

• 生物技术与方法 •

一种检测 *kras* 基因突变的新型 TB-ARMS qPCR 方法的建立

于丽华*, 滕飞*, 蒋明, 郭佳

同济大学 苏州研究院, 江苏 苏州 215000

于丽华, 滕飞, 蒋明, 等. 一种检测 *kras* 基因突变的新型 TB-ARMS qPCR 方法的建立. 生物工程学报, 2019, 35(5): 880–891.
Yu LH, Teng F, Jiang M, et al. Establishment of a novel TB-ARMS qPCR method for *kras* mutation detection. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 880–891.

摘要: 在荧光定量 PCR 基础上建立一种简单有效并且高度灵敏的 TB-ARMS *kras* 基因突变检测方法, 并对其检测性能进行评估, 探讨其临床应用价值。针对 *kras* 基因 8 种常见的点突变类型, 通过设计并优化突变特异性引物、野生型特异性封闭引物并综合应用突变富集扩增反应条件等多种手段, 提高点突变检测的灵敏度和特异性, 采用已知野生型基因组样品和构建的突变质粒作为标准品, 进行方法学评价; 通过对临床样本的检测及与现有商品化试剂盒的比较进行性能验证; 通过对术前血浆和配对组织样品的对比检测, 评估方法是否适用于血液样本的检测。建立了 TB-ARMS *kras* 突变检测的新方法, 能检测的最低突变率可达到 0.01%。通过综合采用野生型特异性封闭引物和突变富集扩增条件等方法证明了其 0.01% 的突变检测灵敏度。检测准确性优于现有商品化试剂盒, 血浆 DNA TB-ARMS qPCR 检测结果与配对组织 DNA 测序结果相符合。因此, TB-ARMS *kras* 基因突变检测方法具有广泛的临床应用价值, 既适用于临床组织样品的检测, 也可应用于液体活检。

关键词: *kras* 突变, 突变检测, 方法学, 液体活检, 个体化治疗

Establishment of a novel TB-ARMS qPCR method for *kras* mutation detection

Lihua Yu*, Fei Teng*, Ming Jiang, and Jia Guo

Suzhou Institute, Tongji University, Suzhou 215000, Jiangsu, China

Abstract: A simple, robust and highly sensitive TB-ARMS method based on qPCR technique was developed to detect *kras* mutations. The technique was evaluated, and its clinical application was investigated. Mutation specific primers for eight common *kras* mutations and wild type gene targeted blockers were designed and optimized. Moreover, a mutant-enriched condition was used in to improve the sensitivity and specificity of mutation detection. Constructed plasmids carrying mutant

Received: November 19, 2018; **Accepted:** March 4, 2019

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangsu Province -Youth Fund (No. BK20150278), Scientific Research Program of Shanghai Science and Technology Commission (No. 19431903200).

Corresponding authors: Lihua Yu. Tel: +86-512-66016586; E-mail: haishuiqq@163.com

*These authors contributed equally to this study.

江苏省自然科学基金青年基金 (No. BK20150278), 上海市科学技术委员会科研计划 (No. 19431903200) 资助。

kras genes, as well as confirmed wild type genomic DNA, were used as standard samples for evaluation of the methodology. The performance of our new method was validated by comparing the results of our method with that of a commercial *kras* kit in testing 40 clinical samples. Preoperative plasma samples, as well as paired tissue samples, were tested in parallel for evaluation of its clinical application. We have developed a new TB-ARMS method for *kras* mutation detection that can detect minor mutant alleles with a frequency as low as 0.01% in a heterogeneous sample. We have successfully demonstrated its 0.01% detection sensitivity with highly specific mutant amplification in conjunction with selective wild type suppression by blocker under a mutant-enriched reaction condition. We also showed that our TB-ARMS method was more accurate than the commercial *kras* kit, which is widely used presently. Furthermore, we have validated our method as an efficient liquid biopsy method, and the results of the plasma DNA detection with our TB-ARMS method were in consistent with the sequencing results of paired tissue samples. In conclusion, our TB-ARMS qPCR method could be effectively applied in *kras* mutation test for clinical tissue samples, as well as for liquid biopsy samples such as plasma.

Keywords: *kras* mutation, mutation detection, methodology, liquid biopsy, personalized medicine

kras 基因突变是结直肠癌、肺癌和胰腺癌等癌症中最常见的突变类型之一^[1-2]。*kras* 突变与肿瘤靶向治疗的耐药性密切相关, 例如非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 中的 *kras* 基因突变会导致对吉非替尼、厄洛替尼等 EGFR 靶向药物耐药, 因此 *kras* 突变检测可用于指导靶向药物的个体化治疗和用于治疗过程中的耐药监测^[3-4]。目前的突变检测技术大都以肿瘤组织为主要检测标本, 由于肿瘤组织的异质性^[5], 突变检测往往需要在较高野生型基因背景下进行, 因此需要一种高特异性的检测方法, 以减少假阳性检测结果的产生。液态活检样本例如血液由于取样方便是更为理想的突变检测样本^[6], 已有研究^[7-10]发现血浆游离 DNA 中存在肿瘤来源的 DNA, 其突变情况与肿瘤组织高度一致, 循环血突变检测被认为是一种较有前途的无创检测方法, 既适用于不适宜手术的肺癌和结直肠癌等癌症患者, 也适用于对病人的突变情况进行跟踪监测, 具有更广的应用范围。但癌症病人血浆游离 DNA 水平较正常人往往明显升高, *kras* 突变基因所占比例通常较低, 很多情况下达不到 1%, 为了增加突变检测的准确性, 需要灵敏度和特异性高的检测方法。目前已有的 *kras* 突变检测方法包括 Sanger 测序法、等位基因特异性 PCR (AS PCR, 也称 ARMS PCR)^[11]、高分辨率溶解曲线分析法^[12]、

scorpion ARMS^[13]、包含焦磷酸测序在内的第二代测序^[14-15]、BEAMing 技术^[16]以及数字 PCR 技术^[17]。除了最后 3 种检测技术, 大部分突变检测技术的突变检测灵敏度都在 1%–5%。BEAMing 技术、第二代测序和数字 PCR 技术虽然突变检测灵敏度较高 (甚至可达到 0.000 5%), 但在实际应用中存在一些限制, 需要一般临床实验室所不具备的特殊仪器, 价格昂贵, 样品制备、操作比较费时。荧光定量 qPCR 方法作为快速简便的检测方法, 仍然具有较大的临床应用价值, ARMS PCR 是目前比较常用的 qPCR 检测方法, 有研究^[18-21]通过在 ARMS PCR 的基础上引入野生型等位基因特异性封闭引物的方法来抑制野生型基因的扩增, 从而改善点突变检测的选择性可以达到 0.1%。文中在现有技术的基础上综合采用多种技术方法对 ARMS 技术作了进一步改进, 命名为 T_m 值相关的封闭 ARMS (T_m -related blocking ARMS, TB-ARMS) 技术, 建立了针对 *kras* 基因 8 种常见点突变的检测方法, 通过与广泛使用的商品化试剂盒进行比较, 及对临床组织和配对血浆样本的检测来验证该方法的实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 基因组 DNA 和质粒标准品的制备

