

·标准与讨论·

血液病分子生物学诊断技术中国专家共识(2013 年版)

中华医学会血液学分会实验诊断血液学学组

The consensus of Chinese experts on molecular biological technology of blood disease diagnosis Hematology Society of Chinese Medical Association, Laboratory Diagnosis Group

Corresponding author: WANG Jian-min. Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University Shanghai 200433, China. Email: jmwang@medmail.com.cn

分子生物学诊断技术已广泛应用于血液系统疾病的诊断分型、疗效评估、预后判断及个体化治疗的各个领域。其技术平台中包括诸多实验手段,如定性和定量 PCR、基因扫描、基因芯片及基因测序等方法,而且结果易受标本采集、标本保存、核酸提取、PCR 扩增、试剂和仪器质量等许多因素的影响。因此,为了完善和规范血液病分子生物学诊断技术的各个环节,进一步提高我国血液病分子生物学诊断技术的水平,中华医学会血液学分会实验诊断血液学学组组织有关专家在系统复习文献的基础上结合我国实际情况,经过反复讨论,形成了本共识,供从事血液病分子诊断的实验室参考,为今后在全国范围内推广分子生物学诊断技术的标准化奠定基础。

一、血液病分子生物学检测前的规范和质量控制

血液病分子生物学检测前的规范和质量控制的主要内容:保证检测项目开展的科学合理以及检测申请、标本采集、运送和保存等方面的规范。

(一)血液病分子生物学检测项目

1. 依据 WHO(2008)分型标准,选取对疾病诊治和预后判断有重要价值的检测项目。

(1)白血病融合基因:急性髓系白血病(AML):AML-ETO、PML-RAR α 、CBF β -MYH11、MLL-AF9 融合基因。急性淋巴细胞白血病(ALL):TEL-AML、E2A-PBX1、BCR-ABL、MLL-AF4 融合基因。慢性髓性白血病(CML):BCR-ABL 融合基因。

(2)基因突变:骨髓增殖性肿瘤检测 JAK2 基因第 12、14 外显子基因突变。AML 检测 NPM1(第 12 外显子)基因突变、FLT3-ITD(第 14-15 外显子)基因突变、CEBP α (全部外显子)基因突变、c-KIT(第 17 外显子)基因突变多见于 AML-M₂ 患者,c-KIT(第 8 外显子)基因突变多见于 AML-M₄ 患者。CML 和 Ph⁺ALL 发生耐药时检测 ABL 激酶区基因突变。

2. 依据已有国内外文献,对疾病诊治和预后判断有一定指导意义的项目,各个单位可根据患者的具体情况自行选择。

(1)急性白血病累及 MLL 基因可检测 MLL-AF4、MLL-AF6、MLL-AF9、MLL-AF10、MLL-ENL 等融合基因。

(2)AML 检测 DNMT3A、IDH1 和 IDH2、RUNX1 基因突变的热点区域。

(3)ALL 检测 TP53 和 NOTCH1 基因突变,IgH/TCR 受体基因重排。

(4)骨髓增生异常综合征(MDS)检测 ASXL1、RUNX1、TP53、EZH2 基因突变。

(5)淋巴瘤检测 IgH/TCR 受体基因重排。

(6)慢性淋巴细胞白血病(CLL)检测 IgHV 突变、TP53、IgH/TCR 受体基因重排。

(7)多发性骨髓瘤(MM)检测 IgH、 κ 、 λ 基因克隆性重排。

(二)血液病分子生物学检测的申请

1. 申请单的基本信息包括姓名、性别、年龄、门诊/住院号、标本类型、采样日期、临床诊断、患者联系电话和地址、检测项目、申请或送检医院、申请人和联系电话、申请日期、收样日期、收样人。

2. 申请单注明标本采集要求:初诊患者在治疗前留取标本;外周血白细胞计数正常的患者,抽取 2~4 ml 骨髓或 5~8 ml 外周血,若白细胞计数升高或偏低,相应调整标本采集量(有核细胞总数要达到 5×10^6 以上)。

(三)血液病分子生物学检测标本的接收、运送和保存

1. 抗凝剂要求:首选 EDTA-K3 抗凝剂或枸橼酸钠抗凝剂,不用肝素抗凝剂。

2. 样本来源:骨髓细胞、外周血细胞、骨髓活检、唾液或口腔黏膜标本;对 CML 患者可抽取外周血或骨髓,淋巴瘤和 MM 患者可采用分选后的细胞悬液。

3. 样本的接收:实验室收到标本后需核对标本是否符合要求,核对标本和申请单的信息是否一致,并登记编号。对于信息不一致、凝血、细胞数少等影响检测结果的不合格标本,收样人需及时联系患者或申请人,退回标本或重新送检,并注明退回标本原因并签字。

