

论著 · 基础研究

利用野生抑制探针提升对 BRAF V600E 基因痕量突变检测的研究和临床应用^{*}

彭佳^{1,2}, 朱川², 魏昆¹, 黄庆^{1△}, 府伟灵^{1▲}

(1. 陆军军医大学第一附属医院检验科, 重庆 400038; 2. 中国人民解放军第 324 医院体检中心, 重庆 400020)

摘要:目的 BRAF V600E 基因痕量突变的筛查可以避免肿瘤患者无效治疗的情况出现。方法 用内部竞争性扩增片段提高野生抑制型 (WTB) 探针对野生型 BRAF V600E 基因的抑制, 提高发生痕量突变的 BRAF V600E 基因型的检出率。结果 当模板 DNA 浓度在 50~200 ng/ μ L 时, 构建的痕量基因突变实时荧光定量检测方法能够完全屏蔽 BRAF V600E 野生型基因扩增。该检测方法的灵敏度可以达到 0.1%, 符合基因痕量突变检测技术灵敏度的要求。在 50 例疑似结直肠癌患者的结直肠镜活检组织中, 构建的该方法检测到 BRAF V600E 基因痕量突变的标本为 8 例 (16.0%), 具备较高的检出率。结论 构建的基因痕量突变的检测方法能够对临床标本中 BRAF V600E 基因痕量突变做快速、简便、低成本的定量分析。

关键词: BRAF V600E 基因; 基因痕量突变; 结直肠肿瘤; 锁核酸

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.001 **中图法分类号:** R730.4

文章编号: 1673-4130(2018)01-0001-05 **文献标识码:** A

Study and clinical application of wild-type blocking probe for improving trace amount mutation detection of BRAF V600E gene^{*}

PENG Jia^{1,2}, ZHU Chuan², WEI Kun¹, HUANG Qing^{1△}, FU Weiling^{1▲}

(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Physical Examination Center, 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

Abstract: **Objective** To study the screening of trace amount mutation of BRAF V600E gene for avoiding the appearance of ineffective treatment in cancer patients. **Methods** The internal competitive amplification fragments were used to improve the inhibition of wild-type blocking (WTB) probe on wild-type BRAF V600E gene to increase the detection efficiency of BRAF V600E genotype of trace amount mutation occurrence. **Results** When the template DNA concentration was 50—200 ng/ μ L, the constructed trace amount gene mutation real time fluorescence quantitative detection method could completely block the amplification of the wild-type BRAF V600E gene. The sensitivity of this assay reached as high as 0.1%, which was in line with the sensitivity requirement for the gene trace amount mutation detection technique. In the colorectal biopsy tissues from 50 cases of suspected colorectal cancer, 8 cases (16.0%) of BRAF V600E gene trace amount mutation were detected by using this constructed method, which had higher detection rate. **Conclusion** The constructed gene trace amount mutation detection method can make the rapid, simple and low cost quantitative analysis for BRAF V600E gene trace amount mutation in clinical samples.

Key words: BRAF V600E gene; gene trace amount mutation; colorectal neoplasms; locked nucleic acid

BRAF 基因位于表皮生长因子受体 (EGFR) 信号通路的下游, 其突变同样能引发蛋白激酶 (MAPK) 途径持续性激活, 从而使得表皮细胞生长不受正常调控, 导致组织过度增生, 最终发生恶变^[1-2]。对结直肠癌患者的突变基因的研究发现, KRAS 基因的第 12、13 密码子、BRAF 基因的第 600 位密码子最容易发生

^{*} 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2011AA02A121)。
作者简介: 彭佳, 女, 主管技师, 主要从事临床分子诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: Dr. Q. Huang@gmail.com; ▲ 共同通信作者, E-mail: weiling_fu@163.com。
本文引用格式: 彭佳, 朱川, 魏昆, 等. 利用野生抑制探针提升对 BRAF V600E 基因痕量突变检测的研究和临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 1-4.

