View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

· 临床论著 ·

用探针熔解曲线法检测急性髓细胞白血病 c-kit 基因突变

姜国强　赵晓明　王航　李庆阁　鹿全意

【摘要】 目的　用改良的杂交探针结合溶解曲线新方法检测急性髓性白血病 c-kit 基因 17 号外显子上基因突变。方法　利用 Primer Premier v5.00、Tm Utility v1.3 等软件设计引物探针，两个阶段探针分别针对 D816、N820 和 N822 等突变热点。取患者 DNA 样品 5 μl 进行 PCR 扩增及熔解曲线分析，PCR 扩增产物进行测序分析并与熔解曲线分析方法进行比较。结果　阳性质粒灵敏度试验的结果显示，N820G 的灵敏度为 10%，其余突变灵敏度均能达到 5%。12 例 CBF-AML 标本中，5 例检测为阳性，突变率为 41.7%，测序结果与测序检测结果相符。结论　新方法具有方便快速、灵敏度高、特异性好等特点，可用于 CBF-AML 患者的个体化诊断和治疗。

【关键词】 白血病;　原癌基因蛋白质 c-kit;　突变;　熔解曲线分析

Scanning of c-kit mutations in acute myeloid leukemia using probe melting curve method

JIANG Guo-qiang, ZHAO Xiao-ming, WANG Hang, LI Qing-ge, LU Quan-yi. Union College of FuJian Medical University, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: LU Quan-yi, Email: quanyilu@hotmail.com

【**Abstract**】 **Objective**　To detect c-kit gene mutations of acute myeloid leukemia in the hotspot exon 17 of the c-kit gene using a modified hybridization probe combining with melting curve. **Methods**　Primer Premier v5.00 and Tm Utility v1.3 software were used to design the primers and probe, the probe contained two parts, the first segment of the probe could detect mutations around D816 and the second segment could detect mutations at N820 and N822. 5 μl DNA samples from patients were used for PCR amplification and melting curve analysis. PCR products were sent to be sequenced, these results were compared with those of the mutation-positive plasmids. **Results**　The detection sensitivity on positive control plasmids was 10% for N820G and 5% for the other mutations. c-kit mutations were identified in 5 of 12 patients with CBF-AML (41.7%), the result was confirmed by sequencing analysis. **Conclusion**　The new method is simple, rapid, and specific with high sensitivity and could be used in individual diagnosis and treatment of CBF-AML patients.

【**Key words**】 Leukemia;　Proto-oncogene proteins c-kit;　Mutation;　Melting curve analysis

在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)中约 50% 的患者伴有特征性的染色体易位，其中比较常见的 t(8;21)(q22;q22) 及 inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)，分别形成 AML1-ETO 及 CBFB-MYH11 两种融合基因[1]。因为 AML1 编码核心结合因子(core binding factor, CBF)基因 α 亚基，CBFB 编码 β 亚基，而 AML1-ETO 及 CBFB-MYH11 干扰了正常 CBF 的功能，所以带有 AML1-ETO 或 CBFB-MYH11 的急性髓系白血病称为 CBF-AML，约占 AML 的 15%[2-3]。

c-kit 受体是一种由 c-kit 原癌基因编码的Ⅲ型跨膜受体酪氨酸激酶，其配体为干细胞因子(stem cell factor, SCF)，c-kit 基因突变引起 c-kit 受体的持续活化，从而赋予了造血前体细胞增殖或生存优势，是导致 CBF-AML 发生发展的机制之一，CBF-AML 患者中 c-kit 基因第 8 和 17 号外显子突变的发生率较高，成为 CBF-AML 患者中最常见的一种分子遗传学异常[3-4]，检测 CBF-AML 的 c-kit 基因突变对于评价患者预后，制定个体化治疗方案有重要意义。我们建立了一种新的探针结合溶解曲线法检测 c-kit 基因突变，并对本方法进行验证。

资料与方法

一、临床标本

2008 年 7 月至 2010 年 1 月，在厦门大学附属中山

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.09.096

作者单位: 350001　福州，福建医科大学协和临床医学院[姜国强(2010 级研究生)]；厦门大学附属中山医院血液科(姜国强、王航、鹿全意)；厦门大学生命科学院(赵晓明、李庆阁)

