

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720091152108

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

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

Application of Probe Melting Curve Analysis combined with
Different Kinds of Primers in K-ras Mutations Detection

张 绚

指导教师姓名: 李 庆 阁 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 绪论.....	5
第一节 结直肠癌的分子靶向治疗与 <i>KRAS</i> 基因突变.....	5
第二节 基于 PCR 的 K-ras 基因突变常见检测方法.....	9
2.1 非实时 PCR 检测方法.....	9
2.2 实时 PCR 检测方法.....	10
第三节 本论文研究内容.....	13
参考文献.....	14
第二章 探针熔解曲线分析结合多种引物扩增技术在 K-ras 突变检测中的应用.....	18
第一节 改良分子信标探针熔解曲线分析结合普通引物扩增技术.....	18
1.1 引言.....	18
1.2 材料和方法.....	20
1.2.1 细胞系 DNA 和结直肠癌临床样品来源.....	20
1.2.2 阴性和阳性质粒的构建.....	20
1.2.3 引物和探针设计.....	21
1.2.4 检测体系的原理.....	23
1.2.5 人工合成靶序列熔解曲线分析对探针检测能力的考察.....	23
1.2.6 检测体系的建立.....	24
1.2.7 反应体系灵敏度和选择性的考察.....	26
1.2.8 临床结直肠癌标本的检测.....	26
1.3 结果.....	27
1.3.1 人工合成靶序列探针熔解曲线分析结果.....	27

1. 3. 2 快速 COLD-PCR 关键变性温度 (Tc 值) 的确定	28
1. 3. 3 体系的灵敏度和选择性考察结果	29
1. 3. 4 临床结直肠癌标本检测结果	33
1. 4 讨论	41
第二节 改良分子信标熔解曲线分析结合序列特异性引物扩增技术	44
2. 1 引言	44
2. 2 材料和方法	46
2. 2. 1 细胞系 DNA、阴性和阳性质粒的构建及临床标本的收集	46
2. 2. 2 引物和探针设计	46
2. 2. 3 检测体系的原理	47
2. 2. 4 检测体系的建立	48
2. 2. 5 反应体系特异性的考察	50
2. 2. 6 反应体系灵敏度的考察	50
2. 2. 7 反应体系选择性的考察	51
2. 2. 8 临床结直肠癌标本的检测	51
2. 3 结果	51
2. 3. 1 反应体系的特异性考察结果	51
2. 3. 2 反应体系灵敏度考察结果	54
2. 3. 3 反应体系选择性考察结果	55
2. 3. 4 临床结直肠癌标本检测结果	55
2. 4 讨论	59
第三节 改良分子信标熔解曲线分析结合 Tm 标签引物扩增技术	63
3. 1 引言	63
3. 2 材料和方法	64
3. 2. 1 细胞系 DNA、阴性和阳性质粒的构建及临床标本的收集	64
3. 2. 2 线性阳性质粒的获得	64
3. 2. 3 引物和探针设计	65
3. 2. 4 检测体系的原理	67
3. 2. 5 检测体系的建立	67
3. 2. 6 反应体系选择性的考察	68

3. 2. 7 反应体系阳性阈值的确定	69
3. 2. 8 临床结直肠癌标本的检测	69
3. 3 结果.....	69
3. 3. 1 反应体系选择性考察结果	69
3. 3. 2 反应体系的阳性阈值	72
3. 3. 3 临床结直肠癌标本检测结果	73
3. 4 讨论.....	77
参考文献	81
致谢.....	87

CONTENTS

Abstract(In Chinese)	1
Abstract(In English)	3
Chaper I Introduction	5
Section I Targeted therapies in colorectal cancer and K-ras mutation	5
Section II Technique for K-ras mutation detection based on PCR	9
2. 1 Non-real-time PCR methods.....	9
2. 2 Real-time PCR methods.....	10
Section III Research contents of this dissertation	13
References	14
Chaper II Application of probe melting curve analysis combined with different PCR strategies in K-ras mutation detecion	17
Section I Molecular beacon melting curve analysis combined with PCR of common primers	17
1. 1 Introduction.....	17
1. 2 Materials and methods	19
1. 2. 1 Cell-line DNA and clinical samples	19
1. 2. 2 Mutant and wild plasmids construction.....	19
1. 2. 3 Primers and probes design.....	20
1. 2. 4 Principle of the method	22
1. 2. 5 Probe melting curve analysis of target sequences	22
1. 2. 6 Establishment of the system	23
1. 2. 7 Sensitivity and selectivity analysis.....	25
1. 2. 8 Clinical samples detection.....	25
1. 3 Results.....	26

