



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102796817 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201210233750. 4

(22) 申请日 2012. 07. 06

(71) 申请人 陕西北美基因股份有限公司

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号

(72) 发明人 陈超 刘金辉 戴鹏高 王浩

王刚

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限

公司 61211

代理人 陈广民

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种快速检测 KRAS 基因突变的方法

(57) 摘要

本发明提出一种快速检测 KRAS 基因突变的方法,以克服传统探针熔解曲线法灵敏度低,检测不精确的缺点。该快速检测 KRAS 基因突变的方法,包括以下步骤:(1) 分子信标探针和模板扩增引物的设计及合成;(2) 提取被测样本的 KRAS 基因组 DNA;(3) 配制反应体系;(4) PCR 反应;PCR 反应完成后进行熔解曲线分析,通过熔解峰的 T_m 值判断出被测样本中是否发生了 KRAS 突变。本发明将分子信标探针和延伸阻滞引物结合起来,并利用无 $5' \rightarrow 3'$ 外切酶活性聚合酶进行体外快速检测 KRAS 突变,不仅节省了耗材,同时具有高灵敏度,高特异性的特点,使检测结果更可靠。

1. 一种快速检测 KRAS 基因突变的方法,包括以下步骤:

(1) 分子信标探针和模板扩增引物的设计及合成

上游引物 (25nt):

5' -GATAGTGTATTAACCTTATGTGTGA-3'

延伸阻滞引物 (38nt):

ttGCTGGTGGCGTCATATTCGTCCACAAAATGATTCTG-3'

额外序列

基础引物序列

5' - 分子信标探针 (27nt):

FAM-cccttgCCTACGCCACCAGCTcaaggg-BHQ2

模板互补序列

(2) 提取被测样本的 KRAS 基因组 DNA ;

(3) 配制反应体系

在反应管中加入被测样本的 KRAS 基因组 DNA、上游引物、延伸阻滞引物、UNG 酶 (尿嘧啶 -N- 糖基化酶)、5' → 3' 外切酶活性缺失聚合酶 (TIANNIUM™Taq DNA Polymerase), dNTPs (脱氧核糖核苷三磷酸)、dUTP (脱氧尿苷三磷酸)、分子信标探针、10×PCR Buffer (TIANNIUM™Taq PCR Buffer) ;

(4) PCR 反应

将配制好的反应体系在荧光实时定量 PCR 仪上进行扩增和熔解, PCR 反应完成后进行熔解曲线分析,通过熔解峰的 T_m 值判断出被测样本中是否发生了 KRAS 突变。

2. 根据权利要求 1 所述的快速检测 KRAS 基因突变的方法,其特征在于:

以单管反应体系 25 μ l 计,反应管中加入上游引物 500nM,延伸阻滞引物 50nM, UNG 酶 (尿嘧啶 -N- 糖基化酶) 0. 2U, 5' → 3' 外切酶活性缺失聚合酶 (TIANNIUM™Taq DNA Polymerase) 0. 5U, dNTPs (脱氧核糖核苷三磷酸) 200 μ M, dUTP (脱氧尿苷三磷酸) 400 μ M, 分子信标探针 250nM, 10×PCRBUFFER (TIANNIUM™ Taq PCR Buffer) 2. 5 μ l, ddH₂O 补足体积 25 μ l。

3. 根据权利要求 2 所述的快速检测 KRAS 基因突变的方法,其特征在于:

PCR 反应参数设置如下: 50 °C, 2~5min; 95 °C, 12~15min; 95 °C, 2~5sec; 56 °C, 0~1sec; 65 °C, 0~1sec; 55~65 个循环; 熔解: 95 °C, 1~5min; 50 °C → 72 °C 每秒收集荧光 15~20 次, 0. 02~0. 05 °C 梯度升温。

一种快速检测 KRAS 基因突变的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测 KRAS 基因突变的方法。

