

应用寡核苷酸微阵列检测肺癌样品中的 P53 和 K-ras 基因点突变

刘军波^{1 2} 解纪攀³ 邹宗亮¹ 陈琳洁² 李龙芸³ 王升启^{1*}

¹(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

²(深圳市益生堂生物药业有限公司, 深圳 518026)

³(中国协和医科大学临床医学院呼吸内科, 北京 100730)

摘 要 对影响寡核苷酸微阵列检测点突变的敏感性和特异性的各种因素,如杂交液、杂交温度、标记引物浓度及其比例等,进行了研究。采用不对称 PCR 扩增有利于敏感性提高;多重不对称 PCR 不影响杂交的特异性,且敏感性有所增加。对 30 例肺癌标本进行寡核苷酸微阵列检测,发现 12 例标本发生了 P53 基因点突变,K-ras 突变有 5 例。与测序结果相比,P53 基因突变符合率达到 80%。由于检测样本较少且检测位点不完全,因而未得到 K-ras 和 P53 基因突变与肿瘤的种类、病期及吸烟之间的明显相关性。

关键词 寡核苷酸微阵列,肺癌,K-ras,P53,点突变

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0447-06

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一。在发达国家中其发病率在男性恶性肿瘤中居首位,女性中占第二、三位^[1]。同其它肿瘤一样,肺癌的发生是多基因参与的多阶段过程,涉及到数种原癌基因的激活,有时还伴有抑癌基因的失活。其中 P53 和 K-ras 基因突变与肺癌的预后及复发呈正相关性,因此 P53 和 K-ras 基因突变有望成为肺癌早期诊断、复发及判断预后的重要指标^[2,3]。

大规模的临床试验表明,痰细胞学与胸片结合的检查手段对于早期发现肺癌是远远不够的^[4]。目前采用的分子生物学检测方法主要有寡核苷酸杂交法、限制性酶切片段长度多态性(RFLP)技术、PCR-RFLP 技术、RNA 酶 A 错配清除法、单链构型多态性分析(SSCP)法及核酸序列分析法,但这些方法存在所需细胞数量大、灵敏度低、假阳性率高、方法繁琐、信息量少等缺点^[4]。

寡核苷酸微阵列技术是最近几年才发展起来的高新技术,它是将特定序列的寡核苷酸有序地固定在玻片或硅片等材料上而形成的寡核苷酸微阵列。应用于疾病的遗传学诊断中,具有快速、灵敏、高通量、多靶位及自动化程度高等优点,已受到越来越多的重视^[5]。本论文首先以克隆的野生型 K-ras 外显

子 1 为研究对象,探讨了影响寡核苷酸微阵列检测点突变的敏感性和特异性的各种因素,获得了一系列最佳的反应参数。然后对采集的 30 例肺癌标本进行 K-ras 和 P53 基因点突变的检测,与测序结果相比,符合率达到 80%。

1 材料与方法

1.1 寡核苷酸合成、玻片预处理、微阵列的制备
见文献[6]

1.2 标本收集

病例来源于 2000 年 10 月至 2001 年 2 月收住北京协和医院心胸外科的肺癌患者,共 30 例。术后均有明确的病理诊断。手术切除的新鲜标本(< 1h),去除坏死组织,无菌生理盐水冲洗后,迅速保存于液氮中。

1.3 基因组 DNA 提取

按照 Qiagen 公司 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒说明书操作。

1.4 PCR 扩增

操作过程见文献[7]。扩增条件:94℃,3min;94℃,30s,55℃,30s,72℃,30s,循环次数为 30;72℃,10min。不对称 PCR 扩增条件同前,除循环次

收稿日期:2001-12-27,修回日期:2002-04-17。

基金项目 国家自然科学基金重点项目(No.3988901)及军队杰出人才基金项目资助。

* 通讯作者。Tel 86-10-66932211 Fax 86-10-66932211 E-mail sqwang@hmi.nic.ac.cn

数变为 45 外,其它条件不变。本实验所采用的引物和寡核苷酸探针的序列如下表 1。需注意的是,用于芯片杂交的 PCR 扩增中, K-ras 基因采用 cy3 标记

