

临床研究

优化的预包装式多探针荧光原位杂交技术可提高白血病细胞遗传学异常的检测效率

曹睿, 宋兰林, 吴福群, 廖立斌, 左媛, 刘晓力

南方医科大学南方医院血液科实验室, 广东 广州 510515

摘要:目的 探讨对预包装式多探针荧光原位杂交(FISH)技术进行优化在检测白血病细胞遗传学异常的意义。方法 141例初诊为ALL或AML/MDS的患者骨髓标本,行优化后的预包装式多探针FISH流程检测(在原始流程的基础上增加了调整细胞密度、蛋白酶消化步骤),其中35例行常规流程检测,对比优化前后对白血病细胞遗传学异常的检测成功率与阳性位点检出率。结果 对多探针FISH实验流程进行优化后,ALL的检测成功率由85.3%提高到100%,阳性位点检出率由5.1%提高到8.6%;AML/MDS的检测成功率由67.4%提高到99.8%,阳性位点检出率由3.5%提高到6.0%,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。结论 通过对常规预包装式多探针FISH系统检测流程进行优化,显著提高了白血病细胞遗传学异常的检测效率,增强了该技术的临床实用性。

关键词:多探针FISH;优化;细胞遗传学异常

中图分类号:R733.71 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)10-1457-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.10.016 <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20121012.2011.002.html>

Optimization of pre-coated multi-probe fluorescence *in situ* hybridization for cytogenetic detection of acute leukemia

CAO Rui, SONG Lanlin, WU Fuqun, LIAO Libin, ZUO Yuan, LIU Xiaoli

Hematology Laboratory, Department of Hematology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To optimize pre-coated multiple-probe fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to improve its efficiency in cytogenetic diagnosis of acute leukemia. **Methods** The original multiple-probe FISH techniques were optimized by adjusting the cell density and adding a process of protease digestion. Cytogenetic anomalies were detected in 141 patients with acute lymphocytic leukemia (ALL) or acute myeloid leukemia/ myelodysplastic syndromes (AML/MDS) using the modified technique, and 35 of the patients were also examined using the original technique. The successful detection rate and positive site detection rate were compared between the modified and original techniques. **Results** Modification of the pre-coated multiple-probe FISH technique resulted in a significant increase of the successful detection rate (from 85.3% to 100%) and the positive site detection rate (from 5.1% to 8.6%) in ALL patients; in AML/MDS patients, the successful detection rate was significantly improved from 67.4% to 99.8% and the positive site detection rate from 3.5% to 6.0% ($P<0.01$). **Conclusion** The modified pre-coated multiple-probe FISH technique can significantly increase the diagnostic efficiency of cytogenetic abnormalities in leukemic patients.

Key words: multiple-probe fluorescence *in situ* hybridization; optimization; cytogenetic abnormalities; leukemia

临床实验室现已广泛应用荧光原位杂交(FISH)技术检测白血病细胞遗传学异常。间期FISH适用于白血病患者的初诊与残留白血病的检测,是染色体检查的重要补充^[1-2]。目前临床上常用的单探针FISH检测一次只能检测一、二种遗传学异常,检测过程费时费力。而预包装式多探针系统是将多种特定探针预先包被在玻片上,检测时只需将滴有细胞悬液的载玻片和带有探针的样

品玻片叠加即可一次完成多个探针的上样过程,大大节约了检测的时间和劳动量。可针对不同疾病设计不同的多探针组合,不仅可以提供相对全面的遗传学信息,且检测成本和人工操作时间与常规单探针FISH检测一、二个位点相近,大大提高了检测效率并明显降低检测成本^[3]。

但是,在使用英国Cytocell公司提供的多探针FISH检测方法的过程中,经常随机出现1~2组探针信号质量不佳,导致无法进行判读。通过一段时间的摸索,我们对此方法进行了相应改进,以期能够对白血病的细胞遗传学异常进行更为行之有效的检测。

收稿日期:2012-05-18

基金项目:国家自然科学基金(81170521)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81170521).

