

• 论 著 •

等位基因特异性 PCR 结合金磁微粒免疫层析
检测膀胱癌患者尿液中 TERT 突变*

郜赵伟,王会平,刘 冲,和 婷,刘 丽,董 轲[△]
空军军医大学第二附属医院检验科,陕西西安 710038

摘 要:**目的** 建立可检测人尿液 DNA 中端粒酶逆转录酶(TERT)启动子区域突变的方法。**方法** 设计等位基因特异性 PCR 引物,利用温度梯度 PCR 确定等位基因特异性 PCR 程序,利用金磁微粒检测板进行扩增产物检测。收集 34 例膀胱癌患者的尿液,提取 DNA,利用该文建立的等位基因特异性 PCR 结合金磁微粒免疫层析方法检测 TERT 启动子区域突变。**结果** 建立了结合等位基因特异性 PCR 和金磁微粒免疫层析的 TERT 启动子区域 C228T 和 C250T 突变检测方法。34 例膀胱癌患者尿液中 8 例患者存在 C228T 突变,1 例患者存在 C250T 突变。**结论** 该研究建立了 TERT 启动子区域 C228T 和 C250T 突变检测方法,可应用于膀胱癌患者尿液 DNA 突变检测。

关键词:端粒酶逆转录酶; 突变检测; 等位基因特异性 PCR; 金磁微粒免疫层析; 尿液
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.03.006 **中图法分类号:**R737.14
文章编号:1673-4130(2021)03-0278-04 **文献标志码:**A

Detection of TERT mutation in urine of patients with bladder cancer by allele specific PCR
combined with gold magnetic particle immunochromatography*
GAO Zhaowei, WANG Huiping, LIU Chong, HE Ting, LIU Li, DONG Ke[△]
Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Air
Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China

Abstract: Objective To establish a method for detection of telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter region mutation in human urine DNA. **Methods** Allele specific PCR primers were designed, and the allele specific PCR program was determined by temperature gradient PCR. The amplified products were detected by gold magnetic particle detection plate. The urine samples of 34 patients with bladder cancer were collected and DNA was extracted. The mutation of TERT promoter region was detected by allele specific PCR combined with gold magnetic particle immunochromatography. **Results** A method for the detection of C228T and C250T mutations in TERT promoter region was established by combining allele specific PCR and gold magnetic particle immunochromatography. The results showed that 8 patients had C228T mutation and 1 patient had C250T mutation. **Conclusion** In this study, we established a method for detecting C228T and C250T mutations in TERT promoter region, which can be used to detect DNA mutations in urine of patients with bladder cancer.

Key words:telomerase reverse transcriptase; mutation detection; allele specific PCR; gold magnetic particle immunochromatography; urine

端粒位于染色体末端,对维持染色体稳定和调控细胞凋亡具有重要作用^[1]。端粒酶通过向端粒末端添加重复序列维持端粒长度,端粒酶活性与细胞增生、分化和不死性密切相关,是肿瘤发生的研究热点^[2-5]。端粒酶逆转录酶(TERT)是端粒酶的蛋白活性成分,由位于染色体 5p15.33 的 TERT 基因编码^[6]。TERT 启动子序列位于转录起始点附近的富

于 GC 区,对端粒酶活性具有关键调控作用^[7-8]。研究显示,TERT 启动子存在 2 个高频突变位点 C228T 和 C250T^[9-11]。启动子区域突变导致 TERT 相对表达水平异常升高,进而上调端粒酶活性,破坏细胞凋亡调控,使细胞获得无限增殖能力,发生癌变^[12-13]。研究显示,TERT 启动子区域突变存在于多种类型的肿瘤中^[14-19],尤其在膀胱癌中,TERT 突变频率在所有

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81702732)。
作者简介:郜赵伟,男,副研究员,主要从事恶性肿瘤发生、发展机制研究。 [△] 通信作者,E-mail:tdjyk3@fmmu.edu.cn。
本文引用格式:郜赵伟,王会平,刘冲,等.等位基因特异性 PCR 结合金磁微粒免疫层析检测膀胱癌患者尿液中 TERT 突变[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(3):278-281.