4. 标本保存和运输:外周血和骨髓标本抽取至 EDTA 抗凝管混匀后 4℃ 储存和运输,骨髓细胞也可存放于 RPMI 1640 培养基。待提取 RNA 的样本需在抽取后的 24 h 内分离出有核细胞并加入 TRIzol,置 -20℃ 保存后尽快送检,推荐在 24 h 内送检。

5. 实验耗材的处理及 RNase 污染的控制:在临床标本

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.07.022

基金项目:卫生公益性行业科研专项(201202017)

通信作者:王健民,Email:jmwang@medmail.com.cn

和实验环境中可能存在大量降解 RNA 作用的 RNase,经高压灭菌的一次性使用的塑料制品如试管和离心管等基本上无 RNase,可以不经预处理直接用于制备和贮存 RNA。

二、血液病分子生物学检测中的规范和质量控制

1. 核酸抽提: DNA 纯度要求吸光度(A_{260}/A_{280})比值在 1.7~1.9。总 RNA 纯度要求 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0。

2. 内参:定性 PCR 检测的内参推荐 GAPDH 或 β -actin 基因。定量 PCR 的内参推荐 ABL 基因,并需采用高拷贝到低拷贝的 5 个浓度制备标准曲线。

3. 室内质控:每批实验需设立阳性和阴性质控,阳性质控可选择细胞株或检测过的阳性样本;阴性质控包括原阴性标本或检测过的阴性标本,以及仅含扩增反应混合液的空白对照管。

4. 室间质控:可根据实验室开展的检测项目参加相应的室间质控,如 BCR-ABL 融合基因的室间质评。

5. 实验结果的判断和复核:

(1) 定性报告:阳性和阴性。

(2) 定量报告:目的基因和内参基因的拷贝数及比值。

(3) 图文报告:各实验室可自行选择,如有图文报告需明确标注是否存在点突变和缺失突变位点、插入或缺失长度、重复序列等内容。

(4) 结果复核:实验原始结果需双人复核,不同实验方法之间结果的审核需要有经验的高年资技术人员承担。

6. 样本的保存:检测后样本在保存时需注明样本编号及姓名, DNA 及 RNA 标本冻存于 $-40\sim -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱长期保存,并有样本保存的记录和登记。

三、血液病分子生物学检测后的规范和质量控制

1. 检测报告单的规范:

(1) 应包括申请单中的基本信息:姓名、性别、年龄、门诊/住院号、标本类型、临床诊断、原始编号、样本编号、采样日期、收样日期、检测日期、收样人、申请人、送检医院。

(2) 注明实验方法:如定性 PCR、定量 PCR、基因测序、基因扫描、基因芯片等方法。

(3) 标注引物参照序列和参比数据库的名称或出处。

(4) 实验结果的报告:包括实验数据、实验结果的解释、备注及建议。

(5) 报告单签名:检测者、复核者、报告者、报告日期。

(6) 实验室信息:实验室的名称、联系方式。

2. 文件的归档和原始数据的保存:

(1) 纸质文件归档:包括样本登记表、实验流程表、室内质控表、申请单、实验原始数据和报告单。

(2) 电子文件归档:包括原始数据和报告单的备份,异地备份至固定电脑保存。

3. 实验试剂的质量控制:

(1) 试剂收样的规范:在试剂登记表中记录所有试剂到货日期、试剂批号、有效期、收样人、并需贴上未质控的标识。试剂经过质控后在试剂登记表中填上质控时间和技术人员姓名,并贴上试剂已质控的标识。技术人员在打开质控

过的试剂使用时,要标注打开试剂的时间和技术人员姓名。

(2) 商品化试剂的质量控制:实验室在收到的每一种商品化试剂都需要质控,同一种试剂更换批号后需要重新进行质控,同一个批号试剂到货时间不同也需要进行质控。试剂质控的样本量可根据实验室检测样本的数量酌情制定。

