液病整体诊治水平的进步作出贡献。

本书不仅适合于血液学专业的实验室科研技术人员和研究生,而且对于年轻医师乃至高年资医师的临床诊断工作同样可以提供帮助。

北京大学人民医院,北京大学血液病研究所所长
中华医学会血液学分会候任主任委员
中国医师协会血液分会会长



2013 年 5 月

前 言

实时定量 PCR (RQ-PCR) 技术的问世是 PCR 领域的一场革命, 它实现了真正意义的对起始模板的定量, 目前已经成为国际上基础研究和临床应用中一个重要的技术平台。许多类型白血病具有特异性的染色体异位, 分子水平表现为特异性融合基因; 有些白血病具有特征性的基因突变; 除此之外, 很多白血病异常高表达泛白血病基因。采用 RQ-PCR 技术检测这些融合基因、突变基因及高表达基因, 能够准确反映患者白血病负荷, 在白血病的诊断、微小残留病的监测及预后中发挥了重要的作用。

慢性髓性白血病 (CML) 是一种起源于造血干细胞的恶性肿瘤, 细胞遗传学的标志为染色体易位 $t(9; 22)(q34; q11)$ 形成的 Ph 染色体, 分子水平表现为 22 号染色体的 *BCR* 基因和 9 号染色体上的 *ABL* 基因形成的 *BCR-ABL* 融合基因, 95% 以上的 CML 患者为 *BCR* 的第 13 或 14 外显子与 *ABL* 上的外显子 2 融合, 形成 e13a2 或 e14a2, 二者均翻译为 P210BCR-ABL 融合蛋

白。伊马替尼等酪氨酸激酶抑制剂(TKI)是一类人工合成的小分子靶向药物,通过特异性抑制 BCR-ABL 等酪氨酸激酶的活性导致 BCR-ABL(+)细胞最终凋亡。TKI 的应用是 CML 患者治疗革命性的进步,使得 CML 从致死性疾病转变为了慢性病,目前已成为慢性期患者一线治疗选择。由于大部分患者应用后很快获得完全细胞遗传学缓解,因此需要采用更加敏感的 RQ-PCR 技术来检测 BCR-ABL mRNA 水平,该指标不仅能够定量反映更深层次的肿瘤负荷,而且能够预测长期疗效以及突变、耐药等的发生,从而对患者进行分层,指导临床治疗。此外,CML 患者接受造血干细胞移植后,肿瘤负荷即降至很低水平,亦需要采用 RQ-PCR 技术来定量监测移植后的 BCR-ABL mRNA 水平,以指导临床采取相应的治疗策略。有些患者在 TKI 治疗过程中出现原发或继发性耐药,目前公认 ABL 酪氨酸激酶区突变是主要的耐药机制,通过 PCR 结合测序技术可以检出突变点和突变类型,指导临床的下一步治疗。因此 CML 患者治疗过程中的分子监测十分重要。其他类型白血病相关分子异常的监测亦十分重要,目前已成为白血病诊治过程中必不可少的指标。

PCR 检测异常基因在临床中发挥作用的前提是准确、稳定,而采用标准化的实验方案

是保证。因此,本书先概述 RQ-PCR 原理,随后以对 CML 患者的 BCR-ABL (P210)检测为范例,详细描述该指标的 RQ-PCR 检测及 ABL 激酶区突变检测的实验方案,并对相关问题给予详细解释说明。无论国际还是国内,对于 RQ-PCR 检测的实验方案均未做过统一要求,无论是试剂、仪器以及引物和探针序列等各家均有多种选择。本书的目的不在于统一,而是希望对于读者在 PCR 实验中出现问题提供帮助,对初学 PCR 的学生和相关人员起到一定指导作用。愿本书在国内白血病分子诊断领域整体检测水平的进步中发挥一份作用。

在本所实验方案发展完善过程中,澳大利亚阿德莱德国际参比实验室的 Susan Branford 教授提供了很大的帮助,在此表示诚挚谢意!

尽管作者多次斟酌修改,本书难免存在错误,其中的观点也不一定全部准确,恳请各位读者批评指正,作者诚挚感谢!

