



厦门大学学报(自然科学版)

*Journal of Xiamen University(Natural Science)*

ISSN 0438-0479,CN 35-1070/N

## 《厦门大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目: 锁核酸修饰探针熔解曲线分析在 Kras 基因突变检测中的应用  
作者: 倪润芳, 黄秋英, 钱思雨, 李腾文, 苏国强, 李庆阁  
收稿日期: 2019-05-10  
网络首发日期: 2019-07-09  
引用格式: 倪润芳, 黄秋英, 钱思雨, 李腾文, 苏国强, 李庆阁. 锁核酸修饰探针熔解曲线分析在 Kras 基因突变检测中的应用. 厦门大学学报(自然科学版).  
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20190708.1756.006.html>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 锁核酸修饰探针熔解曲线分析在 *Kras* 基因突变检测中的应用

倪润芳<sup>1</sup>, 黄秋英<sup>1</sup>, 钱思雨<sup>1</sup>, 李腾文<sup>2</sup>, 苏国强<sup>2</sup>✉, 李庆阁<sup>1</sup>✉

(1. 厦门大学生命科学学院, 分子诊断教育部工程中心, 福建 厦门 361102;

2. 厦门大学附属第一医院胃肠外三科, 福建 厦门 361005)

✉通信作者 qgli@xmu.edu.cn (李庆阁); suguoqiang66@163.com (苏国强)

**摘要** 以探针熔解曲线技术为平台, 结合锁核酸(LNA)修饰探针建立熔解曲线分析(MCA)体系(MCA-LNA体系), 实现一管同时检测 *Kras* 基因中 7 个热点突变, 并通过对探针的改良达到富集突变型的效果, 使其分析灵敏度得到明显提升, 达 0.05%~0.5%。利用 MCA-LNA 体系对 72 份临床结直肠癌标本进行 *KRAS* 突变检测, 共检出 24 份阳性标本, 与普通探针熔解曲线技术相比多检出 5 份突变阳性标本, 经扩增阻碍突变系统(ARMS)方法验证为突变型。由上述结果可见 MCA-LNA 体系能显著提高检测限和阳性标本检出率, 更有利于基因筛查和指导靶向治疗。

**关键词** 熔解曲线分析; *Kras* 突变; 锁核酸

中图分类号 Q-331

文献标志码 A

DOI: 10.6043/j.issn.0438-0479.201905011

## Application of melting curve analysis using locked nucleic acid-modified probe in detection of *Kras* gene mutations

NI Runfang<sup>1</sup>, HUANG Qiuying<sup>1</sup>, QIAN Siyu<sup>1</sup>, LI Tengwen<sup>2</sup>, SU Guoqiang<sup>2</sup>✉, LI Qingge<sup>1</sup>✉

(1. School of Life Sciences, Engineering Research Centre of Molecular Diagnostics, Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** We established a melting curve analysis (MCA) using locked nucleic acid (LNA)-modified probe, the system was referred to as MCA-LNA assay. This approach could detect seven *Kras* hot spot mutations simultaneously in a single PCR reaction. Owing to the LNA probe, the selectivity reached up to 0.05% to 0.5%, which was a significant improvement in comparison with non-modified probe (5% to 10%). When tested with clinical CRC specimens, *Kras* mutations were detected in 24 of total 72 patients using MCA-LNA. Five more *Kras* mutant positive samples were identified compared to MCA assay with non-modified probe, and all the five samples were further confirmed by ARMS PCR. Therefore, MCA-LNA improved the limit of detection and provided an accurate genetic screening for targeted therapy.

**Key words** melting curve analysis; *Kras* mutation; locked nucleic acid

近年来, 对化疗无效的结直肠癌患者的治疗研究中, 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)靶向药物取得了重大的进展, 显著改善了转移性结直肠癌患者的存活率<sup>[1]</sup>。结直肠癌患者 *Kras* 突变率为 35%~40%<sup>[2]</sup>, 其中 90%的突变发生在外显子 2 的密码子 12 和 13 上<sup>[3]</sup> (在密码子 12 上的发生频率为 70%, 密码子 13 上的发生频率为 30%), 极少的比例发生在密码子 61 和 63 上。美国综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)将 *Kras* 突变检测列入结直肠癌患者常规检测项目, 并且明确指出必须进行密码子 12 和 13 上突变的检测。*Kras* 外显子 2 密码子 12 和 13 上常见 7 种热点突变及发生频率见表 1。结直肠癌患者发生任何一种上述类型的 *Kras* 突变均表现为对 EGFR 靶向药物的耐药<sup>[4]</sup>, 因此, 准确检测 *Kras* 突变有十分重要的临床意义。