基因突变,二者具有排他性^[3-4]。部分直肠癌患者接受爱必妥或帕尼单抗治疗无疗效的内在原因就是在部分 KRAS 基因检测结果为阴性的患者中实质上存在着 BRAF 基因的突变,两种基因的排他性特征决定二者都是独立预测指标,因此 BRAF 基因的突变检测很有必要^[5-6]。对众多的野生型基因而言,在肿瘤发生的早期出现突变的基因十分微量,为了进一步提高 BRAF V600E 基因痕量突变的检出率,野生抑制型探针在同一个 聚合酶链反应(PCR) 的反应体系中会相互竞争结合模板互补区域。阻断野生型 PCR 产物的形成,在野生抑制型 PCR(WTB-PCR)的基础上增加了内部竞争性扩增片段,引物与目标基因扩增同时,可以用来降低高循环数出现的碱基错配现象,提高检出率实验结果符合基因痕量突变检测条件,能够运用于临床标本 BRAF V600E 基因痕量突变的检测^[7-8]。

1 材料与方法

1.1 材料 HT-29 细胞株来自美国组织培养库包含杂合突变的 BRAF V600E。来自美国组织培养库的 SW480 细胞株是纯合野生型。DNA 来源于第三军医大学西南医院门诊及住院患者血液或者组织,患者均为汉族,本研究得到西南医院伦理委员会批准,并与患者或其监护人签订了知情同意书。疑似结直肠癌患者直肠镜活检组织经磷酸盐缓冲液洗涤后严格按试剂盒(中国上海基因科技有限公司)说明书进行操作,提取好的 DNA 用微量分光光度仪测量浓度,每个标本测 3 次取平均值。

1.2 仪器与试剂 内参基因引物终浓度 500 nmol/L (SW-329/330)荧光探针终浓度为 100 nmol/L (SW-1294),BRAF V600E 基因引物终浓度为 500 nmol/L (SW-458/461)荧光探针终浓度为 250 nmol/L (SW-467),锁核酸探针(SW-356)终浓度为 500 nmol/L,模板浓度为 100 ng/μL。反应条件 50 ℃,2 min;95 ℃,2 min;95 ℃,15 s;60 ℃,1 min (循环 60 次),酶为 2× SuperMix-UDG。见表 1。

1.3 方法 同时加入锁核酸和作为内部竞争性扩增

片段的内参基因引物对,与发生痕量突变的 BRAF V600E 基因同时扩增,通过屏蔽 BRAF V600E 野生型基因,富集发生痕量突变的 BRAF V600E 基因,定量检测 BRAF V600E 基因特异性探针的荧光强度,通过目标基因与内参基因之间的 CT 差值计算出突变等位基因的比例,达到对 BRAF 基因痕量突变定性或定量检测的目的。提高检测基因痕量突变效率的同时,衡量反应体系中加入 DNA 的总量。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel 2007、SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 反应体系对不同浓度野生型模板的屏蔽效果 实验中采用前期提取的本科室人员志愿者健康全血 DNA 作为模板,浓度分别为 50、100、150、200 ng/μL,反应体系内参基因引物终浓度为 500 nmol/L,荧光探针终浓度为 100 nmol/L;BRAF V600E 基因引物终浓度为 500 nmol/L,荧光探针终浓度为 250 nmol/L,锁核酸探针终浓度为 500 nmol/L,从表 2 可以发现,随着模板浓度增加,不论加入 WTB 与否,LEPTIN 基因组 CT 值无显著变化。而 BRAF V600E 基因扩增组在 WTB 作用下对 50~200 ng/μL 的野生型模板能有效屏蔽。

表 1 合成的引物和探针序列(5'→3')	
序列号	序列
SW-329	CAG TCT CCT CCA AAC AGA AAG TCA
SW-330	GTC CAT CTT GGA TAA GGT CAG GA
SW-1294	(TexasRed) CGG TTT GGA CTT CAT TCC TGG GCT CC (BSW2)
SW-458	CCT TTA CTT ACT ACA CCT CAG
SW-461	CCA CTC CAT CGA GAT TTC
SW-467	(FAM) ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TT (BSW1)
SW-356	GAT TTC ACT GTA G