作者简介:曹睿,主管技师,E-mail: zhujiangcaorui@163.com

通讯作者:刘晓力,教授,电话:020-61641611

1 材料和方法

1.1 病例选择

2008年3月~2010年10月我院门诊及住院初诊为ALL的患者89例,AML/MDS52例,诊断参照《血液病诊断及疗效标准》,分型按照FAB分型。

1.2 材料

预包装式多探针诊断系统购自英国Cytocell公司。

ALL预包装式多探针FISH组合包括MYC断裂基因、p16缺失、E2A/PBX1融合基因、MLL断裂基因、TEL/AML1融合基因、BCR/ABL融合基因、多倍体检测、IGH断裂基因8组探针。

AML/MDS预包装式多探针FISH组合包括AML1/ETO融合基因、PML/Rara融合基因、CBFB倒位、EGR1、7q-、20q-、MLL断裂基因、p53缺失8组探针。

1.3 方法

1.3.1 预包装式多探针FISH常规实验方法 (1)调整细胞悬液密度至60~70细胞/HP($\times 100$);(2)滴片;(3)定位;(4)变性;(5)杂交与冲洗;(6)DAPI复染;(7)荧光显微镜检查:在NikonE600荧光显微镜下通过三色滤光块(DAPI/TRITC/FITC)观察杂交信号,用Macprobe 4.0荧光图像处理系统(美国PSI公司)进行图像分析,每份间期核标本计数500个细胞,并记录杂交信号。

1.3.2 预包装式多探针FISH的实验方法的优化 主要增加2个实验步骤:(1)降低细胞密度:将原方法中滴片时的细胞悬液浓度由60~70细胞/HP($\times 100$)调整为20~30细胞/HP($\times 100$);(2)增加蛋白酶消化步骤:在原实验方法中滴片后增加一步蛋白酶消化,即用50 μg 胃蛋白酶(Sigma,USA)37 $^{\circ}\text{C}$ 消化4 min,2 \times SSC洗涤2 min $\times 2$ 。

1.4 统计学分析

统计软件使用SPSS 12.0。进行配对卡方检验比较实验方法改进前后的成功率和阳性率变化情况, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 多探针FISH系统实验流程优化前后的检测成功率比较

在ALL多探针FISH系统检测过程中,应用原实验流程检测17例标本共136个探针位点中,20个位点出现探针信号不佳,视为检测失败;应用优化流程检测89例标本共712个位点信号较为清楚,均可进行判读;二者之间差异具有统计学意义($P < 0.01$,表1)。

在AML/MDS多探针FISH系统检测过程中,应用原实验流程检测18例标本共144个探针位点中,47个位点出现探针信号不佳,视为检测失败;应用优化流程检测52例标本共416个位点中,1个位点信号不佳,无法进行判读,其余信号较为清楚,均可进行判读;二者之间

表1 多探针FISH技术优化前后的检测成功率比较

Tab.1 Success rate of multi-probe FISH before and after the technical optimization

	ALL		AML/MDS	
	原流程 (n=17)	优化流程 (n=89)	原流程 (n=18)	优化流程 (n=52)
检测位点数	136	712	144	416
检测成功位点数	116	712	97	415
检测成功率	85.3%	100%*	67.4%	99.8% [△]

*与ALL原始流程相比,优化流程检测成功率 $P=0.000$; [△]与AML/MDS原始流程相比,优化流程检测成功率 $P=0.000$

差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 多探针FISH系统实验流程优化前后的阳性位点检出率比较

以ALL的多探针FISH系统的原实验流程与优化实验流程进行检测,分别检测出阳性位点7个(共检测136个位点)与61个(共检测712个位点),阳性位点检出率分别为5.1%与8.6%,二者之间差异具有统计学意义($P < 0.01$);以AML/MDS的多探针FISH系统的原始实验流程与优化实验流程进行检测,分别检测出阳性位点4个(共检测144个位点)与25个(共检测416个位点),阳性位点检出率分别为3.5%与6.0%,二者之间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

