

·论著·

飞行时间质谱技术在结直肠癌 K-ras 基因突变检测中的应用

邢加迪 张连海 李晶晶 李子禹 苏向前 季加孚

【摘要】目的 探讨 MALDI-TOF-MS 方法在检测结直肠癌 K-ras 基因突变中的实际临床价值。
方法 选取 61 例结直肠癌患者的肿瘤组织石蜡标本,应用常规测序和基质辅助激光解析/电离时间飞行质谱(MALDI-TOF-MS)两种方法,检测 K-ras 基因第 2 号外显子中第 12 及 13 位密码子的前两位碱基突变情况。**结果** 常规测序法成功完成检测 47 例(77.0%),而 MALDI-TOF-MS 法成功检测所有 61 例标本。常规测序法检测样本总体突变率为 30.0%(14/47),MALDI-TOF-MS 法检测所有标本的总体突变率为 36.1%(22/61)。6 例样本常规测序法未检测到突变而质谱法检测到明确突变存在。14 例样本经两种方法均检测出突变,且两种方法检测出的突变类型完全一致。2 例样本未完成常规测序检测而通过质谱法检测出突变。**结论** 相对常规测序而言,MALDI-TOF-MS 法是一种对标本质量要求较低、更敏感的结直肠癌 K-ras 突变检测方法,有更好地临床价值。

【关键词】 结直肠肿瘤; 基因, K-ras; 基因突变; 基质辅助激光解析/电离时间飞行质谱

Application of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry in detecting K-ras gene mutation of colorectal cancer XING Jia-di, ZHANG Lian-hai, LI Jing-jing, LI Zi-yu, SU Xiang-qian, JI Jia-fu*. *Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Gastrointestinal Cancer Surgery, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China

Corresponding author: JI Jia-fu, Email: jiafuj@hotmail.com

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical value of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in detecting K-ras gene mutation. **Methods** Sixty-one paraffin-embedded specimens of colorectal cancer were selected. MALDI-TOF-MS and regular sequencing were used to test the mutation of codon 12 and 13 in K-ras exon 2. **Results** Only 47 specimens could be detected successfully in regular sequencing, while all the specimens were tested successfully in MALDI-TOF-MS. Fourteen specimens had K-ras mutation in regular sequencing (30.0%), while 22 specimens had mutation in MALDI-TOF-MS (36.1%). Six specimens with mutation were found in MALDI-TOF-MS but were wild-type in regular sequencing. Same mutation types from 14 specimens were confirmed by both regular sequencing and MALDI-TOF-MS. MALDI-TOF-MS was able to detect the mutation in 2 specimens that was not identified in regular sequencing. **Conclusions** MALDI-TOF-MS is a feasible approach of K-ras gene mutation testing in colorectal cancer, which is less demanding in terms of specimen quality and is more sensitive as compared to regular sequencing.

[Key words] Colorectal neoplasms; Gene, K-ras; Gene mutation; Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2013.01.021

作者单位:100142 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所 胃肠肿瘤微创外科(邢加迪、苏向前), 胃肠肿瘤外科 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室(张连海、李子禹、季加孚), 遗传学实验室(李晶晶)

通信作者:季加孚, Email:jiafuj@hotmail.com

到目前为止,手术仍然是唯一可以治愈结直肠癌的方法。但对于转移性结直肠癌,其治疗效果仍然相对较差,患者生存率较低。近年来,各种辅助治疗的产生及发展使得转移性结直肠癌的治疗效果有了一定程度的提高,其中靶向治疗药物西妥昔单抗的出现在其中发挥了重要的作用^[1]。随着科学的研究的深入,研究者发现,K-ras 基因型对于西妥昔单抗治疗的效果有着较大影响。近年来的一些大型前瞻性随机对照试验也证明,K-ras 野生型患者可以从西妥昔单抗治疗中获益,而 K-ras 突变型患者则无法获益^[2-3]。2008 年 ASCO 会议把 K-ras 基因型检测作为西妥昔单抗治疗前的必须检查项目,同时也写进了最新的 NCCN 结直肠癌临床实践指南。所以,正确检测 K-ras 基因型对于此类患者的治疗是非常重要的。K-ras 基因最常见的突变方式为点突变,突变位点主要位于第 2 外显子的第 12、13 密码子^[4-5]。基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术近年来广泛地应用于核酸分子检测诊断领域,如产前诊断领域的唐氏综合征筛查,病原体分型检测,人乳头瘤病毒分型检测等,是一种值得推广并且有良好市场应用前景的技术^[6-9]。我们拟应用 MALDI-TOF-MS 及常规测序两种方法检测结直肠癌患者标本的 K-ras 基因型,探讨 MALDI-TOF-MS 在 K-ras 基因检测中的优势。