收稿日期: 2019-05-10

基金项目: 福建省高校杰出青年科研人才培育计划

网络首发时间: 2019-07-09 14:15:35 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20190708.1756.006.html>

表1 *Kras*常见7种突变类型及发生频率  
Tab.1 Details of seven common somatic mutations in *Kras*

碱基	密码子	氨基酸	突变频率*/%
c.35G>T	c 12GGT>GTT	p.Gly12Val	23.3
c.35G>A	c 12GGT>GAT	p.Gly12Asp	34.0
c.35G>C	c 12GGT>GCT	p.Gly12Ala	5.4
c.34G>T	c 12GGT>TGT	p.Gly12Cys	11.6
c.34G>A	c 12GGT>AGT	p.Gly12Ser	4.5
c.34G>C	c 12GGT>CGT	p.Gly12Arg	3.3
c.38G>A	c 13GGC>GAC	p.Gly13Asp	12.6

注: \*来自于 Cosmic 数据库。

肿瘤基因突变为发生在实体瘤中的体细胞突变, 表现为混杂有大量野生型基因组的低含量突变, 故称为稀有突变。近年来, 利用外周血循环肿瘤 DNA (ctDNA) [5-7] 进行肿瘤稀有突变无创检测成为热点, 而 ctDNA 中突变比例更低, 一般低于 0.5% [8]。因此, 稀有突变检测方法的灵敏度必须得到很大的提高, 稀有突变检测技术的研发意义重大。

目前, 有多种针对 *Kras* 突变的检测方法, 主要包括等位基因特异性 PCR (AS-PCR)、扩增阻碍突变系统 (ARMS)、高分辨率熔解分析 (HRM)、COLD-PCR、下一代测序技术 (NGS)、BEAMing 和数字 PCR (dPCR) 等。但是这些方法多数因为分析灵敏度性有限 (1%~5%), 难以检测低丰度 *Kras* 突变 [9]。虽然 BEAMing [10] 和 dPCR [11] 方法的分析灵敏度较高, 可以达到 0.1% 左右, 但是因为这些方法操作繁琐且检测成本较高, 在临床上的应用有限。基于以上研究现状, 临床上迫切需要更加简便价廉、灵敏度高的检测方法, 用于检测低丰度的 *Kras* 突变。

探针熔解曲线分析是 PCR 后产物分析技术, 利用探针与不同的靶序列杂交后形成的双链 DNA 熔点的差异来区分不同的靶序列, 方法简便快捷, 闭管操作防止样本交叉污染, 但是其灵敏度一般在 5%~10%。近年来, 有多种 DNA 和 RNA 的类似物用于科学研究, 其中锁核酸 (locked nucleic acid, LNA) 的应用引起了广泛的关注。LNA 是一种核苷酸衍生物 [12], 和普通核苷酸分子区别在于其碳环的 2'氧原子和 4'碳原子位置引入亚甲基桥形成锁状结构, 故被称作锁核酸。LNA 与 DNA/RNA 结合时遵循 Watson-Crick 碱基互补配对原则, 且 LNA 的杂交亲和性远高于相应 DNA/DNA 或 RNA/RNA [13]。据 Wahlestedt 等 [14] 报道, 因为 LNA 和 DNA 的结合导致构象发生一定程度的改变, 含有 LNA 碱基的寡核苷酸更能耐受核酸酶的作用, 不易被降解。LNA 不仅与 DNA 高度亲和, 同时对碱基错配的敏感性高, 可以显著增大完全匹配双链与碱基错配双链间的热稳定性差异, 适合用于点突变检测。

本文报道了一种 *Kras* 突变富集检测的方法, 使用 LNA 修饰探针和熔解曲线分析技术, 旨在建立一种简便快捷的、高灵敏度的突变检测方法, 用于指导肿瘤患者个体化用药, 推进分子诊断技术在精准医疗等方面的临床应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材

#### 1.1.1 细胞系与临床结直肠癌标本

293T 细胞系不含有 *Kras* 突变, 作为野生型基因组标准品。采用 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 德国) 试剂盒进行提取。

结直肠癌标本为冰冻组织标本, 由厦门大学附属中山医院提供。冰冻组织标本经手术切除后立即被分成小块保存在液氮或 -80 °C 冰箱中, 提取前切取米粒大小的组织, 使用 TIANamp 组织/细胞/血液全基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生物有限公司, 北京) 提取。

以上提取好的 DNA 用 NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Nanodrop, 美国) 测定吸光值, 检测提取质量和浓度, 剩余样本置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.1.2 突变型质粒

