

白血病染色体 *MLL* 基因断裂（易位） FISH 探针的研究

孙江漫, 胡林萍, 李承文, 陆宏卿, 薛卫霞, 程涛, 缪为民

【摘要】

目的 自主研制可以检测白血病染色体 *MLL* 基因断裂的双色 FISH 检测试剂盒。

方法 根据染色体基因图谱, 选定合适的 BAC 克隆重叠群分别作为 *MLL* 基因断裂点 5' 端探针和 3' 端探针。采用缺口平移法, 制作出 5' 端标记绿色荧光素, 3' 端标记红色荧光素的探针。用双盲法检测白血病临床样本 40 例, 对自制探针和同类进口探针在各项技术参数上进行对比研究。

结果 自制探针检测 *MLL* 基因断裂（易位）的阴、阳性率与同类进口产品完全相符; 在 Spectrum Green 和 Cy3™ v1 通道中, 自制探针的平均荧光信号强度比进口探针明显提高（自制探针分别为: 2930.5 ± 38.00 , 2766 ± 59.54 ; 进口探针分别为: 2239 ± 45.13 , 1986 ± 59.56 ; $P < 0.01$), 自制探针信噪比分别为进口探针的 2.4 倍和 1.9 倍。

结论 自制的 *MLL* 基因 FISH 检测探针设计合理、质量可靠, 与进口探针相比, 荧光信号更强, 信噪比更高, 将来可能替代价格昂贵的进口产品。

【关键词】 白血病; 髓淋巴细胞性白血病蛋白质; 易位, 遗传; 原位杂交, 荧光; FISH 探针

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2016, 11(6):497-501

位于染色体 11q23 的混合谱系白血病（mixed lineage leukemia, MLL）基因的重组可以在 85% 的儿童 B 型急性淋巴细胞性白血病（acute lymphoid leukemia, ALL）细胞中检测到^[1-2]。该基因和果蝇基因 *trithorax* 同源, 在人类高度保守, 表达一种含 6 个锌指结构的蛋白质, 是一种发育调控蛋白。*MLL* 基因具有维护 *HOX* 基因的功能, 而后者在发育调节中具有重要功能。*MLL* 基因的锌指功能区分别和 *AFF1*、*MLLT3* 和 *FEN1P1* 等基因发生易位融合 t(4;11)、t(11;19) 和 t(11;19)。这些易位基因都具有高度的同源性。*MLL*(11q23) 基因易位和治疗失败密切相关^[3]。其中, 最常见的易位是 t(4;11), 涉及 *MLL* 基因和位于 4 号染色体的 *AFF1*(AF4) 基因^[4-5], 含有这种基因重组的 ALL 儿童的临床预后很差。因此, 检测 *MLL* 基因是否

发生断裂（易位）对于该类型白血病的诊治具有重要意义。

目前, 荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization, FISH）是用于检测染色体易位的首选方法。国际上有美国 Abbott 公司等生产的双色分离探针用于检测 *MLL* 基因断裂状况, 但价格昂贵。国内公司尚无国家食品和药品监督管理局（CFDA）注册的 *MLL* 分离探针, 难以完全满足临床需要。本文拟对血液病临床常用的 *MLL* 基因断裂 FISH 检测试剂盒进行研制, 并与同类进口产品相比较, 结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 质粒纯化试剂盒购于德国 Qiagen 公司; *EcoR* I、ssDNA、tRNA 购于美国 Sigma 公司; DNA polymerase I、人 cot-DNA、SSPE 购于美国 Invitrogen 公司; Spectrum Green-dUTP 购于美国 Abbott Molecular 公司; PromoFluor-555-dUTP 购于美国 PromoKine 公司; 进口探针购于美国 Vysis 公司。Axioimager Z2 型荧光显微镜为德国 Carl Zeiss 公司产品; ThermoBrite 原位杂交仪为美国 Abbott Molecular 公司产品。

