

连接酶-ELISA 检测 K-ras 基因突变方法研究*

肖 娜¹, 唐一通^{1△}, 崔海忠², 李智山³, 邹玖明³

(1. 湖北文理学院医学院, 襄阳 441053; 2. 湖北文理学院医学院枣阳临床学院, 枣阳 441200; 3. 湖北文理学院附属医院, 襄阳 441021)

[摘要] 目的 研究一种简便、灵敏的 K-ras 基因突变检测方法,使其适合于进行常规突变检测。方法 设计对应检测位点寡核苷酸探针,经探针的连接、扩增、标记及 ELISA 反应,通过 ELISA 反应检测值确定突变位点基因型。以 K-ras 基因 12 位密码子的 G12S、G12R、G12C、G12D、G12A、G12V 6 个点突变为检测对象,对 72 例肺癌血浆循环 DNA 标本进行检测,并与直接测序结果进行比较。结果 利用建立方法共检出 3 例标本分别存在 G12S、G12R、G12A 突变。而通过直接测序未能从标本中检出 K-ras 突变,表明直接测序方法灵敏度较低,不适合于对循环 DNA 等不均一标本进行突变检测。结论 建立了一种简便、灵敏的 K-ras 基因突变检测方法,能够对不均一标本进行常规突变检测。

[关键词] 基因; ras; 突变; 循环 DNA; DNA 连接酶类; 酶联免疫吸附测定

[中图分类号] R394.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)02-0217-03

Research on ligase-ELISA method for detecting K-ras gene mutations*

XIAO Na¹, TANG Yitong^{1△}, CUI Haizhong², LI Zhishan³, ZOU Jiuming³

(1. Medical College, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang, Hubei 441053, China; 2. Zaoyang Clinical College, Medical College, Hubei University of Arts and Science, Zaoyang, Hubei 441200, China; 3. The Affiliated Hospital, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang, Hubei 441021, China)

[Abstract] **Objective** To research a simple and sensitive K-ras gene mutations detection method in order to be suitable for the routine mutation detection. **Methods** The corresponding detection locus oligonucleotide probe was designed. By the connection, amplification, labeling and ELISA reaction in probe, the mutation locus genotype was determined by the ELISA reaction detection value. With the six point mutations of G12S, G12R, G12C, G12D, G12A and G12V in 12 codons of K-ras gene as the detection objects, the plasma circulation DNA sample in 72 cases of lung cancer was detected, then the results were compared with those obtained by the direct sequencing. **Results** Three samples were identified as the G12S, G12R and G12A mutagens by the established method. But no K-ras mutations were detected in the samples by using the direct sequencing, indicating that the direct sequencing had lower sensitivity and was not suitable for the mutation detection of heterogeneous samples such as circulating DNA. **Conclusion** The simple and sensitive K-ras gene mutation detection method is established and can conduct the routine mutation detection for the heterogeneous samples.

[Key words] genes; ras; mutation; circulating DNA; DNA ligases; enzyme-linked immunosorbent assay

K-ras 基因是常见的致癌基因,其突变会造成表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂类和 EGFR 抗体类药物的耐药,K-ras 基因突变检测能够帮助肿瘤患者制定个体化治疗方案,提高临床治疗的针对性和有效性^[1-2]。目前,多种方法可进行 K-ras 基因突变检测^[3-8]。由于 DNA 测序灵敏度较低,而高分辨率溶解曲线法^[6]、焦磷酸测序^[8]等方法虽具有较高的灵敏度,但其对实验仪器、实验条件具有很高的要求,在只具备简单实验条件的常规临床检测中很少能够应用。基于此,本研究建立了一种简便、快速、灵敏的 K-ras 突变检测方法,并以肺癌血浆标本为检测对象,对 K-ras 基因 12 位密码子的 6 个点突变进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 非小细胞肺癌血浆标本 72 例收集于湖北文理学院附属医院和枣阳临床学院,抽提血浆循环 DNA, -20℃ 保存。

1.1.2 寡核苷酸检测探针 检测探针设计方法见图 1,用 4 条特异性检测探针 P-12(SRC)-N(N=A/T/G/C)和 1 条共用探针 P-12(SRC)检测 K-ras 基因 12 位密码子的 G12S、G12R、