使用重叠延伸法构建突变型质粒, 包括密码子 12 上的 G12S、G12C、G12R、G12D、G12V、G12A 突变以及密码子 13 上的 G13D 突变。质粒提取使用 Omega 小量质粒提取试剂盒 (Omega, 美国), 提取质粒后使用 BamH I 酶 (TaKaRa, 大连) 酶切, 经琼脂糖凝胶电泳切胶获得对应长度的目的片段, 胶回收纯化得到线性质粒, 用 ND-1000 (Nanodrop, 美国) 全波长紫外/可见光扫描分光光度计测量质粒 DNA 的浓度, 根据浓度及质粒片段大小计算出对应拷贝数, 梯度稀释后置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.1.3 引物和探针

通过 NCBI 数据库查询公布的 *Kras* 序列, 查找到相关序列并标出单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 在后续的引物和探针设计过程中保证引物探针位置未覆盖 SNP, 以免影响扩增效率或杂交效率。

*Kras* 外显子 2 上的 7 个突变集中在密码子 12 和 13 上, 设计一条探针即可覆盖所检测的 7 种突变类型, 为了增强探针对野生型和突变型的区分度, 依据反义序列设计探针, 使探针与野生型完全匹配。使用  $T_m$  Utility 1.3 软件预测探针与野生型和突变型杂交双链的  $T_m$ , 保证两者间  $\Delta T_m$  大于  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使用在线软件 The Mfold Web Server (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>) 进行二级结构分析, 保证设计的改良分子信标仅存在一种稳定的颈环结构, 分析条件为  $\text{Na}^+$  浓度  $50\text{ mmol/L}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度  $3.0\text{ mmol/L}$ , 折叠温度  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。未修饰的探针设计完成之后, 结合 *Kras* 突变特点进行 LNA 修饰, 7 个热点突变发生在密码子 12 和 13 的三个碱基 G 上, 对发生突变的三个位点的核苷酸进行 LNA 修饰。通过在线软件 LNA TM Oligo Tools (<https://www.exiqon.com/oligo-tools>) 对修饰 LNA 后的探针  $T_m$  值进行预测。

探针设计完成后, 在探针两侧设计引物, 引物的设计使用 Primer Premier 5.0、Oligo 6.0 和  $T_m$  Utility v1.3 软件。将设计好的引物和探针均通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对, 保证其扩增和检测的特异性。引物和探针均由上海生物工程有限公司合成, 相应序列见表 2。

表2 MCA-LNA体系所用引物和探针序列  
Tab.2 Primers and probes in MCA-LNA assay

名称	核苷酸序列 (5'→3')
<i>Kras</i> -F	ATTATAAGGCCTGCTGAAAATGAC
<i>Kras</i> -R	GCACCAAGTAATATGCATATTTAAAAC
<i>Kras</i> -LNA-P	ROX-GGTAGACG+CCA+C+CAGCTCCAACCTACC-BHQ2

注: “+”后面的碱基表示其被相应的 LNA 替代。

## 1.2 方法

### 1.2.1 人工合成靶序列熔解曲线分析考察探针检测突变的能力

人工合成的靶序列是一段与探针互补的寡核苷酸, 比探针长约 4~8 bp, 用于考察探针的区分能力和评价 LNA 修饰对探针  $T_m$  值和  $\Delta T_m$  的影响。

探针与人工合成靶序列的熔解曲线分析体系为:  $25\text{ }\mu\text{L}$  反应体系中含有  $1\times\text{PCR}$  缓冲液,  $0.2\text{ }\mu\text{mol/L}$  探针,  $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$  的靶序列或无菌水 (阴性对照)。熔解曲线分析程序为:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ ,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温  $5\text{ min}$ , 随后按照  $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{step}$  的升温速率从  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  递增至  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 升温过程中采集 ROX 通道的荧光信号。实验在 LightCycler 480 实时荧光 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 上进行。

表3 人工合成的靶序列  
Tab.3 Target sequences used in this study

名称	核苷酸序列 (5'→3')
T-WT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC
T-G12S	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>A</u> GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC
T-G12C	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>T</u> GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC
T-G12R	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>C</u> GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC
T-G12D	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>G</u> GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC
T-G12V	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>T</u> GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC
T-G12A	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>G</u> GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC
T-G13D	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGT <u>G</u> ACGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC

注：下划线标记位置为点突变位置。

### 1.2.2 MCA-LNA 体系建立

MCA-LNA 体系组成为：反应总体积为 25  $\mu\text{L}$ ，包括 1 $\times$ PCR 缓冲液，5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ，0.2 mmol/L dNTPs，0.5 U TaqHS (TaKaRa, 大连)，0.4  $\mu\text{mol/L}$  上游引物，0.04  $\mu\text{mol/L}$  下游引物，0.2  $\mu\text{mol/L}$  探针，5  $\mu\text{L}$  DNA 模板。