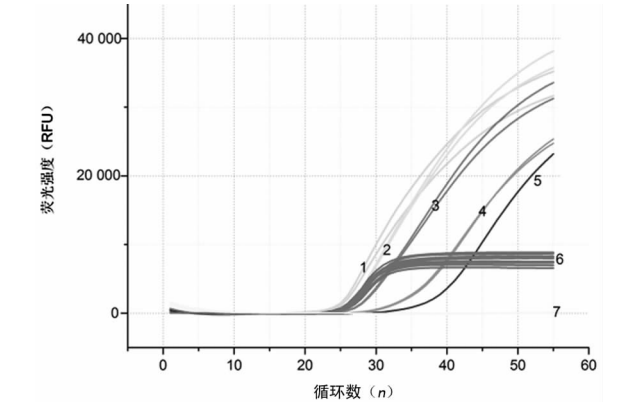
表 2 构建的反应体系对不同浓度野生型模板的屏蔽效果($\bar{x} \pm s$,循环数)					
基因		模板 50 ng/μL	模板 100 ng/μL	模板 150 ng/μL	模板 200 ng/μL
LEPTIN 基因	含 WTB	24.87±0.62	23.8±0.25	24.86±0.43	25.2±0.20
	无 WTB	24.71±0.67	23.7±0.13	24.58±0.22	24.9±0.26
BRAF 基因	含 WTB	—	—	—	—
	无 WTB	23.65±0.63	22.9±0.30	22.57±0.22	22.4±0.14

注:—表示无数据

2.2 内部竞争性片段参与的反应体系灵敏度、特异度及重复性评价 为了解本研究构建的检测体系灵敏度、特异度和重复性,将 HT-29 突变型 DNA 与 SW480 野生型 DNA 按照不同的比例进行混匀,配制

成 BRAF V600E 突变率分别为 50%、25%、10%、1%、0.1% 的不同 DNA 标本,对应的突变模板量分别为 50 000、25 000、10 000、1 000、100 ng/μL。结果见图 1 扩增曲线所示,CT 值随着 BRAF V600E 基因突

变率的降低而增加;图 1 曲线 5 表示对 0.1% 的突变仍能够有效检出符合检测基因痕量突变的水平。此外,重复实验表明重复管的两个反应之间的 CT 值差异小,说明本检测体系的重复性较好;加入的内参基因扩增稳定,曲线 6 所示。依靠已知突变比例的 DNA 模板及其对应的 CT 值,可以计算出扩增效能为 93.6% ($r^2=0.9606$),见图 2。



注:1 为加入含有 50% BRAF 突变型基因后的扩增曲线;2 为加入含有 25% BRAF 突变型基因后的扩增曲线;3 为加入含有 10% BRAF 突变型基因后的扩增曲线;4 为加入含有 1% BRAF 突变型基因后的扩增曲线;5 为加入含有 0.1% BRAF 突变型基因后的扩增曲线;6 为内参基因 LEPTIN 扩增曲线;7 为空白对照没有扩增

图 1 反应体系的灵敏度及特异度检测

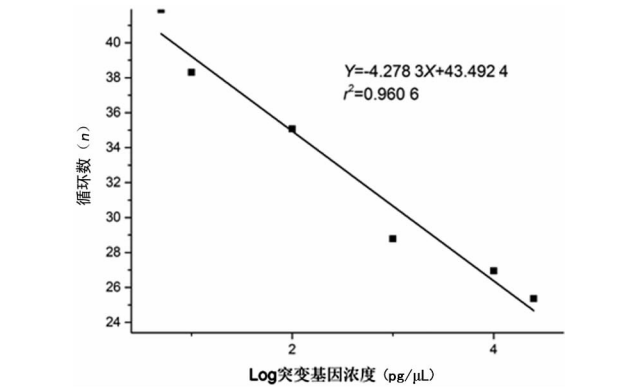
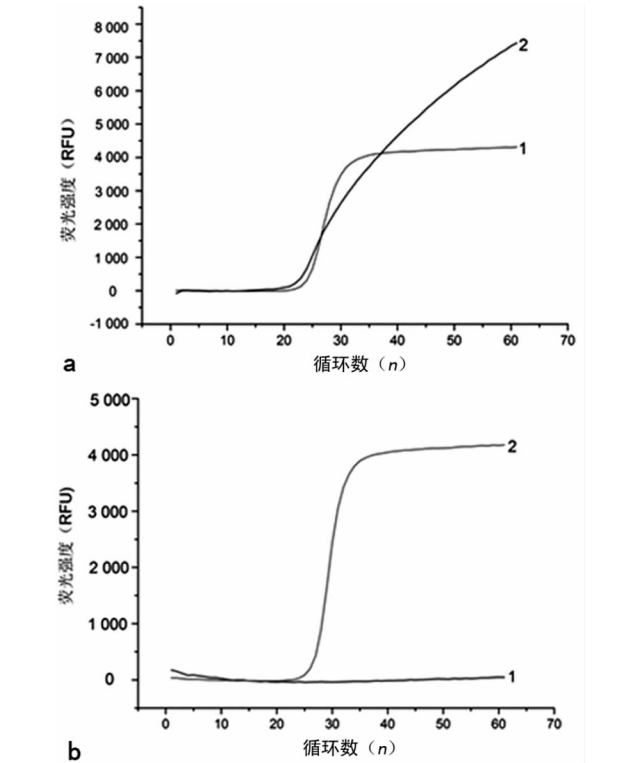