1. 3. 1 Result of target sequences melting curve analysis	26
1. 3. 2 Tc value for fast COLD-PCR	27
1. 3. 3 Results of sensitivity and selectivity analysis	28
1. 3. 4 Results of clinical samples detection.....	32
1. 4 Discussion	40
Section II Molecular beacon melting curve analysis combined with PCR of allele-specific primers	42
2. 1 Introduction.....	42
2. 2 Materials and methods	44
2. 2. 1 Cell-line DNA, plasmids construction and clinical samples	44
2. 2. 2 Primers and Probes design.....	44
2. 2. 3 Principle of the method	45
2. 2. 4 Establishment of the system	46
2. 2. 5 Specificity analysis.....	48
2. 2. 6 Sensitivity analysis	48
2. 2. 7 Selectivity analysis.....	49
2. 2. 8 Clinical samples detecion	49
2. 3 Results.....	49
2. 3. 1 Results of specificity analysis	49
2. 3. 2 Results of sensitivity analysis.....	52
2. 3. 3 Results of selectivity analysis.....	53
2. 3. 4 Results of clinical samples detecion.....	53
2. 4 Discussion	57
Section III Molecular beacon melting curve analysis combined with PCR of Tm-tagged primers	61
3. 1 Introduction.....	61
3. 2 Material and methods.....	62
3. 2. 1 Cell-line DNA, plasmids construction and clinical samples	62
3. 2. 2 Linear positive plasmids.....	62
3. 2. 3 Primers and Probes design.....	63

3. 2. 4 Principle of the method	65
3. 2. 5 Establishment of the system	65
3. 2. 6 Selectivity analysis	66
3. 2. 7 Cut-off line for the system.....	67
3. 2. 8 Clinical samples detection.....	67
3. 3 Results.....	67
3. 3. 1 Results of selectivity analysis.....	67
3. 3. 2 Cut-off line for the system.....	70
3. 3. 3 Results of clinical samples detecion.....	71
3. 4 Discussion	75
References.....	81
Acknowledgement.....	87

摘要

肿瘤等疾病往往伴有多种体细胞突变,近年来,某些基因的突变情况已经作为癌症预后和治疗疗效预测的一种生物分子标记物,服务于分子靶向治疗。在化疗无效的结直肠癌患者中,针对 EGFR 的靶向治疗药物目前取得了重大进展。但大量研究表明,患者一旦携带有 K-ras 基因第 2 号外显子密码子 12 和 13 上的突变,就表现出对 EGFR 靶向治疗药物的耐药。因此, K-ras 基因的突变与否可作为结直肠癌患者进行 EGFR 靶向治疗的有效预测因子。

体细胞突变往往存在大量的野生型背景,对检测技术的要求极高。本论文以探针熔解曲线分析为基本技术平台,结合不同的引物扩增技术和 PCR 策略建立并验证了三种针对 K-ras 常见七种突变类型的检测体系,三种体系所探讨的方法都有望用于其它体细胞突变的检测中。

在第一个体系中,我们将探针熔解曲线分析技术分别与不对称 PCR 和不对称快速 COLD-PCR 结合起来,并对两种扩增技术的检测能力进行了比较。结果表明,不对称快速 COLD-PCR 对突变模板的富集能力约为普通体系的 10 倍。使用快速 COLD-PCR 后,对于 T_m 值降低的五种突变类型,体系的选择性从普通体系的 5% 提高到了 0.5%。本体系简便快速,一管一次反应即可对七种常见突变进行准确筛查,缺点是无法确知样品的突变类型。

在第二个体系中,我们将探针熔解曲线分析技术与序列特异性引物的不对称 PCR 扩增结合起来,建立了针对 K-ras 常见七种突变的八管检测体系。此体系的优点是选择性可以达到 0.01%-0.5%,可以区分样品的突变类型,缺点是管数较多,操作起来比较麻烦。