PCR 反应程序为：95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min，循环周期为 95  $^{\circ}\text{C}$  20 s，58  $^{\circ}\text{C}$  20 s，78  $^{\circ}\text{C}$  10 s，共 60 个循环。PCR 反应结束后，进行探针熔解曲线分析，分析程序为：95  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min，35  $^{\circ}\text{C}$  保温 5 min，随后按 0.2  $^{\circ}\text{C}/\text{step}$  的升温速率从 45  $^{\circ}\text{C}$  递增至 95  $^{\circ}\text{C}$ ，升温过程中采集 ROX 通道的荧光信号。实验在 LightCycler 480 实时荧光 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 上进行。

### 1.2.3 分析灵敏度考察

灵敏度为在一定量的野生型背景下能够检测到的突变模板含量。通过突变型线性质粒 DNA 混合野生型细胞系基因组 DNA 形成不同突变比例的混合模板，我们考察了 MCA-LNA 体系的分析灵敏度。由于 3.3 pg 人类基因组 DNA 相当于 1 拷贝<sup>[15]</sup>，即 100 ng 相当于 30 000 拷贝。在考察灵敏度时，使用浓度为  $6\times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的突变型质粒 DNA 和相同浓度的野生型基因组 DNA 进行混合，形成一系列不同比例的混合样品，所含的突变型比例分别为 50%，10%，5%，1%，0.5%，0.1% 和 0.05%。

### 1.2.4 结直肠癌临床标本的检测

通过对 72 份结直肠癌临床冰冻组织标本的检测，我们考察了 MCA-LNA 体系的准确性和临床适用性。同时采用 MCA 体系、直接测序和本实验室前期建立的 ARMS 方法<sup>[16]</sup>作为对照方法对临床标本的检测结果进行验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 MCA-LNA 体系检测原理

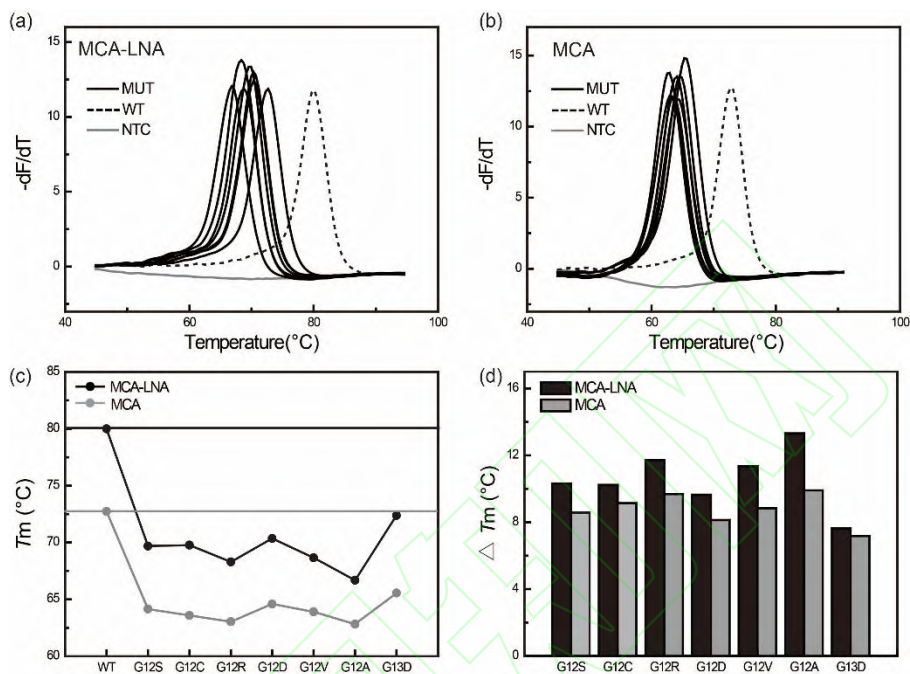
探针熔解曲线技术，即 MCA 技术，其检测突变的原理是在 PCR 反应结束后进行探针熔解曲线分析。当探针设计与野生型序列完全匹配时，探针与野生型扩增子形成完全匹配且稳定的双链产物，熔解曲线分析后产生  $T_m$  值较高的熔解峰；而探针与突变型扩增子会产生单碱基错配，形成稳定性较差的双链产物，熔解曲线分析后产生  $T_m$  值较低的熔解峰。对于 MCA-LNA 检测体系，采用 LNA 修饰探针进行熔解曲线分析。与 MCA 体系检测原理类似，由于完全匹配的 DNA-LNA 双链稳定性显著高于 DNA-DNA 双链，因此探针与野生型模板形成稳定的双链结构，在延伸阶段也可以稳定的结合，导致引物难以延伸，从而起到抑制野生型模板扩增的作用；而探针与突变型模板间有单碱基突变，相对于 DNA-DNA 双链，DNA-LNA 双链存在错配会更大程度地降低双链稳定性，在延伸阶段探针可以解链，使得突变型模板的扩增不受影响，以此达到富集突变型模板的目的。