1.1.2 标本来源 选择在本院就诊的血液病患者骨髓样本。

基金项目: 国家自然科学基金 (81400150、81370598); 天津市科委项目 (14ZCDZSY00176); 江苏省科技型企业技术创新资金 (BC2015057); 南京市 321 人才计划; 协和青年科研基金资助; 中央高校基本科研业务费专项资金 (3332016090); 科技支撑重大疾病防治专项 (09ZCZDSF03800)

作者单位: 300020 天津, 中国医学科学院北京协和医学院血液病医院血液学研究所实验血液学国家重点实验室 (孙江漫、胡林萍、程涛、缪为民), 血液病理中心 (李承文); 211100 南京福隆特医疗科技有限公司 (陆宏卿、薛卫霞)

通信作者: 缪为民, Email: miaowm@hotmail.com

收稿日期: 2016-09-30

1.2 方法

1.2.1 制片过程 取骨髓样本，用 0.075 mol/L KCl 低渗去除红细胞，细胞甩片后用甲醇室温固定过夜，第 2 天用 2% 甲醛固定 5 min 后，储存于 -20 ℃ 70% 乙醇中，使用时依次在 70%、85%、100% 梯度乙醇中脱水，晾干后 FISH 检测备用。

1.2.2 探针设计 使用 UCSC Genome Bioinformatics 数据库定位检索细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 克隆^[6]。选择定位于 11q23 包含 *MLL* 基因断裂点 5' 端的 BAC 克隆重叠群 (图 1，包括 3 个 BAC 克隆)，将该 BAC 克隆群标记绿色荧光素作为 5' 端探针；选择定位于 *MLL* 基因断裂点 3' 端的 BAC 克隆群 (图 1，包括 2 个 BAC 克隆)，将 BAC 克隆群标记红色荧光素作为 3' 端探针 (表 1)。质粒纯化试剂盒分离提取 BAC 的 DNA，然后用 *EcoR* I 酶切。用缺口平移法以荧光素 Spectrum Green-dUTP、PromoFluo-555-dUTP 标记 DNA，乙醇沉淀，最后溶于杂交缓冲液。

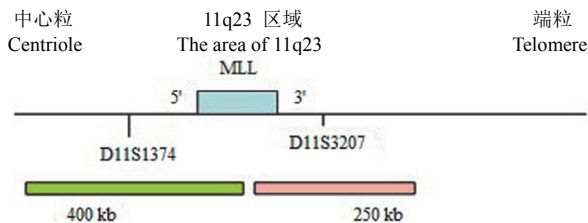


图 1 *MLL* 基因位于染色体 11q23 (绿色长条表示包含 *MLL* 基因断裂点 5' 的 BAC 克隆重叠群，包含 STS 标志 D11S1374，长度达 400 kb；红色长条表示包含 *MLL* 基因断裂点 3' 的 BAC 克隆重叠群，包含 STS 标志 D11S3207，长度达 250 kb)

Figure 1 *MLL* gene is located at chromosome 11q23 (The green strip shows BAC clone contigs located on the 5' side of the break point of the *MLL* gene which includes D11S1374 marker and the length is 400 kb; The red strip shows BAC clone contigs located on the 3' side of the break point of the *MLL* gene which includes D11S3207 marker and the length is 250 kb)

表 1 探针制备及使用 BAC 克隆编码

Table 1 Probe preparation and BAC clone coding

基因	Gene	染色体	Chromosome	克隆编码	Clone coding
<i>MLL</i> 5'		11q23		MLL-R1、MLL-R2、MLL-R7	
<i>MLL</i> 3'		11q23		MLL-R4、MLL-R9	

注：克隆编码为本实验室自编。

Note: The clone coding was made by our laboratory.

