

实时荧光等位基因特异性扩增法快速检测 *K-ras* 癌基因点突变

朱德斌, 邢 达, 李 贤, 张 岚

(华南师范大学激光生命科学研究所以, 激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631)

摘要 将荧光定量 PCR 技术与等位基因特异性扩增 (Allele specific amplification, ASA) 方法相结合, 发展了一种可以快速检测基因点突变的实时荧光等位基因特异性扩增 (Real-time ASA) 方法. 将该法用于检测 *K-ras* 癌基因第 12 位密码子发生的点突变, 分别采用针对其不同点突变方式 (GAT, GTT, CGT) 设计的突变型引物对待测样品进行 ASA, 只有突变型样品能被顺利扩增出双链 DNA 产物, 该产物才能与双链 DNA 染料 SYBR Green I 结合, 发出荧光信号从而被检测到. 用该法检测 31 例结肠癌组织中的 *K-ras* 癌基因点突变, 其中有 15 例样品检出为突变型. Real-time ASA 法可检测到样品中含量为 1/1000 的突变型基因, 具有灵敏、快速、简便、安全、高通量和低成本等优点, 可望用于大量临床样本的点突变筛查.

关键词 实时荧光等位基因特异性扩增; 点突变; *K-ras* 癌基因; 结肠癌

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)06-1031-04

目前, 基因点突变检测已成为分子生物学领域中的一个重要课题, 并已普遍应用于基础性研究和临床研究^[1,2]. 传统的基因突变检测方法, 如限制性片段长度多态性、变性梯度凝胶电泳、单链构象多态性和等位基因特异性扩增 (Allele-specific amplification, ASA) 等, 大多数需要利用琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离野生型 DNA 分子和突变型 DNA 分子, 操作复杂, 费时费力, 需要使用放射性元素或溴化乙锭等有害物质, 且不符合自动化分析的要求, 具有一定的局限性^[3,4].

近年来发展起来的实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR) 技术以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点已成为了分子生物学研究中的重要工具^[5]. 目前, 荧光探针是荧光定量 PCR 中最常用的基因突变检测工具, 但其价格昂贵, 且一对探针只能对应检测一种突变类型, 通用性不强, 导致其使用成本较高.

双链 DNA 染料 SYBR Green I 相对于荧光探针而言, 具有价格便宜、通用性强等优点^[6]. ASA 技术是利用在 DNA 延伸过程中, 3'末端碱基的特殊重要性所设计的扩增技术: 当引物 3'末端碱基与模板链互补时, 引物延伸, 扩增出双链 DNA 产物; 否则无双链 DNA 产物产生. 根据此原理设计不同的正链引物就可以检测出突变基因, 并可鉴定出基因突变的类型^[7].

现有的研究结果已经证明 *K-ras* 癌基因点突变是人类肿瘤中可以频繁检测到的癌基因激活现象之一, 其在胰腺癌中的发生率最高 (约为 90%); 在结肠癌和肺腺癌中的发生率约为 50%. 其中, 第 12 位密码子是其发生突变的热点位置, 检测该点突变对恶性肿瘤的诊断、手术愈后监测等具有重要的临床价值^[8,9].

本文将 SYBR Green I 的通用性和 ASA 的高特异性相结合, 提出一种可快速检测基因点突变的实时荧光 ASA (real-time ASA) 法, 并将其用于 *K-ras* 癌基因第 12 位密码子的点突变检测, 希望发展一种快速、简便、安全、高通量及低成本的基因点突变检测方法.

收稿日期: 2006-06-22.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 30600128, 30670507, 30470494)、广东省自然科学基金 (批准号: 015012, 04010394) 和广东省科技计划 (批准号: 2004B10401011) 资助.

联系人简介: 邢 达 (1957 年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事高灵敏度生物单分子检测以及快速基因诊断研究.

E-mail: xingda@senu.edu.cn

1 实验部分

1.1 材 料

SW480 人结肠腺癌细胞系购于中国典型培养物保藏中心, 该细胞系中 *K-ras* 癌基因第 12 位密码子为 GTT 突变型. 293 人胚肾细胞系购于中山医科大学实验动物中心. 31 例石蜡包埋的结肠癌组织受赠于暨南大学医学院. UNIQ-10 柱式临床样品基因组抽提试剂盒购于上海生物工程公司. LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I 试剂盒购于罗氏诊断产品(上海)有限公司.

