

• 论 著 •

CRLF2 实时定量 PCR 检测方法的建立及初步应用*

付晶晶,李 红[△],易丽君,乐 萍,黄 慧

(江西省儿童医院中心实验室,江西南昌 330006)

摘 要:目的 建立人细胞因子受体样因子 2(CRLF2)实时定量 PCR 检测方法。方法 设计特异性引物扩增目的基因 CRLF2 及管家基因 ABL,将纯化的 PCR 产物进行 TA 克隆,经菌落 PCR 筛选并测序鉴定后,提取重组质粒 DNA,紫外分光光度计检测浓度换算成 copies/mL 浓度,稀释制备成质粒标准品,制作标准曲线观察灵敏度和线性范围,同时对质粒标准品的稳定性进行评估。初步应用该方法检测 10 例健康儿童和 10 例急性淋巴细胞白血病(ALL)初诊儿童的骨髓单个核细胞 CRLF2 水平。结果 CRLF2 PCR 产物具有单一特异的溶解曲线;标准品的线性检测范围为 $10^3 \sim 10^8$ copies/mL;质粒标准品反复冻融 3 次仍旧稳定;临床标本的 CRLF2 水平均在标准品线性检测范围。结论 该实验室建立的 CRLF2 实时定量 PCR 检测方法具有良好的特异性、线性范围和稳定性,可应用于临床 ALL 儿童 CRLF2 基因的定量检测。

关键词:实时定量聚合酶链反应; 急性淋巴细胞白血病; 细胞因子受体样因子 2; 质粒标准品

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)24-3520-03

Establishment and preliminary application of real time PCR assay for quantitative detection of CRLF2*

Fu Jingjing, Li Hong[△], Yi Lijun, Yue Ping, Huang Hui

(Central Laboratory, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: **Objective** To establish a real-time quantitative PCR method for the detection of cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2) expression. **Methods** Specific primers amplification target gene CRLF2 and housekeeping genes ABL were designed, the purified PCR products were performed the TA cloning. After bacterial colony PCR screening and sequencing, then the recombinant plasmids DNA was extracted and measured by using UV spectrophotometer and converted to copies/mL concentration. Finally it was diluted for preparing the plasmid standard substance, then the standard curve was drawn for observing the sensitivity and linear rang, meanwhile the stability of the plasmid DNA was evaluated. This method was initially applied to detect the CRLF2 level of bone marrow mononuclear cells in 10 cases of healthy children and 10 cases of newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Results** CRLF2 PCR product had a single specific melting curve; the linear detection range of the standard substance was $10^3 - 10^8$ copies / ml; the plasmid standard substance by freeze-thawing for 3 times remained stable; the CRLF2 level of clinical sample was within the linear detection range of standard substance. **Conclusion** The real-time quantitative PCR method for CRLF2 established by our laboratory has good specificity, linearity range and stability, which can be applied to the quantitative detection of CRLF2 gene in clinical ALL children.

Key words: real-time quantitative polymerase chain reaction; cytokine receptor-like factor 2; acute lymphoblastic leukemia; plasmid standard substance

尽管新化疗药物及联合化疗方案应用,使得儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)无事件生存率取得长足进步,但仍有 20% 患儿对化疗不敏感或因化疗过度导致复发或第二肿瘤发生。因此,寻找与预后相关的分子靶标进行分层治疗和疗效评估,将有益于进一步提高儿童 ALL 的治愈率^[1]。对细胞因子受体样因子 2(CRLF2)的临床研究发现,ALL 儿童骨髓单个核细胞(BMMC)中 CRLF2 高表达水平与预后不良相关^[2]。因此,本实验组拟建立 CRLF2 的实时定量 PCR(RQ-PCR)检测方法,用于 ALL 儿童 CRLF2 基因检测,为诊断儿童 ALL 和个体化治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 健康对照组及 ALL 儿童的 BMMC 及临床信息由本院中心实验室标本库提供,儿童年龄 1~15 岁,中位数 3.2 岁,所有标本取材均获儿童监护人知情许可。

