

学学报, 2009, 15(3): 503-504.

[2] 潘家华. 实用小儿手足口病诊疗指南[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2010: 41-77.

[3] 徐之良. 手足口病研究进展[J]. 临床内科杂志, 2009, 26(8): 509-510.

[4] 唐红平, 汪秋珍, 李德辉, 等. 手足口病 42 例临床分析[J]. 新医学, 2008, 9(11): 718-719.

[5] 杨江华, 喻艳林, 李志鸿. 168 例手足口病临床与实验室检查特征[J]. 皖南医学院学报, 2008, 27(6): 427-428.

[6] 何时军, 陈贤楠. 病毒相关性小儿危重病[J]. 中国小儿急救医学, 2006, 13(1): 72.

[7] 刘映霞, 周伯平. 肠道病毒 71 相关性手足口病新进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志, 2010, 4(1): 71-75.

[8] 王晓卫, 钟天鹰, 岳玉林. 123 例重症手足口病患者脑脊液和心肌酶谱结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1109-1110.

[9] 夏国文. 69 例手足口病患者血清 CRP、cTnI 联合结果分析[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(1): 99-100.

[10] 孟卫东, 陈双峰. 高敏 C 反应蛋白的研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4): 346-348.

[11] 张红梅, 李成荣, 刘勇军, 等. 2008 年深圳地区手足口病病原学调查[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(5): 334-336.

[12] 刘丽艳, 叶颖子, 王建设, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 法检测手足口病患儿大便标本中肠道病毒 71 型[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(2): 142-145.

[13] 杨峻, 郑文岭, 马文丽. 肠道病毒 71 型的生物学特征与实验室诊断[J]. 医学分子生物学杂志, 2010, 5(6): 546-549.

[14] 孙广超, 杨思达, 陶建平, 等. 重症和危重症手足口病患儿外周血淋巴细胞亚群分析[J]. 中国循证儿科杂志, 2010, 5(4): 251-255.

[15] 韦海春. 手足口病患儿血清心肌酶与免疫球蛋白水平变化及结果分析[J]. 中国医学创新, 2008, 5(35): 103-104.

[16] Wang SH, Lei HY, Yu CK, et al. Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis[J]. J Infect Dis, 2008, 198(7): 1002-1006.

[17] 杨坤, 赵东赤. EV71 感染致重症手足口病的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2010, 37(2): 199-202.

(收稿日期: 2011-02-03)

• 综 述 •

微量肿瘤源性未知突变基因的检测方法及进展

司徒博 综述, 郑 磊[△], 王 前 审校
(南方医科大学南方医院检验医学中心, 广州 510515)

关键词: 肿瘤; 突变; 分子诊断技术
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 08. 029 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2011)08-0888-03

恶性肿瘤已跃居中国农村与城市居民死因第一位。从分子水平上看, 肿瘤是由于细胞在致癌因素的影响下发生基因突变, 失去对生长的正常调控而导致的单克隆性异常增生所致。随着分子生物学技术的迅猛发展, 不仅肿瘤组织, 其他临床标本如血浆^[1]、穿刺液^[2]、尿液^[3]、粪便^[4]等均能检测出肿瘤源性 DNA (常为突变的癌基因或抑癌基因)。突变基因的检测不仅能为肿瘤早期诊断、预后提供重要依据, 同时也渐渐成为病情监测、肿瘤个体化治疗的风向标^[5-7]。但与肿瘤相关的突变基因却常混杂于大量野生型基因中, 即使肿瘤组织本身也是如此。因此, 如何在临床标本中有效富集并检测出微量的肿瘤源性突变基因是目前实验室肿瘤分子诊断的关键问题。现阶段, 针对肿瘤源性微量已知突变基因的检测手段数量众多、发展迅速, 但低水平未知突变的筛查方法发展却相对缓慢。作为确定突变的金标准, 测序虽然直接可靠, 但灵敏度却不高, 因此需结合其他上游技术提高检出率。本文就目前临床实验室常用的筛查少量未知突变的方法及进展作一综述。

1 电泳方法

1.1 单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP) 及异源双链核酸构象分析 (heteroduplex analysis, HET) SSCP 是一种检测未知突变的常用方法。其基本原理是单链 DNA 片段呈复杂的空间构象, DNA 序列差异甚至点突变都能导致这种空间构象的改变, 表现在聚丙烯酰胺凝胶电泳时电泳迁移率不同, 达到分离正常链与突变链的目的。SSCP 分析的灵敏度依赖于突变是否影响到 DNA 的折叠及折