背景技术

[0002] 基因突变是指基因组 DNA 分子在结构功能上发生碱基组成或排列顺序的改变,主要包括碱基的替代和片段的插入缺失,是导致基因型疾病的重要原因之一。基因突变分析在生物医学研究中,尤其是在基因型疾病诊断及病理研究中有着非常重要的作用。KRAS 基因编码的蛋白参与由表皮生长因子受体 (EGFR) 介导的细胞信号转导通路,影响细胞的增殖、生长和转移;正常的 KRAS 基因编码的蛋白在接受上游信号活化后被激活,并将在信号传递给下游细胞因子后恢复非激活状态;而突变的 KRAS 基因所编码的蛋白无需上游信号活化便始终处于激活状态,导致细胞的非正常增殖和生长,引起恶性肿瘤。抗 EGFR 类肿瘤药物通过特异性阻滞 EGFR 与受体结合,阻断细胞转导通路,从而达到抑制癌细胞增殖的目的;多项研究发现,接受抗 EGFR 药物治疗的结直肠癌患者中, KRAS 基因野生型的病人较 KRAS 基因突变型病人更能从治疗中受益;具有更高的药物客观反应率和较长的生存时间。因此,能够准确检测 KRAS 突变状态对指导结直肠癌患者临床用药有重要意义。

[0003] 传统检测 KRAS 基因突变的方法多种多样,其中最为经典是双脱氧测序技术,此外还包括等位基因特异性寡核苷酸杂交 (ASO)、连接酶检测反应 (LDR)、多聚酶链限制性长度多态性分析 (PCR-RFLP) 和 TaqMan 技术。虽然这些方法能够检测突变是否存在,但大多数方法不能确定突变的类型并且只能检测到突变的一部分;同时大多数方法需要琼脂糖凝胶电泳等 PCR 后处理检测才能分析结果,准确度和灵敏度受到限制。近年来,等位基因特异性 PCR (Allele-specific PCR, ARMS)、高分辨溶解曲线 (HRM)、变性高效液相色谱分析 (dHPLC) 和焦磷酸测序技术 (Pyrosequencing) 等方法改善了检测的灵敏度和特异性,但仍存在假阳性现象严重和操作繁琐等缺点。

[0004] 分子信标探针 (Molecular Beacon) 是一种可以自发形成茎环结构的双标记寡核苷酸探针,其 5' 末端标记有荧光基团,3' 末端标记有淬灭基团;当茎环结构形成后,荧光基团和淬灭基团空间距离靠近,发生荧光共振能量转移 (FRET),荧光基团被外界光源激发后发出的光子被淬灭基团吸收,此时探针不能被激发出荧光;若体系中存在与探针序列相匹配的模板,当分子信标探针与模板杂交后,其发夹结构被打开,使得荧光基团与淬灭基团空间距离增大,此时荧光基团被激发出的荧光未被淬灭,可以检测荧光信号;同时由于荧光强度与体系中模板的量呈正比,故分子信标探针可以用于实时定量 PCR 反应。当分子信标与模板链杂交后,若继续升高温度可导致探针与模板再次分离,从而使得荧光强度随温度升高而降低。将荧光强度对温度变化时间求导数便得到熔解曲线,熔解曲线的峰值为荧光信号降低速率最大时对应的温度,即为模板与探针结合强度 (T_m 值)。由于序列的差别,探针与野生型模板和突变型模板的结合强度有差别,表现在熔解曲线 (熔解峰) 的不同。传统的熔解曲线法灵敏度较低,使得检测结果不准确。

发明内容

[0005] 为了克服传统探针熔解曲线法灵敏度低,检测不精确的缺点,本发明提出一种快速检测 KRAS 基因突变的方法,不仅节省了耗材,同时具有高灵敏度,高特异性的特点,检测结果更可靠。

[0006] 为实现以上发明目的,本发明提供如下基本技术方案。

[0007] 一种快速检测 KRAS 基因突变的方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 分子信标探针和模板扩增引物的设计及合成

[0009] 上游引物 (25nt):

[0010] 5' -GATAGTGTATTAACCTTATGTGTGA-3'

[0011] 延伸阻滞引物 (38nt):

[0012]

TTGCTGGTGGCGTCATATTCGTCCACAAAATGATTCTG-3'

额外序列

基础引物序列

[0013] 5' - 分子信标探针 (27nt):

[0014]

FAM-cccttgCCTACGCCACCAGCTcaaggg-BHQ2

模板互补序列

[0015] (2) 提取被测样本的 KRAS 基因组 DNA ;

[0016] (3) 配制反应体系

[0017] 在反应管中加入被测样本的 KRAS 基因组 DNA、上游引物、延伸阻滞引物、UNG 酶 (尿嘧啶 -N- 糖基化酶)、5' → 3' 外切酶活性缺失聚合酶 (TIANNIUM™ Taq DNA Polymerase), dNTPs (脱氧核糖核苷三磷酸)、dUTP (脱氧尿苷三磷酸)、分子信标探针、10×PCR Buffer (TIANNIUM™ Taq PCR Buffer) ;