图 2 突变型基因扩增标准曲线

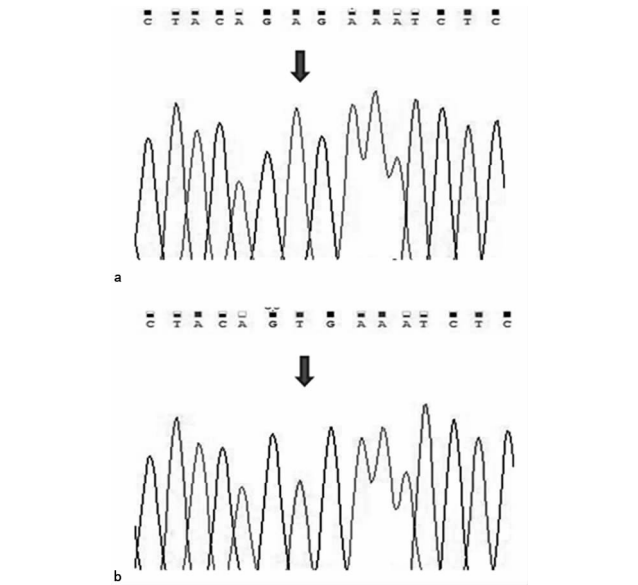
2.3 检测临床标本中 BRAF V600E 基因痕量突变 对 50 例临床结直肠疑似肿瘤患者活检标本 BRAF V600E 基因痕量突变情况分析,结果显示 8 例标本为阳性,提示 50 例患者标本 BRAF V600E 基因痕量突变标本约占总数的 16%。图 3a 显示的是利用前期构建好的体系检测出来的 BRAF V600E 基因突变标本,图 3a 中曲线 2 表示加入锁核酸后,标本中的 BRAF V600E 突变基因仍有扩增,说明该标本发生了 BRAF V600E 基因突变。图 3b 显示的是加入锁核酸后,没有特异性基因扩增产出,该标本没有发生 BRAF V600E 基因突变。同时加入锁核酸前后,内部竞争性扩增片段的扩增并不受影响,且显示实验结果有较好的重复性。为进一步确认 8 例标本的突变情况,将阳性标本扩增产物和阴性标本扩增产物送交上

海生物工程公司进行测序,结果发现抽检标本含有 BRAF V600E 基因 T 到 A 的突变,如图 4a 中长箭头所指的波峰,与病理科小标本肠镜活检组织切片染色 200 倍镜下免疫组化分析结果相符,见图 5a。图 4b、5b 显示的是临床健康肠镜组织标本 BRAF V600E 基因扩增产物测序图和肠镜活检组织切片染色图。



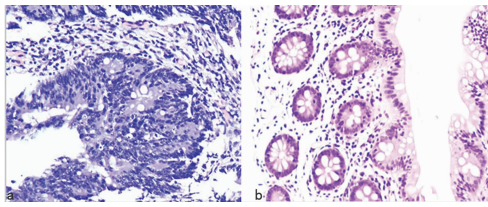
注:a 中 1 为 LEPTIN 基因扩增曲线;2 为 BRAF V600E 突变基因扩增曲线。b 中 1 为 BRAF V600E 突变基因;2 为 LEPTIN 基因扩增曲线

图 3 临床肠镜组织标本 BRAF V600E 基因扩增曲线



注:a 发生 BRAF V600E 基因突变扩增产物测序图;b 未发生 BRAF V600E 基因突变扩增产物测序图

图 4 临床肠镜组织标本 BRAF V600E 基因突变位点扩增产物测序



注: a 肠镜组织标本中分化切片; b 正常肠镜组织标本切片($\times 200$)