叠后单链 DNA (ssDNA) 分子在电泳中的移动速度。Jugessur 等^[8]和 Frost 等^[9]结合限制性内切酶的 SSCP 技术 (restriction endonuclease fingerprinting-SSCP, REF-SSCP) 检测家族性乳腺癌/卵巢癌 BRCA1 基因的突变情况, 解决了灵敏度随 DNA 片段长度的增加而降低的问题, 一定程度上提高了突变检出率。在 SSCP 原理基础上发展起来的低离子强度 PCR-SSCP (PCR-LIS-SSCP)、RNA-SSCP、DDF, 以及与毛细管电泳、非同位素标记等技术的结合, 使 SSCP 的速度、敏感性得到一定的提高。

HET 的基本原理与 SSCP 相似。突变和野生型 DNA 形成的异源双链 DNA 错配时, 在非变性凝胶电泳时呈现与同源双链 DNA 不同的电泳速度, 因而可将野生型和突变型双链 DNA 分开。一般认为, HET 对 200~300 bp 大小的片段突变检测效果较好, 且对 SSCP 法不敏感的 DNA 片段检出率很高, 因此两者常联合应用以提高突变的检出率^[10]。

SSCP 和 HET 方法开展较早, 被广泛用于未知突变分析, 虽技术上已有所发展, 但通量低、检出率不高、假阳性率高等问题有待进一步解决。

1.2 梯度变性凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) DGGE 又称温度梯度凝胶电泳 (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE), 最早于上世纪八十年代出现, 历经多次改进。其基本原理是当双链 DNA 在变性剂浓度或温度梯度增加的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 电泳至与 DNA 变性温度 (熔解温度) 一致的凝胶变性位置时, DNA 发生解旋变

[△] 通讯作者, E-mail: nfyzyz@163.com。

性。当变性的 DNA 链中含有碱基突变,而高熔点区仍为双链时, DNA 分子迁移率发生改变,从而达到分离的效果。为了提高 DGGE 的突变检出率,可人为地在一侧引物的 5' 端加上一个 30~40 bp 的 GC 夹,以提高非目的片段的 T_m 值,使相应的目的序列处于低熔点区而更便于分析。在 DGGE 基础上发展起来的恒变性毛细管电泳 (constant denaturing capillary electrophoresis, CDCE) 可在一定程度上提高通量及灵敏度^[11]。尽管 DGGE 重复性好、突变检出率较高,但同样存在通量低、实验周期长与配胶繁琐等问题,且需要特殊的仪器,合成带 GC 夹的引物也比较昂贵,对突变筛查需要较高数量的模板,因此在低水平突变筛查未能普及应用。

2 裂解方法

基本原理是利用各种特殊工具酶识别并切割错配的双链 DNA 位点,最后标记的酶切片段通过电泳分离并测序来鉴别未知突变。如常用的利用核酸内切酶 endo-V 切割某错配碱基的 3' 端,以形成一个缺口,随后加入连接酶,连接正常配对序列的 3' 末端碱基,然后利用电泳分析荧光标记片段筛查未知突变。类似的方法还包括利用糖基化酶如 MutY 特异性切割 AG 错配,胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶 (TDG) 特异性切割 TG 错配^[12]。Li 等^[13]采用高选择性 CEL I 核酸酶结合测序可以检测带有 TP53 与表皮生长因子受体 (EGFR) 突变细胞系的所有突变错配,敏感性达 $(1 \sim 5) \times 10^{-2}$ 。化学裂解法 (chemical cleavage of mismatch) 与酶裂解法的原理基本相似,不同点是杂合双链 DNA 中,错配位点是由某些化学物质加以修饰后从该处将其裂解,最后由变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后放射自显影检测出突变及其粗略位置。裂解方法发展迅速,但需要高品质的特定工具酶或者特殊化学物质,因此普及应用受限。

3 熔解动力学方法

3.1 变性高效液相色谱分析 (denaturing high performance liquid chromatography, dHPLC) dHPLC 是近年来应用最广泛的突变检测技术之一。将扩增的 DNA 与野生型 DNA 共同变性、复性,形成各种纯合双链和杂合双链后,将 DNA 片段吸附到分离柱上。有错配的杂合双链 DNA 熔解温度低,解链早于完全配对的纯合双链,在不同分离柱温度条件下实现对 DNA 的分析,最后通过由紫外或荧光检测被分离的 DNA 样品色谱峰的峰形和数目确定突变情况。与传统的方法相比,如 SSCP 的结果易受样本质量、抽提方法等因素的影响,且步骤繁琐; DGGE 则需要标记引物,存在放射性污染,较费时、费力。而 dHPLC 则具备自动化、高通量、检测速度快等优点,且能够纯化 DNA 片断,无需进行聚合酶链反应 (PCR) 引物修饰、特殊试剂或其他样品处理。缺点是需要特殊的仪器,一般临床实验室难以配备,且只能检测杂合突变,但可以利用纯合突变和野生型样品混合来解决。dHPLC 结合测序可检测出约 6.5%~17% 的突变序列^[14],灵敏度较高,但仍难以满足追踪微量突变的临床要求。