秦亚臻 主鸿鹄

2013 年 4 月

目 录

第一章 实时定量 PCR 基本原理	1
一、RQ-PCR 原理	2
二、RQ-PCR 定量方法	5
三、RQ-PCR 的术语及其定义	6
四、敏感度判断以及影响因素	7
第二章 RQ-PCR 检测 BCR-ABL(P210)	
mRNA 操作程序	9
一、样本采集	9
二、有核细胞分离及 RNA 提取	10
三、逆转录合成 cDNA	17
四、RQ-PCR 及结果分析	20
五、报告结果	32
第三章 PCR 结合测序技术检测 BCR-ABL	
激酶区突变操作程序	43
一、样本采集、RNA 提取及逆转录	
合成 cDNA	44
二、扩增	44

三、电泳·····	46
四、测序·····	46
五、序列分析·····	46
六、报告结果·····	59
 第四章 RQ-PCR 检测白血病相关异常 基因表达水平在临床应用的 标准化·····	 62
 主要参考文献·····	 67

集数据,降低了污染机会,减少假阳性结果的出现;④无需PCR后的电泳过程,使操作时间缩短;⑤能够通过内参基因的定量评价样本的质量,减少假阴性结果的发生;⑥实现自动化,可以进行高通量分析。

一、RQ-PCR 原理

在 RQ-PCR 技术的发展过程中,两个重要的发现起了关键的作用:①在 90 年代早期, Taq DNA 聚合酶的 5' 外切酶活性被发现,它能够降解与模板特异性结合的荧光标记探针,使得间接检测 PCR 产物成为可能。②荧光双标记探针的运用使得在一个密闭的反应管中能实时地监测反应全过程。这两个发现以及相应的仪器和试剂的商品化发展实现了 RQ-PCR 的最终应用。PCR 反应过程先是指数增长期,随着反应循环数的增加,逐渐进入平台期。在 RQ-PCR 的整个反应扩增过程是实时监测并连续分析扩增相关的荧光信号,监测到的荧光信号的变化绘制成一条曲线。在 PCR 反应早期,产生荧光的水平不能与背景明显地区别即所谓荧光背景信号阶段,而后荧光的产生进入指数期,此阶段 PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系,随后先后进入线性期和最终的平台期,因此可以在 PCR 反应处于指数期

的某一点上(CT 值)来检测 PCR 产物的量,并由此来推断模板最初的含量。

目前 RQ-PCR 所使用的荧光化学方法包括 DNA 结合染色、水解探针、分子信标、荧光标记引物和杂交探针。它们又可分为扩增序列特异和非特异的检测两大类。扩增序列非特异性检测方法的基础是 DNA 结合的荧光分子,如 SYBR green 1 等荧光染料。在 PCR 反应体系中,加入的过量 SYBR green 1 荧光染料能够特异性地掺入 DNA 并发射荧光信号。荧光染料的优点在于简便,因为它可以检测任何双链 DNA 序列的扩增,而不需要设计特异性探针,这样同时也降低了检测的成本。缺点在于由于不识别序列而仅仅是与双链 DNA 结合,因此它的特异性差,容易产生假阳性信号,包括引物二聚体也能产生扩增曲线,不过通过扩增之后继续进行熔解曲线(melting curve)的过程,根据熔解温度有助于排除这种影响,因为熔解温度取决于序列的长度和组成。

扩增序列特异性检测方法是在 PCR 反应中利用标记荧光染料的基因特异寡核苷酸探针来检测产物,例如目前 RQ-PCR 中应用最广泛的 TaqMan 探针。TaqMan 探针是一条寡核苷酸,5' 端和 3' 端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团,这时 5' 端荧光基团吸收

能量后将能量转移给邻近的 3' 端荧光淬灭基团(发生荧光共振能量转移, FRET), 因此在探针完整时, 检测不到荧光。但在 PCR 扩增中, 溶液中的模板变性后低温退火时, 引物与探针同时与特异性的模板结合。在引物的介导下, Taq 酶自模板 5' 端向 3' 端延伸, 至探针与模板结合处时, 发挥其 5'-3' 外切酶活性将探针 5' 端连接的荧光基团从探针上切割下来, 游离于反应体系中, 从而脱离 3' 端荧光淬灭基团的屏蔽, 接受光刺激而发出荧光信号。这样每扩增一条 DNA 链, 就有一个荧光分子形成, 实现了荧光信号的累积完全反映了 PCR 产物的产生量。

MGB 探针是美国 Applied Biosystems 公司开发的另一种 TaqMan 探针。它与常规 TaqMan 探针相比, 一是探针 3' 端标记了自身不发光的淬灭荧光分子, 以取代常规可发光淬灭分子——TAMRA, 这就使荧光本底降低, 荧光光谱分辨率得以大大改善。另外探针 3' 端结合了 MGB(minor groove binder)结合物, 使得探针的 T_m 值提高, 大大增加了探针的杂交稳定性, 使结果更精确, 分辨率更高。正是由于它的高分辨性, 目前 TaqMan MGB 探针主要应用于等位基因的区分, 甚至能够检测到仅有单个核苷酸差异的等位基因的表达水平。此外, 由于 MGB 探针短于 TaqMan 探针, 所以当适合用