### 2.2 靶序列熔解曲线分析考察

靶序列的熔解曲线结果如图 1(a)和(b)所示：探针与野生型模板完全匹配，产生双链产物的  $T_m$  值最高；探针与 7 个突变型模板均有一个碱基错配，产生双链产物的  $T_m$  值较低，探针在修饰 LNA 前后均可达到区分野生型和突变型的目的。将其  $T_m$  值统计后见图 2(c)，可发现探针修饰 LNA 后，对 7 种

突变型和野生型模板的  $T_m$  值都得到显著的提升, 其  $T_m$  提升在  $7\sim 10\text{ }^\circ\text{C}$ 。由此可见 LNA 修饰能提升探针的结合能力。

探针熔解曲线的区分能力取决于野生型与突变型的  $T_m$  值差值, 即  $\Delta T_m$ 。如图 1(d)所示, 对比 LNA 修饰探针与未修饰的普通探针的  $\Delta T_m$  值, 发现 LNA 修饰后探针的  $\Delta T_m$  提高约  $1\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 。由此可见 LNA 修饰能提升探针的区分能力。



(a) 和 (b) 图分别为 MCA-LNA 和 MCA 体系的探针与靶序列熔解曲线的结果; (c) 不同突变类型的  $T_m$  值对比; (d) 不同突变类型与野生型之间的  $\Delta T_m$  值对比。

图 1 靶序列熔解曲线分析  
Fig.1 Melting curve analysis of target sequence

### 2.3 分析灵敏度的考察

灵敏度为在一定量的野生型背景下能够检测到的突变模板的百分比含量。在临床标本检测中, 标本中突变含量不一且往往较低, 因此灵敏度的考察可以评估体系用于实际标本检测时的情况。MCA-LNA 体系灵敏度考察结果如图 2 所示, 灵敏度标准品由于混有野生和突变两种模板, 因此会有两个  $T_m$  值不同的溶解峰。灵敏度以突变型峰形的有无为判读依据, MCA-LNA 体系的分析灵敏度可达到  $0.05\%\sim 0.5\%$ 。由此可见 LNA 修饰探针能显著提高体系的检测灵敏度, 更适用于肿瘤稀有突变的检测。

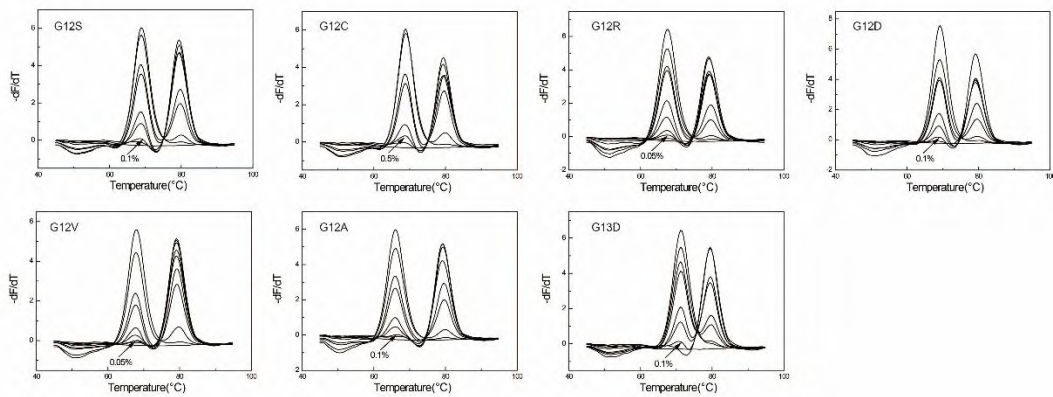
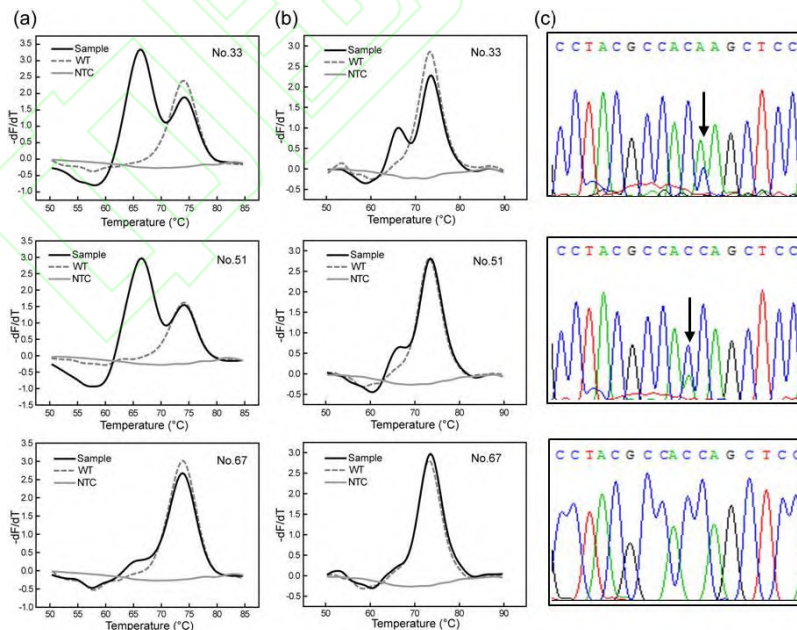


