

电化学发光-聚合酶链式反应方法检测 胰腺癌中 *K-ras* 基因点突变

朱德斌 邢达* 唐亚兵 周小明

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

摘要 发展了一种可用于快速检测胰腺癌中 *K-ras* 癌基因点突变的电化学发光-聚合酶链式反应 (ECL-PCR) 分析方法。该法采用三联吡啶标记的上游引物和生物素标记的下游引物对目的片段进行 PCR 扩增; 再采用限制性内切酶 *Mva*I 对扩增产物进行酶切。由于野生型样品和突变型样品间存在酶切位点的变化, 其中只有野生型样品能被切断; 通过生物素与链霉亲和素包被的磁珠连接, 将生物素标记的 DNA 片段收集到检测池中, 进行电化学发光检测。采用该法对 13 例胰腺癌组织中的 *K-ras* 癌基因第 12 位密码子进行点突变分析, 只需要 10 μ L 样品、20 min 孵育时间和 30 s 采集时间, 就可得出其中有 12 例存在点突变, 点突变率为 92.3%。本方法操作简便、安全、快速、灵敏, 可用于检测任何一种导致限制性内切酶位点改变的基因点突变。

关键词 电化学发光-聚合酶链式反应, 胰腺癌, *K-ras* 癌基因, 点突变

1 引言

近年来, 电化学发光 (ECL) 分析方法已被应用于核酸检测^[1~4]。该法通过测定标记在核酸上的三联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 与三丙胺 (TPA) 反应所产生的光信号来实现检测^[5]。

K-ras 癌基因点突变与胰腺癌密切相关。研究报道, *K-ras* 在胰腺癌中的突变率约为 90%^[6], 其密码子 12 是发生突变的热点位置。检测该点突变对胰腺癌的确诊、预后及监测等都具有重要的临床价值。

本研究将聚合酶链式反应 (PCR) 技术和 ECL 分析方法结合起来, 用于检测胰腺癌组织中 *K-ras* 癌基因密码子 12 发生的点突变, 发展了一种安全、高效的基因点突变检测方法。

2 实验部分

2.1 材料和实验装置

人结肠癌 SW480 细胞 (中国典型培养物保藏中心), 其 *K-ras* 癌基因的密码子 12 已由 GGT 突变为 GTT; 石蜡包埋的胰腺癌组织 (广州中医药大学第一附属医院); 上、下游引物序列分别为 5'- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -gac tga ata taa act tgt ggt agt tgg acc t-3' 和 5'-Biotin-cta ttg ttg gat cat att cgt cc-3', 其中, 上游引物的 3' 末端倒数第三位碱基处引入了一个错配碱基 (带下划线碱基), 用于在扩增野生型样品时引入一个 *Mva*I 酶切位点。引物合成及生物素标记均由上海生工进行, 发光标记物 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 的合成及标记由本课题组进行。基因组抽提、纯化试剂盒, PCR 扩增所需试剂及 *Mva*I 限制性内切酶均购于上海生工。三丙胺 (TPA, 98%) 和链霉亲和素包被磁珠 ($\phi 2.8 \mu\text{m}$) 分别购于美国 Sigma 公司和 Dynal 生物技术公司。三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液 (TE, pH = 7.4) 为本实验室自行配制。

ECL 检测分析系统由本课题组自行设计。核心部分是检测池与超微弱光信号采集部分, 密闭于暗箱中。检测池为样品进行电化学发光反应的部位, 产生的光信号通过光纤束传输, 到达可进行单光子计数的光电倍增管的光电阴极, 转换成的电信号经过放大、甄别后, 输出标准的 TTL 脉冲, 经 USB 数据采集卡计数后, 由计算机软件 Labview 处理和显示^[1]。

2006-08-21 收稿; 2006-12-01 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30600128, 30670507, 30470494) 和广东省自然科学基金 (No. 015012) 资助项目

* E-mail: xingda@scau.edu.cn

2.2 实验方法

采用 ECL-PCR 方法检测 *K-ras* 癌基因点突变的基本原理如图 1 所示。用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的上游引物和生物素标记的下游引物对,对 *K-ras* 癌基因进行 PCR 扩增,产生一段 107 个碱基对的扩增片段。由于野生型基因在密码子 12 处存在一个 *Mva*I 酶切位点(5'-CC* A (T)GG-3'),用 *Mva*I 酶切, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记端与生物素标记端被切开;突变型基因密码子 12 发生了点突变,导致酶切位点丢失,所以不会被切断。通过生物素与链霉亲和素包被的磁珠连接,将生物素标记的 DNA 片段收集到检测池中,检测电化学发光信号。被切去 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记端的 DNA 片段不能与 TPA 反应产生光信号,因此,通过是否能检测到电化学发光信号,就可以确定其中是否含有突变型基因。

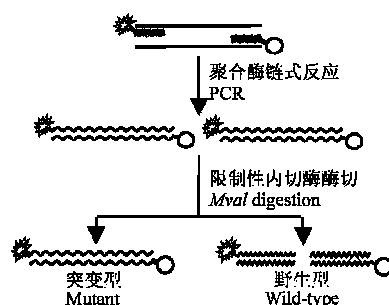


图1 *K-ras* 癌基因点突变分析原理

Fig. 1 Principle of *K-ras* point mutation assay

◆: 钌标记的上游引物 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -labeled upstream primer); ○: 生物素标记的下游引物 (biotin-labeled downstream primer)。

2.2.1 样品准备 基因组 DNA 抽提、PCR 扩增及 *Mva*I 酶切均参照试剂说明书进行。其中 PCR 退火温度为 55 °C,以 SW480 细胞基因组 DNA 为模板扩增的样品作为阳性对照。