G12C 3 种突变。P-12(SRC)-N 探针的 5' 端为通用扩增序列 Tag1,中间序列为与模板同源互补序列 H1,3' 端为与突变位点碱基对应的互补碱基 N。P-12(SRC)探针的 5' 端为与模板同源互补序列 H2,3' 端为通用扩增序列 Tag2。同理,用 4 条特异性检测探针 P-12(DAV)-N(N=A/T/G/C)和 1 条共用探针 P-12(DAV)检测 K-ras 基因 12 位密码子的 G12D、G12A、G12V 3 种突变,所用检测探针和检测位点的对应见表 1。

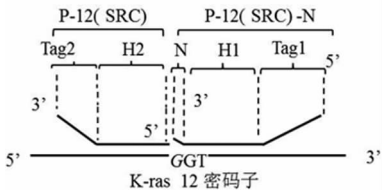


图 1 检测探针设计示意图(N=A/T/G/C)

对探针进行通用扩增的引物序列为: Tag1: 5' biotin-GGG TTC GTG GTA GAG CGT CGG AGT-3'; CTag2: 5' digoxin-CCA GAC GAC ACC GAG ATA GCA GCC-3'。所有核酸序列由上海生工生物有限公司合成。

* 基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会科研基金(WJ2015MB266);襄阳市科技局研究开发项目[襄科业(2016)73 号]。 作者简介:肖娜(1981—),实验师,硕士,主要从事遗传药理学与个体化用药研究。 △ 通信作者, E-mail: yitongtang@126.com。

表 1 检测探针序列

突变类型	突变位点	检测探针(5'-3')
G12S	GGT/AGT	P-12(SRC)-N:GGGTTCGTGGTAGAGCGTCGGAGTACTCTTGCTACGCGACC/T/G/A; P-12(SRC):p- AGCTCCAACCTACCACAAGTGGCTGCTATCTCGGTGTCGTCTGG
G12R	GGT/CGT	
G12C	GGT/TGT	
G12D	GGT/GAT	P-12(DAV)-N:GGGTTCGTGGTAGAGCGTCGGAGTCACTCTTGCTACGCCAC/T/G/A; P-12(DAV):p-CAGCTCCAACCTACCACAAGTGGCTGCTATCTCGGTGTCGTCTGG
G12A	GGT/GCT	
G12V	GGT/GTT	

1.1.3 实验试剂 2×PCR Mastermix 购自天根生化科技北京有限公司,QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)购自上海叶舟生物科技有限公司,Low MW DNA Marker-A 购自上海生工生物工程有限公司,Taq DNA 连接酶购自 New England BioLabs,链亲和素磁性微粒购自西安金磁纳米生物技术有限公司,其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 K-ras 基因扩增 对 K-ras 基因 exon2 进行 PCR 扩增,引物为,正向引物:5'-TAA GCG TCG ATG GAG GAG TT-3';反向引物:5'-CAT CAT GGA CCC TGA CAT AC-3';扩增体系:标本循环 DNA 5 μL,扩增引物各 2.5 μL(10 pmol/μL),去离子水 5 μL,2×Taq PCR Mastermix 15 μL。扩增条件为:95℃ 5 min;95℃ 45 s,54℃ 45 s,72℃ 90 s,36 个循环;72℃ 4 min。扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,同时用直接测序法测定序列。

1.2.2 连接反应 用 4 支反应管对 G12S、G12R、G12C 3 种突变位点进行检测,分别标记为 P-12(SRC)-C、P-12(SRC)-T、P-12(SRC)-G、P-12(SRC)-A 管。另 4 支反应管对 G12D、G12A、G12V 3 种突变位点进行检测,分别标记为 P-12(DAV)-C、P-12(DAV)-T、P-12(DAV)-G、P-12(DAV)-A 管。各管中分别加入 10×连接反应缓冲液 2 μL,模板 2 μL,1 U Taq 连接酶。将 4 组检测探针 P-12(SRC)-C/T/G/A 和 P-12(SRC)各 2 μL(10 nmol/L) 分别加入 P-12(SRC)-C/T/G/A 管,同理,4 组检测探针 P-12(DAV)-C/T/G/A 和 P-12(DAV)分别加入 P-12(DAV)-C/T/G/A 管,去离子水补足 20 μL。另设定一空白对照管 B,不加入检测探针,其他成分与检测管相同。各管 95℃ 变性 45 s,60℃ 3 min,10 个循环,95℃ 变性 5 min。