图 2 MCA-LNA 体系分析灵敏度  
Fig.2 Analytical sensitivity of MCA-LNA assay

## 2.4 结直肠癌冰冻组织标本检测

MCA-LNA 体系检测结直肠癌标本的结果显示（典型结果见图 3），72 份标本中检测出 24 份阳性，突变率为 33.3%，与相关文献报道的突变频率相一致<sup>[17, 18]</sup>。标本的检测结果见表 4，直接测序时，由于测序的灵敏度只能达到 15%~20%，检测标本时容易造成假阴性，24 份阳性标本中测序仅检测到 15 份突变阳性；MCA 体系检测时，相比 MCA-LNA 体系少检出 5 份阳性标本，其余检测结果完全一致；ARMS 方法检测时，检测到 26 份突变阳性标本，其中比 MCA-LNA 体系多检出 2 份 G12V 阳性标本（10 号和 18 号），分析其检测结果不一致的原因为，ARMS 方法对该位点的检测灵敏度（0.01%）略高于 MCA-LNA 体系中该位点的灵敏度（0.05%），所以当样本中突变含量在 0.05% 以下时，MCA-LNA 在该位点可能存在突变标本漏检的情况。以上结果说明突变阳性率与分析灵敏度的高低有关，MCA-LNA 体系的探针经 LNA 修饰后提升了检测的灵敏度，提高了突变阳性标本的检出率。



(a) MCA-LNA 体系；(b) MCA 体系；(c) 测序。NTC. 无模板对照；WT. 野生型对照。

图 3 标本典型检测结果  
Fig.3 Typical detection results of clinical samples

表4 不同方法的样本检测结果  
Tab.4 Results of sample detection by different methods

样本编号	MCA-LNA 体系	MCA 体系	ARMS 方法	测序	样本编号	MCA-LNA 体系	MCA 体系	ARMS 方法	测序
1	WT	WT	WT	WT	37	WT	WT	WT	WT
2	WT	WT	WT	WT	38	MUT	MUT	G12D	G12D
3	WT	WT	WT	WT	39	MUT	MUT	G12S	G12S
4	WT	WT	WT	WT	40	WT	WT	WT	WT
5	WT	WT	WT	WT	41	WT	WT	WT	WT
6	MUT	MUT	G12D	WT	42	WT	WT	WT	WT
7	MUT	MUT	G13D	G13D	43	WT	WT	WT	WT
8	WT	WT	WT	WT	44	MUT	WT	G12A	WT
9	WT	WT	WT	WT	45	WT	WT	WT	WT
10	WT	WT	G12V	WT	46	MUT	WT	G12V	WT
11	MUT	WT	G12D	WT	47	WT	WT	WT	WT
12	WT	WT	WT	WT	48	WT	WT	WT	WT
13	WT	WT	WT	WT	49	WT	WT	WT	WT
14	MUT	MUT	G12V	G12V	50	WT	WT	WT	WT
15	MUT	MUT	G12D	G12D	51	MUT	MUT	G12V	G12V
16	WT	WT	WT	WT	52	WT	WT	WT	WT
17	MUT	MUT	G12D	WT	53	WT	WT	WT	WT
18	WT	WT	G12V	WT	54	WT	WT	WT	WT
19	WT	WT	WT	WT	55	MUT	MUT	G12D	G12D
20	WT	WT	WT	WT	56	WT	WT	WT	WT
21	WT	WT	WT	WT	57	WT	WT	WT	WT
22	MUT	MUT	G13D	G13D	58	WT	WT	WT	WT
23	WT	WT	WT	WT	59	WT	WT	WT	WT
24	MUT	MUT	G13D	G13D	60	WT	WT	WT	WT
25	MUT	MUT	G12V	WT	61	WT	WT	WT	WT
26	WT	WT	WT	WT	62	MUT	MUT	G12V	WT
27	WT	WT	WT	WT	63	MUT	MUT	G13D	G13D
28	MUT	MUT	G12D	G12D	64	WT	WT	WT	WT
29	WT	WT	WT	WT	65	MUT	MUT	G12V	G12V
30	WT	WT	WT	WT	66	MUT	MUT	G13D	G13D
31	WT	WT	WT	WT	67	WT	WT	WT	WT
32	WT	WT	WT	WT	68	MUT	MUT	G12V	G12V
33	MUT	MUT	G12C	G12C	69	WT	WT	WT	WT
34	WT	WT	WT	WT	70	WT	WT	WT	WT
35	MUT	WT	G12D	WT	71	WT	WT	WT	WT
36	WT	WT	WT	WT	72	MUT	WT	G12D	WT

