

# 人髓过氧化物酶基因cDNA克隆及急性 白血病髓过氧化物酶基因的表达

朱元晓 赖春宁 王建安 汲言山 王槐春 白炎

(军事医学科学院基础所, 北京 100850)

应用PCR技术和DNA重组技术从HL-60细胞中克隆人髓过氧化物酶(MPO)轻链和部分重链基因cDNA片段,经核酸序列分析确证克隆片段全长769bp。将克隆的MPO cDNA片段作为探针,对一组白血病细胞系和急性白血病病例样本细胞的mRNA进行Northern印迹和点印迹分析,结果显示,MPO基因表达产物与急性白血病的粒细胞源性相关,因而它可作为白血病分型中确定细胞源性的重要标志。

**关键词** 人髓过氧化物酶; cDNA克隆; 白血病

髓过氧化物酶(MPO)是粒细胞胞浆中特有的糖蛋白颗粒,也是临床上诊断急性粒细胞白血病的重要标志。根据FAB分型标准,当骨髓涂片中MPO组化染色阳性的幼稚细胞数大于3%时,即可诊断为急粒。但临床上存在部分MPO组化染色阴性的急粒,部分是因肿瘤细胞胞浆中MPO颗粒太小,不足以被光镜分辨出来,还有一些病例细胞中的MPO缺乏活性<sup>[1,2]</sup>。

近来一组研究结果表明,对急性白血病MPO基因转录产物的分析,有助于识别一些MPO组化染色阴性的粒系白血病<sup>[3]</sup>。本研究首先应用反转录-PCR技术从HL-60细胞中克隆人MPO cDNA片段,再以此作为探针,对急性白血病MPO基因的表达,进行了初步分析和研究。

## 材料与方 法

### (一) 材料

异硫氰酸胍(Sigma公司); RNA逆转录酶(Promega公司); PCR kit(CE-TUS); T7 sequencing kit(Pharmacia

公司); 随机引物标记kit(Promega公司);  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP(福瑞公司)。

### (二) 方法

1. 引物设计: 根据Johnson等1987年发表的人MPO基因cDNA序列<sup>[4]</sup>, 选择MPO轻链N端基因(665bp处)和重链中间的编码基因(1433bp)分别为两侧引物的起始端,使欲扩增片段长度为769bp,左右引物全长均为28mer,两端分别设有EcoRI和Hind III切点,此对引物经PCR设计软件程序检索,均符合PCR引物设计原则<sup>[5]</sup>。

Right primer 5'CCCAAGCTTGTGCTCCCGAAGAAAG-AGG 3'

left primer 5'TGGAATTCCGGAGCAGGACAAATACCG-C 3'

引物采用固相法在DNA合成仪上合成,并经高压液相分离纯化。

2. HL-60细胞总RNA提取: 用AGPC方法提取HL-60细胞总RNA<sup>[6]</sup>,

本文于1991年10月14日收到。

本工作承蒙沈倍奋教授帮助,在此表示衷心感谢。

经分光光度计测定和琼脂糖电泳分析确定 RNA 浓度, 纯度和完整性。

3. 反转录-PCR 扩增 MPO 基因 cDNA: 将 20 $\mu$ g HL-60 细胞总 RNA 溶于 20 $\mu$ l 双蒸水中, 于 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min, 冰浴 3min, 依次加入 4 $\mu$ l 10 $\times$  逆转录酶缓冲液, 4 $\mu$ l 2.5mmol/L dNTP, 2 $\mu$ l RNA 酶抑制物(Rnasin, 10u/ $\mu$ l), 0.4 $\mu$ g 双侧引物(各 4 $\mu$ l), 20u 逆转录酶(2 $\mu$ l), 42 $^{\circ}$ C 作用 1h。用 40 $\mu$ l 双蒸水稀释反应物, 取 10  $\mu$ l 直接进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 50 $\mu$ l, 其中加双侧引物各 0.3 $\mu$ g, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 100s, 55 $^{\circ}$ C 100s, 72 $^{\circ}$ C 100s, 共 30 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min, 取 5 $\mu$ l 反应物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