的正向引物,而 P53 基因采用的是 cy3 标记的反向引物。

表 1 PCR 引物和寡核苷酸探针的序列及用途
Table 1 Sequences and Usage of PCR primers and probes

Name	Sequencex (5'→3')	Usage
* KE1-F	ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA	To amplify human K-ras Exon1
KE1-R	CTC TAT TGT TGG ATC ATA TTC GTC	
* KE2-F	GAT TCC TAC AGG AAG CAA GTA GTA	To amplify human K-ras Exon2
KE2-R	TAT GGC AAA TAC ACA AAG AAA GCC	
PE5-F	GTG CAG CTG TGG GTT GAT TC	To amplify human P53 Exon5
* PE5-R	CTG CTC ACC ATC GCT ATC TG	
PE7-F	AG GTT GGC TCT GAC TGT ACC A	To amplify human P53 Exon7
* PE7-R	CCA GTG TGA TGG TGA GG	
KP1-4	TAC GCC ACN AGC TCC AA	To detect the first nucleotide in codon 12
KP5-8	C TAC GCC ANC AGC TCC A	To detect the second nucleotide in codon12
KP9-12	GCC TAC GCN ACC AGC TC	To detect the first nucleotide in codon 13
KP13-16	T GCC TAC GNC ACC AGC T	To detect the second nucleotide in codon 13
KP17-20	TA CTC CTC TTN ACC TGC TGT G	To detect the first nucleotide in codon 61
KP21-24	GTA CTC CTC TNG ACC TGC TGT	To detect the second nucleotide in codon 61
KP25-28	T GTA CTC CTC NTG ACC TGC TG	To detect the third nucleotide in codon 61
PP1-4	GTG AGG CNC TGC CCC	To detect the second nucleotide in codon 175
PP5-8	CCC CAC CNT GAG CGC	To detect the second nucleotide in codon 179
PP9-12	C ATG GGC NGC ATG AAC	To detect the first nucleotide in codon 245
PP13-16	C ATG GGC GNC ATG AAC	To detect the second nucleotide in codon 245
PP17-20	C ATG AAC NGG AGG CCC	To detect the first nucleotide in codon 248
PP21-24	C ATG AAC CNG AGG CCC	To detect the second nucleotide in codon 248
PP25-28	G AAC CGG ANG CCC ATC C	To detect the second nucleotide in codon 249

注: * 表示需要 cy3 标记的引物, N 表示 A、G、C 和 T 4 种核苷酸。

1.5 PCR 产物的克隆及野生型模板的获得

按 Promega 公司的 PGEM[®]-T Vector System 1 试剂盒说明书操作。将纯化的、并经测序证实的分别含有克隆的野生型 K-ras 外显子 1、2 和 P53 外显子 5、7 基因片段的重组质粒 pGEM-KE1、pGEM-KE2、pGEM-PE5 和 PGEM-PE7 混合(最终浓度均为 1ng/ μ L)即获得野生型模板。

1.6 DNA 测序

重组质粒和 PCR 产物的测序由大连宝生物工程公司完成。

1.7 杂交反应及突变判断

将待杂交的 PCR 扩增产物以 1:4 的比例溶于杂交液 X (7.5 \times SSC, 0.5% SDS) 中。于沸水浴变性 5min, 立即置于冰浴中, 放置 10min。然后按 2 μ L/cm² 转移至探针区。置于杂交盒中, 加入 3 \times SSC 溶液保持湿度。于 55 $^{\circ}$ C 水浴中, 杂交时间为 1.5h。杂交完毕后, 室温下用高严紧洗脱液 A (2 \times SSC, 0.1% SDS) B (0.1 \times SSC, 0.1% SDS) C (0.1 \times SSC) 依次洗脱。晾干后用激光共聚焦荧光扫描仪 ScanArray3000