1.2.3 通用扩增 取 3 μL 连接反应产物,加入 15 μL 2×PCR Mastermix,2 μL(5 μmol/L) 通用扩增引物 Tag1 和 CTag2,去离子水补足 30 μL。扩增反应为:95℃ 30 s;95℃ 30 s,60℃ 45 s,72℃ 20 s,20 个循环;72℃ 1 min。

1.2.4 产物检测 用链亲和素磁性微粒提取纯化各管通用扩增产物,将各管磁性微粒提取物对置置于 96 孔板中,分别加入 50 μL 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗地高辛抗体溶液,恒温摇床中 70 r/min,室温 15 min。PBST(1×)清洗 3 次后加入 100 μL 四甲基联苯胺(TMB)底物缓冲液,室温显色 5 min,2 mol/L 硫酸(H₂SO₄)终止显色,酶标仪测定各反应管 450 nm 处光密度值(OD)。根据两组反应管(OD-C、OD-T、OD-G、OD-A 和 OD-B)对应显色值进行突变类型判定(若 OD-B<0.05 时,设定 OD-B=0.05)。对 G12S、G12R、G12C 3 种突变位点进行检测的 OD-SRC-C、OD-SRC-T、OD-SRC-G、OD-SRC-A 和 OD-SRC-B 5 个显色管,若 OD-SRC-C/OD-B>5,则此检测位点为野生型;若 OD-SRC-T/OD-B>5,则此检测位点为 G12S(GGT/AGT)突变;若 OD-SRC-G/OD-B>5,则此检测位点为 G12R(GGT/CGT)突变;若 OD-SRC-A/OD-B>5,则此检测位

点为 G12C(GGT/TGT)突变。对 G12D、G12A、G12V 3 种突变位点的判定方法同理。

2 结果

2.1 K-ras 基因外显子扩增 各标本扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,所在泳道均有长度为 511 bp 的目标条带出现,图 2 显示了对 8 个标本的 K-ras 基因外显子 2 PCR 扩增产物电泳检测结果。

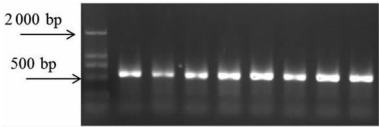


图 2 K-ras 基因 2 外显子 PCR 扩增产物凝胶电泳检测

表 2 循环 DNA 标本 K-ras 基因 12 位密码子 ELISA 基因突变检测结果 1(±s,n=72)

检测管	标本中各检测管对应显色值(OD-SRC)				
	C	T	G	A	B
17#	1.46±0.17	1.02±0.09	0.12±0.05	0.15±0.03	0.04±0.04
51#	1.62±0.13	0.16±0.06	1.16±0.15	0.15±0.05	0.07±0.02
8#	1.71±0.18	0.15±0.06	0.12±0.06	0.13±0.06	0.05±0.02
32#	1.81±0.11	0.17±0.06	0.16±0.05	0.12±0.03	0.07±0.02
63#	1.85±0.16	0.16±0.07	0.14±0.07	0.11±0.06	0.05±0.04

表 3 循环 DNA 标本 K-ras 基因 12 位密码子 ELISA 基因突变检测结果 2(±s,n=72)

检测管	标本中各检测管对应显色值(OD-DAV)				
	C	T	G	A	B
38#	1.59±0.09	0.13±0.06	1.14±0.02	0.15±0.06	0.06±0.03
3#	1.52±0.10	0.14±0.04	0.15±0.06	0.17±0.02	0.07±0.01
21#	1.82±0.15	0.14±0.06	0.17±0.03	0.18±0.03	0.04±0.02
44#	1.71±0.07	0.15±0.04	0.16±0.04	0.11±0.02	0.05±0.03
72#	1.74±0.03	0.11±0.03	0.15±0.04	0.11±0.05	0.05±0.03