研究采用经测序证实为野生型 *kras* 基因的健

康人全血基因组 DNA 作为野生型模板。基因组 DNA 的提取采用天根生化科技有限公司的血液、细胞、组织基因组 DNA 提取试剂盒 (目录号: DP304-02), 具体操作按照说明书进行。本研究所采用的突变标准品为采用基因重组技术构建的 *kras* 突变质粒, 设计并采用 pCR Blunt II TOPO 质粒载体 (Invitrogen), 构建 8 种常见突变类型的 *kras* 突变质粒, 包括 G12C、G12V、G12D、G12R、G12S、G12A、G13C 和 G13D, 并经测序证实突变序列。*kras* 8 种突变质粒分别采用 *Bam*H I 限制性内切酶单酶切使其线性化, 并割胶回收, 采用 PCR 胶回收试剂盒纯化。基因组 DNA 和线性化质粒分别采用分光光度计测定浓度, 并对其进行质量控制 $OD_{260/280}=1.6-1.8$ 。

1.2 标准品的制备

本研究中通过将线性化突变质粒系列稀释至 10 000、1 000、100 和 10 copies/ μ L, 然后分别取 10 μ L 与 90 μ L 野生型人基因组 DNA (30 ng/ μ L) 混合制备 10%、1%、0.1% 和 0.01% 不同突变率的样品。

1.3 肿瘤组织样品及血浆样品的收集和处理

40 例 NSCLC 病人组织样品由上海市肺科医院提供, 均为术后新鲜肿瘤组织样品; 收集 20 例 NSCLC 病人术前血浆样本和配对组织样本, 样品收集后均 -80°C 保存备用。组织 DNA 的提取采用天根生化科技有限公司的血液、细胞、组织基因组 DNA 提取试剂盒, 血浆 DNA 的提取采用天根生化科技有限公司的血清/血浆游离 DNA 提取试剂盒 (目录号: DP339), 具体操作按照说明书进行。

1.4 新的 *kras* 突变检测方法的建立

为了准确有效地检测到大量野生型基因背景下稀少的 *kras* 突变基因, 组合使用多种手段, 以增强 ARMS-PCR 对较低突变率突变基因的检测灵敏度, 增大突变型等位基因特异性引物对突变型等位基因模板与野生型等位基因模板的区分能

力。使用的手段包括: 1) 应用野生型等位基因特异性封闭引物, 其被设计为与野生型等位基因互补, 3'端经磷酸化修饰; 2) 突变型等位基因特异性引物 3'端倒数第 4-6 位引入错配碱基; 3) 突变富集扩增的反应条件, 采用较高退火温度的预循环, 该温度条件下仅有突变模板能被结合扩增, 突变模板被富集, 然后采用较低退火温度的循环进行高效扩增。

1.4.1 引物设计及扩增

本研究针对 *kras* 基因 12 和 13 号外显子上 8 种常见突变类型, 包括 c. 34G>A (p. G12S)、c. 34G>T (p. G12C)、c. 34G>C (p. G12R)、c. 35G>T (p. G12V)、c. 35G>A (p. G12D)、c. 35G>C (p. G12A)、c. 37G>T (p. G13C) 和 c. 38G>A (p. G13D) 的点突变, 采用 Oligo 7 软件辅助设计 ARMS-PCR 等位基因特异性引物, 并控制其 T_m 值, 以便筛选出与富集扩增反应条件相适应的最佳引物。采用的富集扩增反应条件较高退火温度为 64°C , 设计突变特异性引物时控制引物的 T_m 值范围为 $50-60^{\circ}\text{C}$ 。封闭引物序列与野生型等位基因位点完全匹配, 包括引入修饰的碱基, 封闭引物 T_m 值要大于等于退火温度, 确保其在退火时与野生型模板结合起封闭作用, 并且封闭引物 3'末端经修饰, 使其在 DNA 聚合酶作用下不能被延伸。同时设计锁核酸修饰封闭引物, 可使引物 T_m 值增加 $5-10^{\circ}\text{C}$, 修饰碱基为 *kras* 突变等位基因对应的野生型基因, 以增强封闭引物对野生型等位基因的区分能力。封闭引物 3'末端碱基采用磷酸化修饰。由于 8 种点突变位点在外显子上的位置靠近, 因此可采用相同的封闭引物。同时采用 *beta-actin* 基因作为内参照基因, 对其设计常规引物探针, 用以对反应的质量进行监控。所有引物、探针均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。本研究所采用的引物探针序列见表 1。

检测仪器采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪。荧光定量 PCR 反应采用 25 μ L 反应体系, 包括

1×*Taq* HS 酶 (TaKaRa) PCR 反应液、200 nmol/L 上游引物和对应的下游引物、400 nmol/L 封闭引物、200 nmol/L 的 Taqman 探针、100 nmol/L 内参照引物、200 nmol/L 内参照探针, 突变富集扩增反应条件设定为: 95 °C 变性 5 min, 然后 10 个预循