细胞遗传学异常的检测在ALL、AML和MDS等恶性血液病的诊断和预后评估中占据着重要的地位,临床上已广泛使用FISH检测白血病的细胞遗传学异常^[4-5]。但单探针FISH一次只能检测一个目标位点,而ALL、MDS等疾病需要多个遗传位点的信息来对患者进行综合评估^[6-7],如MDS预后分级便至少包括5q-、7q-、20q-等位点^[8-9],儿童ALL危险度分组至少包括BCR/ABL、E2A/PBX1、MLL等位点^[10-11]。

八探针FISH技术检测可以一次性获得相关的多种遗传学信息。但我们在早期应用FISH开展对细胞遗传学异常进行检测的工作中,发现按英国Cytocell公司提供的官方实验流程所检测到的杂交信号不够稳定,体现在会随机出现几组探针信号不佳,无法进行判读,公司外籍专家亲自操作亦无法避免这种情况。分析既往实验结果,发现信号不佳情况在骨髓标本中的急性非淋巴细胞较外周血的淋巴细胞标本更为明显(成功率67.4% vs 85.35%),且骨髓标本的问题多表现为背景高,细胞上有云雾状物质覆盖,导致信号模糊难以判读(图1A),这种情况与石蜡组织标本FISH实验中蛋白酶消化不完全时表现相同^[12]。从样品类型考虑,可能由于骨髓标本中含有的胞浆和胞核蛋白较多,干扰了探针与基因组

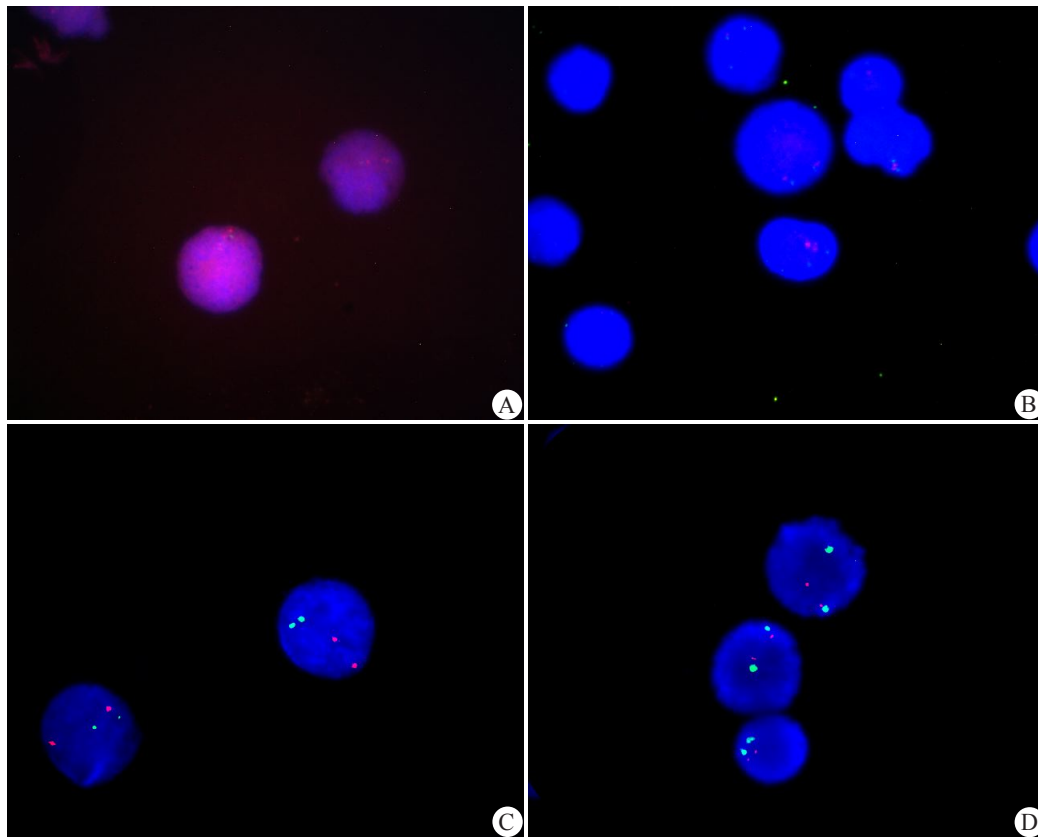


图1 多探针FISH实验流程优化前后效果图

A: 未以蛋白酶进行消化,密度为2个/视野; B: 以蛋白酶进行消化,密度8个/视野; C: 以蛋白酶进行消化,密度2个/视野;

D: 以蛋白酶进行消化,密度3个/视野

Fig.1 Image of multi-probe FISH before and after the optimization (Original magnification: $\times 100$).