1.2 引物设计 根据 Genbank 中人的 CRLF2 和 ABL 基因

序列,选择保守区用 Primer Premier 5.0 设计引物,经 Blast 验证后交由上海英骏公司合成。目的基因 CRLF2 上游引物:5'-GTT CAG TAC CGG AGC CCC TTC-3',下游引物:5'-GTT TGG GAG GCG TTG GTG TC-3',预计扩增长度为 232 bp;内参基因 ABL 上游引物:5'-TCA TCA CCA CGC TCC ATT AT-3',下游引物:5'-CAC CGT CAG GCT GTA TTT CT-3',预计片段长度为 178 bp。

1.3 仪器与试剂 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);-80℃超低温冰箱、Nanodrop2000(美国 Thermo Fisher 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);凝胶成像分析系统(美国 Bio rad 公司)。Ficoll 淋巴细胞分离液(北京索莱宝公司);逆转录试剂盒、Tag 酶(美国 Promega 公司);Trizol、琼脂糖粉、Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒(美国 OMEGA 公司);pEASY-T1 Simple TA 克隆试剂盒(北京全式

* 基金项目:江西省自然科学基金项目(20114BAB215031);江西省卫生厅科技计划项目(20141152)。 作者简介:付晶晶,女,主管检验技师,主要从事儿童白血病分子诊断及耐药机制研究。 [△] 通讯作者, E-mail: icemade@hotmail.com。

金公司);E. coli DH5 α 感受态细胞为本室自制。基因测序由上海英骏公司完成。

1.4 方法

1.4.1 骨髓 BMMC cDNA 合成 参照文献[3]和试剂说明书,提取健康对照组及 ALL 儿童 BMMC 总 RNA 后逆转录为 cDNA,放置-20℃备用。

1.4.2 质粒标准品的制备 以健康对照组 BMMC cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。内参 ABL 扩增条件为:94℃,5 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s 35 个循环;72℃ 延伸 10 min;CRLF2 扩增条件为:94℃,5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物切胶回收纯化后进行 TA 克隆。将菌落 PCR 阳性的单克隆菌扩增提取质粒,送测序鉴定。构建成功的重组质粒测定浓度后用 TE 缓冲液 10 倍梯度稀释至 10² copies/mL,分装后放置-20℃备用。

1.4.3 荧光定量 PCR 标准曲线的制作 将梯度稀释的 CRLF2 和 ABL 标准品按照优化后的 RQ-PCR 条件进行定量检测,每个浓度设置 3 个复孔,并设置无模板对照(NTC)3 管。PCR 反应结束后,结合熔解曲线进行分析,观察产物特异性。记录标准曲线的斜率、截距以及相关系数,观察线性范围。

1.4.4 质粒标准品稳定性试验 将分装放置在一-20℃保存的质粒反复冻融 3 次,选用 10⁷、10⁵、10³ copies/mL 即高、中、低三个浓度同一批次质粒进行组内试验,不同批次质粒进行组间试验,验证质粒的稳定性。

1.4.5 临床标本检测 检测 10 例健康对照儿童和 10 例 ALL 初诊儿童 BMMC cDNA CRLF2 水平,每份标本同步测定内参基因 ABL,测定 3 个复孔;ABL Ct 值大于 35 视为标本不合格,数据弃用;每个基因设定 3 管 NTC;选用 10⁷、10⁵、10³ copies/mL 作为阳性标准品,制作标准曲线。根据标准曲线自

动得到标本 CRLF2、ABL 的绝对定量水平,再以 CRLF2/ABL 绝对表达量比值为该标本的 CRLF2 相对表达水平。

1.5 统计学处理 数据分析应用 SPSS 9.0 软件进行及 Graphad Prism 5 进行,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,ALL 组与健康对照组 CRLF2 相对表达水平比较采用 Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 产物琼脂糖电泳 以健康对照组 BMMC cDNA 为模板,定性 PCR 扩增管家基因 ABL 和目的基因 CRLF2,扩增产物电泳观察到与预计大小相符的单一一条带,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 重组质粒测序鉴定 筛选重组子质粒送往测序,将测序结果与 Genbank 公布序列一致的重组质粒分别命名为 pEASY-T1-Simple-ABL、pEASY-T1-Simple -CRLF2。测序结果见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 RQ-PCR 方法学评价