通讯作者: 鹿全意，Email: quanyilu@hotmail.com

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

医院共收集107份白血病患者的骨髓(2 ml)标本。全部病例经骨髓形态学及免疫分型分析,符合白血病的诊断标准。其中有12份CBF-AML标本。

二、DNA提取

采血24 h内,利用血液基因组DNA提取盒(天根生化科技有限公司,北京)对血液基因组DNA进行提取,根据吸光度(A)260值确定所抽提DNA浓度,并将基因组DNA样品稀释至10 ng/μl。

三、引物探针设计

利用Primer Premier v5.00、Tm Utility v1.3等软件设计引物探针,所有引物及探针均委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。两个阶段探针分别针对D816和N820,N822等突变热点进行检测(表1)。

表1 引物和探针序列

引物探针名称	序列(5′→3′)
d-kit17-F1	ACAGAGACTTGGCAGCCAGAA
d-kit17-R	TTGCAGGACTGTCAAGCAGAG
D816-ROX	ROX-TGGTCTAGCCAGAGaCATCAA-BHQ
N822-HEX	HEX-TGATTCTAATTATGTGGTTAAA-NH2

四、阳性质粒构建

以野生型293T细胞的基因组DNA为模板,参考文献方法[5-6]构建阳性突变质粒。所构建质粒包括:D816WT,D816V,D816Y,D816H,D816F,N822K(A),N822K(G),N820G。其中D816WT含野生型序列,D816V指编码816号氨基酸的GAC碱基突变为GTC,致使D(Asp,天冬氨酸)转变为V(Val,缬氨酸)。

五、PCR反应体系及扩增、检测程序

PCR反应为25 μl体系,包括1×SSP buffer[67 mmol/L Tris-HCl,16.6 mmol/L $(NH4)_2SO_4$,6.7 μmol/L EDTA,0.085 mg/ml BSA],4 mmol/L Mg^{2+},0.2 mmol/L dNTP,上游引物1 pmol,下游引物10 pmol,探针D816-ROX、N822-HEX均为2 pmol,Taq HS 1 U,ddH_2O补足至20 μl,模板5 μl。

在BIOER gene-pro基因扩增仪器上按以下扩增程序进行扩增:95 ℃ 20 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共50个循环。扩增完成后在Biorad CFX96实时荧光PCR仪上进行熔解曲线分析:从35 ℃上升到80 ℃,每上升0.5 ℃采光一次(HEX与ROX通道)。

六、标本检测及测序

取患者DNA样品5 μl进行PCR扩增及熔解曲线分析。将12份CBF-AML患者标本PCR扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司完成测序,结果与熔解曲线分析方法进行比较。

结 果

一、质粒灵敏度试验

为了对所建检测体系的灵敏度进行考察,我们将含c-kit基因序列的野生质粒与7个突变质粒进行掺杂,作为模拟的阳性标本。突变质粒包括:D816位点的4个热点突变,D816V、D816Y、D816H、D816F;N822位点的2个热点突变,N822K(A)、N822K(G);N820位点的1个热点突变N820G。

混合质粒的检测显示,N822K(A)、N822K(G)的检测灵敏度约为5%,而N820G突变的检测灵敏度约为10%。

二、CBF-AML标本的熔解曲线分析及测序分析

对于12份CBF-AML标本进行溶解曲线分析,发现5例溶解曲线异常,提示存在C-kit基因突变。检测结果见图1。熔解图分为两个部分,ROX信号与HEX信号。ROX信号的熔解图显示4份患者样本的熔解曲线与野生型不同,证明有D816位点突变的存在。1份患者样本存在HEX信号的熔解峰异常,显示存在N820或N822位点的突变。不同标本的熔解曲线峰高有所差异,这可能是由于DNA标本放置时间不同、降解程度不同所致。

我们将此12份患者标本进行测序验证,发现5份c-kit突变阳性标本中涉及3种突变,包括D816H突变(1份),D816V突变(3份),N822K(A)突变(1份),而其余7份标本均无突变。这进一步验证了本方法的准确性。

三、非CBF-AML标本的熔解曲线分析

为了考察c-kit基因在其他类型的白血病标本中的突变情况,我们进一步考察了95份非CBF-AML的标本,包括:AML 58份(不带有AML1-ETO或CBFB-MYH11),急性淋巴细胞白血病(ALL)25份,慢性粒细胞白血病(CML)10份,慢性嗜酸粒细胞白血病(CEL)2份。