于设计探针位置的核苷酸序列较短时可以设计为 MGB 探针。

二、RQ-PCR 定量方法

分为相对定量和绝对定量两类。相对定量指的是在一定样本中靶序列相对于另一参照样本的量的变化。绝对定量指的是用已知的标准曲线来推算未知的样本的绝对量。

相对定量可以采用标准曲线进行,由于此方法中量的表达是相对的,因此用系列稀释的样品制备标准曲线即可。同时还要扩增内参基因。采用比较 CT 值的方法进行的相对定量是运用数学公式来计算相对量,不过应用前提是目的基因和内参基因的扩增效率都接近 100%。计算方法如下:

$$\Delta CT(\text{待测样本}) = CT(\text{待测样本目的基因}) - CT(\text{待测样本内参基因})$$

$$\Delta CT(\text{参照样本}) = CT(\text{参照样本目的基因}) - CT(\text{参照样本内参基因})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{待测样本}) - \Delta CT(\text{参照样本})$$

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{表达量的相对值。}$$

绝对定量通过预先已知拷贝数的标准品制作的标准曲线来实现,往往使用插入了目的序列的质粒 DNA 作为标准品,而标准品的量可根据 260nm 的吸光度值并用 DNA 或 RNA

的分子量来转换成其拷贝数(具体方法参见第二章)。

三、RQ-PCR的术语及其定义

CT 值:是指每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle at threshold)。在 RQ-PCR 反应的指数期,首先需设定一个荧光信号的阈值,一般这个阈值是以 PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号(baseline),通常设置是 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。每个模板的 CT 值与其起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多,CT 值越小。CT 值与起始模板量的关系为

$$CT = -k \lg X_0 + b$$

其中 X_0 代表起始模板量, $-k$ 代表标准曲线的斜率,当 PCR 扩增效率为 100% 时,扩增 1 个循环样本模板 DNA 含量翻成 2 倍,其 CT 值相差 1,当模板量翻成 10 倍时其 CT 值相差 3.32 (即 $2^{3.32} = 10$),即标准曲线的斜率为 -3.32 。因此根据已知拷贝数的标准品的 CT 值制作出标准曲线,再根据未知样品的 CT 值和标准曲线即可以获得其拷贝数。

阴性对照:包括无模板对照 (NTC, no-template control, 以水替代 DNA/cDNA 样本)、

无扩增对照(不含 DNA 聚合酶)和无目的基因对照(不含 PCR 靶基因的 DNA/cDNA)。

阳性对照: 包含目的基因序列的阳性细胞系、患者细胞或者质粒。质粒作为阳性对照只能检测 PCR 过程,不能反映出 PCR 前处理的影响。阳性细胞系或者患者细胞可以从初始步骤开始与待测样本同时操作,能够反映出 RNA 提取、逆转录过程和扩增各步骤的效率,更有利于分析实验结果。

内对照荧光染料: 在 PCR 反应体系中加入一个内对照荧光染料(如 ROX)可以减少不同反应管之间加样体积、反应管或者反应板的质量等方面的差异对结果的影响,提高检测的精确度。

四、敏感度判断以及影响因素

敏感度可以用稀释试验来证实,一般包括:细胞稀释(利用阳性细胞和阴性细胞系列稀释)、cDNA 稀释以及质粒标准品稀释。前三种方法可以用来进行相对定量,敏感度表示为如 10^{-5} 等,而质粒标准品稀释方法可以进行绝对定量,敏感度表示为拷贝数。相比之下,绝对定量的方法更科学,因为 RQ-PCR 本质检测的就是拷贝数,而用稀释度表示的敏感度会受到起始拷贝数的影响。例如,针对同一个基因

同时做两个 cDNA 水平的稀释度试验, 一个的起始拷贝数是 10^5 , 另一个是 10^4 , 若用稀释度表示可能敏感度分别为 10^{-5} 和 10^{-4} , 而以拷贝数表示, 则均为 1 个拷贝。不过, 相对定量的方法更易被临床接受。

敏感度是指 PCR 所能检测到的最低水平。由于在 RQ-PCR 检测临界值时, 变异很大, 因此“可重复的敏感度”或“稳定敏感度”即此敏感度范围内定量结果稳定具有可重复性的说法更科学。最大敏感度是指可以检测的最高极限, 此时结果重复性较差。

(主鸿鹄)