检测, 获取的图像用 Imagen3.0 定量。

根据定量的结果, 按下列公式计算样品微阵列上每一个点的 ratio 值: ratio = 校正系数 \times 样品信噪比 / 对应于样品相同点的野生型模板信噪比, 其中校正系数 = 野生型模板中这一点所属外显子的所有点的信噪比之和 / 样品中对应的信噪比之和。如果对应于野生型模板阳性信号的样品杂交点 ratio 小于 0.4, 则表明这一点发生了突变; 而对于其它的样品杂交点, 只有满足信噪比大于 3 及 ratio 值大于 2.5 这两个条件, 才能说明这一点发生了突变。

2 结 果

2.1 野生型 K-ras 和 P53 基因片段的克隆

根据 GenBank 中 K-ras、P53 外显子序列设计了 4 对引物分别扩增出 K-ras 外显子 1 和 2 及 P53 外显子 5 和 7 基因片段。图 1 为从正常人基因组 DNA 中扩增出 K-ras 和 P53 基因片段的琼脂糖电泳结果。其中 K-ras 外显子 1、2 片段大小分别为 111bp、141bp, P53 外显子 5 和 7 分别为 141bp 和 100bp。将

其克隆至 pGEM-T 载体中获得重组质粒 pGEM-KE1、pGEM-KE2、pGEM-PE5 和 pGEM-PE7。测序结果表明(图略),克隆的 K-ras 外显子 1 和 2 的序列与报道的正常人基因序列完全相符,且含 *ras* 基因突变热点 12、13 和 61 位密码子。同样,克隆的外显子 5 和 7 的序列与报道的正常人基因序列完全相符,且含 P53 基因突变热点 175、179、245、248 和 249 位密码子。

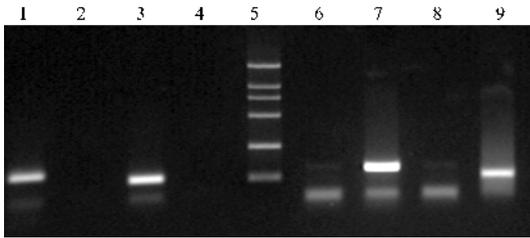


图 1 PCR 产物电泳结果图

Fig.1 Agarose electrophoresis of PCR products

1. K-ras exon2 PCR product(141bp);
2. K-ras exon2 PCR negative;
3. K-ras exon1 PCR product(100bp);
4. K-ras exon1 PCR negative;
5. DNA molecular marker(100, 250, 500, 750, 1000, 2000bp);
6. P53 exon5 PCR negative;
7. P53 exon5 PCR product(141bp);
8. P53 exon7 PCR negative;
9. P53 exon7 PCR product(100bp)

2.2 寡核苷酸微阵列探针排列方式

图 2A 表示的是 *ras* 寡核苷酸微阵列中用于检测 *ras* 基因中 12、13 和 61 位密码子点突变的寡核苷酸探针排列示意图。图 2B 为 P53 寡核苷酸微阵列,用于检测 175、179、245、248 和 249 位密码子。每一列中含四种探针,除检测位点的核苷酸不同外,其它核苷酸完全相同。其检测的核苷酸由上到下依次为 A、G、C、T。每一检测位点重复点两列,其中的实心点表示野生型模板阳性信号。

2.3 影响寡核苷酸微阵列检测敏感性的因素

这部分实验是以 K-ras 外显子 1 作为研究对象,且 PCR 扩增模板为构建的 pGEM-KE1。微阵列上只点了检测外显子 1 中 12 和 13 位密码子的四组探针,且每一检测位点只点了一列。

2.3.1 不对称 PCR: 将对称 PCR 和不对称 PCR 扩增产物(引物浓度比 1:10)与微阵列杂交。结果表明,对称 PCR 产物几乎无杂交信号,而不对称 PCR 扩增产物显示较强杂交信号(杂交结果略)。

2.3.2 引物浓度比: 图 3 表示的是以不同的引物浓度比(1:10、1:50、1:100)进行不对称 PCR 扩增后的电泳结果。从中可看出,随着引物浓度比的增加,扩增的双链 DNA 的量逐步降低。与对应的寡核苷酸微阵列杂交,结果表明(图版 I-A),采用 3 种引物