表 1 研究中所采用的引物探针序列

Table 1 Sequences of primers and probes in this study

| Primer name | Primer sequence (5'-3') | T_m (°C) |
|-----------------|---------------------------------------|------------|
| G34A-R1 | TTGCCTACGCCACT | 50.0 |
| G34A-R2 | CTCTTGCCTACGCCACT | 55.6 |
| G34A-R3 | CACTCTTGCCTACGaCACT | 55.4 |
| G34T-R1 | CcgCTTGCCTACGCCACA | 52.7 |
| G34T-R2 | CTTGCCTACGCCACA | 54.9 |
| G34T-R3 | GCACTCTTGCCTACGaCACA | 58.9 |
| G34T-R4 | CACTCTTGCCTACGaCACA | 52.7 |
| G34C-R1 | CTTGCCTACGCCACG | 56.7 |
| G35T-R1 | CACTCTTGCCTACGCCAA | 54.8 |
| G35A-R1 | gTCTTGCCTACGCCAT | 52.7 |
| G35C-R1 | CTCTTGCCTACGCCAG | 54.1 |
| G37T-R1 | CACTCTTGCCTACGCA | 53.4 |
| G38A-R1 | CACTCTTGCCTACGT | 50.6 |
| G38A-R2 | GCACTCTTGCCTACGT | 54.5 |
| G38A-R3 | AGGCACTCTTGCaTACGT | 56.1 |
| G38A-R4 | GGCACTCTTGCaTACGT | 52.4 |
| G38A-R5 | AGGCACTCTTGCCcACGT | 56.1 |
| G38A-R6 | AAGGCACTCTTGCCcACGT | 56.0 |
| <i>kras</i> -F | TGACATGTTCTAATATAGTCACA TT | 54.1 |
| <i>kras</i> -P | FAM-ATTCAGTCATTTTCAGC AGGCCTT-BHQ1 | 61.0 |
| <i>kras</i> -B1 | TGCCTACGCCACCAGCTC-PO4 | 62.2 |
| <i>kras</i> -B2 | CCTACG+CCA+C+CAGC-PO4 | 73.0 |
| IPC-F | ATCGCCGCGCTCGTC | 60.2 |
| IPC-R | CCGGGGGGCATCGTCG | 62.8 |
| IPC-P | JOE-CAACGGCTCCGGCATGT GCA-BHQ1 | 67.6 |

Note: *kras*-F is shared forward primer of 8 *kras* mutations, and it is combined with different allele specific primers of c. G34A, c. G34T, c. G34C, c. G35T, c. G35A, c. G35C, c. G37T, c. G38A mutations for genotype assay. *kras*-P is detection probe modified with fluorescence dye and quencher dye at 5'-end and 3'-end. *kras*-B1 and *kras*-B2 are blockers. "+" denotes LNA modified nucleotide and *kras*-B2 was only used in G38A mutation detection. IPC-F, IPC-R and IPC-P are primers and probe for internal positive control gene. Bases in lower case are mismatched bases adopted in this study.

环 (95 °C 10 s, 64 °C 1 min), 再运行 35 个循环 (95 °C 10 s, 60 °C 1 min)。第三步退火时检测荧光信号。内参照引物探针包含在每个反应体系中。

1.4.2 封闭引物增强 *kras* 点突变检测特异性的验证

以 *kras* 基因 G34A、G35A 突变检测为例, 分别采用含有和不含有封闭引物的反应体系对突变率 0、0.01%、0.1%、1% 和 10% 的样品进行检测, 除封闭引物其余组分完全相同, 通过 ΔC_t 值 (即 $C_{t\text{wild}}-C_{t\text{mut}}$) 的比较确定封闭引物对 *kras* 突变检测特异性是否有改善, ΔC_t 值越大说明检测特异性越好。

1.4.3 引入适当突变碱基增强等位基因特异性引物检测特异性的验证

通过在 *kras* G34A、G34T 和 G38A 等位基因特异性引物 3'端倒数第 4-6 位引入适当突变碱基并调整 T_m 值对其进行优化, 并与未引入突变碱基的等位基因特异性引物对同样的野生型模板、0.01% 和 0.1% 突变率的样品进行检测, 通过 ΔC_t 值 (即 $C_{t\text{wild}}-C_{t\text{mut}}$) 的比较确定每种突变类型的最佳突变等位基因特异性引物, ΔC_t 值越大说明引物的检测特异性越好。

1.4.4 突变富集扩增反应条件与常规反应条件的比较

对 *kras*-G34A、*kras*-G35A 的引物探针组合分别采用富集扩增的反应条件和常规反应条件对相同的 135 ng 野生型样品、0.01% 和 1% 突变率的样品进行检测比较。富集扩增反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 然后 10 个预循环 (95 °C 10 s, 64 °C 1 min), 再运行 35 个循环 (95 °C 10 s, 60 °C 1 min), 第三步退火时检测荧光信号。对比反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 然后 10 个预循环 (95 °C 10 s, 60 °C 1 min), 再运行 35 个循环 (95 °C 10 s, 60 °C 1 min), 第三步退火时检测荧光信号。通过 ΔC_t 值 (即 $C_{t\text{wild}}-C_{t\text{mut}}$) 的比较确定最佳

反应条件, ΔC_t 值越大说明检测特异性越好。

1.5 方法学评估

1.5.1 突变检测特异性分析

采用经测序证实为野生型的人全血基因组 DNA 样本, 分别对 3 个不同量 (1 ng、20 ng、135 ng) 的野生型模板进行 *kras* 突变分型检测, 每样品重复 3 次。PCR 扩增反应实施方法和条件如前所述。反应结束, 获得每个样品的突变检测 C_t 值和内控 C_t 值。

1.5.2 突变检测灵敏度的评价

本研究通过在 135 ng 野生型基因组 DNA 背景下, 对 *kras* 8 种突变的每种突变类型采用 TB-ARMS qPCR 方法检测其 0.1% 和 0.01% 突变率的样品, 以野生型样品作对照, 来分析 *kras* 突变检测的灵敏度。

1.5.3 两种检测方法对组织样品的检测比较

对 40 例 NSCLC 患者组织样品提取 DNA, 每样品分别取 10 ng DNA, 采用本研究的 TB-ARSM 技术和商品化 ADx-ARMS *kras* 突变检测试剂盒进行分型检测, 并对检测结果进行比较。对两种方法

检测结果不一致的样品进一步进行测序验证。

1.5.4 血浆和配对组织样品的对照分析

为验证本研究方法对血浆 DNA *kras* 突变检测的准确性, 对 20 例 NSCLC 患者血浆及其配对组织样品提取的 DNA 进行对照分析。采用本研究的 TB-ARMS 技术方法对血浆 DNA 进行 8 种 *kras* 突变分型检测。同时采用测序方法对组织 DNA 样品进行 *kras* 突变检测。对血浆和组织样品的检测结果进行对比分析, 判断血浆突变检测的准确性。