讨 论

检测急性白血病的基因突变对白血病的诊断、预后分析和制定化疗策略具有重要价值,对NPM1基因、N-ras和CEBPA基因突变检测对白血病的临床价值已有公认[5-6],但c-kit基因突变的意义和检测方法研究较少。目前多使用以下四种方法检测c-kit基因突变:(1)扩增耐突变系统(Amplification Refractory Mutation System,ARMS)[7],选择性高,但ARMS对引物要求高,检测的突变位点少,检测方法十分繁琐。(2)高分辨溶解法(High-Resolution Melting)方法[8]利用DNA分子本

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

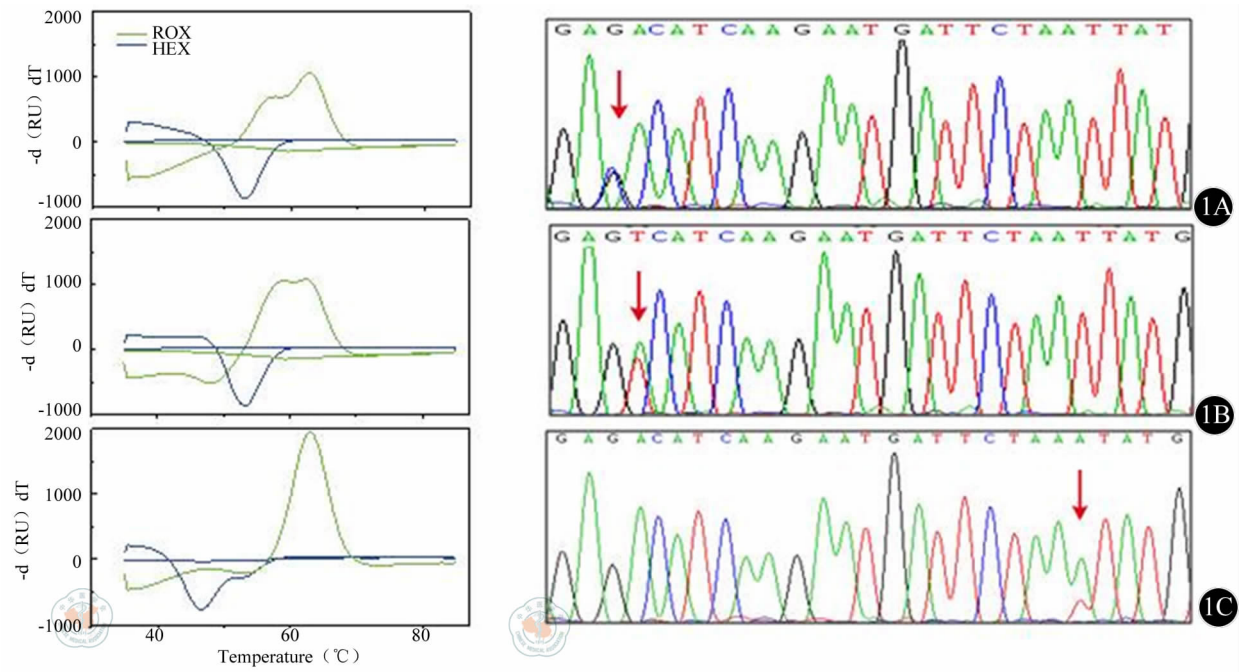

图1　急性髓性白血病AML1-ETO融合基因阳性病例溶解曲线，12例AML1-ETO融合基因阳性病例中与5例有异常的溶解曲线，提示C-Kit基因突变，基因序列分析结果与溶解曲线结果一致。红色箭头指向突变位点。1A：D816H突变；1B：D816V突变；1C：N822K（A）突变

身的熔解特性对 DNA 的突变情况进行扫描，材料简单，但 HRM 体系较为敏感，如标本中盐离子浓度不同就会影响结果的判断。(3) 杂交探针法(Hybridization Probe)[8] 可以对热点 D816 附近位点进行检测，但对于其他热点突变无能力。(4) 变性高效液相色谱(DHPLC) 结合直接测序的方法[10] 为目前常用方法，该方法需要对 PCR 产物进行后处理容易产生污染，操作较繁琐，不适合临床检测应用。需要探索一种简便，准确，高效的 c-kit 基因突变检测方法。本文对探针熔解曲线[11] 方法进行改良，利用一种新的探针排布策略，建立了新的溶解曲线检测法，本文结果显示，该方法可以检测几乎所有的外显子 17 热点突变，具有方便快速、灵敏度高、特异性好的特点。