3.2 高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM) HRM 是近年来迅猛发展起来的一种新型突变分析技术^[15],可用于突变扫描^[16]、基因分型^[17-18]、甲基化研究^[19]、序列匹配^[20]等方面。其检测原理离不开新型饱和染料的发明 (如 LC Green)。与传统的染料 (如 Sybr Green) 相比,新型饱和染料在 PCR 反应时可以饱和的浓度加入,不会抑制 PCR 反应。在进行 HRM 分析时,由于新型饱和染料占据了 DNA 双链上每一对碱基上的空位,故在双链解链时,染料与双链脱离,使荧光信

号发生敏感且较大的变化,而非饱和染料多发生位置上的迁移,对荧光信号没有敏感的影响。表现在 PCR 过程中加入与 DNA 结合能力更强的新型饱和染料后, DNA 在解链过程中所形成的熔解曲线具有更高的分辨率。突变基因熔解曲线的荧光强度与时间曲线跟野生型基因峰形有所差异,从而具备筛查未知突变的能力。Cherbal 等^[21]利用高分辨率熔解曲线技术对 86 例有乳腺癌/卵巢癌家族史或病史者进行筛查,在 BRCA1 基因中检测出 3 例致病突变、2 例片段缺失及 6 例新发现 SNP 位点,在 BRCA2 基因中筛查出 2 例致病突变及 14 例新 SNP 位点。由于高分辨率熔解率曲线技术具有高通量、简便、闭管、快捷、低廉等优点,在突变检测上具有可观的应用前景,大有取代 dHPLC 的趋势。通过优化条件检测微量突变模板的下限可达 1.5%~2.5%^[22],适合一般临床实验室配备。但 HRM 实验对样品间温度均一性提出较高要求,需要在特定仪器或在一些温度精控实时定量 PCR 仪器 (如 LC480) 中使用,且对 DNA 的质量以及反应体系要求较高。

4 低温变性共扩增 PCR (coamplification at lower denaturation temperature-PCR, COLD-PCR)

COLD-PCR 是近年来对 PCR 的一项革新技术^[23]。在 PCR 反应中,由于完全匹配的同源双链熔解温度较高,当变性温度处于临界的变性温度 (T_c) 时,可减少完全匹配的同源双链模板的扩增,富集扩增序列上任意位点的未知突变。Full COLD-PCR 与 Fast COLD-PCR 是 COLD-PCR 的两种主要形式: Full COLD-PCR 在数轮常规 PCR 循环后,增加了形成杂交双链的一步。由于野生型基因占了大部分比例,因此突变序列多与野生型基因形成杂合双链。再于 T_c 温度点上进行变性,因杂合双链较同源双链具有较低的熔解温度,因此杂合链得到解链扩增,而完全匹配的双链则因解链受抑制而扩增受阻,最终达到富集未知突变模板的目的。Fast COLD-PCR 与 Full COLD-PCR 相比步骤更简便,变性时直接用 T_c 温度代替常规的 94 °C 进行即可,但要求突变同源双链序列比野生型同源双链具有较低的 T_m 值 (如 $G:C > A:T$)。Fast COLD-PCR 不需要形成杂合双链,因此富集效率更高,但不能富集未知突变或突变双链 T_m 值较同源双链高的序列。两种检测方法各有优、劣势,但都可以提高下游分析步骤 (如测序) 的突变模板数量,提高检测灵敏度。

Li 等^[24]利用 COLD-PCR/Taqman 检测结直肠癌与非小细胞肺癌低水平 TP53 及 T790 突变较常规 Taqman PCR 灵敏度提高 15~30 倍。Milbury 等^[25]利用 COLD-PCR 结合高分辨率熔解曲线检测肺腺癌的 TP53 基因突变情况,较联合传统的 PCR 加 HRM 检测效率提高 6~20 倍,检测下限可达 0.1%~1%。COLD-PCR 的技术难点在于确定特定序列的 T_c 值需要结合高分辨率熔解曲线分析技术摸索,且扩增反应须在温度精控的 PCR 仪器上进行,分析片段最好在 200 bp 内。但 COLD-PCR 不需要设计特殊的引物和探针、价格低廉、应用简便且能富集未知突变^[26],结合下游分析技术能提高对微量肿瘤源性突变基因检测的灵敏度,因而具有巨大的临床应用潜能,未来有望成为临床实验室的一项新的常规检测手段。