2 结果与分析

2.1 封闭引物增强 *kras* 基因点突变检测的特异性

通过对 *kras* G34A 和 G35A 点突变的检测, 结果显示含有或不含有封闭引物内控检测 C_t 值相似, 而采用封闭引物对野生型模板突变检测的 C_t 值增大, 对突变样品突变检测的 C_t 值与不采用封闭引物相似或更低 (图 1), 因而采用封闭引物的 ΔC_t 值即 $C_{t\text{wild}} - C_{t\text{mut}}$ 会变大, 说明封闭引物可改善 *kras* 点突变的检测特异性。

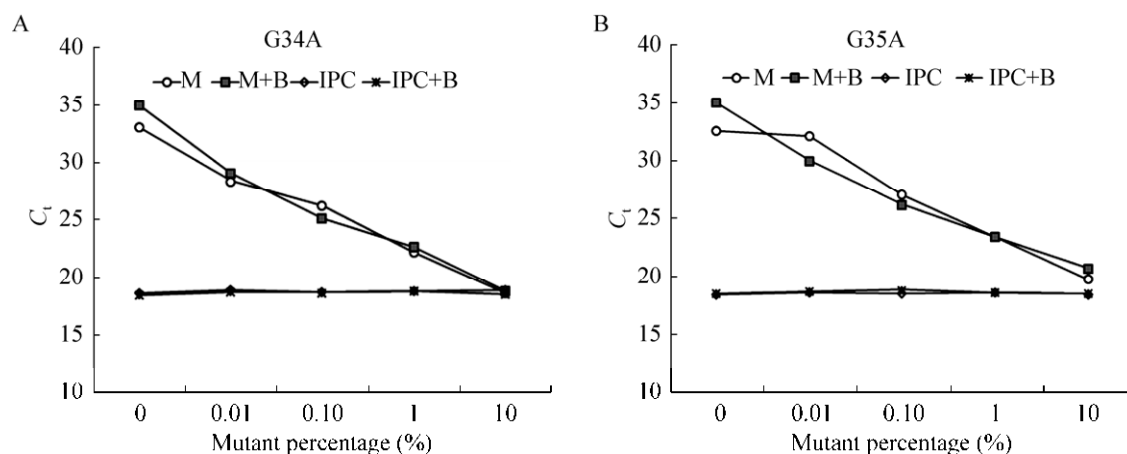


图 1 封闭引物增强突变检测的特异性

Fig. 1 Enhanced specificity with wild type blocker in mutation detection. (A) Comparison of the results with and without blocker in detection of *kras* G34A mutation. (B) Comparison of the results with and without blocker in detection of *kras* G35A mutation. Mutation analysis was performed on wild and mutant samples with reagents (with and without blocker), and each reagent included the primer set for internal positive control. Reactions were run in triplicate and data are shown as average C_t values. Legend "M" represents mutation detection without blocker; "M+B" represents mutation detection with blocker; "IPC" represents internal positive control detection without blocker; and "IPC+B" represents internal positive control detection with blocker.

2.2 突变碱基的引入可提高 *kras* 等位基因特异性引物突变检测的特异性和选择性

对 *kras* 突变的引物优化结果 (表 2) 表明, *kras*-G34A 等位基因特异性引物 3'端倒数第 5 位引入突变碱基 C>A 的等位基因特异性引物 G34A-R3 较未引入突变碱基的等位基因特异性引物 G34A-R1、G34A-R2 对 0.1% 和 0.01% 样品突变检测的 ΔC_t 值明显增大; 同样, 3'端倒数第 5 位引入突变碱基 C>A 的等位基因特异性引物 G34T-R4 较 3'端未引入突变碱基的等位基因特异性引物的 G34T-R1、G34T-R2 的 ΔC_t 值增大, 较 T_m 值较高的 G34T-R3 突变检测的 ΔC_t 值亦增大; 而对于 *kras*-G38A 倒数第 6 位引入突变碱基 C>A 的等位基因特异性引物 G38A-R4 较 3'端未引入突变碱基的等位基因特异性引物 G38A-R1、G38A-R2 的 ΔC_t 值增大, 较 3'端倒数第 5 位引入突变碱基 T>C 的等位基因特异性引物 G38A-R5、

G38A-R6 的 ΔC_t 值也增大, 较 T_m 值较高的 G38A-R3 突变检测的 ΔC_t 值亦增大, G38A-R4 检测特异性最好。

2.3 突变富集扩增反应条件与常规扩增条件的比较

通过采用突变富集扩增反应条件 (表 3) 和常规扩增条件 (表 4) 对 *kras*-G34A 和 *kras*-G35A 的不同突变样品进行检测, 检测结果表明采用突变富集扩增反应条件对野生型样品检测的 C_t 值比常规扩增条件的 C_t 值均增大; 采用突变富集扩增反应条件对于 10% 高突变率样品检测, G34A 突变检测 ΔC_t 值与常规检测条件相比增加, 而 G35A 突变检测 ΔC_t 值与常规检测条件相比无明显改变; 但采用突变富集扩增反应条件对 0.1% 和 0.01% 低突变率样品检测, G34A 和 G35A 突变检测的 ΔC_t 值均高于常规扩增条件的 ΔC_t 值, 数值至少可增加 1 以上。

表 2 等位基因特异性引物引入适当突变碱基可增加突变检测特异性

Table 2 Introduction of certain mutated base increased the specificity of mutation detection

| Mutant type | Primer name | $C_{t,wild}$ | $C_{t,mut0.01\%} (\Delta C_t)$ | $C_{t,mut0.1\%} (\Delta C_t)$ |
|-------------------|-------------|--------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>kras</i> -G34A | G34A-R1 | 28.27 | 26.99 (1.28) | 23.66 (4.61) |
| | G34A-R2 | 23.10 | 22.95 (0.15) | 22.29 (0.81) |
| | G34A-R3 | 31.49 | 24.77 (6.72) | 22.74 (8.75) |
| <i>kras</i> -G34T | G34T-R1 | 32.44 | 29.25 (3.19) | 25.86 (6.58) |
| | G34T-R2 | 33.20 | 27.65 (5.55) | 24.78 (8.42) |
| | G34T-R3 | 31.98 | 29.80 (2.18) | 25.24 (6.74) |
| | G34T-R4 | 34.24 | 28.08 (6.16) | 25.52 (8.72) |
| <i>kras</i> -G38A | G38A-R1 | 31.39 | 29.78 (1.61) | 25.85 (5.54) |
| | G38A-R2 | 29.15 | 27.46 (1.70) | 24.48 (4.67) |
| | G38A-R3 | 31.04 | 30.19 (0.85) | 24.74 (6.30) |
| | G38A-R4 | 31.97 | 29.68 (2.29) | 25.67 (6.30) |
| | G38A-R5 | 32.84 | 33.12 (-0.28) | 28.36 (4.48) |
| | G38A-R6 | 29.54 | 29.32 (0.22) | 24.60 (4.94) |

Note: qPCR reactions were performed in duplicate. C_t values were presented as mean C_t . ΔC_t was calculated as $C_{t,mut} - C_{t,wild}$. Values representing highest specificity of each mutant type are highlighted in bold.