资料与方法

一、标本选取

选取北京肿瘤医院病理科 2008 年 6 月至 2009 年 1 月留存的结直肠癌石蜡标本共 61 例,其中直肠癌 30 例,结肠癌 31 例;原发灶标本 43 例,转移灶标本 18 例,所有标本均经病理科确诊。调取相应患者病例资料,显示所有患者在获取标本之前均未接受过任何靶向药物治疗及放化疗。

二、标本提取

从病理玻片上(4~5 张)刮取组织约 50 mg,按照试剂盒说明提取 DNA(Qiagen DNease Kit 69504),所有 DNA 产物均检测吸光度值(A)并进行 DNA 纯度测定。61 例标本浓度在 5~50 ng/μl 之间;51 例标本 A_{260/280} 值在 1.8~2.0 之间,另 10 例标本取材质量较差,A_{260/280} 值未在此范围内。

三、实验方法

所有检测均委托深圳华大基因研究所完成,包

括常规测序及 MALDI-TOF-MS 检测。

1. 常规测序:PCR 反应体系为每管 50 μl,其中包含 1 μmol/L(各为 0.5 μl) 的上下游引物,1.25 U (0.25 μl) Taq DNA 聚合酶(TAKARA),10 μl 5×PCR 缓冲溶液,1.5 mmol/L(3 μl) MgCl₂,每种 0.2 mmol/L (4 μl) dNTP, 约 400 ng 模板 DNA; 反应条件为 95°C 预变性 2 min,然后进行 35 个循环:95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 20 s, 终止延伸为 72°C 5 min, 最后得到 PCR 产物。引物设计依据美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库提供的参考序列(NM_004985.3)。

PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,有部分样本扩增不出条带或条带很弱,进行 PCR 反应体系优化重新扩增样本,对部分二次扩增后仍然无 PCR 无条带的样品再进行一次重复扩增,仍有 14 例样本未扩增出目的条带,最终有 47 份样本 PCR 扩增后得到结果,故只对这 47 份样本进行常规测序。应用美国 Applied Biosystems 公司的 3730XL 全自动 DNA 测序仪进行正反双向测序,得到含 K-ras 基因第 2 外显子第 12 及 13 密码子基因片段的测序结果。

2. MALDI-TOF-MS 检测:检测原理是根据待检测终产物 PCR 片段的荷质比差异形成的飞行时间不同,从而到达检测器的时间不同而产生顺序的电流信号来完成的。整个检测过程分为两个阶段进行,首先设计 PCR 扩增引物(同常规测序扩增引物),富集含 K-ras 基因 12,13 号外显子的 PCR 片段,然后针对突变位点设计特异的探针引物,通过单碱基延伸实验获得突变/野生型位点基因片段混合产物,最后通过质谱分离这些差异片段,实现最终检测的目的。样本 DNA 提取,K-ras 基因扩增反应体系和条件严格参照 sequenom complete PCR Reagent Set 操作说明进行。探针引物延伸反应,反应体系和条件严格参照 sequenom iPLEX Gold ReagentKjc 操作说明进行。探针引物的设计参照 NCBI 参考序列 NM_004985.3,利用 Assay design 2.0(Sequenom)完成。检测结果利用 Typer 4.0(Sequenom)软件进行分析,辅以人工进行二次峰图校正。

结 果

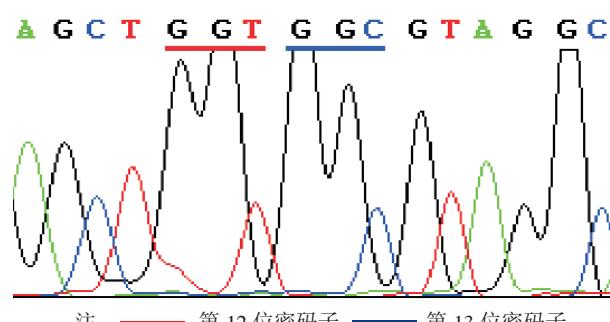
常规测序法成功完成检测 47 例 (77.0%), 检测 K-ras 突变率为 30.0%(14/47); 而质谱法成功检测所有 61 例标本的突变率为 36.1%(22/61), 具体突变种类及其所占比例见表 1。其中有 6 例标本常规测序法未检测到突变而质谱法检测到明确突变