5 展 望

日新月异的分子生物学技术使检测肿瘤源性突变序列的灵敏度日渐提高,高敏的技术为肿瘤的早期非侵入性诊断及个体化治疗提供了新的手段。目前的各种低水平突变筛查方法依然存在或多或少的的问题。经济、简便、灵敏将是未来筛查技

术的发展方向,相信不久的将来,更加成熟、完善的检测手段将普及于临床检测,造福于人类健康。

参考文献

- [1] Gormally E, Vineis P, Matullo G, et al. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence; a prospective study[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13): 6871-6876.
- [2] Benlloch S, Galbis-Caravajal JM, Martin C, et al. Potential diagnostic value of methylation profile in pleural fluid and serum from cancer patients with pleural effusion[J]. *Cancer*, 2006, 107(8): 1859-1865.
- [3] Rieger-Christ KM, Mourtzinou A, Lee PJ, et al. Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection[J]. *Cancer*, 2003, 98(4): 737-744.
- [4] Zou H, Taylor William R, Harrington JJ, et al. High detection rates of colorectal neoplasia by stool DNA testing with a novel digital melt curve assay[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(2): 459-470.
- [5] Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 6000 trial[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(3): 466-474.
- [6] Shi C, Hong SM, Lin P, et al. KRAS2 mutations in human pancreatic acinar-ductal metaplastic lesions are limited to those with PanIN; implications for the human pancreatic cancer cell of origin[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(2): 230-236.
- [7] Franklin WA, Haney J, Sugita M, et al. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(1): 43-50.
- [8] Jugessur A, Frost P, Andersen TI, et al. Enhanced detection of mutations in BRCA1 exon 11 using restriction endonuclease fingerprinting-single-strand conformation polymorphism[J]. *J Mol Med*, 2000, 78(10): 580-587.
- [9] Frost P, Jugessur A, Apold J, et al. Complete mutation screening and haplotype characterization of the BRCA1 gene in 61 familial breast cancer patients from Norway[J]. *Dis Markers*, 2005, 21(1): 29-36.
- [10] Tamboom K, Kaasik K, Arsavskaja J, et al. BRCA1 mutations in women with familial or early-onset breast cancer and BRCA2 mutations in familial cancer in Estonia[J]. *Hered Cancer Clin Pract*, 2010, 8(1): 74-81.
- [11] Li Q, Liu Z, Monroe H, et al. Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(10): 1499-1511.
- [12] Zhang YZ, Kaur M, Price BD, et al. An amplification and ligation-based method to scan for unknown mutations in DNA[J]. *Human Mutation*, 2002, 20(2): 139-147.
- [13] Li J, Ross B, Distel Robert J, et al. s-RT-MELT for rapid mutation scanning using enzymatic selection and real time DNA-melting: new potential for multiplex genetic analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(12): e84.
- [14] Emmerson P, Maynard J, Jones S, et al. Characterizing mutations in samples with low-level mosaicism by collection and analysis of DHPLC fractionated heteroduplexes[J]. *Human Mutation*, 2003, 21(2): 112-115.
- [15] Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(2): 219-240.
- [16] Chou LS, Lyon E, Wittwer CT. A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model[J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 124(3): 330-338.
- [17] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(6 Pt 1): 853-860.
- [18] Liew M, Nelson L, Margraf R, et al. Genotyping of human platelet antigens 1 to 6 and 15 by high-resolution amplicon melting and conventional hybridization probes[J]. *J Mol Diagn*, 2006, 8(1): 97-104.
- [19] Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(6): e41.
- [20] Zhou L, Vandersteen J, Wang L. High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity[J]. *Tissue Antigens*, 2004, 64(2): 156-164.
- [21] Cherbal F, Bakour R, Adane S, et al. BRCA1 and BRCA2 germline mutations screening in algerian breast/ovarian cancer families[J]. *Disease Markers*, 2010, 28(6): 377-384.
- [22] Kramer D, Thunnissen FB, Gallegos-Ruiz MI, et al. A fast, sensitive and accurate high resolution melting (HRM) technology-based assay to screen for common K-ras mutations[J]. *Cellular Oncology*, 2009, 31(3): 161-167.
- [23] Li J, Wang L, Mamon H, et al. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing[J]. *Nat Med*, 2008, 14(5): 579-584.
- [24] Li J, Wang L, Jaenne PA, et al. Coamplification at lower denaturation temperature-PCR increases mutation-detection selectivity of taqman-based real-time PCR[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 748-756.
- [25] Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM, et al. COLD-PCR-enhanced high-resolution melting enables rapid and selective identification of low-level unknown mutations[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(12): 2130-2143.
- [26] Zuo Z, Chen S, Chandra PK, et al. Application of COLD-PCR for improved detection of KRAS mutations in clinical sample[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(8): 1023-1031.

(收稿日期: 2011-01-22)