表 3 突变富集反应条件下的突变检测

Table 3 Mutation detection under mutant-enriched condition

| Mutant type | Mutant-enriched condition | | | | |
|-------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | $C_{t,wild}$ | $C_{t,mut0.01\%} (\Delta C_t)$ | $C_{t,mut0.1\%} (\Delta C_t)$ | $C_{t,mut1\%} (\Delta C_t)$ | $C_{t,mut10\%} (\Delta C_t)$ |
| <i>kras</i> -G34A | 33.83 | 29.06 (4.77) | 25.13 (8.70) | 22.67 (11.16) | 18.87 (14.95) |
| <i>kras</i> -G35A | 33.33 | 29.98 (3.35) | 25.93 (7.40) | 23.42 (9.91) | 20.76 (12.57) |

表 4 常规反应条件下的突变检测

Table 4 Mutation detection under traditional condition

| Mutant type | Traditional condition | | | | |
|-------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | $C_{i,wild}$ | $C_{i,mut0.01\%} (\Delta C_i)$ | $C_{i,mut0.1\%} (\Delta C_i)$ | $C_{i,mut1\%} (\Delta C_i)$ | $C_{i,mut10\%} (\Delta C_i)$ |
| <i>kras</i> -G34A | 28.20 | 25.38 (2.82) | 22.19 (6.01) | 19.02 (9.18) | 16.01 (12.19) |
| <i>kras</i> -G35A | 29.53 | 28.86 (0.67) | 23.23 (6.30) | 19.46 (10.08) | 16.87 (12.66) |

Note: qPCR reactions were performed in triplicate. C_i values were presented as mean C_i . ΔC_i was calculated as $C_{i,mut} - C_{i,wild}$.

2.4 突变检测特异性分析

通过对 1 ng、20 ng 和 135 ng 野生型基因组 DNA 的检测,观察每个样本的内控 C_i 值均 < 30 (数据未列出),不同分型试剂对野生型样品突变检测的 C_i 值均大于 30 (表 5),提示 TB-ARMS 技术 *kras* 突变分型检测在 1-135 ng 模板范围内,突变检测 C_i 值均小于 30。

2.5 突变检测的灵敏度评价

kras 8 种分型试剂对 0.01%、0.1% 突变率样品的检测结果(表 6)表明,不同分型试剂对相应的

0.1% 和 0.01% 突变率样品的突变检测 C_i 值均小于 30,小于相应野生型模板检测 C_i 值,且与野生型模板检测的 C_i 值差值即 ΔC_i 值均大于 3,初步判定本发明 *kras* 分型试剂突变检测的灵敏度均可达到 0.01%,分型检测 0.01% 突变检测 C_i 临界值可取 $C_{i,wild}$ 和 $C_{i,0.01\%}$ 中间的数值。

2.6 两种方法临床组织样本检测结果比较

对 40 例 NSCLC 组织样本提取的 DNA,分别采用 TB-ARMS 技术和 ADx-ARMS 技术进行检测,其中 35 例样品检测结果一致,5 例样品两种方法

表 5 8 种 *kras* 分型试剂对野生型样品的检测 C_i 值Table 5 C_i values of wild type samples with 8 *kras* genotyping reagents

| Amount | G34A | G34T | G34C | G35T | G35A | G35C | G37T | G38A |
|--------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 ng | 35.00±0.00 | 33.97±1.79 | 35.00±0.00 | 35.00±0.00 | 35.00±0.00 | 35.00±0.00 | 35.00±0.00 | 35.00±0.00 |
| 20 ng | 33.41±1.53 | 35.00±0.00 | 35.00±0.00 | 35.00±0.00 | 32.92±2.14 | 35.00±0.00 | 34.80±0.34 | 34.51±0.86 |
| 135 ng | 33.54±2.54 | 35.00±0.00 | 35.00±0.00 | 34.70±0.52 | 32.98±1.27 | 35.00±0.00 | 34.59±0.60 | 33.72±2.22 |

Note: 1 ng, 20 ng and 135 ng wild type gDNA were tested with 8 typing reagents. qPCR reactions were run in triplicate. C_i value was presented as mean C_i ±standard deviation for each mutation detection system.

表 6 *kras* 8 种分型检测试剂的突变检测灵敏度Table 6 The sensitivity of 8 *kras* typing reagents

| Typing reagent | $C_{i,wild}$ | $C_{i,mut0.01\%} (\Delta C_i)$ | $C_{i,mut0.1\%} (\Delta C_i)$ |
|-------------------|--------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>kras</i> -G34A | 31.83 | 28.16 (3.68) | 24.77 (5.32) |
| <i>kras</i> -G34T | 33.20 | 27.79 (7.21) | 25.21 (9.79) |
| <i>kras</i> -G34C | 35.00 | 26.93 (8.07) | 24.15 (10.85) |
| <i>kras</i> -G35T | 34.15 | 28.68 (6.32) | 24.68 (10.32) |
| <i>kras</i> -G35A | 33.33 | 28.98 (4.35) | 25.93 (7.40) |
| <i>kras</i> -G35C | 35.00 | 27.32 (7.68) | 24.78 (10.22) |
| <i>kras</i> -G37T | 35.00 | 27.62 (7.38) | 23.22 (11.78) |
| <i>kras</i> -G38A | 35.00 | 27.39 (7.61) | 24.89 (10.11) |

Note: C_i values were calculated as average C_i from samples of triplex reactions. If there were no available C_i values for certain samples, the number 35 was used to calculate the C_i values in order to get informative data.