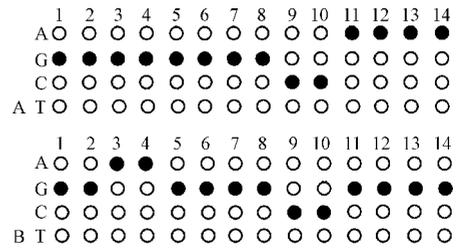


图 2A K-ras 寡核苷酸探针排列方式

Fig.2A The probe array of K-ras gene

- 1~2 and 3~4: The first and second nucleotides in codon12;
5~6 and 7~8: The first and second nucleotides in codon13;
9~10, 11~12 and 13-14: The first, second and third nucleotides in codon61

图 2B P53 寡核苷酸探针排列方式

Fig.2B The probe array of P53 gene

- 1~2 and 3~4: The second nucleotide in codon 175 and 179;
5~6 and 7~8: The first and second nucleotides in codon245;
9~10 and 11~12: The first and second nucleotides in codon248;
13~14: The second nucleotide in codon249

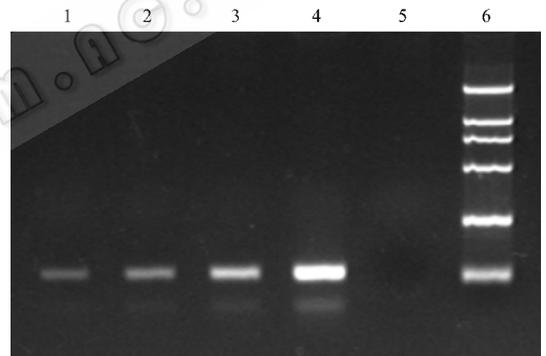


图 3 不同引物浓度比下的 PCR 产物电泳结果

Fig.3 Agarose electrophoresis of PCR

products in different primer ratios

- 1.1:10; 2.1:50; 3.1:100; 4.1:1; 5. negative;
6. DNA molecular marker(100 250 500 750 1000 2000bp)

浓度比都能获得较强的杂交信号。

2.3.3 标记引物浓度: 以标记引物终浓度为 5、10、20、50、100ng/ μ L 进行不对称 PCR 扩增(引物浓度比为 1:10),然后与寡核苷酸微阵列杂交,结果可看出,随着标记引物的浓度升高,信号有所增强,但背景变得很高(图略)。综合两方面因素,标记引物浓度为 20ng/ μ L 时,杂交结果最佳。

2.4 影响寡核苷酸微阵列检测特异性的因素

采用标记引物浓度为 20ng/ μ L,引物浓度比为 1:10,扩增模板为 50ng/mL pGEM-KE1 进行不对称 PCR 扩增。

2.4.1 杂交液种类: 图版 I-B 为采用 4 种杂交液

进行杂交反应后的扫描结果,从中可看出,杂交液 3 的特异性好,且信号最强。

2.4.2 杂交温度:将扩增产物与杂交液 3 混合后,分别放于 45、50、55、60℃中放置 1.5h,结果表明(图略)随着温度升高,特异性增强,但信号有所下降,综合两方面因素,在 55℃下杂交最佳。

2.4.3 洗涤条件:将扩增产物与杂交液 3 混合后,于 55℃中进行杂交反应,然后分别用高严紧洗脱液 A(2 × SSC, 0.1% SDS) B(0.1 × SSC, 0.1% SDS) C(0.1 × SSC) 和低严紧洗脱液 A(5 × SSC, 0.2% SDS) B(2 × SSC, 0.2% SDS) C(2 × SSC) 进行洗脱。从扫描结果(略)中可看出,在高严紧条件下洗脱,效果较好。

2.5 双重 PCR 对寡核苷酸微阵列检测敏感性和特异性的影响

将重组质粒 pGEM-KE1 和 pGEM-KE2 混合,作为模板,将用于扩增 K-ras 外显子 1 和 2 的标记引物及对应的反向引物加入同一 PCR 反应液中,进行不对称 PCR。电泳结果见图 4。图版 I-C 显示多重不对称 PCR 产物杂交结果与 K-ras 单重不对称 PCR 产物混和后,进行杂交的结果,从中可看出,特异性未发生明显变化,而杂交信号有所增加。