分别针对 *K-ras* 癌基因第 12 位密码子的野生型 (GGT) 及常见的几种突变类型 (GAT, GTT, CGT) 进行引物设计, 其序列分别为 $R_1 = 5'-GTGGTAGTTGGAGCTCG-3'$, $R_2 = 5'-GTGGTAGTTGGAGCTCA-3'$, $R_3 = 5'-TGTGCTAGTTGGAGCTCT-3'$, $R_4 = 5'-GTGGTAGTTGGAGCAC-3'$, $R_5 = 5'-TTGTTGGATCATATTCGT-3'$. 其中, 带下划线的碱基为错配碱基. 配对方式为 $R_1 \sim R_5$ 及 $R_2 \sim R_5$ 分别扩增出野生型 (GGT) 及 GAT 突变型基因, 扩增片段皆为 88 bp; $R_3 \sim R_5$ 扩增出 GTT 突变型基因, 扩增片段为 89 bp; $R_4 \sim R_5$ 扩增出 CGT 突变型基因, 扩增片段为 88 bp.

1.2 等位基因特异性扩增

基因组 DNA 的抽提参照 UNIQ-10 柱式临床样品基因组抽提试剂盒操作手册进行. 分别采用不同配对方式的引物对对待测样品进行 ASA, 程序设置如下: 于 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 45 循环. 以 SW480 基因组 DNA 为模板扩增的样品为阳性对照, 以模板被纯水替换的扩增样品为阴性对照. 样品采用 LightCycler 荧光定量 PCR 仪(罗氏, 德国)进行扩增, 反应体系为 10 μ L.

1.3 溶解曲线分析

从 95 °C 起, 以 20.0 °C/s 的速度降温至 65 °C; 在 65 °C 孵育 15 s 后, 以 0.1 °C/s 的速度升温至 95 °C.

1.4 不同稀释比例的样品检测

以 1:1 至 1:1000 的摩尔比依次将 SW480 DNA (GTT 突变型) 稀释至 293 DNA (野生型) 中, 以不同浓度稀释比例的混合 DNA 为模板进行 ASA.

2 结果与讨论

2.1 *K-ras* 基因点突变检测灵敏度

图 1 为采用不同稀释比例的 SW480 DNA 为模板进行实时荧光 ASA 的产物溶解曲线. 由图 1 可见, 随着 SW480 DNA 稀释比例从 1:1 下降到 1:1000, 其扩增产物依次减少. 表明采用该法可以检测到样品中含量为 1/1000 的突变型基因.

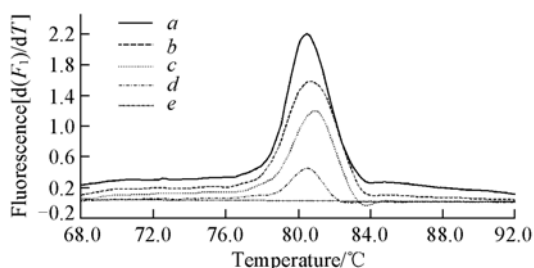


Fig. 1 Serial dilution experiment showing the sensitivity of the real-time ASA assay

DNA from cell line SW480, which harbors a homozygous *K-ras* codon 12 mutation (G12V), was diluted into DNA from 293 cell line containing wild-type (WT) *K-ras*. As a negative control, the template DNA was replaced with PCR-grade water. w (SW480) : w (293DNA) : a . 1:1; b . 1:10; c . 1:100; d . 1:1000; e . negative control (water).

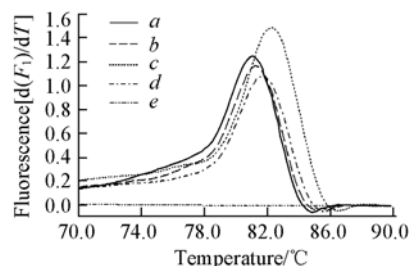


Fig. 2 Representative melting curves for *K-ras* mutation analysis

The results show the GAT (G12D), GTT (G12V), and CGT (G12R) mutation of *K-ras* gene. a . Patient with GAT mutation; b . patient with GTT mutation; c . patient with CGT mutation; d . negative control (293); e . negative control (water).