注: WT. 野生型; MUT. 突变型。

### 3 结论

*Kras* 突变检测对结直肠癌患者的个体化治疗起到非常重要的作用。由于 *Kras* 突变属于实体瘤中体细胞的稀有突变, 对现有检测方法造成了技术瓶颈, 这就要求稀有突变检测的灵敏度必须得到很大程度的提升, 避免检测结果出现假阴性, 使稀有突变的检出率大大增高。目前数字 PCR 在稀有突变检测中有较高的灵敏度, 但是该方法操作繁琐, 仪器和试剂成本都较高, 在临床检测中难以推广。众多市售的试剂盒普遍使用 ARMS 方法, 该方法的反应管数较多, 检测所需样本量较大, 不适合液体活检等低浓度样本的检测。

LNA 对 DNA 的亲合性高且区分度良好, 在 PCR 反应过程不会被 DNA 聚合酶的 5'→3'外切酶活性所影响, 可以富集突变型, 提高体系的灵敏度。目前 LNA 技术已广泛使用于低丰度突变的检测中, 利用与野生型完全匹配的 LNA 修饰的寡核苷酸链作为阻抑子, 阻碍野生型模板的扩增, 实现对突变型模板的富集。例如利用 LNA 技术对低丰度突变富集后测序<sup>[19,20]</sup>, 富集后测序的灵敏度达到约 1%, 其富集能力约 20 倍; 利用 LNA 技术结合实时 PCR 检测<sup>[21,23]</sup>时, 在 PCR 反应中同时加入 LNA 阻抑子和荧光检测探针, 灵敏度约为 0.1%。本研究对探针熔解曲线技术中的荧光双标记自淬灭探针进行 LNA 修饰, 使探针同时作为阻抑子和检测探针, 既在扩增阶段达到压制野生型和富集突变型的目的, 又在熔解曲线分析时作为检测探针对多种突变型与野生型进行区分, 体系的灵敏度可达 0.05%~0.5%, 与普通探针熔解曲线体系相比, LNA 修饰后体系的突变富集能力为 10~100 倍。

本体系存在的缺点是无法区分 *Kras* 突变的类型, 但 *Kras* 多种突变类型对 *EGFR* 靶向药物都是耐药的, 不能区分突变类型不会影响耐药情况的判断。近年来有研究显示, 含有不同 *Kras* 突变的患者可能会有不同的临床反应: 患者若携带有 *Kras* G12D 突变, 可能发生造血系统的转移<sup>[24]</sup>; 患者发生



*Kras* 密码子 13 的突变, 同时 *MACC1* 基因高表达, 生存期会减短<sup>[25]</sup>; 患者若发生 G12C 或 G13D 突变时, 预后会变差<sup>[26]</sup>。这些研究说明, *Kras* 突变类型的区分也是有意义的, 但是以上研究还未得到普遍的认证。若检测中需要进行突变类型的确认, 可将 MCA-LNA 体系的扩增产物测序验证, 进行辅助判读。

综上, 本研究以探针熔解曲线技术为基础平台, 结合 LNA 修饰探针技术, 建立了 MCA-LNA 体系。与普通探针熔解曲线相比, 通过探针的改良达到了富集突变型的效果, 显著提高了灵敏度, 实现了一管反应中同时检测 *Kras* 密码子 12 和 13 的 7 个热点突变, 此方法判读简单, 检测成本较低, 具有良好的临床推广潜力。