1.2.3 FISH 检测 取制备好的骨髓片加入探针，加盖盖玻片，用封片胶封片后 85 ℃ 变性 5 min，47 ℃ 杂交 24 h。47 ℃ 核酸杂交缓冲液 SSPE 洗涤 5 min。55 ℃ 洗涤 10 min，梯度乙醇中脱水后加 DAPI 复染细胞核，加 Zeiss 盖玻片，荧光显微镜下观察，拍照。

1.2.4 图像采集及 FISH 信号的判断 用 Axioimager Z2 型荧光显微镜，在 DAPI 图像下选择视野，定位，记录图像采集位置。分别于 Spectrum Green 和 Cy3™ v1 滤光片下观察间期细胞荧光杂交信号。于 63 倍油镜下在 DAPI、Spectrum Green、Cy3™ v1 通道中采集细胞核和 2 种荧光素的原始图像，软件分析合成最后的分类图像，照相记录。采用 AxioVisionRel.4.8 软件分析测量图像，评估探针杂交情况^[7]。每张玻片选择 10 个区域拍照，每个通道分别测量 200 个以上细胞的平均荧光强度和背景强度。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 Graphpad prism5 软件进行统计学分析，组间比较用 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 将荧光素标记的 BAC 探针和已知 *MLL* 基因正常的白血病细胞杂交

将绿色荧光素 Spectrum Green 标记的 5' 探针和红色荧光素 PromoFluo-555 标记的 3' 探针混合，和 *MLL* 基因正常的白血病细胞进行杂交，可以检出 2 个黄色的融合信号 (红绿色信号融合显示黄色)，提示该白血病细胞 2 个 *MLL* 基因拷贝均没有发生断裂 (图 2)。

2.2 自制探针和进口探针用于检测同一例已知白血病 *MLL* 染色体易位阳性的样本

结果显示自制探针 (图 3) 和进口探针 (图 4) 均可检出一个独立的红色信号和一个独立的绿色信号，以及 1 个红色和绿色融合信号 (黄色)，结果提示，该患者含有一个正常的 *MLL* 基因拷贝，另一个拷贝的 *MLL* 基因发生了断裂 (图 3)。

2.3 自制和进口 FISH 探针的对比研究

通过双盲法检测了 40 例临床血液病门诊样本，结果显示自制和进口 FISH 探针均检测到其中相同的 7 例 *MLL* 基因断裂 (易位) 阳性的样本，两者阴、阳性检测结果完全相符。在 Spectrum Green

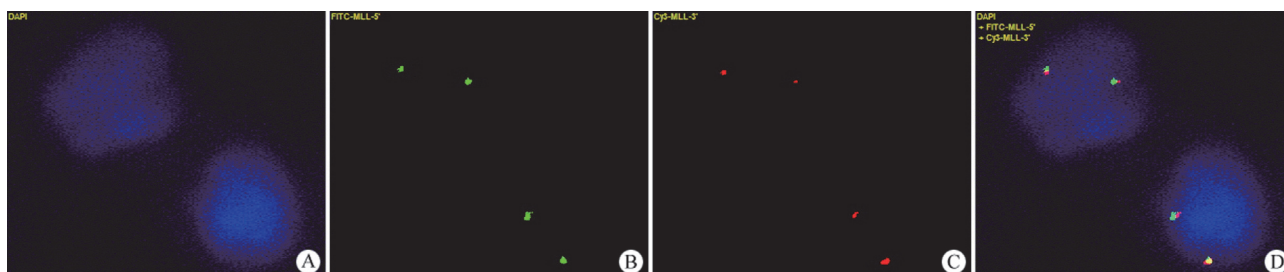


图 2 将标记绿色荧光素的 5' 探针和标记红色荧光素的 3' 探针和已知 *MLL* 基因正常的白血病细胞进行杂交, 可以检出 2 个黄色的融合信号 (红绿色信号融合显示黄色) (A: 细胞核; B: *MLL* 基因 5' 端绿色荧光信号; C: *MLL* 基因 3' 端红色信号; D: *MLL* 基因正常的黄色融合信号)

Figure 2 The 5' probe labeled with green fluorescein and the 3' probe labeled red fluorescein were hybridized with a leukemia sample containing a normal *MLL* gene revealed two yellow fusion signals (red-green signal fusion displays as yellow colour) (A: Nucleus; B: The green fluorescent signal of the 5' side of *MLL* gene; C: The red fluorescent signal of the 3' side of *MLL* gene; D: The yellow fusion signal of the normal *MLL* gene)

