

经验交流

PCR 扩增 TCR V δ 2-D δ 3 片段的临床价值

李昕权 郑 敏

(华西医科大学附属二院, 成都 610041)

李昕跃

(大连大学医学院, 大连 116012)

摘要 以巢式 PCR 扩增急性淋巴细胞白血病细胞中 TCR V δ 2-D δ 3 重排片段, 同时将生物素掺入初诊期骨髓标本扩增产物中, 标记成患者克隆特异性探针, 通过点杂交法检测缓解期患者体内残留的白血病细胞。结果提示该法对于临床病情监测有一定的价值。

关键词 PCR, 白血病, TCR, 探针

白血病经治疗获缓解后, 体内仍残留白血病细胞, 依据骨髓细胞形态学诊断敏感性差, 需要更特异敏感的检测方法, 才能更好地对白血病的病情进行评估。T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 基因在淋巴细胞分化中, 各基因片段以 VDJ 形式重新组合, 在其结合处形成不同的核苷酸序列, 对于每一细胞克隆犹如独特的指纹。由于淋巴细胞白血病是单克隆恶性增殖性疾病, TCR 基因重排所形成的特异片段, 可以作为白血病克隆特异性标志^[1]。我们以 TCR δ 基因重排亚型 V δ 2-D δ 3 片段为靶序列, 用巢式 PCR (nest PCR) 扩增急性淋巴细胞白血病骨髓细胞中 V δ 2-D δ 3 片段, 同时将生物素掺入初诊期标本的扩增片段中, 制成每个患者的克隆特异性探针, 通过点杂交法检测缓解期患者体内残留的白血病细胞, 探讨其临床价值。

1 材料与方法

1.1 引物

选自 V δ 2-D δ 3 重排基因中 L、V δ 2、D δ 3、J δ 1 区互补序列 (图 1), 引物序列: 1. L: 5'-TCA TCC ATC TCT CTC TCT TC-3'; 2. J δ 1: 5'-AAA TGC TAG CTA TTT CAC CCA-3'; 3. V δ 2: 5'-GCA CCA TCA GAG AGA GAT GA-3'; 4. D δ 3: 5'-TTG TAG

CAC TGT GCG TAT CC-3'.

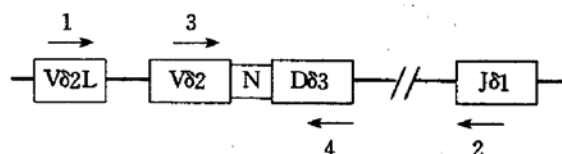


图 1 PCR 扩增 V δ 2-D δ 3 片段引物位置

1.2 提取 DNA

取骨髓 ACD 抗凝、淋巴细胞分层液分离单个核细胞, 按常规方法进行^[2]。

1.3 巢式 PCR 扩增及标记探针

以二轮 PCR 进行, 每轮 PCR 体积 50 μ l, 各引物量 25 pmol, 各 200 μ mol dATP、dCTP、dGTP、dTTP (第二轮 PCR 中 dTTP 为 150 μ mol、Biotin-11-dUTP 50 μ mol), Taq DNA 聚合酶 1 U。第一轮 PCR 模板为提取 DNA 0.2~1.0 μ g, 用引物 1、2。第二轮 PCR 模板为第一轮 PCR 产物 2 μ l, 用引物 3、4。变性、退火及延伸温度和时间分别为 94 $^{\circ}$ C, 30 s、56 $^{\circ}$ C, 60 s、72 $^{\circ}$ C, 90 s, 每轮为 35 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C, 5 min 终止反应, 扩增产物即标记的探针。

1.4 斑点杂交

将患者缓解期扩增产物 2 μ l 点膜, 80 $^{\circ}$ C 干

烤 2 h. 55℃ 预杂交、68℃ 杂交 6~12 h (杂交液为 6×SSPE、5×Denhardt、0.2% SDS, 100 μg 鱼精 DNA, 探针 200 μg/L, 或直接用标记的 PCR 产物 6 μl). 探针敏感性试验是将非标记 PCR 产物连续 10 倍稀释, 由 2 g/L 至 20 μg/L 分 6 个浓度, 各取 1 μl 点膜. 交叉杂交试验是用一种探针对各病例 PCR 产物进行杂交. 化学发光检测按照北京医科大学试验盒说明进行.

2 结果与讨论

TCR Vδ2-Dδ3 基因片段是一较有用的重排亚型, 利用其作为急性淋巴细胞白血病克隆特异性标志, 能更敏感地检测残留白血病细胞. 本文以巢式 PCR 在第二轮扩增中将生物素成功地掺入 Vδ2-Dδ3 扩增片段中, 标记为每个患者的克隆特异性探针, 将其用于残留白血病细胞的检测, 较 Yokota 等^[3]采用的放射性核素标记, 具有方法简单, 无放射性危害, 保存时间长, 取用方便等优点.

用所获得的 9 个病例的探针, 分别检测各自缓解期内残留的白血病细胞. 有 6 个病例获得阳性结果, 其中有 4 例连续二次检测阳性, 并在以后随访中临床复发. 另 3 例检测阴性者仍在观察中. 上述表明该探针能用于早期病情复发的监测. 最近 Steenbergen 等^[4]采用该基因片段为标志, 结合 PCR 扩增和探针杂交检测白血病患者体内残留的白血病细胞, 获较满意的结果, 进一步支持利用 TCR Vδ2-Dδ3 基因片

段为克隆特异性标记, 检测残留白血病细胞具有一定的临床应用价值.

参 考 文 献

- 1 van Dongen J J M, Wolvers-Tettero I L M. Clin Chim Acta, 1991; 198 (1~2): 1
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 9.16
- 3 Yokota S, Hansen-Hagge T E, Lidwig W D *et al.* Blood, 1991; 77 (2): 331
- 4 Steenbergen E J, Verhagen O J H M, van Leeuwen E F *et al.* Leukemia, 1995; 9 (1): 216

Amplifying TCR Vδ2-Dδ3 Fragment by PCR and Its Clinical Value. Li Xinquan, Zheng Min (Second University Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China); Li Xinyue (Medical School of Dalian University, Dalian 116012, China).

Abstract Incorporating biotin-11-dUTP, the rearranged fragment Vδ2-Dδ3 of T cell receptor gene has been amplified by nest PCR from bone marrow DNA of acute lymphoblastic leukemic patients to get biotin-labeled leukemic clonospecific probe for detection of minimal leukemic cells. The initial results of dot hybridization show that the clonospecific probes are sensitive and specific for identifying residual leukemic clone in clinical practice.

Key words PCR, leukemia, TCR, probe

一种鉴定过氧化氢酶活性的铁染色法*

董泗建 刘昌玲

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术, 建立了一种新的鉴定过氧化氢酶活性的方法——铁染色法. 结果表明, 细菌过氧化氢酶及牛肝过氧化氢酶显示单一的酶活性带. 该方法操作简单、快速、灵