#### 参考文献:

- [1] BOUTIN A T, LIAO W T, WANG M, et al. Oncogenic *Kras* drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer[J]. *Genes & Development*, 2017, 31(4): 370-382.
- [2] AMADO R G, WOLF M, PEETERS M, et al. Wild-type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, 26(10): 1626-1634.
- [3] PEETERS M, KAFATOS G, TAYLOR A, et al. Prevalence of *RAS* mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of randomised controlled trials[J]. *European Journal of Cancer*, 2015, 51(13): 1704-1713.
- [4] LIEVRE A, BACHET J B, LE CORRE D, et al. *KRAS* mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(8): 3992-3995.
- [5] CHAE Y K, DAVIS A A, CARNEIRO B A, et al. Concordance of genomic alterations by next generation sequencing (NGS) in tumor tissue vs. cell-free DNA[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(14 Supp):5233.
- [6] DIAZ L A, JR., BARDELLI A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(6): 579-586.
- [7] KOMATSUBARA K M, SACHER A G. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy: current clinical applications and future directions[J]. *Oncology (Williston Park)*, 2017, 31(8): 618-627.
- [8] KINDE I, WU J, PAPADOPOULOS N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(23): 9530-9535.
- [9] WAN J C M, MASSIE C, GARCIA-CORBACHO J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17(4): 223-238.
- [10] LI M, DIEHL F, DRESSMAN D, et al. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(2): 95-97.
- [11] DECREAENE C, SILVEIRA A B, BIDARD F C, et al. Multiple hotspot mutations scanning by single droplet digital PCR[J]. *Clin Chem*, 2018, 64(2): 317-328.
- [12] SINGH S K, NIELSEN P, KOSHKIN A A, et al. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition[J]. *Chemical Communications*, 1998,(4): 455-456.
- [13] BRAASCH D A, COREY D R. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(1): 1-7.
- [14] WAHLESTEDT C, SALMI P, GOOD L, et al. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(10): 5633-5638.
- [15] SHI J X, LIU Q, SOMMER S S. Detection of ultrarare somatic mutation in the human *TP53* gene by bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization allele specific amplification[J]. *Human Mutation*, 2007, 28(2): 131-136.
- [16] 张绚. 探针熔解曲线分析结合多种引物扩增技术在 *K-ras* 基因突变检测中的应用[D]. 厦门: 厦门大学, 2012.
- [17] SIENA S, SARTORE-BIANCHI A, DI NICOLANTONIO F, et al. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009, 101(19): 1308-1324.
- [18] WANG Y, LIU H, HOU Y, et al. Performance validation of an amplicon-based targeted next-generation sequencing assay and mutation profiling of 648 Chinese colorectal cancer patients[J]. *Virchows Arch*, 2018, 472(6): 959-968.
- [19] EFRATI E, ELKIN H, PEERLESS Y, et al. LNA-based PCR clamping enrichment assay for the identification of *KRAS* mutations[J]. *Cancer Biomark*, 2010, 8(2): 89-94.
- [20] NAFA K, HAMEED M, ARCILA M E. Locked nucleic acid probes (LNA) for enhanced detection of low-level, clinically significant mutations[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1392: 71-82.
- [21] IIDA T, MIZUNO Y, KAIZAKI Y. Real-time PCR-based method for the rapid detection of extended *RAS* mutations using bridged nucleic acids in colorectal cancer[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2019, 489: 164-168.
- [22] ZHANG S C, CHEN Z Y, HUANG C R, et al. Ultrasensitive and quantitative detection of *EGFR* mutations in plasma samples from patients with non-small-cell lung cancer using a dual PNA clamping-mediated LNA-PNA PCR clamp[J]. *Analyst*, 2019, 144(5): 1718-1724.
- [23] JAKUBAUSKAS A, GRISKEVICIUS L. *KRAS* and *BRAF* mutational status analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using multiplex polymerase chain reaction-based assay[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2010, 134(4): 620-624.
- [24] FINKELSTEIN S D, SAYEGH R, BAKKER A, et al. Determination of tumor aggressiveness in colorectal-cancer by *K-Ras-2* analysis[J]. *Archives of Surgery*, 1993, 128(5): 526-532.
- [25] ILM K, KEMMNER W, OSTERLAND M, et al. High *MACC1* expression in combination with mutated *KRAS* G13 indicates poor survival of colorectal cancer patients[J]. *Molecular Cancer*, 2015, 14(1):38.
- [26] ANDREYEV H J N, ROSS P J, CUNNINGHAM D, et al. Antisense treatment directed against mutated *Ki-ras* in human colorectal adenocarcinoma[J]. *Gut*, 2001, 48(2): 230-237.