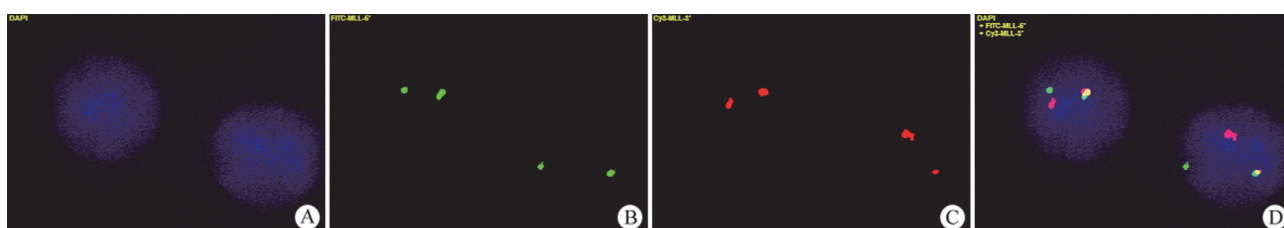


图 3 自制探针检测一例已知 *MLL* 染色体易位阳性的患者骨髓样本 (5' 探针标记成绿色, 3' 探针标记成红色; 该患者含有一个正常的 *MLL* 基因拷贝, 另一个拷贝的 *MLL* 基因发生了断裂) (A: 细胞核; B: *MLL* 基因 5' 端绿色荧光信号; C: *MLL* 基因 3' 端红色信号; D: *MLL* 染色体异位 FISH 杂交检出 1 个独立的红色信号, 1 个独立的绿色信号, 1 个红绿融合信号)

Figure 3 The self-developed *MLL* probes were used to detect a patient bone marrow sample with a known *MLL* translocation (The 5' and 3' FISH probes were labeled with red and green fluorophores respectively; The results suggested that the patient contains a normal copy and a broken copy of *MLL* gene) (A: Nucleus; B: The green fluorescent signal of the 5' side of *MLL* gene; C: The red fluorescent signal of the 3' side of *MLL* gene; D: FISH hybridization displayed a separate red signal, a separate green signal, a red and green fusion signal of the translocated *MLL* gene)

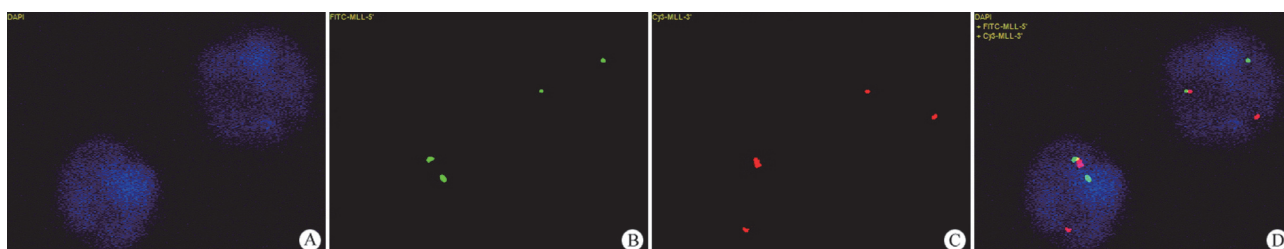


图 4 进口探针检测同一例已知 *MLL* 染色体易位阳性的患者骨髓样本 (5' 探针标记成绿色, 3' 探针标记成红色; 该患者含有一个正常的 *MLL* 基因拷贝, 另一个拷贝的 *MLL* 基因发生了断裂) (A: 细胞核; B: *MLL* 基因 5' 端绿色荧光信号; C: *MLL* 基因 3' 端红色信号; D: *MLL* 染色体异位 FISH 杂交检出 1 个独立的红色信号, 1 个独立的绿色信号, 1 个红绿融合信号)

Figure 4 The commercial imported FISH probes were used to detect a patient bone marrow sample with a known *MLL* translocation (The 5' and 3' FISH probes were labeled with red and green fluorophores respectively; The result suggested that the patient contains a normal copy and another broken copy of *MLL* gene) (A: Nucleus; B: The green fluorescent signal of the 5' side of *MLL* gene; C: The red fluorescent signal of the 3' side of *MLL* gene; D: FISH hybridization displayed a separate red signal, a separate green signal, a red and green fusion signal of the translocated *MLL* gene)