2.2 标本检测 利用建立的方法共检测出 3 例标本存在突变。结果显示,突变类型分别为 17# 标本的 G12S(GGT/AGT)突变,51# 标本的 G12R(GGT/CGT)突变,38# 标本的 G12A(GGT/GCT)突变。3 例突变标本(17、51、38#)和 7 例野生型标本对应各检测管的检测值见表 2、3。17、51、38# 标本的野生型等位基因对应检测管 OD-C 分别为 1.46±0.17、1.62±0.13、1.59±0.09,突变等位基因对应检测管 OD(OD-SRC-T、OD-SRC-G、OD-DAV-G)分别为 1.02±0.09、1.16±0.15、1.14±0.02。并且,对每个突变标本检测的 5 个检测管中,突变等位基因检测管 OD 与非突变等位基因检测管 OD 的比值(如 17# 标本中 OD-SRC-T/OD-SRC-G 和 OD-SRC-T/OD-SRC-A)明显大于 5;突变等位基因检测管 OD 与对照管 OD-B 的比值(如 17# 标本中,OD-SRC-T/OD-B)明显大于 10。

对于非突变标本的检测,野生型等位基因对应检测管 OD-C 与其余各检测管对应的 OD 值比值均明显大于 10。而通过对所有标本 K-ras 外显子扩增测序后发现,在 12 密码子对应测序位点均未见有明显的提示突变的杂合套峰出现。仅在 17、51、38# 标本相应突变碱基处有不明显的测序峰出现,且与背景分离不明显,见图 3。说明直接测序方法检测灵敏度较低,对不均一标本的突变检测具有局限性,而新建立方法有着简便、灵敏的特点,适合于从不均一的标本中进行突变等位基因的检测。

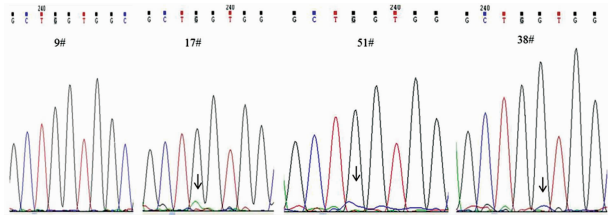


图 3 血浆循环 DNA 标本 K-ras 基因 12 位密码子位点测序图

3 讨 论

K-ras 基因突变是 EGFR-TKIs 靶向药物治疗产生耐药性的原因之一,研究提示非小细胞肺癌中 K-ras 基因突变与较短的生存期及预后不良有密切联系^[9-10]。开展 K-ras 基因突变检测对于肺癌、结直肠癌等肿瘤患者的个体化用药具有重要意义。DNA 测序是目前核酸突变检测的金标准,但是灵敏度低,只有 20%~50%^[11-12],不能够有效地从肿瘤组织等不均一标本中检测到基因突变。虽然焦磷酸测序、实时定量 PCR 及质谱等检测方法具有高达 1% 的灵敏度^[12-13],但这些检测方法却要求昂贵的检测平台和试剂,不能够在常规简便实验条件下应用。因此不适合于在基层医疗或研究机构应用。

本课题组在之前研究中建立了一种单核苷酸多态性(SNP)突变检测方法,具有较高的检测灵敏度,可达 5%^[14]。在此方法基础上,本研究根据 K-ras 基因突变特点,通过巧妙设计特定检测探针,建立了一种对 K-ras 基因突变检测的新方法。进行突变检测时,同时利用特异性检测探针 3' 端碱基与突变碱基的配对识别能力和 Taq DNA 连接酶对错配碱基的识别作用保证反应的高特异性。而方法的灵敏度则通过引物二次扩增及 ELISA 反应保证。