检测结果不一致。5 例检测不一致样品中 2 例样品分型结果不一致,3 例样品 ADx-ARMS 商品化试剂盒未检测到突变。对该 5 例检测不一致样品进一步进行测序验证,结果(见表 7 和图 2)表明 TB-AMRS 技术的检测结果与测序结果一致。

表 7 5 例检测不一致样品三种检测方法的结果比较

Table 7 Comparison of the results of 5 inconsistent samples with three different methods

| Sample | ADx-ARMS | TB-ARMS | Sequencing |
|--------|----------|---------|------------|
| U6 | WT | G37T | G37T |
| U8 | WT | G35T | G35T |
| U16 | WT | G37T | G37T |
| #13 | G34A | G34T | G34T |
| #14 | G34A | G34T | G34T |

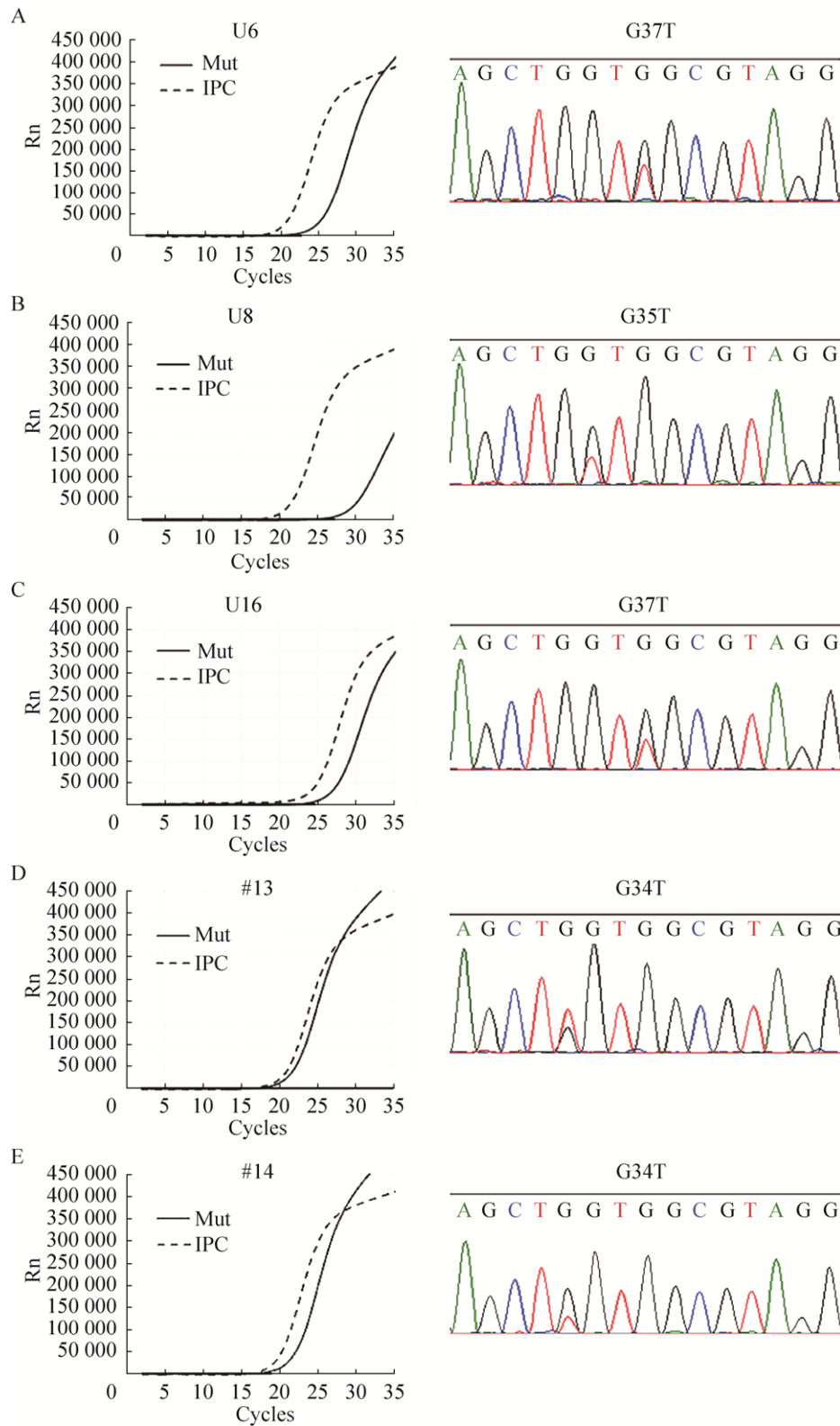


图 2 五例检测不一致样品的 TB-ARMS qPCR 检测结果和测序结果

Fig. 2 TB-ARMS qPCR results and sequencing results of five inconsistent samples.

2.7 血浆及配对组织 DNA 样品检测结果比较

血浆 DNA 检测结果与配对组织样品测序结

果的比较见表 8 和图 3, 表明血浆 DNA 样品检测结果与配对组织样品测序结果完全一致。

表 8 20 例 NSCLC 病人血浆 DNA 样品 *kras* 突变 qPCR 检测结果

Table 8 The qPCR results of *kras* mutation for 20 NSCLC plasma DNA samples

| Sample ID | C_t | | | | | | | | Results |
|-----------|-------|-------|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|---------|
| | G34A | G34T | G34C | G35T | G35A | G35C | G37T | G38A | |
| S1 | 34.47 | 31.92 | 30.53 | — | 8.56 | 22.11 | 24.39 | 27.01 | G35A |
| S2 | 32.59 | — | — | 31.48 | 34.32 | — | — | — | N |
| S3 | 19.30 | 19.35 | — | — | 6.18 | 15.94 | 19.07 | 19.38 | G35A |
| S4 | — | — | — | 13.88 | — | — | — | — | G35T |
| S5 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |
| S6 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |
| S7 | — | — | — | 33.87 | 31.27 | — | — | — | N |
| S8 | — | — | — | — | — | 34.47 | 34.39 | — | N |
| S9 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |
| S10 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |
| S11 | 34.73 | — | — | — | 6.24 | 24.45 | 23.22 | 26.85 | G35A |
| S12 | — | — | — | — | 10.43 | — | 39.32 | — | G35A |
| S13 | — | — | — | — | 14.58 | — | — | — | G35A |
| S14 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |
| S15 | — | — | 31.44 | 34.90 | 34.64 | — | — | — | N |
| S16 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |
| S17 | — | — | — | 7.04 | — | — | 25.96 | — | G35T |
| S18 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |
| S19 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |
| S20 | — | — | — | — | — | — | — | — | N |

Note: “—” in C_t value shows C_t value is not available due to the limited cycle number. $C_t < 30$ was used as cutoff value and the genotype with the minimum C_t value is determined as mutation type if there are more than one mutation types. Result “N” means mutation negative. The minimum C_t value for each sample is highlighted in bold, which corresponds to the relevant mutation type.

