

Brief report

Improvement of the positivity of B- and T-cell lymphoma by the use of multiple primers in a polymerase chain reaction with formalin-fixed paraffin-embedded tissues

Nagaoka Central Hospital, Department of pathology, Genetic laboratory

Toshihiko Ikarashi

In the genetic diagnosis of both B-cell lymphoma and T-cell one by the polymerase chain reaction (PCR) using formalin fixation paraffin-embedded tissue (FFPE) the improvement of the positive rate could be obtained by increasing types of the primers to use in PCR, which we reported in this paper.

The polymerase chain reaction (PCR) method was applied into formalin-fixed paraffin-embedded tissues for pathological diagnosis of lymphoma for 20 years in our laboratory, but there remained its low positive rate with the use of only one primer set on each PCR study (1). In B-cell lymphoma the semi-nested PCR was very well done with the primers of Framework three (Fr3) within the variable (V) segment for an upstream consensus primer and LJH within the joining (J) region for an outer downstream one and VLJH within the J region for inner downstream one. In T-cell lymphoma the ordinary PCR was performed with both TV γ as an upstream consensus primer of T-cell receptor- γ (TCR- γ) gene and TJ γ as a downstream one.

Because the rearranged locus was various in a genetic chromosome, it was important to improve the accuracy of detection of the rearranged locus by an amplification with multiple primers. Multiplex PCR amplification using multiple primers was, therefore, very useful method to resolve the above problem.

Based on the original paper of Stanek, B cell lymphoma was analyzed with 27 primer sets, grouped into 5 PCR groups (5 testing tubes) (2,3) : A group consisted 6 sets and their final products were 310-360 bp, B group ; 7 sets and 250-295 bp, C group ; 7 sets and 100-170 bp, D group ; 6 sets and 110-290 bp and 390-40 bp, E group ; one set and 100-130 bp. F group ; Positive control bands ; 96, 199, 299, 399, and 608 bp.

On the other hand, T cell lymphoma was studied on TCR- β , - γ , and - δ . The primers for TCR- β consisted of 3 groups : A group had 207 sets and their final products were 249-262 base pairs (bp), B group ; 92 sets and 254-263 bp, C group ; 26 sets and 304-311 bp or 189-193 bp. The primers for TCR- γ consisted of 2 groups ; A group had 4 sets and their final products were 164, 190, 216, and 242 bp, B group ; 4 sets and 96, 122, 179, 205 bp. The primers for TCR- δ consisted of one group ; 24 sets and 162-247 bp.

The reaction conditions were same as original

reports except the number of amplification cycles in TCR : the number of original cycles as 35 times was altered into 43 ones. The electropherographic bands of PCR final product were trace at 35 cycles, various at 40 ones, and bright at 45 ones. 43 cycles was chosen to decrease false positive bands.

Key words : improvement of the positivity, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, multiple primers, multiplex, polymerase chain reaction (PCR), formalin-fixed paraffin-embedded tissues (FFPE), IgHVDJ, TCR- α , TCR- γ , TCR- δ

References

1. Ikarashi T et al. Detection of monoclonality in B- and T-cell lymphoma by the use of polymerase chain reaction of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Niigata-ken Koseiren Med J 2000 ; 10 : 10-5.
2. Stanek L et al. Our experiences with B cell clonality analysis using multiplex PCR amplification in paraffin-embedded tissue. <https://www.degruyter.com/download-pdf/j/acm.2014.14.issue-1/acm-2014-0001/acm-2014-0001.pdf>
3. van Dongen JJM et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2004 ; 17 : 2257-317. https://www.researchgate.net/publication/8962239_Design_and_standardization_of_PCR_primers_and_protocols_for_detection_of_clonal_immunoglobulin_and_T-cell_receptor_gene_recombinations_in_suspect_lymphoproliferations_Report_of_the_BIOMED-2_Concerted

和 文 抄 録

短報

ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) に複数の (multiplex) プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による B 細胞と T 細胞リンパ腫の遺伝子診断の陽性率の改善

長岡中央病院、病理部、遺伝子検査室

いからしとしひこ
五十嵐俊彦

我々は20年間にわたり、FFPE 検体のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 方法により、リンパ腫の病理診断を実施してきた。しかし、従来の PCR 検査は B、T リンパ球に対して各 1 つのプライマーだけを用いており、その陽性率の改善が問題となっていた。すなわち、従来、B 細胞リンパ腫では、semi-nest 式 2 段階 PCR により、IgH の VDJ 領域の 1 種類のプライマーセットを使用していた。T 細胞リンパ腫では、同様の 2 段階 PCR で、TCR γ の VJ 領域の 1 種類のプライマーセットを使用していた。

再編成された遺伝子座が染色体上の位置で多様であり、プライマー数を複数にして、再編成部分を確実に増幅検出することが診断精度を改善する上で重要である。故に、複数のプライマーを使用している Multiplex PCR 増幅手法は役立つ方法である。

原著論文に基づいて、B 細胞リンパ腫は 27 組のプライマーセットを 6 本 (5 本は検索用、1 本は陽性対照用) に分注して増幅分析された。T 細胞リンパ腫は TCR- γ のみでなく TCR- β 、 γ 、 δ の 3 種類に増やして検討し、357 組のプライマーセットを 6 本に分注して増幅分析された。TCR- β 検討は 3 本で、325 組のプライマーセットが使用された。TCR- γ 検討は 2 本で、8 組のプライマーセットが使用された。TCR- δ 検討は 1 本で、24 組のプライマーセットが使用された。

当施設保存の陽性対照試料を使って妥当性を確認した。その結果、PCR 増幅条件は原著論文と同一で良いが、唯一 TCR の PCR 増幅条件に関して、43 サイクルに変更した方が良好であった。

キーワード：B 細胞リンパ腫、T 細胞性リンパ腫、複数のプライマー (マルチプレックス) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE)、IgHVDJ、TCR- α 、TCR- γ 、TCR- δ 、検出率の改善