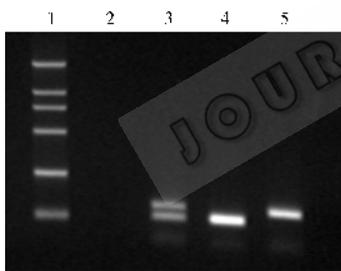


图 4 PCR 产物电泳结果

Fig.4 Agarose electrophoresis of PCR products

1. DNA molecular marker(100 250 500 750 1000 2000bp)
2. Negative ;3. Multiple PCR product ;
4. Exon 1 PCR product ;5. Exon2 PCR product.

2.6 肿瘤标本寡核苷酸微阵列检测结果

对 30 例提取的样品基因组 DNA 分别进行 K-列进行杂交。根据杂交结果进行分析发现,其中有 5 例发生了 K-ras 突变,P53 基因突变有 12 例。K-ras 和 P53 基因中突变频率高的密码子分别是 12 位和 249 位。将检测有 P53 基因突变的 PCR 产物进行测序(结果略)符合率达到 80%。图版 I-D 显示的是 P53 基因突变的样品和野生型基因的杂交扫描结果,从中可看出,P53 基因中的 249 位密码子第二位核苷酸由 G 突变成为 T。

3 讨 论

肺癌的发病率在我国大中城市中居恶性肿瘤的第一位,死亡率在全国居首位,因此对肺癌诊断(特别是早期诊断)的研究具有重要的临床意义。P53 和 K-ras 基因是肺癌中突变率较高的两种基因。通过对这两种基因进行点突变的检测,对肺癌的诊断、分期和治疗都有重要的意义。

在国内首次报道应用寡核苷酸微阵列对肺癌标本中 P53 和 K-ras 基因点突变进行检测,发现寡核苷酸微阵列检测点突变较其它分子学检测方法具有更大的优越性,如对样品取材和保存的要求不高;采用双重 PCR 大大缩短了检测时间;可同时对多个样品及多个突变位点同时进行检测;具有较高的准确性,有文献报道应用寡核苷酸微阵列检测点突变比直接测序法相比,敏感性高出 4%,特异性达到 98%^[8];寡核苷酸微阵列的制备采用了合成后交联的方法,大大降低了成本。综上所述,寡核苷酸微阵列检测在肺癌的临床诊断上具有广泛的应用前景,值得推广。

文献通常用分离双链 DNA、线性 PCR 扩增来制备单链 DNA 与微阵列杂交。而我们发现应用不对称 PCR 扩增的方式制备单链 DNA,不需要通过分离、纯化过程,可直接与微阵列进行杂交反应,从而有效地减少寡核苷酸微阵列操作中间环节,提高检测速度,且降低检测成本。除此以外,对影响寡核苷酸微阵列点突变检测敏感性和特异性的其它因素,如杂交液、杂交温度及引物浓度及浓度比等,也做了初步的方法学上的探讨。由于进行不对称 PCR 扩增时,反应的成功与否通常是通过琼脂糖凝胶电泳检测双链来判定,但是在引物比例高时,产物中双链 DNA 的含量较低,用常规的凝胶电泳难以检测。由于不对称 PCR 在引物比例为 1:10 和 1:100 时都能产生足够的单链 DNA 与寡核苷酸微阵列杂交,为了方便应用凝胶电泳检测扩增效果,选择 1:10 的引物浓度较合适。标记引物的增加,有利于杂交信号的增强,但背景也明显增加,不利于结果判断,同时也增加了临床检测的成本。这可能是由于标记引物浓度增加,造成了非特异性 PCR 扩增产物的增多,导致微阵列中非特异性杂交增多,从而引起背景增强。

本实验共检测了 30 例标本,P53 和 K-ras 的突变率分别为 36.7% 和 16.7%,与文献报道基本相符。在 9 例以下的病例中,有 7 例(33.3%)P53