突变基因中排名第一。研究表明,TERT 启动子区域突变与膀胱癌的进展、复发及转移相关^[20-22]。因此,TERT 启动子区域突变检测对膀胱癌患者的诊断及预后监测具有重要意义,尤其是以患者尿液为检测对象,实现无创检测,具有重要临床应用价值。本文建立了一种 TERT 启动子区域突变的检测方法,可用于检测尿液 DNA 中 TERT 启动子区域的 C228T 突变和 C250T 突变,为 TERT 启动子区域突变检测在膀胱癌患者诊断及预后监测中的临床应用提供依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 TERT-C228T 纯合突变细胞系 U251 来自本实验室;TERT-C250T 杂合突变的基因组 DNA 来自本实验室;DMEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司,小牛血清购自杭州四季青公司;基因组提取试剂盒(D3392-02)购自美国 OMEGA 生物技术公司;引物合成及测序委托西安擎科生物技术公司完成;Taq Mix 购自西安润德生物技术公司;金磁微粒检测板购自西安金磁纳米生物技术公司;膀胱癌患者尿液取自

本实验室,患者留取尿液至尿杯中,除吸取足量尿液用于体液指标检验外,尿杯中剩余标本转移至 15 mL 离心管中,提取 DNA。

1.2 方法

1.2.1 基因组提取 培养 U251 细胞,采用 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养。取患者尿液 10~15 mL,转速 5 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min,弃上清液,收集尿沉渣,200 μL 的 PBS 重悬,收集 1×10⁶ 个细胞,利用 OMEGA 基因组提取试剂盒提取 DNA。

1.2.2 引物设计 根据等位基因特异性 PCR 原理,利用 Primer Premier 5 软件设计 TERT 启动子区域 228 和 250 位点基因型检测引物,包括野生型 PCR 引物对(-WT,3'端碱基为野生型)和突变型 PCR 引物对(-M,3'端碱基为突变型);Sanger 测序鉴定采用 PCR 引物对(TERT-seq);生物素(上游引物)和地高辛(下游引物)标记 PCR 引物,引物委托西安擎科泽西生物公司进行合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因型	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
TERT228-WT	GGG TCC CCG GCC CAG CCC CC	GGC TCG GCA GCG GGG AGC GC
TERT228-M	GGG TCC CCG GCC CAG CCC CT	GGC TCG GCA GCG GGG AGC GC
TERT250-WT	CGC CCC GTC CCG ACC CCT C	GGC TCG GCA GCG GGG AGC GC
TERT250-M	CGC CCC GTC CCG ACC CCT T	GGC TCG GCA GCG GGG AGC GC
TERT-seq	CCG GGC TCC CAG TGG ATT CGC	GGC TCG GCA GCG GGG AGC GC
Labeled/TERT228-M	Biotin-GGG TCC CCG GCC CAG CCC CT	Digoxin-GGC TCG GCA GCG GGG AGC GC
Labeled/TERT250-M	Biotin-CGC CCC GTC CCG ACC CCT T	Digoxin-GGC TCG GCA GCG GGG AGC GC

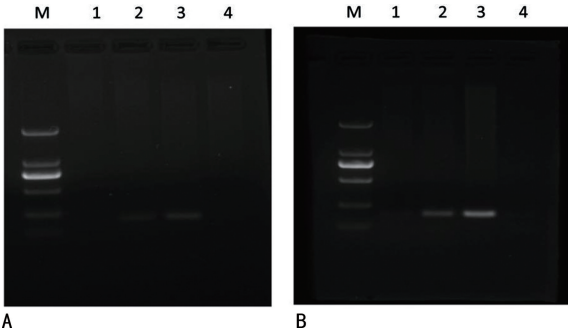
1.2.3 等位基因特异性 PCR 利用无标记的等位基因特异性 PCR 引物进行 PCR,采用梯度 PCR 确定退火温度,PCR 体系:DNA 模板 3.0 μL;上游+下游引物(10 μmol)0.5 μL;2×Tag mix 10.0 μL;灭菌水 6.5 μL;PCR 反应程序:94 ℃ 10 min;94 ℃ 20 s;60~78 ℃ 1 min;30 个循环;72 ℃ 5 min;4 ℃ 保存。共选择 18 个退火温度,根据凝胶电泳检测结果,确定最佳 PCR 条件。

1.2.4 等位基因特异性 PCR 结合金磁微粒免疫层析检测 利用生物素和地高辛标记的引物进行等位基因特异性 PCR,将 10.0~20.0 μL 的等位基因特异性 PCR 产物加入金磁微粒检测板,室温静置 5 min,读取检测结果,质控线和检测线均显示条带即表示 DNA 携带有相应位点突变。利用 TERT-seq 引物对 DNA 模板进行 PCR 扩增,回收 PCR 产物,进行测序鉴定,与金磁微粒检测板显示结果进行比对。

2 结 果

2.1 等位基因特异性 PCR 程序建立 根据梯度 PCR 结果,确定 TERT228 位点基因型检测的等位基因特异性 PCR 反应程序:94 ℃ 10 min; 94 ℃ 20 s, 78 ℃ 1 min,30 个循环; 72 ℃ 5 min,4 ℃ 保存。利用