3 讨论

当使用基于 PCR 方法的 *kras* 基因突变检测时, 样本中的突变型等位基因的扩增会被野生型基因干扰, 尤其在高野生型基因背景下检测稀少的突变时, 突变型等位基因特异性引物会错配至野生型等位基因并发生延伸, 从而产生假阳性结果。目前常用的 *kras* 点突变检测 PCR 方法大都为 ARMS 方法及其改进的技术方法, 原理都是通过等位基因特异性引物 3'末端的特异性碱基区分突变和野生型 *kras* 基因。仅通过 ARMS 方法对点突

变的检测灵敏度只能达到 1%, 即最低只能检测到 1% 突变率的样品。而对于大量野生型基因背景下的稀少突变, 例如 0.1% 突变率的样品, ARMS 技术方法的应用将受到限制。高野生型背景下稀少的突变检测依赖于抑制样品中野生型等位基因的扩增, 不少研究^[18-21]均已证明野生型等位基因特异性封闭引物有助于增加突变检测的特异性, 我们的研究也作了进一步验证, 采用封闭引物 *kras* G34A 和 G35A 突变检测的灵敏度和特异性均可获得改善, 甚至提高到 10 倍。有研究对封闭引物进一步采用 MGB 修饰或锁核酸修饰来增加其

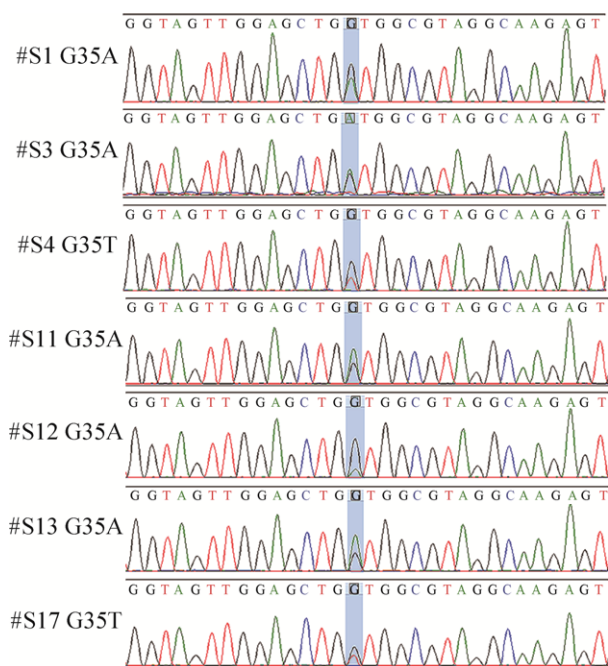


图 3 突变阳性组织样品测序结果

Fig. 3 Sequencing results of mutant tissue samples.

T_m 值从而增强其封闭效果, 虽然这样可增强其结合能力但引物合成的成本较单纯磷酸化修饰大大增加并对突变检测亦产生抑制。例如 Huang 等^[22]采用 6 个锁核酸修饰碱基的 WTB 封闭引物, 明显提高了 WTB 的 T_m 值, 对野生型模板的封闭能力显著增强, 但亦需要采用较长的 36 碱基的等位基因特异性引物以增加其 T_m 值可与 WTB 竞争, 减少 WTB 对突变检测的抑制, 均使其应用成本增加。本研究的封闭引物仅 3' 末端进行磷酸化修饰或采用 3 个锁核酸修饰碱基, 其亦可以达到较好的检测效果, 具有更高的性价比。

同时对含有野生型等位基因样品中的突变型等位基因的特异性检测依赖于对突变型等位基因的选择性扩增, 等位基因特异性引物 3' 端仅有一个区分碱基有时不足以抑制野生型模板的结合, 在靠近 3' 端的适当位置再人为引入一个突变碱基, 会进一步降低野生型模板的结合能力。Xue 等^[23]的研究即采用引入错配碱基的方法改善了基因分型检测中等位基因特异性引物的检测特异

性, 我们的研究也表明通过引入适当突变碱基可改善某些 *kras* 突变等位基因特异性引物的检测特异性, 如果扩增效率按 100% 计算, 最高可改善达 10 倍。

此外, 通过富集扩增的反应条件我们亦改善了 *kras* 突变检测的特异性, 与常规检测条件相比, 我们的富集扩增反应条件对 0.01% 和 0.1% 低突变率样品检测的 ΔC_t 值可增加至少 1, 如果扩增效率按 100% 计算, 则我们的富集扩增条件可使突变检测特异性改善 2 倍以上。

通过采用多种组合手段, 文中的 TB-ARMS 技术 *kras* 点突变检测的灵敏度可达到 0.01%, 较单纯 ARMS 方法检测灵敏度可提高 100 倍以上。与现有商品化试剂盒相比具有更高的检测灵敏度和准确性, 证明了 TB-ARMS 技术检测灵敏度优于单纯的 ARMS 技术方法。此外我们的研究方法对模板具有更广的检测范围, 模板量 10–135 ng 不影响突变检测的特异性, 并且由于检测特异性的改善可在同一反应体系中进行 *kras* 多种点突变的同时检测, 因此在实际应用中将会更加方便。

液态活检作为伴随诊断的无创检测方法受到越来越多的关注, 成为研究的热点之一, 血液是最常用的液态活检样品。已有研究^[24]表明肺癌组织样品中常常存在低突变率的 *kras* 突变, 血液中的 *kras* 突变率可能会更低, 甚至不到 0.1% 的突变率。现有的 ARMS 检测技术受灵敏度限制不适宜血液等样品的检测, TB-ARMS 技术突变检测的灵敏度大大提高, 通过对 20 例术前血浆样本和配对组织样品的对照检测, 两者检测结果的一致亦验证了 TB-ARMS 技术方法的检测准确性, 适用于液体活检样品的检测。