2.2 结肠癌组织中 *K-ras* 癌基因点突变分析

采用实时荧光 ASA 法对 31 例结肠癌样品中的 *K-ras* 癌基因第 12 位密码子进行点突变分析, 结果显示: 有 8 例样本检出为 GAT 突变型, 5 例为 GTT 突变型, 2 例为 CGT 突变型, 点突变检测阳性率为 48.4%。该结果与采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析结果相一致。

图 2 给出了 GAT, GTT 和 CGT 3 种不同突变型样品的溶解曲线。图 3 给出了 8 例 GAT 突变型样品的琼脂糖凝胶电泳分析结果。

ASA 可以高选择性地扩增某一特定等位基因, 因此常被用于区分不同的基因型样品。然而, 在设计用于扩增 *K-ras* 突变型等位基因引物时, 发现在采用突变型引物进行扩增时, 野生型样品仍然能被部分扩增。因此, 在等位基因特异性引物的 3' 端倒数第二个碱基处引入了一个错配碱基来减少引物与模板退火时的稳定性, 从而大大提高了扩增的特异性, 取得了良好的扩增效果。

采用实时荧光 ASA 对 31 例结肠癌样品中 *K-ras* 癌基因进行点突变分析, 只须在加样时打开一次盖子, 其后的过程完全是闭管操作, 不需要 PCR 后处理, 即可得出与琼脂糖凝胶电泳分析相一致的结果(图 3)。

与基于凝胶电泳分析的传统方法相比, 实时荧光 ASA 不需要用到对人体有害的溴化乙锭等染色剂, 不需要经过复杂的制胶、点样、电泳、溴化乙锭染色和采用紫外光观察结果等繁杂、费时的操作步骤, 从而大大地减少了污染和假阳性的几率。检测时, 仅需向毛细管中加入待测样品和反应试剂, 整个分析过程均由仪器完成, 有效缩短了检测时间, 总体检测时间小于 1 h。此外, 双链 DNA 染料 SYBR Green I 相对于荧光探针而言, 具有价格便宜、通用性强等优点; 且 10 μ L 的小反应体系也大大节约了样品和试剂, 从而进一步降低了检测成本。

采用实时荧光 ASA 法对 *K-ras* 基因进行点突变分析, 可以检测出样品中含量极低的点突变(突变型模板占野生型模板量的 1/1000), 表明该方法可以应用于检测临床样品中微量的点突变, 其进一步发展有可能用于直接从粪便样品中检测结肠上皮组织所脱落的微量癌细胞, 从而实现结肠癌的早期无损伤检测。

该方法具有快速、简便、灵敏、安全、高通量、低成本等优点, 可望用于对大量临床样本进行点突变筛查。

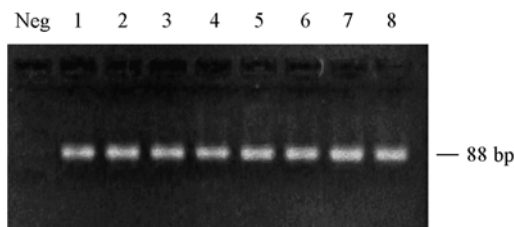


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis analysis result of *K-ras* point mutation

The result shows eight cases of GAT(G12D) mutation.

参 考 文 献

- [1] Zhu D., Xing D., Shen X., *et al.* Biosens. Bioelectron. [J], 2004, **20**(3): 448—453
- [2] Zhu D., Xing D., Shen X., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 2004, **324**(2): 964—969
- [3] Zhu D., Xing D., Shen X., *et al.* Chinese Science Bulletin [J], 2003, **48**(16): 1741—1744
- [4] ZHU De-Bin(朱德斌), XING Da(邢达), SHEN Xing-Yan(沈行燕), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2005, **26**(7): 1248—1251
- [5] HAN Jun-Ying(韩俊英), ZENG Rui-Ping(曾瑞萍). Foreign Medical Sciences: Genetics(国外医学遗传学分册) [J], 2000, **23**(3): 117—120
- [6] Zhu D., Xing D., Li X., *et al.* Chinese Chemical Letters [J], 2006, **17**(4): 499—501
- [7] YIN Wen-Xuan(殷文璇), LIU De-Pei(刘德培), LI Zhu-Hong(李竹红), *et al.* Prog. Biochem. Biophys. (生物化学与生物物理进展) [J], 2000, **27**(5): 553—555
- [8] CAI Jun(蔡军), ZHU Li-Wei(朱理玮), ZHANG Jing-Yu(张镜宇), *et al.* Chinese Journal of Clinical Oncology(中国肿瘤临床) [J], 1997, **24**(11): 823—826
- [9] LIU Xun-Liang(刘训良), DAI Cun-Cai(戴存才), DU Jing-Hui(杜竞辉), *et al.* Chin. J. Exp. Surg. (中华实验外科杂志) [J], 1997, **14**(2): 126—127