4. 扩增片段纯化及 pMPO769 重组质粒的构建: 将扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 将含阳性条带的胶条放入透析袋中电泳回收, 用足量的 EcoR I 和 Hind III 分别消化扩增片段和 pUC19 载体各 2 $\mu$ g, 再按文献方法进行连接、转化和阳性克隆筛选<sup>[7]</sup>。

5. 双脱氧核苷酸随机终止法测定 DNA 顺序<sup>[8]</sup>: 将 PCR 扩增片段克隆至 M13mp19 RF' DNA 上, 提取重组单链, 再按 T7 Sequencing kit 说明书进行测序。

6. 急性白血病的 MPO 基因表达检测: 选用临床血液学检查确诊的急性白血病骨髓样本, 经淋巴细胞分离液分离出单个核细胞, 部分细胞用于形态、组化和免疫表型分析, 另一些细胞经提取出总 RNA 后, 再与 <sup>32</sup>P 标记的 MPO 基因 cDNA 探针进行 Northern 印迹杂交和狭缝印迹杂交分析<sup>[7]</sup>。

## 结 果

(一) PCR 扩增产物的电泳分析结果  
由 HL-60 细胞 RNA 经反转录后,

再经 PCR 扩增出来的产物, 在电泳胶上显示出单一清晰的条带, 分子量在 872bp 至 603bp 之间, 与原设计产物大小基本相符。未经反转录过程直接用 PCR 扩增的 HL-60 细胞 RNA 的对照组, 未出现合成条带, 仅有引物二聚体带, 表明实验组扩增产物由 mRNA 反转录后扩增而来 (Fig.1)。



图 1 PCR 扩增产物的电泳分析  
Fig.1 Electrophoresis analysis of PCR amplified product

1.  $\phi$   $\times$  174 DNA-Hae III as marker
2. The PCR amplified product of the reverse transcript of mRNA from HL-60 cells
3. Control: the PCR amp lified product of HL-60 cell mRNA without reverse transcription

## (二) pMPO769 重组质粒的初步鉴定

本研究在含 X-gal 的 LB 培养基上, 挑选白色菌落, 快速抽提其质粒并经凝胶电泳检测其大小。结果发现一分子量较大的质粒, 经 EcoR I 和 Hind III 完全酶解。该质粒被切成两条带, 一条与 pUC19 载体大小相符, 另一条与 PCR 扩增产物大小相同 (Fig.2)。此结果提示, PCR 扩增

出来的片段两端具有 EcoR I 和 Hind III 酶切位点，此片段被克隆在 pUC19 载体相应的切点上。

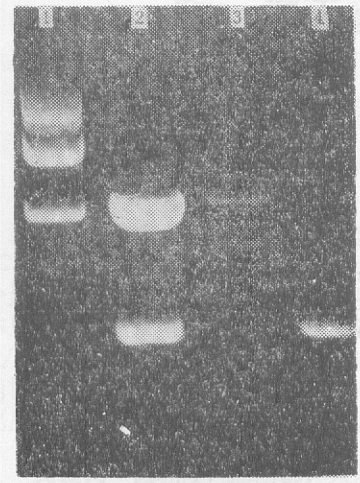


图 2 pMPO769经EcoR I 和Hind III 酶切后的电泳分析

- Fig.2 Electrophoresis analysis of pMPO769 digested with EcoR I and Hind III
1. Recombinant plasmid, pMPO769
  2. pMPO769 digested with EcoR I and Hind III
  3.  $\phi$ X174 DNA-Hae III as marker
  4. The segment amplified by PCR

### (三) PCR扩增片段的核酸测序结果

本研究采用双脱氧核苷酸随机终止法对 4 个不同插入方向的重组 M13mp19 单链模板进行测序。结果发现，被测出的序列相当于欲扩增片段中 (665bp—1433bp) 675bp—997bp 和 1139bp—1432bp，两段序列中的碱基序列与发表的人 MPO cDNA 中相应片段的序列无任何差异。

### (四) 急性白血病的 MPO 基因表达

Northern 印迹分析结果显示，HL-60 细胞和 AML 细胞表达 3.0—3.5kb MPO 基因转录产物，淋巴白血病细胞系则无 MPO 基因表达。对不同类型 ( $M_1$ — $M_5$ ) 急非淋白血病样本 RNA 的狭缝印迹分析结果表明， $M_3$  型 AML 表达 MPO 基因