2.3.1 特异性分析 从熔解曲线可见,管家基因和目的基因都仅出现产物单峰,ABL 熔解温度为 89.0℃,CRLF2 熔解温度为 85.1℃,说明引物特异性强,无非特异性扩增。见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3.2 线性范围 结果显示,质粒标准品在 10³~10⁸ copies/mL 浓度间具有良好相关性。ABL 标准曲线斜率为-3.65, $R=0.999\ 9$;CRLF2 标准曲线斜率为-3.64, $R=0.999\ 2$,见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3.3 稳定性分析 分析结果可见,标准品批内 CV 值均小于 3.0%,批间 CV 值均小于 4.0%,NTC 阴性,证实标准品及本方法的重复性良好,结果见表 1。

表 1 ABL/CRLF2 标准品批内及批间重复性试验

标准品浓度 (copies/mL)	质粒标准品	批内试验				批间试验			
		1	2	3	CV(%)	1	2	3	CV(%)
10 ⁷	ABL	16.27	15.61	15.91	2.07	15.68	15.09	16.19	3.52
	CRLF2	20.09	20.73	20.51	1.59	20.26	21.43	20.99	2.83
10 ⁵	ABL	24.26	24.95	24.09	1.86	24.08	25.02	25.29	2.56
	CRLF2	27.28	27.95	28.15	1.64	27.33	28.1	28.71	2.47
10 ³	ABL	31.23	32.01	31.16	1.50	32.21	33.86	33.05	2.50
	CRLF2	34.35	34.09	35.63	2.38	35.98	34.09	35.03	2.78
NTC	ABL	—	—	—	—	—	—	—	—
	CRLF2	—	—	—	—	—	—	—	—

—:无数据。

2.4 临床标本检测 应用本系统检测临床标本,所有标本均在标准品的线性范围,ALL 组 CRLF2 相对表达水平显著高于健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 5(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

CRLF2 参与正常淋巴细胞的成熟与分化。2009 年 Russell 等^[4]首次报道 CRLF2 异常高表达可能是造成 ALL 发生的直接机制。I-Ming 等^[5]发现有 17.5% ALL 儿童存在由 CRLF2 基因异位、缺失、突变造成的失调性高表达,Harvey 等^[6-7]多中心临床研究报道 CRLF2 高表达在 ALL 高危组中为

预后不良的独立危险因素,应予以高度重视。因此,作为一个潜在判断 ALL 预后的分子标志物,CRLF2 定量检测已引起 ALL 临床应用研究的重视。本研究组将 CRLF2 纳入本院 ALL 分子诊断平台建设体系中,希望建立优良稳定的 CRLF2 基因定量检测方法,为临床 ALL 儿童的个体化治疗预后判断提供参考。

基因表达检测首推 RQ-PCR 方法,较之普通定性 PCR,RQ-PCR 灵敏度高出 2 个数量级以上,因此,在临床分子诊断和科研中得到普遍应用^[8]。目前最常用的 RQ-PCR 方法有 SYBR Green I 染料法和 Taqman 探针法。(下转第 3524 页)

法。所以,从检测的灵敏度来说,反向蛋白质微点阵对 TORCH 感染的检测超过 ELISA 方法。最重要的是,在一块芯片上能同时检测所有的 TORCH 项目,能同时检测多个标本,大大节约了成本和人力。凌云等^[14]研究发现反向蛋白质微点阵法检测弓形虫的灵敏度高于 ELISA 法。

尽管反向蛋白质微点阵对 TORCH 感染的检测具有简单、快速、经济和灵敏度高等特点,但该方法用于临床之前,仍需要多中心大样品进行测试。

参考文献

[1] Edward R, Newton MD. Diagnosis of perinatal TORCH infections [J]. Clin Obst Gyne, 1999, 42(1): 59-70.

[2] Sever JL. TORCH tests and what they mean [J]. Am J Obstet Gynecol, 1985, 152(5): 495-498.

[3] Fung JC, Tilton RC. TORCH serologies and specific IgM antibody determination in acquired and congenital infections [J]. Ann Clin Lab Sci, 1985, 15(3): 204-211.

[4] Montoya JG, Liesenfeld O, Kinney S, et al. VIDAS test for avidity of Toxoplasma-specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant women [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2504-2508.