Rapid Detection of *K-ras* Oncogene Point Mutation by Real-time Fluorescence Allele-specific Amplification

ZHU De-Bin, XING Da^{*}, LI Xian, ZHANG Lan

(Key Laboratory of Laser Life Science of Ministry of Education, Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Mutation analysis is of great importance in molecular genetics. However, conventional electrophoresis-based methods have many shortcomings, such as time-consuming, multi-step, and using radioactive isotopes or other hazardous materials. In this work, a one-step real-time fluorescence allele specific amplification (ASA) method was developed for rapid detection of *K-ras* oncogene point mutation at codon 12. Thirty-one colon cancer samples were analyzed by the assay. Genome DNA was amplified by a pair of mutant specific primers, only the mutant sample could be amplified, producing double-stranded DNA product, which can be detected by the fluorescence of SYBR Green I, a double-stranded DNA-selective fluorescent dye. The results show that the sensitivity of the assay was 1/1000 of mutant/wild-type DNAs. The positive rate for *K-ras* oncogene point mutation was 48.4%. The real-time fluorescence ASA method is rapid, simple, sensitive, safe, high throughput, and low cost. It can be used for screening a large amount of clinical samples.

Keywords Real-time fluorescence allele-specific amplification; Point mutation; *K-ras* oncogene; Colon cancer (Ed.: H, J, Z)

欢迎订阅《Chemical Research in Chinese Universities》

《Chemical Research in Chinese Universities》(《高等学校化学研究》, 英文版, 双月刊)是中华人民共和国教育部委托吉林大学主办的化学学科综合性学术刊物, 1984年创刊。本刊以研究论文、研究快报、研究简报和综合评述等栏目集中报道我国高等院校和中国科学院各研究所在化学学科及其交叉学科、新兴学科、边缘学科等领域所开展的基础研究、应用研究和重大开发研究所取得的最新成果。

本刊由中华人民共和国教育部从全国重点高等院校和中国科学院聘请82位学术造诣精湛的化学家组成学术阵容强大的编委会, 由国内外著名的理论化学家唐敖庆教授任名誉主编, 著名的高分子化学家周其凤院士任主编。

本刊以“新、快、高”(即选题内容新, 文章发表速度快和学术水平及编辑出版质量高)为办刊特色, 刊载国家自然科学基金、攀登计划、“八六三”和“九七三”计划资助项目及其它科学基金资助项目成果文章达90%以上。从1992年起先后被美国科技信息研究所(ISI)的数据库和《SCI Expanded》、《SCI Search》、《Research Alert》、《Chemistry Citation Index》等检索刊物所收录, 从1999年起被《Current Contents/Physical, Chemical & Earth Science》收录, 据美国科技信息研究所期刊引证报告(JCR)公布的文献计量学数据, 本刊影响因子2001年为0.223, 2002年为0.229, 2003年为0.370, 2004年为0.538, 2005年为0.411。刊文长期被《中国化学化工文摘》、美国《化学文摘》(C. A.)、美国《EI, Compendex》、俄罗斯《文摘杂志》(P. Ж.)和日本《科技文献速报》等中外著名检索刊物和文献数据库摘引和收录。

本刊1992年荣获国家教委直属高校优秀科技期刊奖, 1997年荣获国家教委系统优秀科技期刊二等奖, 1999年荣获国家教育部全国高等学校自然科学学报及教育部优秀科技期刊一等奖(等同于教育部科技进步一等奖), 2004年荣获全国高校优秀科技期刊二等奖, 2006年荣获首届中国高校精品科技期刊称号。《Chemical Research in Chinese Universities》于2004年由季刊扩为双月刊, 16开本(A4), 每期128页, 采用微机排版, 激光照排, 80g胶版纸, 胶版印刷, 装帧质量高。2007年国内定价30元/期(180元/年), 国内外公开发行, 国际刊号ISSN 1005-9040, 国内刊号CN 22-1183/06, 邮发代号12-170。国内读者可在当地邮局订阅, 国外读者可通过中国国际图书贸易总公司(国外发行代号: 1533BM)订阅。补订者可与本刊编辑部联系。

2006年开始与Elsevier公司合作出版发行网络版(<http://www.sciencedirect.com>)。

通讯地址: 长春市吉林大学前卫校区北区《高等学校化学学报》编辑部(邮政编码: 130021); 电话: 0431-88499216, 88499867, 88499870; 传真: 0431-88925344; E-mail: cjcj@jlu.edu.cn; <http://www.cjcj.jlu.edu.cn>