上述程序,采用 TERT228-M 引物可以特异性地识别携带有 TERT-C228T 突变的 DNA 模板,并扩增出 DNA 片段,而无法识别和扩增 TERT 野生型 DNA 片段,见图 1;相反,采用 TERT228-WT 引物可特异性识别并扩增 TERT 野生型 DNA 片段,而无法识别和扩增携带有 TERT-C228T 突变型 DNA 片段。



注:A 表示 C228T 突变的等位基因特异性 PCR;模板为 U251 DNA;1 表示 TERT228-WT;2 表示 TERT228-M;3 表示 TERT250-WT;4 表示 TERT250-M;M 表示 Takara DL2000 DNA marker。B 表示 C250T 突变的等位基因特异性 PCR;模板为 C250T 突变 DNA;1 表示 TERT250-WT;2 表示 TERT250-M;3 表示 TERT228-WT;4 表示 TERT228-M;M 表示 Takara DL2000 DNA marker。

图 1 TERT 启动子区域 C228T 突变和 C250T 突变的等位基因特异性 PCR

确定 TERT250 位点检测的 PCR 反应程序: 94 ℃ 10 min; 94 ℃ 20 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 5 min, 4 ℃ 保存。利用上述程序, 采用 TERT250-M 引物可以特异性地识别携带有 C250T 突变的 DNA 模板, 并扩增出 DNA 片段, 而无法识别和扩增 TERT 野生型 DNA 片段。上述结果表明, 本文设计的特异性引物和程序可用于检测 TERT 启动子区域 C228T 和 C250T 突变。见图 1。

2.2 等位基因特异性 PCR 结合金磁微粒免疫层析检测 以 TERT-C228T 突变的 U251 细胞 DNA、TERT-C250T 突变的 DNA 为模板, 分别利用生物素或地高辛标记的 Labeled 或 TERT228-M 和 Labeled

或 TERT250-M 引物, 进行等位基因特异性 PCR 扩增, PCR 产物加入金磁微粒检测板进行检测, 见图 2A、C。PCR 产物经 Sanger 测序验证, 等位基因特异性 PCR 结合金磁微粒免疫层析检测结果与测序结果一致, 见图 2B、D。

2.3 尿液 DNA 的 TERT 启动子区域突变检测 等位基因特异性 PCR 结合金磁微粒免疫层析方法检测 34 例膀胱癌患者尿液 DNA 中的 TERT 启动子区域突变情况。结果显示, 其中 8 例 (23. 53%) 患者尿液 DNA 中存在 TERT-C228T 突变, 1 例 (2. 94%) 患者尿液 DNA 中存在 TERT-C250T 突变。