(3) 实验室自配试剂推荐使用的质控方法:购买的通用试剂可集中统一进行质控,如 Taq 酶、缓冲液、dNTP 等;对于合成的引物,可以采用阳性标本和阴性标本进行质控。试剂质控后需分装、存储并标记管号,在规定时间内使用完毕(可每月进行重复性检测至失效期)。

4. 实验仪器的质量控制:

(1) 仪器的维护:包括 PCR 仪、离心机、测序仪、芯片仪等仪器日常维护,需要每天、每周、每月、每年进行相应的维护,并有维护记录。

(2) 仪器的校正:PCR 扩增仪需每半年进行温度校正,包括 PCR 扩增仪的升温 and 降温及孔间温度差异的评价;离心机需每半年进行速度和温度校正;移液枪需每半年进行精确度校正;温度计和秒表需每半年进行精确度校正;测序仪和芯片仪需每年进行光谱校正;天平、生物安全柜、超净工作台需每年进行维护和校正。可由专职维修工程师进行仪器的维护和校正。

5. 参照卫生部(或省)临床基因扩增实验室防止实验室交叉污染和生物安全的规范和要求,以下建议供实验室参考。

(1) 合理的实验室设置,包括试剂准备间、样品制备间、加样间、扩增间、扩增后区域、电泳间、仪器间等。

(2) 每周完成检测后定期进行紫外线消毒,并有消毒记录。

(3) 实验室废弃物按医疗垃圾统一处理。

(4) 各种化学挥发性和有毒试剂统一存放于生物安全柜。

(5) 每月检查一次实验室内部污染的擦拭实验,并有文件记录。

(执笔:何军、秦亚濤)

(主审:王健民、周剑峰)

参加共识讨论的专家(排列不分先后):中国医学科学院血液病医院(王建祥、肖志坚、李庆华);第二军医大学长海医院(王健民、宋献民、程辉);上海交通大学医学院附属瑞金医院(赵维莅、蒋春雷、陈冰);北京大学人民医院(刘开彦、秦亚濤);南京医科大学第一附属医院(李建勇、张苏江);华中科技大学附属同济医院(周剑峰、肖敏);第二军医大学长征医院(侯健);苏州大学附属第一医院(何军、沈宏杰、岑建农);第四军医大学附属西京医院(陈协群);天津医科大学总医院(邵宗鸿);福建医科大学附属协和医院(黄慧芳);河北燕达医院陆道培血液·肿瘤中心(刘红星);贵阳医学院附属医院(王季石);中国医学科学院北京协和医院(赵永强);南方医科大学南方医院(徐兵);北京大学第一医院血液室(朱平);吉林大学医学院第一附属医院(崔久嵬);哈尔滨血液肿瘤研究所(邱林);上海交通大学医学院附属仁济医院(陈芳源)

附件一:实时定量PCR检测常见白血病特异性融合mRNA水平标准操作规程

1. 有核细胞分离:

裂解法获得有核细胞:将骨髓或外周血标本加入25 ml红细胞裂解液(0.144 mol/L NH_4Cl , 0.01 mol/L NH_4HCO_3)中,混匀,室温连续旋转振荡或静止放置10 min,期间吹吸混匀。500×g离心5 min。若裂解不完全再重复1次。再用10 ml的PBS洗涤细胞1次。

分层法分离单个核细胞:用PBS稀释骨髓或外周血标本,小心加至相对密度为1.077 g/L的淋巴细胞分离液中(体积比,PBS:标本<1:1,稀释标本:分离液<2:1),500×g室温离心20 min,小心吸取单个核细胞层,加入PBS至10 ml吹吸混匀,500×g离心5 min弃上清,再加10 ml的PBS洗涤1次细胞。

2. RNA提取:按照RNA提取试剂说明进行。常用试剂如TRIzol,操作步骤如下。

(1) 1.5 ml的EP管中放入约 1×10^7 的细胞,弹起后加入1 ml的TRIzol彻底吹吸均匀,再加入200 μl 氯仿溶液,上下彻底振荡混匀,放置2~3 min后4℃12 000×g离心15 min。

(2) 小心吸取上层水相至预冷的600 μl 异丙醇中,上下颠倒混匀。-20℃过夜或室温放置15 min沉淀RNA。4℃12 000×g离心15 min,可见白色的RNA沉淀。弃上清,加入1 ml的80%乙醇溶液洗涤RNA,7500×g离心5 min。

(3) 弃掉乙醇溶液,晾干RNA,然后加入适量DEPC处理的去离子水溶解RNA,测浓度及 A_{260}/A_{280} 比值。

3. 逆转录合成cDNA:

(1) 制备逆转录公共体系,主要成分包括逆转录酶(常用MMLV逆转录酶)及相应缓冲液、引物(常用随机六聚体引物)、dNTPs和RNA酶抑制剂。根据选用的产品说明书配制公共体系并分装。

(2) 将溶解的RNA于65℃变性5 min,冰浴5 min。

(3) 向分装的公共体系中分别加入RNA(1~2 μg RNA/10 μl 体系)。

(4) 按照选用的产品说明设置反应条件,完成逆转录过程。

4. 扩增:

(1) 标准曲线的制作

①制备内参基因ABL质粒标准品:采用上游引物5'-CCTTCAGCGGCCACTAGC-3'和下游引物:5'-GGACACAG-GCCCATGGTAC-3'扩增1份人外周血标本,将PCR产物分别插入PGEM-T质粒载体中,经过细菌转化、筛选、鉴定、扩增,提取DNA,获得ABL质粒标准品。对于目的基因的质粒标准品,设计一对位于该基因实时定量PCR所用上下游引物外侧的引物扩增阳性标本,制备方法同上。

②根据浓度计算质粒拷贝数,利用质粒稀释液10倍系列稀释,用于制作ABL及各种目的基因的标准曲线。标准曲

线的制作包括6个点: 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 各1管, 1×10^2 做2个平行管。合格的标准曲线的相关系数应介于0.997~1.000,斜率介于-3.30~-3.59。

(2) 制备实时定量PCR反应体系:每份反应体系为20 μl ,主要成分包括DNA聚合酶及其缓冲液、dNTPs、上游引物0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、下游引物0.3 $\mu\text{mol/L}$ 和TaqMan探针0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。根据选用的产品说明书配制公共体系并分装,再加入cDNA 2 μl 。每批扩增均同时包括目的基因及ABL阳性对照、阴性对照以及质粒标准品的扩增。

(3) 实时定量PCR条件:50℃2 min,1个循环;95℃10 min,1个循环;95℃15 s,62℃1 min,40个循环。

(4) 分析结果:根据标准曲线分别计算出各份标本ABL及目的基因的拷贝数。每份标本的目的基因及ABL均需做平行管或进行两次扩增,拷贝数取两次结果的平均值。若两次结果差异较大,还需做第3次扩增。

5. 计算比值:目的基因mRNA水平(%)=(目的基因拷贝数/ABL拷贝数)×100%。

6. 其他问题的处理:本方案检测各型融合基因mRNA均针对典型类型,而它们往往有变异型存在,如CML患者除了典型的P₂₁₀ BCR-ABL之外,还有P₂₃₀ BCR-ABL、P₁₉₀ BCR-ABL及其他变异类型,因此若实时定量PCR未检测出而临床或其他检测结果提示存在该融合基因,应进一步采用扩增较大片段及包含少见类型的定性PCR进行检测,并结合测序方法,以确定是否存在少见类型。

7. 常见融合基因mRNA水平检测所用引物及探针序列见表1。

附件二:基因测序方法检测ABL激酶区基因突变标准操作规程

1. 有核细胞分离、RNA提取和逆转录合成cDNA:方法同上。

2. 采用PCR-直接测序法检测ABL激酶区突变:检测要求以患者cDNA为模板,扩增包括ABL激酶区的BCR-ABL融合基因和总ABL激酶区,同时检测ABL激酶区突变。扩增反应:10×PCR缓冲液2 μl ,2.5 mmol/L Mg^{2+} 0.8 μl ,10 mmol/L dNTP 1 μl ,10 pmol/L上、下游引物各0.5 μl ,Hotstar Taq 0.15 μl ,cDNA模板4 μl ,补足双蒸水至20 μl 。95℃10 min;94℃30 s,58℃30 s,72℃2.5 min,40个循环;72℃10 min;10℃恒温保存。同时扩增ABL阳性对照(有条件者可做一高突变比例和一低突变比例阳性对照)和阴性对照。PCR产物进行电泳鉴定。

3. 消化反应:5 μl PCR产物加入2 μl 虾碱酶消化,振荡混匀后:37℃30 min,80℃15 min,4℃保存。

4. 测序反应:取2 μl 消化PCR产物,3 μl 双蒸水,4 μl BigDye(注:BigDye原液稀释倍数不得超过8倍),10 pmol/L测序引物1 μl ,共10 μl 进行测序反应,94℃30 s,50℃30 s,72℃2 min,25个循环。