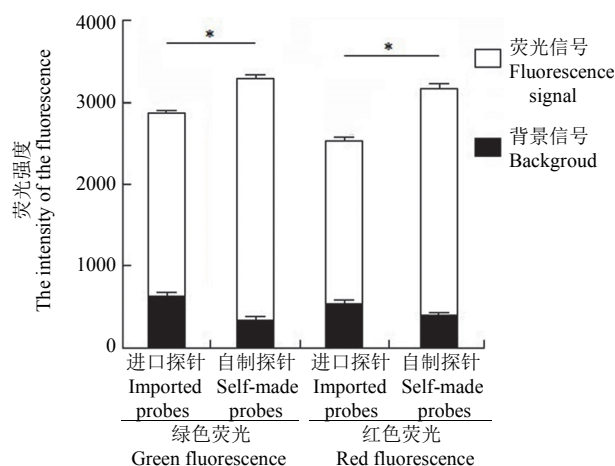


图 5 自制探针与进口探针在绿色通道和红色通道的信号平均荧光强度和背景强度比较(在绿色和红色荧光通道中自制探针信号的平均荧光强度比进口探针要高,背景强度要低,信噪比为进口探针的 2.4 倍和 1.9 倍, $P < 0.01$)

Figure 5 Comparison of average fluorescence intensity and background intensity of self-made and imported probes in green channel and red channel (The average fluorescence intensities of the self-made probes in both the green and red channels were higher, and the background intensities were lower than those of the imported probes, and the signal-to-noise ratios of our green and red fluorescence-labeled probes were 2.4 and 1.9 times those of the imported probes, $P < 0.01$)

和 Cy3™ v1 通道中,自制探针的平均荧光信号强度比进口探针明显提高(自制探针分别为: 2930.5 ± 38.00 , 2766 ± 59.54 ;进口探针分别为: 2239 ± 45.13 , 1986 ± 59.56 ; $P < 0.01$, 图 5),自制探针信噪比分别为进口探针的 2.4 倍和 1.9 倍(图 5)。

3 讨论

白血病是由各种不同的遗传变异引起的造血干祖细胞性疾病,具有很大的异质性。染色体重排引起的融合蛋白是引起白血病的重要发病机制,而且 *MLL* 基因重排在白血病的发生发展中扮演着相当重要的角色。近年来, FISH 对于检测白血病细胞中的染色体变异,如染色体重排、缺失、扩增等已成为一种金标准。因此, FISH 检验对于白血病等血液病的早期诊断、鉴别诊断、分子病理分型、预后及靶向治疗均具有重要的意义,已成为血液病理诊断中不可缺少的部分^[8-9]。

然而由于技术原因,我国血液病理 FISH 诊断主要依靠进口产品,进口产品不仅价格昂贵,而且购买需要复杂的程序,时间消耗长,因此难以满足国内众多患者的需求。此外,国内分子生物试剂公

司的 FISH 产品主要以检测实体肿瘤和遗传病为主,其获得 CFDA 批文的血液病 FISH 试剂盒种类较少。鉴于此种状况,作为国内较大的血液病专科医院和血液病研究所,我们很有必要自主开发高品质的国产血液病 FISH 系列产品。