存在;2 例样本质谱法检测出突变而常规测序检测失败未能获得结果。两种检测方法均确定为突变基因型的 14 例标本,突变种类检测结果完全相同。

其中 1 例常规测序法未检测到突变,而质谱法检测到明确突变的样本测序峰图和对应质谱峰图。在测序峰图中第 12 位密码子第 1 位碱基突变测序检测结果为阴性,而在质谱检测中却明显可见突变碱基峰,见图 1~3。

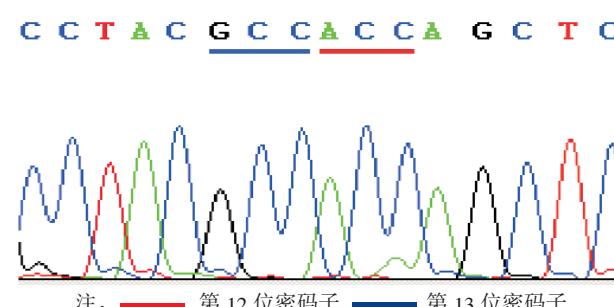
表 1 两种方法的突变检测结果

突变种类	突变例数(%)	
	常规测序法(47 例)	质谱法(61 例)
G12A	2(14.3)	2(9.1)
G12C	1(7.1)	4(18.2)
G12D	3(21.4)	5(22.7)
G12S	0	2(9.1)
G12V	6(42.9)	7(31.8)
G13D	2(14.3)	2(9.1)
合计	14	22



注: — 第 12 位密码子, — 第 13 位密码子

图 1 正向测序结果



注: — 第 12 位密码子, — 第 13 位密码子

图 2 反向测序结果

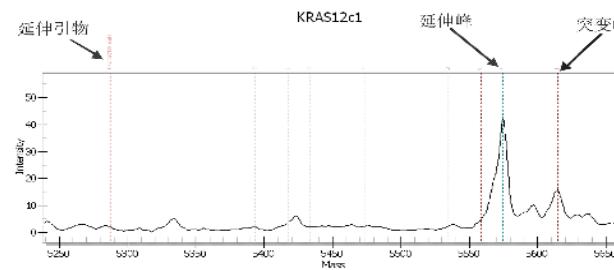


图 3 MALDI-TOF-MS 检测结果

讨 论

基因突变研究已成为现今生命科学研究的热点之一,而基因突变检测方法在近年间也迅速发展,目前常用的检测方法有 DNA 测序(DNA sequencing)、等位基因特异性寡核苷酸分析法(allele-specific oligonucleotide, ASO)、变性梯度凝胶电泳法(denaturing gradient electrophoresis, DGGE)、扩增阻碍突变系统方法 (amplification refractory mutation system, ARMS)、PCR 单链构象多态性分析 (PCR-single-strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 等,但它们都存在耗时长,分辨率相对较低,灵敏度较差等缺点。MALDI-TOF-MS 是近年来发展起来的一种软电离新型有机质谱,其基本原理是通过引入基质分子,促使能量蓄积并升温,待测物分散在基质分子中形成共结晶,用一定强度的激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量,样品解吸附,基质-样品之间发生电荷转移使得样品分子电离,使得待测分子不产生碎片而得到离子化,从而解决了非挥发性和热不稳定性生物大分子解吸离子化的问题,再进行飞行时间(time of flight, TOF)检测,具体为待测物在离子源离子化后,离子在电场作用下加速,飞过自由漂移区后到达检测器,根据到达检测器的飞行时间不同而被检测,即测定离子的质量电荷比(M/Z)与离子的飞行时间成正比来检测离子,并测得样品分子的分子量^[10]。

MALDI-TOF-MS 具有灵敏度高、准确度高、分辨率高、图谱简明、质量范围广及速度快等特点,在操作上制样简便、可微量量化、大规模、并行化和高度自动化处理待检生物样品,而且在测定生物大分子和合成高聚物应用方面有特殊的优越性。目前在世界范围内已被广泛应用于各种分子生物学及分子遗传学研究中,包括 DNA 分析领域^[11-13]。在本研究中,常规测序法的检测成功率只有 77.0%, MALDI-TOF-MS 的检测成功率为 100%;且常规测序法检测的总体突变率为 30.0%(14/47),低于 MALDI-TOF-MS 检测法的 36.1%。常规测序方法对 DNA 样本的质量要求较高,当样本的浓度低或纯度差时,PCR 的扩增反应和测序反应均会受到影响,导致检测失败,而 MALDI-TOF-MS 对于这部分样本的检测具有明显的优势。