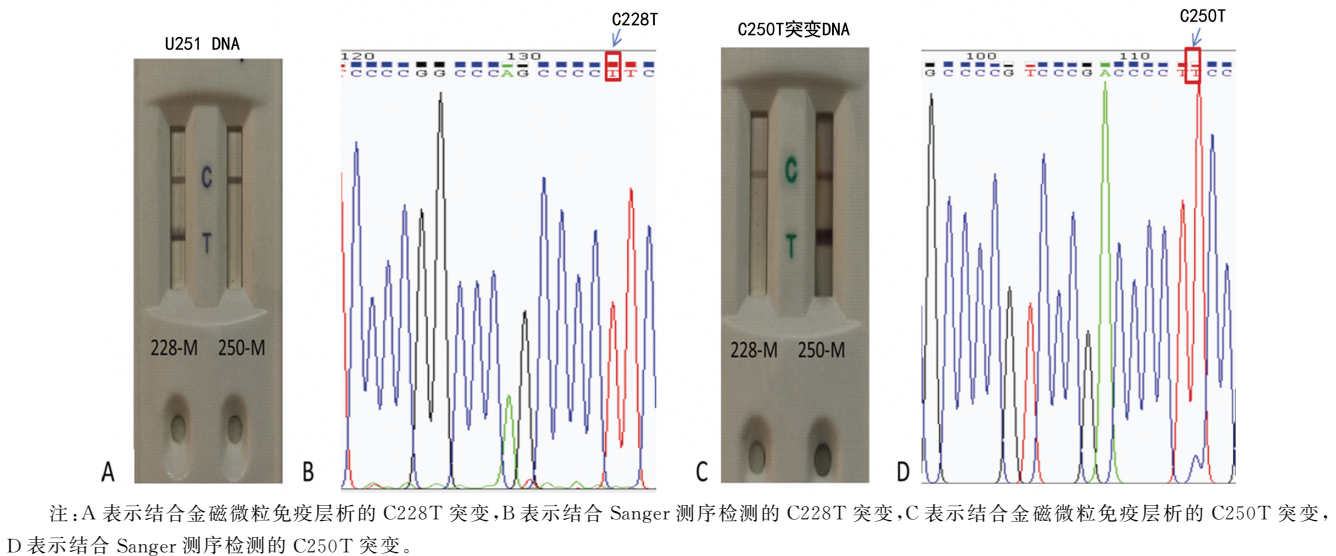


图 2 等位基因特异性 PCR 结合金磁微粒免疫层析和 Sanger 测序检测 TERT 的 C228T 和 C250T 突变

3 讨论

端粒酶活性对于细胞永生化具有重要作用, 而 TERT 则是端粒酶活性的关键成分。TERT 在衰老或损伤的细胞中是阴性的, 端粒缩短导致 DNA 损伤应答途径的激活和细胞凋亡, 然而, 在肿瘤细胞中, TERT 相对表达水平增强, 维持肿瘤细胞端粒长度, 进而逃避细胞凋亡, 使肿瘤细胞获得无限增殖的能力。TERT 启动子区域活性的增强对 TERT 表达上调具有重要作用。2013 年有研究报道, TERT 启动子区域在恶性黑色素瘤细胞中发生突变, 最常见的 2 个突变位点为 C228T 和 C250T, 此突变会形成新的转录因子结合位点, 导致 TERT 转录活性异常升高^[23-24]。目前, 已在泌尿系统 (突变率 11. 55%)、乳腺组织 (突变率 1. 67%)、宫颈组织 (突变率 2. 06%) 等多种类型的组织中发现 TERT 启动子区域突变现象。肿瘤基因突变数据库显示, TERT 在膀胱癌中的突变率为 12. 00%。TERT 启动子区域突变检测对膀胱癌患者诊断、病理分级、预后监测具有重要价值。研究表明, 尿液中 TERT 启动子区域突变检测有助于早期发现治疗后膀胱癌患者的复发^[25]。

目前, TERT 启动子区域突变检测的方法有多

种, 主要包括 Sanger 测序和荧光定量 PCR, 均需要较昂贵的仪器设备, 在基层医院普及具有一定困难。金磁微粒免疫层析检测已经成熟应用于基因分型的临床检测中, 如叶酸多态性检测^[26-27]。金磁微粒检测板包括加样区、地高辛单抗-金磁微粒区、检测线 (包被链霉亲和素)、质控线 (包被地高辛二抗)。其检测原理为 PCR 设计时两端的引物分别带有生物素和地高辛标记, 当受检测的 DNA 中包含阳性模板时, 可以扩增出同时带有生物素和地高辛单抗的产物。此 PCR 产物加至检测板加样区后, 根据薄层层析的原理向前泳动, 达到地高辛单抗-金磁微粒区后, PCR 产物上的地高辛与地高辛单抗结合, 进而使 PCR 产物上携带金磁微粒, 继续泳动, 达到检测线后, PCR 产物上的生物素与此处包被的链霉亲和素结合, 因此处可显示出金磁微粒的颜色, 过量的金磁微粒进一步达到质控线停留显色。与此相反, 当受检测 DNA 中不包含阳性模板时, 则检测线处无颜色, 质控线处有颜色。本文基于此检测原理, 首先设计标记引物, 建立尿液 TERT 启动子区域 C228T 和 C250T 突变的等位基因特异性 PCR 方法, 然后利用金磁微粒免疫层析进行快速检测, 并对膀胱癌患者尿液进行初步验证, 最终

构建了 TERT 启动子区域的突变检测方法,为后续开发临床检验试剂盒提供方法学基础。当然,本文初步建立的检测方法还存在一定的缺陷,首先,使用的尿液量较大;其次,PCR 循环数较多,导致用时较长。因此,后续需要对尿液 DNA 提取,以及等位基因特异性 PCR 的扩增效率进行优化,使检测方法更加灵敏。

综上所述,本文建立了一种尿液样本 TERT 启动子区域 C228T 和 C250T 突变检测方法,此方法无需荧光定量 PCR 仪,操作简单,可视化结果解读快速、方便,便于基层推广应用。由于 TERT 启动子区域突变状态与膀胱癌患者的预后密切相关,本文研究结果为膀胱癌患者 TERT 启动子区域突变无创检测试剂盒的开发提供了方法学参考。