本文自主设计 *MLL* 基因 FISH 探针,采用多个 BAC 克隆组成的克隆重叠群作为探针,大大提高了 FISH 杂交荧光信号的强度,同时我们在杂交缓冲液中加入 ssDNA、tRNA 和 cot-DNA 等试剂封闭基因组中的重复序列,使得非特异背景杂交信号显著下降,信噪比进一步提高,大幅度增强了 *MLL* 基因信号的强度及可视性。除了通过正常人二倍体成纤维细胞的验证,我们对本院 40 例临床血液病骨髓样本检测的结果显示,自制和进口 FISH 探针在检测 *MLL* 染色体断裂(易位)的结果是完全相符的。此外,由于荧光杂交信号强度跟所用探针的 DNA 片段长度有关,我们在设计中采用了多个 BAC 克隆重叠群组成的加长探针,提高了检测信号的强度。对比实验表明,自制试剂盒在各个荧光通道里信号的平均荧光强度较高,杂交的背景较低,拍照所需的曝光时间短,荧光信号衰减程度低,大大提高了 FISH 检测的效率和准确性,为白血病的诊断、分型、治疗和预后提供了更为可靠的依据。因此,自制试剂盒的各项技术指标均达到了国外同类产品的标准,而且其高信号强度和低信噪比的优势使之替代价格昂贵、进口繁琐的国外产品成为可能。

参考文献

- [1] Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ, et al. Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*, 1994, 84(2):570-573.
- [2] Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet*, 1998, 32:495-519.
- [3] Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 1998, 339(9):605-615.
- [4] Felix CA, Lange BJ. Leukemia in infants. *Oncologist*, 1999, 4(3): 225-240.
- [5] Heerema NA, Sather HN, Ge J. Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. *Leukemia*, 1999, 13(5):679-686.
- [6] O'Connor M, Peifer M, Bender W. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science*, 1989, 244(4910):1307-1312.
- [7] Zhang S, Shao Y, Hou G. QM-FISH analysis of the genes involved in the G1/S checkpoint signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Tumour Biol*, 2014, 35(3):1847-1854.

- [8] Hu L, Ru K, Zhang L, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomark Res*, 2014, 2(1):3.
- [9] Wertheim GB, Hexner E, Bagg A. Molecular-based classification of acute myeloid leukemia and its role in directing rational therapy: personalized medicine for profoundly promiscuous proliferations. *Mol Diagn Ther*, 2012, 16(6):357-369.

Development of FISH probes for detection of *MLL* gene breakage (translocation) in leukemia

SUN Jiang-man, HU Lin-ping, LI Cheng-wen, LU Hong-qing, XUE Wei-xia, CHENG Tao, MIAO Wei-min

【Abstract】

Objective In this work, we aim to develop the dual-colour FISH kit for detecting *MLL* gene chromosomal translocation, one of common genomic aberrations in certain type of leukemia.

Methods Based on the chromosome and gene map, corresponding BAC clone contigs were selected as 5' and 3' FISH probes located on each side of the break point of the *MLL* gene. The 5' and 3' FISH probes were labeled with red and green fluorophores, respectively, by nick translation. The self-developed FISH kit and the commercial imported one were compared in terms of multiple technical parameters in the double blind study of 40 cases of clinical hematological samples.

Results The detection results were consistent between the self-developed FISH kit and the commercial imported one with regard to detecting *MLL* gene breakage. The self-developed probes showed stronger average fluorescence intensities in spectrum green and Cy3™ v1 channels (for the self-developed probes: 2930.5 ± 38.00 , 2766 ± 59.54 , respectively; for the commercial imported FISH probes: 2239 ± 45.13 , 1986 ± 59.56 ; $P < 0.01$, respectively). The signal noise ratios for the self-developed *MLL* probes were 2.4 and 1.9 times, respectively, of those respective imported probes.

Conclusions The self-developed *MLL* probes in this work have reasonable design and reliable quality. Furthermore, the self-developed probes have stronger fluorescence signal intensities and better signal noise ratios than the imported probes do. Thus, the FISH probes developed could serve as a domestic replacement for the expensive imported products.

【Key words】 Leukemia; Myeloid-lymphoid leukemia protein; Translocation, genetic; In situ hybridization, fluorescence; FISH probes

Author Affiliations: State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology (SUN Jiang-man, HU Lin-ping, CHENG Tao, MIAO Wei-min), Department of Pathology (LI Cheng-wen), Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 300020 Tianjin, China; Nanjing Fulongte Medical Technology Company, 211100 Nanjing, China (LU Hong-qing, XUE Wei-xia)

Corresponding Author: MIAO Wei-min, Email: miaowm@hotmail.com