5. 纯化和上机:测序反应产物加入2 μl 醋酸钠/EDTA

表 1 常见融合基因 mRNA 水平检测所用引物及探针序列

基因	引物名称	引物序列(5'-3')
ABL	上游引物 ENF1003	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
	下游引物 ENR1063	GATCTAGTTCGTTGGGACCCA
	探针 ENPr1043	CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCAAT
	P210 型:上游引物	CCGCTGACCATCAATAAGGAA
	P190 型:上游引物 ENF402	CTGGCCCAACGATGGCGA
BCR-ABL	P210 型:下游引物	CTCAGACCCCTGAGGCTCAAAGT
	P190 型:下游引物 ENR561	CACTCAGACCCCTGAGGCTCAA
	P210 和 P190 型:探针	AGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCT
	上游引物 ENF701	CACCTACCAAGAGCCATCAAA
AML1-ETO	下游引物 ENR761	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT
	探针 ENPr747	AACCTCGAAATCGTACTGAGAAGCACTCCA
	S 型:上游引物 ENF905	CCGATGGCTTCGACGAGTT
	V 型:上游引物 ENF906	ACCTGGATGGACCGCCTAG
PML-RARA	L 型:上游引物 ENF903	TCTTCCTGCCCCAACAGCAA
	下游引物 ENR962	GCTTGTAGATGCGGGGTAGAG
	探针 ENPr942	AGTGCCAGCCCTCCCTCGC
	上游引物 ENF803	CATTAGCACAACAGGCCTTTGA
CBFβ-MYH11	下游引物 ENR862	AGGGCCCGCTTGGACTT
	探针 ENPr843	TCGCGTCTCCTTCTCCGAGCCT

注:所有探针均为 TaqMan 探针,荧光标记为 5' FAM, 3'TAMRA

缓冲液、25 μl 无水乙醇,2000×g 离心、10 s,振荡混匀 2 min 后室温 2000×g 离心 30 min。弃上清,沉淀加入 45 μl 80% 乙醇,室温 2000×g 离心 5 min。弃上清,室温干燥 1 min 后加入 10 μl 高度去离子甲酰胺,95 ℃ 2 min 热激活后上 ABI 3730 测序仪测序。

6. 实验结果判断和分析标准:

(1) 推荐 SeqScape 软件协同 Sequence analysis 软件分析结果:背景荧光强度在平均荧光信号强度的 5% 以内时,突变峰达到平均荧光信号强度 20% 以上,且对正反向测序结果一致的基因点突变或缺失突变方可确定为基因突变。插入或缺失突变要求解码明确突变位点及插入或缺失长度。

(2) 背景荧光强度大于平均荧光信号的 5% 则判断为结

果信号差,需重新进行 PCR 扩增检测。

7. 可能存在问题的处理:

(1) PCR 扩增无条带:排除试剂原因后考虑标本是否肝素超标,可把标本进一步稀释后进行 PCR 扩增。

(2) 对于 ABL 激酶区突变检测到罕见位点 BCR-ABL 融合基因或转录本异常缺失突变从而影响缺失部分序列突变判断的患者,应在报告中注明,并要求随访。

(3) PCR 反应一轮完成且反应循环次数不得超过 40 次,两轮及两轮以上 PCR 会造成非特异性条带增多。

(收稿日期:2013-05-12)

(本文编辑:王叶青)

本刊编辑部人员联系方式

董文革:022-23909100, Email: dongwg@sina.com

徐丽娟:022-23909421, Email: xlj592002@sina.com

王叶青:022-23909421, Email: wangyeqing74@163.com

李梅:022-23909350, Email: meili702@sina.com

刘志红:022-23909350, Email: xzliu63@163.com

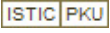
徐茂强:022-23909430, Email: xu_mao2013@sina.com

刘爽:022-23909430, Email: liuyjdqshuang@163.com

编辑部传真:022-27304167, Email: cnblood82@163.com

网址: <http://www.hematoline.com>

血液病分子生物学诊断技术中国专家共识(2013年版)

作者: [中华医学会血液学分会实验诊断血液学学组, Hematology Society of Chinese Medical Association,](#)
作者单位:
刊名: [中华血液学杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Hematology](#)
年, 卷(期): 2013, 34(7)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhxyx201307022.aspx