在第三个体系中,我们将探针熔解曲线分析技术与人工熔点标签标记的引物扩增技术结合起来,建立了针对 K-ras 常见七种突变的两管检测体系。人工熔点标签技术实现了一管多个突变的同时筛查与区分。优点是两管体系操作简便,选择性较高 (0.5%),可以区分样品的突变类型。

三种体系检测结果的 Kappa 一致性检验表明,三种体系的一致性很好。

本论文所探讨的方法有望用于其它体细胞突变的检测中。

关键词：K-ras；探针熔解曲线分析；不对称 PCR

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

Somatic mutations are often found in cancer. In recent years, several somatic mutations are taking roles as biological molecular markers which are used in prognosis and therapy efficacy prediction in cancer, which serves in molecular targeted therapy. Targeted therapies against EGFR have made significant progress in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. However, a number of studies have shown that patients who carry mutations on the codon 12 and 13 of exon 2 of K-ras gene are resistant to the targeted therapies against EGFR. K-ras mutant-status can be used as an effective predictor in EGFR targeted therapy.

Somatic mutations are often rare mutations with a large amount of wild DNA background, making it difficult to detect and identify. In this study, we developed and validated three detection systems for 7 common mutants of K-ras gene. We used probe melting curve analysis as basic technical platform, and combined it with different kinds of primers and PCR strategies. The methods used in the three systems are also expected to be applied in other somatic mutations detection.

In the first assay, we combined probe melting curve analysis with asymmetric PCR or asymmetric fast COLD-PCR, and compared the detective capability of the two PCR strategies. The study shows that the enrichment ability of asymmetric fast COLD-PCR is about ten times better than usual asymmetric PCR. The selectivity of the asymmetric fast COLD-PCR is 0.5% and the other is 5%. The assay is simple and fast and can screen for seven common K-ras mutations in one reaction, while the drawback is that it can't give the exact mutant types.

In the second assay, we combined probe melting curve analysis with asymmetric PCR and allele-specific primers, and constructed an 8-tube detection system for 7 common mutations of K-ras gene. The selectivity of the assay is 0.01%-0.5%. It can also give information of exact mutant type of the sample.

In the third assay, we combined probe melting curve analysis with asymmetric PCR and T_m-tagged primers and constructed a 2-tube detection system for 7 common

mutations of K-ras gene. Artificial T_m label technique achieved screening and distinction of multiple mutations in one tube. The selectivity of the system is 0.5%. The assay is fast, simple, and can give information of exact mutant type of the sample.

Kappa test result showed high consistency of the three assays. The methods used in the three systems are expected to be applied in detection of other somatic mutations.

Keywords: K-ras; Probe Melting Curve Analysis; Asymmetric PCR

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

第一节 结直肠癌的分子靶向治疗与 *KRAS* 基因突变

所谓分子靶向治疗，是指在细胞分子学水平上，针对经研究已明确的致癌位点（肿瘤细胞内的某蛋白分子或基因片段），设计相应的针对这些靶点的治疗药物，从而有效地干扰受该生物标志分子调控且与肿瘤的发生密切关联的信号转导通路，以达到抑制肿瘤生长、增殖和转移的疗效。根据此定义，可知道其包含两个层面的含义：一是指抗癌药物或抗癌制剂特异性地作用于癌细胞的特定靶点，以达到高选择性杀死癌细胞的目的，即分子靶向治疗具有高效性和特异性；二是指正常细胞组织不表达或低表达这些靶点，因此分子靶向治疗对正常细胞或组织不杀伤或很少损伤，其毒性较细胞毒类药物要低很多，即分子靶向治疗具有良好的耐受性与安全性^[1]。

结直肠癌是全球范围内排名第三位的恶性肿瘤，每年新发病例 120 万例，其相关死亡排名第四位。在我国，结直肠癌的发病率呈逐年递增趋势，特别是在大中城市，每年以 4% 的增长速度上升。手术切除是结直肠癌治疗的主要手段，但其疗效并不理想。近四十年来，手术切除治疗后，病人的五年生存率只有 50%-60%^[2-6]。