2.2.2 阳性临界值的确定 用 ECL-PCR 分析方法检测 10 组阴性对照样品(以正常人血液基因组 DNA 为模板扩增的样品经 *Mva*I 酶切)的电化学发光值,计算出平均发光值 (V_{negative}) 和标准差 ($V_{\text{stdev(neg)}}$)。根据参考文献[1],阳性临界值 $V_{\text{cutoff}} = V_{\text{negative}} + 3 V_{\text{stdev(neg)}}$ 。

2.2.3 胰腺癌组织中 *K-ras* 癌基因点突变分析 将样品与链霉亲和素包被的磁珠在室温下振荡孵育后,置于磁分离器中,用 TE 缓冲液清洗以除去未连有生物素的成分。再将磁珠和 TPA 一起加入检测池中,置于工作电极底部的磁铁会将磁珠吸附于工作电极表面。给定工作电极与参比电极之间恒定电压 1.25V ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 与 TPA 反应电压),采集并输出电化学发光信号。发光值高于阳性临界值的样品为突变型样品。

3 结果与讨论

3.1 阳性临界值

10 组阴性对照样品的平均发光值为 18.2cps,标准差为 2.1cps。根据公式 $V_{\text{cutoff}} = V_{\text{negative}} + 3V_{\text{stdev(neg)}}$,计算出 *K-ras* 点突变检测的阳性临界值为 24.5 cps。

3.2 胰腺癌组织中 *K-ras* 癌基因点突变分析

图 2 为 13 例胰腺癌样品中 *K-ras* 癌基因电化学发光检测结果。点突变阳性临界值用虚线表示。其中有 12 例样品的发光值高于阳性临界值,即 *K-ras* 癌基因在胰腺癌组织中的点突变率为 92.3%,与前人报道的结果相近^[6]。

3.3 ECL-PCR 方法与凝胶电泳方法的比较

点突变检测在诊断遗传性疾病、确定癌基因激活、抑癌基因失活以及与药物抗性相关的突变中发挥着重要作用^[7]。目前,常用的检测方法大多采用凝胶电泳分析^[8]。该方法不仅操作复杂、费时,还需要用到放射性元素或溴化乙锭等致癌物质对凝胶进行染色,具有一定的危险性;此外,通过染色观察实验结果,具有一定的主观性,特别在目测小片段样品时,由于引物二聚体等的干扰,容易得出假阳性结果。

ECL-PCR 分析方法则是利用标记在样品上的生物素与链霉亲和素包被的磁珠连接来选择性富集

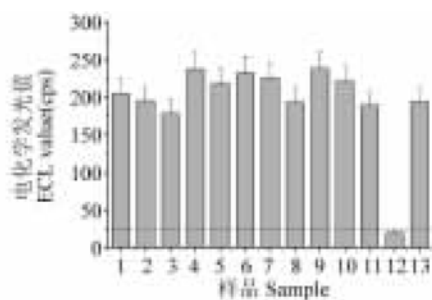


图2 胰腺癌组织中 *K-ras* 癌基因点突变分析结果

Fig. 2 *K-ras* point mutation assay results of thirteen pancreatic cancer samples

待测样品,通过检测标记在样品上的发光物 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的发光值,来测定样品的含量,既省略了电泳、杂交等烦琐费时的步骤,又缩短了实验时间,整个检测过程在 1 h 内就可以完成,操作安全简便。检测结果直接通过计算机输出,消除了人为因素导致的错误判断,结果客观、准确。

References

- 1 Zhu D B, Xing D, Shen X Y, Liu J F, Chen Q. *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**, 20: 448 ~ 453
- 2 Zhu D B, Xing D, Shen X Y, Liu J F. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2004**, 324: 964 ~ 969
- 3 Zhu D B, Xing D, Shen X Y, Yan G H. *Chinese Science Bulletin*, **2003**, 48(16): 1741 ~ 1744
- 4 Zhu Debin(朱德斌), Xing Da(邢达), Shen Xingyan(沈行燕), Liu Jinfeng(刘晋峰). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2005**, 26(7): 1248 ~ 1251
- 5 Deaver D R. *Nature*, **1995**, 377(6551): 758 ~ 760
- 6 Lebedeva I V, Sarkar D, Su Z Z, Gopalkrishnan R V, Athar M, Randolph A, Valerie K, Dent P, Fisher P B. *Cancer Research*, **2006**, 66: 2403 ~ 2413
- 7 Erichsen H C, Chanock S J. *British Journal of Cancer*, **2004**, 90: 747 ~ 751
- 8 Kricka L J. *Clinical Chemistry*, **1999**, 45: 453 ~ 458

Detection of *K-ras* Point Mutation in Pancreatic Cancer by Electrochemiluminescence-Polymerase Chain Reaction

Zhu De-Bin, Xing Da*, Tang Ya-Bing, Zhou Xiao-Ming

(Key Laboratory of Laser Life Science, Ministry of Education,

Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract An electrochemiluminescence polymerase chain reaction (ECL-PCR) method for rapid detection of *K-ras* point mutation was developed. Briefly, the target gene was amplified by a $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -labeled forward primer and a biotin-labeled reverse primer, and then followed by digestion with the restriction enzyme, *Mva*I, which only cut the wild-type amplicon containing its cutting site. Digestion product was detected by ECL assay after adsorption of the resulting DNA duplex to the solid phase. Thirteen pancreatic cancer samples were analyzed by ECL-PCR assay. The positive rate of *K-ras* point mutation was 92.3%. The ECL-PCR method is useful in point mutation detection due to its sensitivity, rapidness, simplicity and safety. It can be used to detect a point mutation that creates or destroys a restriction site in any gene.

Keywords Electrochemiluminescence-polymerase chain reaction, pancreatic cancer, *K-ras* oncogene, point mutation

(Received 21 August 2006; accepted 1 December 2006)