通过对 K-ras 基因 12 位密码子 6 种突变的检测,在 72 例肺癌循环 DNA 标本中共检测到 3 例突变,分别是 17# 标本的 G12S(GGT/AGT)突变,51# 标本的 G12R(GGT/CGT)突变,38# 标本的 G12A(GGT/GCT)突变。然而与直接测序方法比较时,测序方法中所得测序图谱在突变位点不能分离出明显的突变碱基对应峰,说明直接测序法由于检测灵敏度低,不适合于不均一的标本的突变检测。研究表明,K-ras 基因突变率在不同肿瘤类型及人群中差异较大,如白种人群结直肠癌标本中可达 15%~30%,而在亚裔人群肺癌标本中突变率只有 4%~10%^[2,4,15-17],与本研究得出的突变检测率相近。

总之,本研究建立了一种基于连接酶-ELISA 反应的对 K-ras 基因突变检测的方法。本方法操作简便,无需昂贵的实验仪器设备、试剂,在普通 PCR 仪、酶标仪等简单实验条件下即可完成。适合于在简单实验条件下对不均一标本进行常规突变检测。但是,本方法不能对未知突变位点进行检测,且有一定检测通量的限制,不适合于进行高通量检测。

参考文献

[1] 许洁,李丽,张科平,等. K-ras 基因突变两种检测方法的

比较[J]. 诊断病理学杂志,2013,20(10):629-633.
[2] 张阳,潘振奎,张星,等. 非小细胞肺癌患者 K-RAS 基因突变的研究[J]. 中国肺癌杂志,2010,13(6):602-606.
[3] DOBRE M, COMĂNESCU M, ARSENE D, et al. K-ras gene mutation status in colorectal cancer: comparative analysis of pyrosequencing and PCR-RFLP [J]. Rom J Morphol Embryol, 2013, 54(3): 567-574.
[4] KINUGASA H, NOUSO K, MIYAHARA K, et al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer[J]. Cancer, 2015, 121(13): 2271-2280.
[5] 石冬琴,王荣,谢华,等. 结直肠癌组织中 K-ras 基因突变的毛细管电泳检测[J]. 色谱, 2013, 31(6): 582-586.
[6] 毕媛,王捷. K-Ras 基因突变检测方法进展[J]. 广东医学, 2011, 32(11): 1496-1498.
[7] 刑加迪,张连海,李晶晶,等. 飞行时间质谱技术在结直肠癌 K-ras 基因突变检测中的应用[J]. 中华胃肠外科杂志, 2013, 16(1): 80-83.
[8] VINCENZI B, CREMOLINI C, SARTORE-BIANCHI A, et al. Prognostic significance of K-Ras mutation rate in metastatic colorectal cancer patients [J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 31604-31612.
[9] LI T, ZHENG Y T, SUN H, et al. K-Ras mutation detection in liquid biopsy and tumor tissue as prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer: a systematic review with meta-analysis[J]. Med Oncol, 2016, 33(7): 61.
[10] TAO L Y, ZHANG L F, XIU D R, et al. Prognostic significance of K-ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis[J]. World J Surg Oncol, 2016, 14: 146.
[11] GARCIA C A, AHMADIAN A, GHARIZADEH B, et al. Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene[J]. Gene, 2000, 253(2): 249-257.
[12] DUFORT S, RICHARD M J, DE FRAIPONT F. Pyrosequencing method to detect K-RAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues[J]. Anal Biochem, 2009, 391(2): 166-168.
[13] JARRY A, MASSON D, CASSAGNAU E, et al. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E[J]. Mol Cell Probes, 2004, 18(5): 349-352.
[14] 崔海忠,肖娜,张永平,等. 连接酶-ELISA 反应检测循环 DNA 基因突变研究[J]. 天津医药, 2015, 43(5): 533-536.
[15] OMIDIFAR N, GERAMIZADEH B, MIRZAI M. K-ras mutation in colorectal cancer, a report from southern Iran [J]. Iran J Med Sci, 2015, 40(5): 454-460.
[16] OHBA T, TOYOKAWA G, OSOEGAWA A, et al. Mutations of the EGFR, K-ras, EML4-ALK, and BRAF genes in resected pathological stage I lung adenocarcinoma[J]. Surg Today, 2016, 46(9): 1091-1098.
[17] 卢珊珊,徐昕,郭会芹,等. 非小细胞肺癌细胞学标本检测表皮生长因子受体和 K-ras 基因的突变[J]. 中华肿瘤杂志, 2013, 35(8): 585-589.