表2 多探针FISH技术优化前后的阳性位点检出率比较

Tab.2 Positive site detection rate of multi-probe FISH before and after optimization

	ALL		AML/MDS	
	原始流程 (n=17)	优化流程 (n=89)	原始流程 (n=18)	优化流程 (n=52)
位点数	136	712	144	416
阳性位点数	7	61	4	25
阳性位点检出率	5.1%	8.6%*	3.5%	6.0% [△]

*与ALL原始流程相比,优化流程检测阳性率 $P=0.000$; [△]与AML/MDS原始流程相比,优化流程检测阳性率 $P=0.000$

DNA结合,致使探针信号不稳定^[13]。与实验室日常骨髓标本单探针FISH实验流程相比,Cytocell公司的官方实验流程并不包括胃蛋白酶消化步骤,而胃蛋白酶消化为去除标本中胞浆和胞核蛋白的重要环节^[14],因此我们尝试在官方流程基础上按单探针FISH实验方法加入蛋白酶消化步骤,发现信号背景明显降低(图1C),说明增加蛋白酶消化步骤对去除骨髓标本的胞浆和胞核蛋白有明显作用,可有效增强骨髓标本的实验质量。

ALL多探针组合出现高背景情况较少,而信号缺失情况较为明显,表现为视野中有部分细胞无论阴性信

号还是阳性信号均缺失,且不属于该探针异常信号范围,不对应已知遗传学异常,因此无法纳入统计^[15]。无信号细胞的DAPI染色效果良好,不像是细胞质量差导致的无信号,推测可能是由于细胞密度过高,超出预包被探针结合能力。传统单探针FISH先将细胞悬液滴到玻片上进行老化再加探针,可以用显微镜观察玻片上细胞的密度来加以调整,探针的量也可手动调节,保证覆盖到整个盖玻片区域。而Cytocell公司的多探针组合为预包被式,探针数量已固定,但官方说明书却并未详细规定细胞样本的数量或浓度,只提及可根据结果进行调整。因此玻片上细胞过密将导致探针相对密度降低,杂交效率下降,从而导致部分细胞出现信号缺失。由于Cytocell公司并未给出预包被探针数量的详细说明,无法与平时单探针FISH的实验方法直接对比,只有根据经验设置不同浓度进行平行比较,发现将细胞密度控制在20~30细胞/HP时信号缺失情况不再发生,以此密度为基础的后续89例实验成功率为100%,与过去的85.3%相比有了明显改进。

综上所述,多探针FISH组合虽然具有方便经济的特点,但Cytocell公司的官方实验流程存在缺陷,在实际工作中结果质量不如单探针FISH。本实验室通过分

析实验结果,结合单探针 FISH 实验流程和石蜡组织 FISH 实验流程图 1 多探针 FISH 实验流程优化前后效果图中的经验,通过增加控制细胞密度、胃蛋白酶消化两个步骤,成功的提高了多探针 FISH 技术的检测成功率与阳性位点检出率,增加了该技术在临床的应用的可靠性,为病人的细胞遗传学分型提供更为全面和可靠的信息。

参考文献:

- [1] Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence *in situ* hybridization technique [J]. *Biotechniques*, 2008, 45(4): 385-6.
- [2] Han Y, Xue Y, Zhang J, et al. Translocation (14; 14)(q11; q32) with simultaneous involvement of the IGH and CEBPE genes in B-lineage acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008, 187(2): 125-9.
- [3] Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, et al. Guidance for fluorescence *in situ* hybridization testing in hematologic disorders[J]. *J Mol Diagn*, 2007, 9(2): 134-43.
- [4] Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2009, 144(2): 147-56.
- [5] Wan TS, So CC, Hui KC, et al. Diagnostic utility of dual fusion PML/RARalpha translocation DNA probe (D-FISH) in acute promyelocytic leukemia[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(4): 799-805.
- [6] 左媛,杜庆锋,李荣,等.八探针间期荧光原位杂交技术联合染色体核型分析比较成人与儿童急性淋巴细胞白血病患者的细胞遗传学差异[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(5): 707-9.
- [7] Coleman JF, Theil KS, Tubbs RR, et al. Diagnostic yield of bone marrow and peripheral blood FISH panel testing in clinically suspected myelodysplastic syndromes and/or acute myeloid leukemia: a prospective analysis of 433 cases[J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 135(6): 915-20.
- [8] Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(19): 1872-85.
- [9] 高超,李志刚,赵玮,等.儿童急性淋巴细胞白血病e2a-pbx1融合基因的表达水平与临床特点、早期治疗反应的相关性[J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 73(3): 569-73.
- [10] Dawson AJ, Bal S, Mctavish B, et al. Inversion and deletion of 16q22 defined by array CGH, FISH, and RT-PCR in a patient with AML[J]. *Cancer Genet*, 2011, 204(6): 344-7.
- [11] Tirado CA, Valdez F, Klesse L, et al. Acute myeloid leukemia with inv(16) with CBFβ-MYH11, 3'CBFβ deletion, variant t(9;22) with BCR-ABL1, and del(7)(q22q32) in a pediatric patient: case report and literature review [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 200(1): 54-9.
- [12] Tojo M, Perez-Becerra R, Vazquez-Boquete A, et al. Looking for ferns: optimization of digestion pretreatment in fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique on paraffin-embedded tissues [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2008, 17(1): 59-63.
- [13] Keyvanfar K, Weed J, Swamy P, et al. Interphase chromosome Flow-FISH[J]. *Blood*, 2012, 121(11): 2233-6.
- [14] Morrissette JJ, Bagg A. Acute myeloid leukemia: conventional cytogenetics, FISH, and molecuolocentric methodologies [J]. *Clin Lab Med*, 2011, 31(4): 659-86.
- [15] Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia[J]. *Blood Rev*, 2004, 18(2): 115-36.

(编辑:吴锦雅)

(上接1456页)

- deuterium-depleted water on cultured cell growth[J]. *Rom J Physiol*, 2004, 41(1-2): 53-67.
- [27] Krempels K, Somlyai I, Somlyai G. A retrospective evaluation of the effects of deuterium depleted water consumption on 4 patients with brain metastases from lung cancer[J]. *Cancer Ther*, 2008, 7(3): 172-81.
 - [28] Turusov VS, siniak IuE, Grigor'ev AI, et al. Low-deuterium water effect on transplantable tumors[J]. *Vopr Onkol*, 2005, 51(1): 99-102.
 - [29] Tyrysov VS, Siniak IuE, Antoshina EE, et al. The effect of preliminary administration of water with reduced deuterium content on the growth of transplantable tumors in mice[J]. *Vopr Onkol*, 2006, 52(1): 59-62.
 - [30] 丛峰松,张亚茹,石中瑗,等.低氘水对肺癌细胞增殖的抑制作用及可能的机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(5): 485-9.
 - [31] White KO, Watkins WR, Bruce CW, et al. Water vapor continuum absorption in the 3.5-4.0-microm region [J]. *Appl Opt*, 1978, 17(17): 2711-20.
 - [32] Haulică I, Peculea M, Ștefănescu I, et al. Effects of heavy and deuterium-depleted water on vascular reactivity[J]. *Rom J Physiol*, 1998, 35(1-2): 25-32.
 - [33] Bild W, Ștefănescu I, Haulică I, et al. Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water[J]. *Rom J Physiol*, 1999, 36(3-4): 205-18.
 - [34] Bild W, Năstăsă V, Haulică I. In vivo and in vitro research on the biological effects of deuterium-depleted water: influence of deuterium-depleted water on cultured cell growth [J]. *Rom J Physiol*, 2004, 41(1-2): 53-67.
 - [35] Gyöngyi Z, Somlyai G. Deuterium depletion can decrease the expression of C-myc Ha-ras and p53 gene in carcinogen-treated mice[J]. *In Vivo*, 14(3): 437-9.

(编辑:陈望忠)