目前用于结直肠癌治疗的常见药物主要有四种，分别是伊立替康（Irinotecan）、氟尿嘧啶及其衍生物（5-Fu/替加氟/卡培他滨/S1）、奥沙利铂（Oxaliplatin）和分子靶向治疗药物，其中分子靶向治疗药物主要有单克隆抗体类药物，如西妥昔单抗（Cetuximab）、帕尼单抗（panitumumab）和贝伐单抗（Bevacizumab）等。近年来，分子靶向药物在结直肠癌的治疗方面取得了较为重大的进展，并发展成为结直肠癌的标准内科治疗方法。

在目前的抗肿瘤分子靶向治疗中，表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)是最受关注的治疗靶点之一，西妥昔单抗和帕尼单抗都是针对表皮生长因子受体的用于治疗结直肠癌的单抗类靶向治疗药物^[6, 7]。EGFR 是 ErbB 家族的一员，它与 HER1 (erbB1, EGFR)、HER2 (erbB2, NEU)、HER3 (erbB3) 及 HER4 (erbB4) 均属于表皮生长因子受体家族。EGFR 是一种属于

酪氨酸激酶型受体的糖蛋白, 分子量为 170Da。EGFR 贯穿于细胞膜上(图 1-1^[16]), 当其没有被激活时为单体状态, 当表皮生长因子 (EGF, Epidermal Growth Factor) 或转化生长因子 (TGF- α , Transforming Growth Factor α) 等配体与 EGFR 结合时, EGFR 即与 EGFR 结合形成同源二聚体, 或 EGFR 与 ErbB 家族的其他成员结合形成异源二聚体。二聚化导致 EGFR 胞内酪氨酸激酶结构域的激活, 使其发生自体磷酸化, 从而激活下游通路的一系列级联反应, 最后将信号传导到细胞核内, 引起一系列相关基因的活化。在肿瘤细胞中, EGFR 信号转导通路的持续活化, 造成肿瘤细胞的持续增殖并抑制凋亡, 促使肿瘤细胞转移并导致化疗耐受, 在肿瘤发展中扮演着重要角色^[8-11]。

目前针对 EGFR 的分子的靶向治疗药物主要有两大类: 一类是针对 EGFR 胞外配体结合区的单克隆抗体; 另一类是针对 EGFR 胞内酪氨酸激酶 (TK: Tyrosine Kinase) 结构域的小分子化合物抑制剂。针对 EGFR 的单克隆抗体类分子靶向药物的作用机理就是与细胞表面的 EGFR 特异性结合, 从而竞争性地阻抑 EGF 和其他配体的结合, 继而阻碍了酪氨酸激酶的自体磷酸化和下游的一系列级联反应, 阻断了细胞内的信号转导途径, 阻滞肿瘤细胞停留在 G1 期、阻抑新生血管的生成、促进细胞凋亡、抑制癌细胞侵袭和转移等, 从而达到治疗肿瘤的目的。但同时有研究发现, K-ras 基因外显子 2 上所发生的激活性突变, 会使病人对西妥昔单抗和帕尼单抗表现出耐药^[12-15]。K-ras 基因位于第 12 号染色体上, 含 1 个位于 5' 端的非可编码外显子和 4 个可编码外显子, 编码含 189 个氨基酸的蛋白质。K-ras 蛋白为位于 EGFR 下游的膜结合型的 GTP/GDP 结合蛋白 (图 1-1^[16]), 在 GTP 和 GDP 的相互转化过程中, K-ras 基因有节制地调节信号系统的开启和关闭, 传递细胞的生长分化信号。当 K-ras 发生突变后, 导致 RAS 蛋白一直处于 GTP 结合的活化形式, 使下游信号传递通道一直处于非配体依赖的持续活化状态, 刺激细胞不断生长分化和恶性转化^[17]。即, 尽管已经用 EGFR 靶向药物将 EGFR 进行了抑制, 但 K-ras 突变还是能够持续激活下游通路, 从而导致肿瘤的发生。临床研究结果显示, K-ras 发生突变的病人无法从 EGFR 靶向治疗中获益, 其与 K-ras 野生型病人相比, 使用 EGFR 靶向药物西妥昔单抗和化疗联合治疗时, 反应率分别为 6.7% 和 35.8%, 无进展生存期分别为 12 周和 24 周^[18]。所以, 在病人的治疗过程中, K-ras 检测将起到关键性的预测作用, 它可以帮助筛选出针对表皮生长因子受体的靶向药物治疗有效的结直肠癌患者, 从而实现肿瘤病人的个

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