本研究采用一个淬灭基团同时对两个荧光报告基团进行淬灭，探针前半部分亦为独立的自淬灭探针，5′端标记荧光基团，3′端标记 BHQ 荧光淬灭基团，同时 5′端的前三个碱基硫代磷酸化修饰以防止 DNA 聚合酶的 5′外切酶活性对探针的剪切作用。在退火阶段探针与扩增产物结合，进行熔解曲线分析显示出产物独特的序列信息；探针后半部分是一个 5′标记荧光基团的寡核苷酸序列，这样该寡核苷酸序列与前半部分共形成一个杂交探针，退火阶段与扩增产物结合，经熔解曲线分析可对该探针覆盖区域的序列情况进行分析。这种改良探针的优点在于能够同时对两段探针覆盖序列进行分析，可以检出该区域所有的突变位点。

肿瘤标本既有野生型细胞，也有突变型细胞。野生型模板的存在可能会干扰突变模板的检测，因此灵敏度是一个很关键的评价标准。作为 c-kit 突变检测的金标准，测序的灵敏性一般能够达到 20% 左右[9]。相比之下，本方法具有更高的灵敏度。除了 N820G 的灵敏度为 10%，其余突变［N822K(A)、N822K(G)、D816V、D816Y、D816H、D816F］的灵敏度均能达到 5%。

应用本文的方法对 12 例 AML-ETO 阳性白血病样本进行分析，2 份检测失败，可能与标本量较少有关，其余 10 份标本中共检出 5 份 c-kit 基因突变，阳性率 50%，接近于文献报道的 12.8% ~46.8%[9]。

此外我们亦研究了 c-kit 突变在非 CBF-AML 患者中是否存在，进而考察了 95 份非 CBF-AML 的白血病标本中 c-kit 基因突变的情况，但均未检出 c-kit 突变。这些结果显示，c-kit 外显子 17 突变主要发生在 CBF-AML 中，在其他类型的白血病(包括髓系白血病、淋巴细胞白血病) 中极为少见。

总的来说，本研究建立了一种新型的 c-kit 突变检测方法，可用于外显子 17 热点突变的筛选，具有方便快速、灵敏度高、特异性好的优点，将有助于对 CBF-AML 患者的分类与个体化治疗。

参 考 文 献

[1] Beghini A, Peterlongo P, Ripamonti CB, et al. C-kit mutations in core binding factor leukemias. Blood, 2000, 95: 726.

[2] Dombret H, Preudhomme C, Boissel N. Core binding factor acute myeloid leukemia(CBF-AML): is high-dose Ara-C(HDAC) consolidation as effective as you think? Curr Opin Hematol, 2009, 16: 92.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[3] Heinrich MC,Blanke CD,Druker BJ,et al. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. J Clin Oncol,2002,20:1692-1703.

[4] Schnittger S,Kohl TM,Haferlach T,et al. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. Blood,2006,107:1791-1799.

[5] 阮国瑞,江滨,牛继红,等. 急性髓性白血病 CEBPA 基因突变的检测及临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版,2010,5:4987-4991.

[6] 张瑶,牛继红,李玲娣. 急性髓性白血病 N-ras 基因突变的检测及临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版,2010,4:1798-1802.

[7] Corless CL,Harrell P,Lacouture M,et al. Allele-specific polymerase chain reaction for the imatinib-resistant KIT D816V and D816F mutations in mastocytosis and acute myelogenous leukemia. J Mol Diagn,2006,8:604.

[8] Fusteró,Barragún E,Bolufer P,et al. Rapid detection of KIT mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia using high-resolution melting analysis. J Mol Diagn,2009,11:458.

[9] Sotlar K,Escribano L,Landt O,et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. Am J Pathol,2003,162:737-746.

[10] Paschka P,Marcucci G,Ruppert AS,et al. Adverse Prognostic Significance of KIT Mutations in Adult Acute Myeloid Leukemia With inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. J Clin Oncol,2006,24:3904-3911.

[11] Huang Q,Liu Z,Liao Y,et al. Multiplex Fluorescence Melting Curve Analysis for Mutation Detection with Dual-Labeled,Self-Quenched Probes. PloS One,2011,6:e19206.

(收稿日期: 2013-01-05)

(本文编辑: 戚红丹)

姜国强,赵晓明,王航,等. 用探针熔解曲线法检测急性髓细胞白血病 c-kit 基因突变[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版,2013,7(9):3836-3839.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net