[5] Amaya M, Baer A, Voss K, et al. Petricoin III E & Narayanan A. Proteomic strategies for the discovery of novel diagnostic and therapeutic targets for infectious diseases [J]. Pathogens and Disease, 2014, 71(2): 177-189.

[6] Pawletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, et al. Petricoin EF III & Liotta LA. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front [J]. Oncogene, 2001, 20(1): 1981-1989.

[7] Mueller C, Liotta LA & Espina V (2010) Reverse phase protein microarrays advance to use in clinical trials [J]. Mol Oncol, 2010, 4(3): 461-481.

[8] Einspahr JG, Calvert V, Alberts DS, et al. Functional protein pathway activation mapping of the progression of normal skin to squamous cell carcinoma [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2012, 5(3): 403-413.

[9] Popova T, Espina V, Bailey C, et al. Anthrax infection inhibits the AKT signaling involved in the E-cadherin-mediated adhesion of lung epithelial cells [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009, 56(2): 129-142.

[10] Baer A, Austin D, Narayanan A, et al. Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication [J]. J Biol Chem, 2012, 287(10): 7399-7410.

[11] Austin D, Alan B, Lundberg L, et al. p53 activation following rift valley fever virus infection contributes to cell death and viral production [J], 2012, 14(1): 36327.

[12] Spurrier B, Ramalingam S & Nishizuka S (2008) Reverse-phase protein lysate microarrays for cell signaling analysis [J]. Nat Protoc, 2008, 3(1): 1796-1808.

[13] Hu S, Xie Z, Qian J, et al. Functional protein microarray technology [J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2011, 3(3): 255-268.

[14] 凌云, 李华, 冯春颜, 等. 蛋白芯片法检测弓形虫的临床应用 [J]. 临床医学工程, 2010(8): 81-82.

(收稿日期: 2015-05-24)

(上接第 3521 页)

相对探针法而言, SYBR Green I 染料法性价比且操作简便, 因而应用更为广泛, 但由于 SYBR Green I 能与任何双链 DNA 结合, 因此需要优化反应体系并结合熔解曲线分析以确保反应特异性^[9]。本研究小组建立的 CRLF2 RQ-PCR 检测方法经一系列评估实验显示: 本方法特异性强, 线性范围广, 荧光信号与扩增 Ct 值相关系数大于 0.999, 质粒标准品经反复冻融 3 次后, 批内及批间变异系数均低于 4%, 证明该方法完全符合实验要求, 可应用于临床 CRLF2 检测。笔者将该建立的方法初步应用于健康及 ALL 儿童的临床标本检测, 所有样本的 CRLF2 mRNA 水平均在标准品线性范围内, 因此本方法具有特异性强, 可行性好的特点, 完全符合检测要求。

综上所述, 本研究成功建立了 CRLF2 基因 RQ-PCR 检测方法, 为 ALL 儿童个体化诊疗和 CRLF2 转化医学研究提供了参考工具。

参考文献

[1] Ekiz HA, Can G, Baran Y. Role of autophagy in the progression and suppression of leukemias [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 81(3): 275-285.

[2] Mi JQ, Wang X, Yao Y, et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (II): Prognosis related to genetic abnormalities in a series of 1091 cases [J]. Leukemia, 2012, 26(7): 1507-1516.

[3] 祝亮方, 陈鑫基, 胡建达. eIF4E 在白血病中的表达及其临床意义 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(1): 1-6.

[4] Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated expression of

cytokine receptor gene, CRLF2 is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2009, 114(13): 2688-2698.

[5] I-Ming C, Richard C, Harvey, et al. Oncology Group Study disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK and minimal residual [J]. Blood, 2012, 119(15): 3512-3522.

[6] Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2010, 115(26): 5312-5321.

[7] Cario G, Zimmermann M, Romey R, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol [J]. Blood, 2010, 115(26): 5393-5397.

[8] 付晶晶, 周红平, 刘发娣, 等. 2012 年江西地区重症手足口病病原分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(22): 3024-3028.

[9] 何紫琪, 李从荣, 童永清. 乙型肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(4): 464-466.

(收稿日期: 2015-05-08)