刘忠臣等^[14]比较 ARMS 实时 PCR 与 MALDI-TOF-MS 在 K-ras 基因型检测方面的优缺点,认为

MALDI-TOF-MS 准确性高, 反应体系简单稳定, 对模板依赖性小, 可以广泛应用, 并将成为一种很有潜力的高通量、自动化基因分型的金方法。而在本研究中, 也可以看到, 质谱检测相对于测序检测而言, 存在着可以明显读出密码子突变类型的优点, 且测序结果中染料峰高低对结果判定影响重大, 突变碱基完全由人工判定, 如背景过高很可能造成误读或者漏读突变密码子造成误差。质谱通过突变位点和野生位点的碱基质量差异来判断是否突变, 可以准确检测微量突变样品的存在。理论上, 突变率在 15% 以下样本的通过常规测序是无法检测, 而在实际操作中因为受各种因素制约, 这个比率接近 30% 左右, 而对于质谱检测而言, 理论上 1% 的突变即可检测, 且检测过程受制约及干扰较小, 可以最大程度地检测突变。在本研究中 6 例(9.5%)样本, 常规测序法未检测出突变但质谱法检测到清晰突变的存在, 2 例样本在测序组未完成检测而在质谱组检测出突变。由于质谱法检测敏感性很高, 且本研究受实验条件所限, 未能对此 8 例样本进行其他检测方法验证。但我们仍然有理由相信, 飞行时间质谱检测方法相对于传统的测序方法, 在临床应用中具有显著的优势。

对于结直肠癌患者来说, 成功并正确检测 K-ras 突变是极其重要的。正如前述, K-ras 突变型患者无法从西妥昔单抗治疗中获益, 而应用西妥昔单抗治疗的费用是相对昂贵的, 所以, 如果给予 K-ras 突变型患者西妥昔单抗治疗, 不仅是药物的浪费, 更使患者及其家庭蒙受巨大的经济损失。本研究的 MALDI-TOF-MS 检测在 sequenom 公司研制开发的 MassArray 技术平台上完成, 该系统的突出特点是能以极高的精确度快速进行基因型识别, 不需要各种标记物, 可以最大程度地发挥 MALDI-TOF-MS 的精确检测优势。但因其设备价格昂贵, 从而在一定程度上限制了其大规模推广。

我国是结直肠癌高发国家之一, 转移性结直肠癌患者人数亦呈逐年上升趋势。如何更好地使他们从最佳的治疗中获益, 是一个亟待解决的问题。我们尝试用 MALDI-TOF-MS 方法检测结直肠癌患者标本的 K-ras 基因型, 已初步证明其可靠性及相对于常规测序方法的优势。相信在不久的将来, MALDI-TOF-MS 有可能成为结直肠癌 K-ras 基因突

变检测的标准方法。

参 考 文 献

- [1] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, 351:337-345.
- [2] Lièvre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*, 2008, 26:374-379.
- [3] Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2008, 359:1757-1765.
- [4] Ma ES, Wong CL, Law FB, et al. Detection of KRAS mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis. *J Clin Pathol*, 2009, 62:886-891.
- [5] Angulo B, Garcia-Garcia E, Martinez R, et al. A commercial real-time PCR kit provides greater sensitivity than direct sequencing to detect KRAS mutations: a morphology-based approach in colorectal carcinoma. *J Mol Diagn*, 2010, 12:292-299.
- [6] Bradić M, Costa J, Chelo IM. Genotyping with Sequenom. *Methods Mol Biol*, 2011, 772:193-210.
- [7] Yi X, Li J, Yu S, et al. A new PCR-based mass spectrometry system for high-risk HPV, part I methods. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136:913-919.
- [8] Arcila M, Lau C, Nafa K, et al. Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma: roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping. *J Mol Diagn*, 2011, 13:64-73.
- [9] Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol*, 2011, 204:e1-e11.
- [10] Sascha S. Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clin Chim Acta*, 2006, 363:95-105.
- [11] Griffin TJ, Smith LM. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol*, 2000, 18:77-84.
- [12] Bonk T, Humeny A. MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *Neuroscientist*, 2001, 7:6-12.
- [13] Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet*, 2006, 2:e100.
- [14] 刘忠臣, 郑薇薇, 李庆阁. ARMS 实时 PCR 和 MALDI-TOF-MS 进行 K-ras 基因分型. *中国肿瘤*, 2005, 14:256-260.

(收稿日期:2012-04-03)