参考文献

- [1] DE LANGE T. How telomeres solve the end-protection problem[J]. *Science*, 2009, 326(5955): 948-952.
- [2] AKINCILAR S C, UNAL B, TERGAONKAR V. Reactivation of telomerase in cancer[J]. *Life Sci*, 2016, 73(8): 1659-1670.
- [3] BERNARDES D B, BLASCO M A. telomerase at the intersection of cancer and aging[J]. *Trends Genet*, 2013, 29(9): 513-520.
- [4] DE VITIS M, BERARDINELLI F, SGURA A. Telomere length maintenance in cancer: at the crossroad between telomerase and alternative lengthening of telomeres (ALT) [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 606-610.
- [5] MACIEJOWSKI J, DE LANGE T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(3): 175-186.
- [6] LEAO R, APOLONIO J D, LEE D, et al. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 22-33.
- [7] HEIDENREICH B, KUMAR R. TERT promoter mutations in telomere biology[J]. *Mutat Res*, 2017, 771: 15-31.
- [8] STOGBAUER L, STUMMER W, SENNER V, et al. Telomerase activity, TERT expression, hTERT promoter alterations, and alternative lengthening of the telomeres (ALT) in meningiomas-a systematic review[J]. *Neurosurg Rev*, 2020, 43(3): 903-910.
- [9] BELL R J, RUBE H T, XAVIER M A, et al. Understanding TERT promoter mutations: a common path to immortality[J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(4): 315-323.
- [10] BOSCOLO R P, GIUNCO S, RAMPAZZO E, et al. TERT promoter hotspot mutations and their relationship with TERT levels and telomere erosion in patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(2): 381-389.
- [11] VINOTHKUMAR V, ARUNKUMAR G, REVATHIDEVI S, et al. TERT promoter hot spot mutations are frequent in Indian cervical and oral squamous cell carcinomas [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7907-7913.
- [12] COLEBATCH A J, DOBROVIC A, COOPER W A. TERT gene: its function and dysregulation in cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2019, 72(4): 281-284.
- [13] PESTANA A, VINAGRE J, SOBRINHO-SIMÕES M, et al. TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation[J]. *J Mol Endocrinol*, 2017, 58(2): R46-R129.
- [14] ALZHRANI A S, ALSAADI R, MURUGAN A K, et al. TERT promoter mutations in thyroid cancer [J]. *Horm Cancer*, 2016, 7(3): 165-177.
- [15] BICZOK A, KRAUS T, SUCHORSKA B, et al. TERT promoter mutation is associated with worse prognosis in WHO grade II and III meningiomas[J]. *J Neurooncol*, 2018, 139(3): 671-678.
- [16] ICHIMURA K. TERT promoter mutation as a diagnostic marker for diffuse gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2019, 21(4): 417-418.
- [17] KIM H, AHN D, SOHN J H, et al. TERT promoter mutation and telomere length in salivary gland tumors[J]. *Pathol Oncol Res*, 2018, 24(3): 697-698.
- [18] LIU T, BROWN T C, JUHLIN C C, et al. The activating TERT promoter mutation C228T is recurrent in subsets of adrenal tumors[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(3): 427-434.
- [19] SHIMOI T, YOSHIDA M, KITAMURA Y, et al. TERT promoter hotspot mutations in breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2018, 25(3): 292-296.
- [20] GOURD E. TERT mutations in urine could predict bladder cancer recurrence [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(8): e443.
- [21] GUNES C, WEZEL F, SOUTHGATE J, et al. Implications of TERT promoter mutations and telomerase activity in urothelial carcinogenesis[J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(6): 386-393.
- [22] LI C, WU S, WANG H, et al. The C228T mutation of TERT promoter frequently occurs in bladder cancer stem cells and contributes to tumorigenesis of bladder cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19542-19551.
- [23] HORN S, FIGL A, RACHAKONDA P, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma[J]. *Science*, 2013, 339(6122): 959-961.
- [24] HUANG F W, HODIS E, XU M J, et al. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma[J]. *Science*, 2013, 339(6122): 957-959.
- [25] DESCOTES F, KARA N, DECAUSSIN P M, et al. Non-invasive prediction of recurrence in bladder cancer by detecting somatic TERT promoter mutations in urine[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(4): 583-587.
- [26] 毛华芬, 杨舒婷, 刘双, 等. PCR-金磁微粒层析法在叶酸代谢相关基因检测中的应用研究[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2019, 38(5): 890-895.
- [27] 郭博阳, 马乐, 张梦丹, 等. 利用金磁微粒免疫化学发光技术检测高敏 C 反应蛋白[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(11): 1468-1472.