图 5 临床肠镜组织标本免疫组化切片

3 讨 论

研究发现,大约有 8% 的肿瘤患者携带有 BRAF 基因突变,不同肿瘤 BRAF 基因突变率是不一致的,黑色素瘤、甲状腺瘤及结直肠癌是突变率较高的类型^[9]。BRAF V600E 是 BRAF 基因突变的最多的一种,位于 11 号外显子或者 15 号外显子,占 BRAF 基因突变的 60%~100%^[10]。临床用药中发现,利用 EGFR 抗体治疗的肿瘤患者中部分出现治疗失败或者效果不明显的情况,这除了与之前发现的 KRAS 基因突变有着主要的关系外,BRAF V600E 可能扮演着非常重要的角色,临床抗肿瘤药物治疗之前要进行 BRAF V600E 基因突变的检测,以避免无效治疗的情况出现就显得尤为重要^[11]。常见的检测基因痕量突变的方法也多种多样,如需要特异性的聚合酶或者对模板 DNA 要求特殊处理还需要采用凝胶电泳鉴别,费时费力。直接测序法是检测突变的金标准,但需要突变比例达到 20% 以上才能对突变的基因进行有效检测,而且检测成本较高,综合其检出效率考虑也是没有广泛用于临床标本检测的原因^[12]。

为此,研究者初步构建了基于内部竞争性扩增片段提高野生型抑制性 PCR 扩增特异性的基因痕量突变实时荧光定量检测方法,该方法首先设计了针对 BRAF V600E 基因有意义链互补的寡核苷酸,该寡核苷酸有较强的抑制性,在反应中称为野生抑制型探针即 WTB 探针,WTB 探针碱基序列与野生型模板有部分重叠,在同一个反应体系中,竞争性地结合野生型模板,WTB 探针中的锁核酸与模板结合效率更高,占据了引物与模板的碱基互补结合区域,引物与野生型模板无法结合,达到抑制野生型基因扩增的目的。为了避免 WTB 探针与模板结合区域产生部分非目标突变基因的扩增,导致假阳性结果,特别加入内参 LEP-TIN 基因 HQ-329/330 作为内部竞争性扩增片段,期望消耗反应体系中多余的 DNA 聚合酶和游离碱基片段,从而增强 WTB 探针对野生型 BRAF V600E 基因模板的屏蔽能力,提高基因痕量突变的检测效率。同时由于加入的内部竞争性扩增片段并没有与 WTB 探针相对应的结合位点,WTB 探针只会特异性地与之配对互补的模板区域结合,而不会与内部竞争性扩增片段结合,不影响其在反应体系里的扩增。

在临床标本的 DNA 中,浓度大多在 50~150 ng/ μ L,检测前期实验构建反应体系中的 WTB 浓度

能对不同浓度的 DNA 模板有效屏蔽就显得很有必要,本研究构建的方法可以对 50~200 ng/ μ L 的野生型模板能有效屏蔽,符合临床标本的 DNA 浓度检测范围。在灵敏度、特异度和重复性检测中,本方法能在 1 000 倍的野生基因型中检测到单拷贝的 BRAF V600E 突变基因,且扩增有较好的重复性,见图 1 所示。依靠已知突变比例的模板 DNA 模板及其对应的 CT 值,可以计算出扩增效能。利用加入 WTB 探针前后 CT 差值及 BRAF V600E 突变率的数据分析,计算出两者之间的线性关系,计算出标本中 BRAF V600E 基因痕量突变的量。BRAF V600E 在对临床 50 例疑似结直肠癌患者的活检标本检测中,对 BRAF V600E 基因突变检出率为 16.0%。对发生突变的标本分别进行组织切片染色分析和突变的标本的扩增产物测序,进一步验证了该方法的准确性。利用野生抑制探针提升 BRAF V600E 基因痕量突变检测比测序法更经济实用,比传统免疫组化镜下检测更简便快速,2 h 内可以完成临床基因痕量突变 DNA 检测,有较强的临床实用价值。

参考文献

- [1] CHEN D, ZHANG L Q, HUANG J F, et al. BRAF mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS one, 2014, 9 (6):101354.
- [2] KARAPETIS C S, JONKER D, DANESHMAND M, et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer—results from NCIC CTG/AGITG CO. 17 [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(3):744-753.
- [3] MAYER R J, VAN CUTSEM E, FALCONE A, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2015, 372(20):1909-1919.
- [4] FRUMAN D A, ROMMEL C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(2):140-156.
- [5] DE ROOCK W, CLAES B, BERNASCONI D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(8):753-762.
- [6] VAN CUTSEM E, PEETERS M, SIENA S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(13):1658-1664.
- [7] MISALE S, YAEGER R, HOBOR S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer[J]. Nature, 2012, 486(7404):532-536.