水平最高， $M_2$  次之， $M_1$ 、 $M_4$  较低， $M_5$  则检测不到。对 22 例急性淋巴细胞白血病样本的狭缝印迹分析结果显示，大多数病例无 MPO 基因表达，少数病例显示弱阳性 (Fig.3)

## 讨 论

本研究主要探讨了 MPO 基因表达与各型急性白血病的相互关系。Northern 杂交显示，粒系白血病细胞表达 3.0—3.5kb 的 MPO 基因 mRNA 产物，而淋巴白血病细胞系则不表达 MPO 基因的 mRNA。对各型急非淋和急性淋巴细胞白血病的狭缝点印迹杂交结果进一步证实，MPO 基因表达与粒细胞源性白血病相关。MPO 基因在各型急性髓系白血病细胞中的表达水平，表明 MPO 基因的表达与髓系白血病的类型和分化水平相关。上述结果与 Zaki 等人的报道相似 [3]，只是他们在

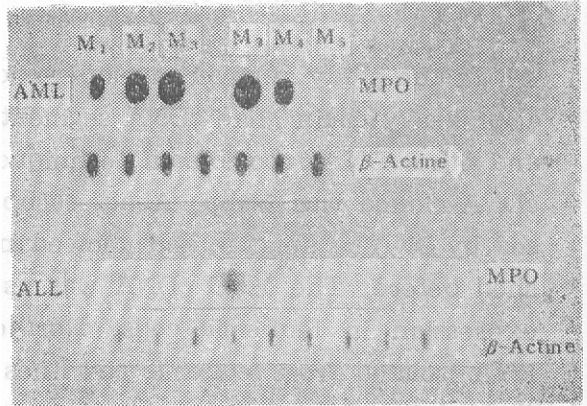


图 3 MPO 基因在人白血病细胞中表达的狭缝印迹分析

Fig.3 Slot blot analysis of MPO gene expression in human leukemic cells AML: acute myeloid leukemia, which is classified into  $M_1$ — $M_4$  according to FAB criteria, ALL: acute lymphoid leukemia. Same quantity of sample RNA hybridized to  $\beta$ -actin probe, to demonstrate activity and equal loading of mRNA

M<sub>5</sub>型白血病细胞中仍检出少量MPO基因产物,这可能与双方观察的病例数和检测手段的敏感度不同有关。Ferrari等人曾报道少数淋巴白血病细胞高度表达MPO基因mRNA产物<sup>[9]</sup>,但本研究中仅有个

别急淋病例样本出现弱阳性,经分析后认为,这可能由骨髓中少量正常粒细胞所致,因为当急淋病人骨髓中肿瘤细胞比例大于80%时,出现弱阳性的机率随之减少。

### 参 考 文 献

- [1] Vainchenker, W. et al.: *Leukemia*, 2:224, 1988.
- [2] Zaki, S. R. et al.: *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 50:283, 1989.
- [3] Zaki, S. R. et al.: *Blood*, 74:2096, 1989.
- [4] Johnson, K. R. et al.: *Nucleic Res.*, 15:2013, 1987.
- [5] 王槐春等: *生物化学杂志*, 8:342, 1992.
- [6] Chomczynski, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 162:156, 1987.
- [7] Maniatis, T. et al.: In *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, SCH. USA, 1982.
- [8] Tabor, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:4767.
- [9] Ferrari, S. et al.: *Blood*, 72:873, 1988.

## Human Myeloperoxidase Gene cDNA Cloning and Expression in Acute leukemia

Zhu Yuanxiao Lai Chunni Wang jianan Ji Yanshan

Wang Huaichun Bai Yan

(Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850)

In the study, human myeloperoxidase (MPO) light chain and partial of heavy chain gene cDNA segment was molecularly cloned with PCR and other DNA recombinant techniques from HL-60 cells. The size of cDNA cloned was 769bp. About 600bp of the cDNA segment was analysed by DNA sequencing and showed no any differences from that published before. The MPO cDNA was used as a probe to study MPO gene expression in leukemic cells. Northern blot and slot blot analysis of RNA isolated from leukemic cell lines and blast cells of acute leukemia showed that MPO gene expression correlated with myeloid lineage and might be serve as a marker for subclassification of acute leukemia.

**Key words** MPO; cDNA cloning; leukemia