除了应用于 *kras* 基因点突变的检测, TB-ARMS 突变检测方法只要遵循相应的引物设计原则和应用方法, 理论上适用于所有野生型背景下的基因点突变检测, 例如可应用于与癌症个体化治疗和

预后预测相关的 *braf*、*pi3k*、*tp53* 等其他基因的点突变检测^[25-26]，因此具有广泛的应用前景。随着基因突变检测技术的发展，虽然出现了一系列高灵敏度的突变检测方法，包括第二代测序技术、数字化 PCR 等，相较于这些高成本的检测方法，改进的 TB-ARMS 荧光 PCR 点突变检测方法具有低成本、简单方便的应用特点，检测时间只需大约 1.5 h，在荧光定量 PCR 仪临床应用已经十分普及的今天，更适宜在临床检测中广泛应用。

REFERENCES

- [1] Li SQ, Balmain A, Counter CM. A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(12): 767-777.
- [2] Inamura K. Clinicopathological characteristics and mutations driving development of early lung adenocarcinoma: tumor initiation and progression. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1259.
- [3] Lindsay CR, Jamal-Hanjani M, Forster M, et al. KRAS: reasons for optimism in lung cancer. *Eur J Cancer*, 2018, 99: 20-27.
- [4] Chuang HC, Huang PH, Kulp SK, et al. Pharmacological strategies to target oncogenic KRAS signaling in pancreatic cancer. *Pharmacol Res*, 2017, 117: 370-376.
- [5] Molinari C, Marisi G, Passardi A, et al. Heterogeneity in colorectal cancer: a challenge for personalized medicine? *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3733.
- [6] Marrugo-Ramírez J, Mir M, Samitier J. Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: a promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 2877.
- [7] Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, et al. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2017, 107: 100-107.
- [8] Furuki H, Yamada T, Takahashi G, et al. Evaluation of liquid biopsies for detection of emerging mutated genes in metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2018, 44(7): 975-982.
- [9] Tu M, Chia D, Wei F, et al. Liquid biopsy for detection of actionable oncogenic mutations in human cancers and electric field induced release and measurement liquid biopsy (eLB). *Analyst*, 2016, 141(2): 393-402.
- [10] Guo NN, Lou F, Ma YF, et al. Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery. *Sci Rep*, 2016, 6: 33519.
- [11] Wang C, Chen XM, Wu YY, et al. Lateral flow strip for visual detection of *K-ras* mutations based on allele-specific PCR. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(10): 1709-1714.
- [12] Sun HY, Yang Y, Yang LX, et al. Snapback primer mediated clamping PCR for detection of *EGFR* and *KRAS* mutations in NSCLC patients by high resolution melting analysis. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 407537.
- [13] Matsunaga M, Kaneta T, Miwa K, et al. A comparison of four methods for detecting *KRAS* mutations in formalin-fixed specimens from metastatic colorectal cancer patients. *Oncol Lett*, 2016, 12(1): 150-156.
- [14] Cortes U, Guilloteau K, Rouvreau M, et al. Development of pyrosequencing methods for the rapid detection of *RAS* mutations in clinical samples. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99(2): 207-211.
- [15] Jing CW, Mao XH, Wang Z, et al. Next-generation sequencing-based detection of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA*, *Her2* and *TP53* mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 2191-2197.
- [16] Garcia J, Forestier J, Dusserre E, et al. Cross-platform comparison for the detection of *RAS* mutations in cfDNA (ddPCR Biorad detection assay, BEAMing assay, and NGS strategy). *Oncotarget*, 2018, 9(30): 21122-21131.
- [17] Luo YW, Li Y. Detection of *kras* mutation in colorectal cancer patients' cfDNA with droplet digital PCR. *Chin J Biotech*, 2018, 34(3): 407-420 (in Chinese).

- 罗宇文, 李瑶. 基于微滴式数字PCR检测肠癌病人游离环状DNA *KRAS* 突变的新方法. 生物工程学报, 2018, 34(3): 407–420.
- [18] Huang MMC, Leong SM, Chua HW, et al. Highly sensitive *KRAS* mutation detection from formalin-fixed paraffin-embedded biopsies and circulating tumour cells using wild-type blocking polymerase chain reaction and Sanger sequencing. *Mol Diagn Ther*, 2014, 18(4): 459–468.
- [19] Jia Y, Sanchez JA, Wangh LJ. Kinetic hairpin oligonucleotide blockers for selective amplification of rare mutations. *Sci Rep*, 2014, 4: 5921.
- [20] Qu SF, Liu LC, Gan SZ, et al. Detection of low-level DNA mutation by ARMS-blocker-Tm PCR. *Clin Biochem*, 2016, 49(3): 287–291.
- [21] Kim H, Ruby AE, Shandilya HG, et al. T-blocker: a simple and robust probe-free quantitative PCR assay to detect somatic mutations down to 0.1% frequency. *Biotechniques*, 2018, 65(4): 205–210.
- [22] Huang JF, Zeng DZ, Duan GJ, et al. Single-tubed wild-type blocking quantitative PCR detection assay for the sensitive detection of codon 12 and 13 *KRAS* mutations. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0145698.
- [23] Xue L, Ye YX, Yi GH, et al. Analysis of *CYP2C19* genotypes in Chinese population using allele-specific PCR. *J Hainan Med Univ*, 2010, 16(9): 1101–1105, 1110 (in Chinese).
薛丽, 叶玉兴, 易国辉, 等. AS-PCR方法检测中国人群 *CYP2C19* 基因多态性. 海南医学院学报, 2010, 16(9): 1101–1105, 1110.
- [24] Myers MB, McKim KL, Meng FX, et al. Low-frequency *KRAS* mutations are prevalent in lung adenocarcinomas. *Personal Med*, 2015, 12(2): 83–98.
- [25] Tsilimigras DI, Ntanasis-Stathopoulos I, Bagante F, et al. Clinical significance and prognostic relevance of *KRAS*, *BRAF*, *PI3K* and *TP53* genetic mutation analysis for resectable and unresectable colorectal liver metastases: A systematic review of the current evidence. *Surg Oncol*, 2018, 27(2): 280–288.
- [26] Salemi R, Falzone L, Madonna G, et al. MMP-9 as a candidate marker of response to *BRAF* inhibitors in melanoma patients with *BRAF*^{V600E} mutation detected in circulating-free DNA. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 856.

(本文责编 陈宏宇)