(下转第 9 页)

与人体免疫系统调节,对人体健康发挥重要作用。本研究发现远航后脐周微生物中病原菌比例升高,微生物感染性基因比例升高;与岸基作业人员相比,远航作业人员的免疫系统平衡发生改变。提示远航离港前应针对由于某些致病菌或条件致病菌大量增殖,可能导致皮肤感染比例增加,需采取一定的预防措施;在作业期间,作业人员应调整膳食结构,合理安排作息时时间,适当参加体育锻炼,及时调整心理状态,提高机体免疫力。远海作业,机体共生微生物种类与比例信息或许可以作为反映作业者健康状况的窗口。

参考文献

- [1] OLDENBURG M, HARTH V, JENSEN HJ. Overview and prospect; food and nutrition of seafarers on merchant ships[J]. *Int Marit Health*, 2013, 64(4):191-194.
- [2] RYDSTEDT L W, LUNDH M. The relationship between psychosocial workload and mental strain among engine officers in the Swedish merchant fleet[J]. *Int Marit Health*, 2010, 62(3):168-175.
- [3] SANFORD J A, GALLO R L. Functions of the skin microbiota in health and disease[J]. *Semin Immunol*, 2013, 25(5):370-377.
- [4] NAIK S, BOULADOUX N, WILHELM C, et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals[J]. *Science*, 2012, 337(698):1115-1119.
- [5] GUINANE C M, COTTER PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ[J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2013, 6(4):295-308.
- [6] 叶丹丹, 樊萌萌, 关琼, 等. 宏基因组研究的生物信息学平台现状[J]. *动物学研究*, 2012, 33(6):574-585.
- [7] ZHENG W, ZHANG Z, LIU C, et al. Metagenomic sequencing reveals altered metabolic pathways in the oral microbiota of sailors during a long sea voyage[J]. *Sci Rep*, 2015, 25(1):9131.
- [8] 张泽, 郑巍巍, 赵晓航. 远航作业人员口腔细菌 16S rRNA 测序[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 6(11):1681-

- 1684.
- [9] 周典蓉, 张泽, 赵晓航. 应用二代测序方法研究远航作业人员口腔细菌变化[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 22(10):1369-1372.
- [10] FINDLEY K, OH J, YANG J, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin[J]. *Nature*, 2013, 498(7454):367-370.
- [11] GALLO R L, HOOPER L V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(7):503-516.
- [12] WANG Z, MACLEOD D T, DI NARDO A. Commensal bacteria lipoteichoic acid increases skin mast cell antimicrobial activity against vaccinia viruses[J]. *J Immunol*, 2012, 189(4):1551-1558.
- [13] COGEN A L, YAMASAKI K, SANCHEZ K M, et al. Selective antimicrobial action is provided by Phenol-Soluble modulins derived from staphylococcus epidermidis, a normal resident of the skin[J]. *J Invest Derm*, 2010, 130(1):192-200.
- [14] IWASE T, UEHARA Y, SHINJI H, et al. Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization[J]. *Nature*, 2010, 465(7296):346-349.
- [15] LARSEN AR, STEGGER M, BOCHER S, et al. Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Denmark, 1999 to 2006[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(1):73-78.
- [16] LAI Y, DI NARDO A, NAKATSUJI T, et al. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury[J]. *Nat Med*, 2009, 15(12):1377-1382.
- [17] NAIK S, BOULADOUX N, LINEHAN J L, et al. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature[J]. *Nature*, 2015, 520(7545):104-108.

(收稿日期:2017-06-16 修回日期:2017-09-11)

(上接第 4 页)

- [8] HUANG Q, WANG G Y, FU W L, et al. High sensitive mutation analysis on KRAS gene using LNA/DNA chimeras as PCR amplification blockers of wild-type alleles[J]. *Mole Cellular Probes*, 2010, 24(6):376-380.
- [9] ZIEMKE E K, DOSCH J S, MAUST J D, et al. Sensitivity of KRAS-mutant colorectal cancers to combination therapy that cotargets MEK and CDK4/6[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(2):405-414.
- [10] OSTREM J M, PETERS U, SOS M L, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions[J]. *Nature*, 2013, 503(7477):548-

- 551.
- [11] MAO M, TIAN F, MARIADASON J M, et al. Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(3):657-667.
- [12] DIAZ L J, WILLIAMS R T, WU J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7404):537-540.

(收稿日期:2017-06-24 修回日期:2017-09-26)