突变 2 例 (9.5%) K-ras 突变; III b 以上的病例中, 有 4 例 (44.4%) P53 突变, 3 例 (33.3%) K-ras 突变。K-ras 的 5 例突变均发生在腺癌 (包括腺鳞癌) 中, 占腺癌病例总数的 21.7%, 这与 K-ras 突变在腺癌中的发生率最高是一致的, 但统计学上无明显相关性。P53 在 NSCLC 中突变例为腺鳞癌 > 腺癌 > 鳞癌, 而多数文献报道 P53 突变在鳞癌中的发生率高于腺癌^[11,12]。两种基因突变与吸烟无明显统计学相关性。造成以上结果的原因可能由于样本数目太少及检测位点不完全。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Parker S L, Tong T, Bolden S *et al.* Cancer statistics. *Cancer J Clin*, 1996, **46**: 5 ~ 27
- [2] Quinlan D C *et al.* Accumulation of P53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res*, 1992, **52**: 4824 ~ 4831
- [3] Robert J *et al.* K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*, 1990, **323**: 561 ~ 565
- [4] LAI M D (来茂德). *Medicine Molecular Biology* (医学分子生物学), Beijing: People Sanitation Press, 1999
- [5] ZOU Z L (邹宗亮), WANG Z Q (王志清), WANG S Q (王升启). Research progress of gene microarray technique. *High Technology Communication* (高技术通讯) 2000 (5) 95 ~ 98
- [6] ZOU Z L (邹宗亮), WANG S Q (王升启), WANG Z Q (王志清). Preparation optimization and properties of the aldehyde microscopic slides for oligonucleotide microarray fabrication. *Chinese Journal Biotechnology* (生物工程学报) 2001, **17**(5): 498 ~ 502
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed (分子克隆实验指南 第二版), Beijing: Scientific Press, 1996. pp680 ~ 683
- [8] Ahrendt S A, Halachmi S, Chow J T *et al.* Rapid P53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 7382 ~ 7387
- [9] Cho J K, Kim J H, Lee Y H *et al.* Correlation between K-ras gene mutation and prognosis of patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 1997, **79**: 462 ~ 467
- [10] Hussain S P, Harris C C. P53 mutation spectrum and load: the generation of hypothesis linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutation Res*, 1999, **428**: 23 ~ 32
- [11] Greenblatt M S, Bennett W P, Hollsten M, Harris C C. Mutations in the P53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994, **54**: 4855 ~ 4878
- [12] Bennett W P, Hussain S P, Vahakangas K H *et al.* Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and P53 mutation spectrum in human lung cancer. *J Pathol*, 1999, **187**: 8 ~ 18

Detection of P53 and K-ras Gene Mutations in Lung Cancer with Oligonucleotide Chip

LIU Jun-Bo² XIE Ji-Pan³ ZOU Zong-Liang¹ CHEN Lin-Jie² LI Long-Yun³ WANG Sheng-Qi^{1*}

¹(Institute of Radiation Medicine of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

²(ShenZhen Yishengtang Biopharmaceutical Co., Ltd. Shenzhen 518260, China)

³(Department of Respiratory Internal Medicine of Peking Union Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract Different factors including hybridization solution components, hybridization temperature, and the concentration and proportion of the labelled primer, which affected the sensitivity and specificity of single mutation identification, were exploited. Asymmetric PCR increased the hybridization sensitivity, and the asymmetric multi-PCR did not affect the specificity, while the sensitivity was improved a little. Among 30 lung cancer samples detected with the oligonucleotide microarray, 12 was found P53 gene mutations and 5 had K-ras gene mutations. The P53 gene mutations identified by the oligonucleotide microarray was proved 80% same as the sequencing results. The obvious statistical relations of K-ras and P53 gene mutations with tumor type, tumor stage and smoking were not obtained because of less samples and mutation sites.

Key words oligonucleotide microarray, lung cancer, P53, K-ras, point mutation

Received: 12-27-2001

This work was supported by Grants from the National Natural Science Foundation of China (No.3988901) and the Military Elitist Foundation.

* Corresponding author. Tel: 86-10-66932211; Fax: 86-10-66932211; E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>