[0018] (4) PCR 反应

[0019] 将配制好的反应体系在荧光实时定量 PCR 仪上进行扩增和熔解, PCR 反应完成后进行熔解曲线分析,通过熔解峰的 T_m 值判断出被测样本中是否发生了 KRAS 突变。

[0020] 基于以上基本方案,为取得更佳的技术效果,本发明还可作出以下优化限定。

[0021] 以单管反应体系 25 μ l 计,反应管中加入上游引物 500nM,延伸阻滞引物 50nM,UNG 酶 (尿嘧啶 -N- 糖基化酶) 0. 2U,5' → 3' 外切酶活性缺失聚合酶 (TIANNIUM™Taq DNA Polymerase) 0. 5U, dNTPs (脱氧核糖核苷三磷酸) 200 μ M, dUTP (脱氧尿苷三磷酸) 400 μ M, 分子信标探针 250nM, 10×PCRBUFFER (TIANNIUM™ Taq PCR Buffer) 2. 5 μ l, ddH₂O 补足体积 25 μ l。

[0022] 在反应体系的总量确定的情况下 (比如 25 μ l), 以上加入物的量纲均为本领域技术人员的常规取量方式。

[0023] 上述 PCR 反应参数设置如下 :50℃, 2~5min ;95℃, 12~15min ;95℃, 2~5sec ;56℃, 0~1sec ;65℃, 0~1sec ;55~65 个循环 ;熔解 :95℃, 1~5min ;50℃ → 72℃ 每秒收集荧光 15~20 次, 0. 02~0. 05℃ 梯度升温。

[0024] 本发明与现有技术相比具有明显的优点和有益效果 :

[0025] 1. 特异性强。在本发明中,针对 KRAS 突变位点设计的分子信标探针和引物组合具有很高的特异性,保证了模板的特异性扩增。

[0026] 2. 灵敏度高。在本发明中,使用的聚合酶缺少 5' → 3' 外切酶活性,分子信标探针和延伸阻滞引物在其基础功能之外都起到了阻碍野生型模板扩增,富集突变的效果;同时聚合酶具有很高的酶活力,可以在极短的时间内(0~2 秒)高效扩增突变型模板;两种效果共同保证了该发明具有很高的灵敏度。

[0027] 3. 节省耗材和时间。基于本实验中分子信标探针的设计,使得该方法可以很大程度上节省实验时间和耗材,再结合设计的反应程序,也大大优化了扩增效果,PCR 反应和熔解过程总共只需要 60-70min,同时每个样本只需要一个反应孔,无需额外设置野生型模板作为对照。

[0028] 4. 结果分析简单。本发明相对于传统的高分辨熔解曲线法,更容易进行实验结果分析;对每个样本只需观察其熔解峰 T_m 便可以分析其突变是否发生,无需参照标准品。

附图说明

[0029] 图 1 为 KRAS 突变位点序列信息,分子信标探针和引物信息示意图。

[0030] 图 2 为该发明实验流程和设计原理示意图。

[0031] 图 3、4 为本发明应用于 KRAS 突变检测实验结果图。

具体实施方式

[0032] 本发明将分子信标探针和延伸阻滞引物结合起来,并利用无 5' → 3' 外切酶活性聚合酶进行体外快速检测 KRAS 突变,不仅节省了耗材,同时具有高灵敏度,高特异性的特点,使检测结果更可靠。

[0033] 延伸阻滞引物(Extension-Refractory primes)是一种可以和自身延伸产物形成“颈环”结构的引物;除了普通引物序列部分之外,延伸阻滞引物 5' 端额外包含的一段碱基序列,这段序列可以与自身延伸得到的产物单链中包含突变位点在内的一段碱基序列互补,形成“颈环”结构;由于野生型和突变型模板间序列的不同,故形成的“颈环”结构强度(T_m 值)有明显差别。

[0034] 本发明针对 KRAS 基因第二号外显子热点突变区域设计一条高特异性分子信标探针,该探针序列与野生型 KRAS 基因完全匹配;在探针的上下游设计一对高特异性引物,其中上游引物为普通引物,下游引物为延伸阻滞引物。在 PCR 反应体系中,上游引物浓度为延伸阻滞引物浓度的 10 倍;延伸阻滞引物的基础引物部分对模板没有选择性,但其 5' 端额外序列部分只与野生型模板延伸得到产物完全互补配对。在反应体系中加入引物对和分子信标探针,在 PCR 反应过程中,选择合适的退火和延伸温度,控制退火和延伸的时间,探针与野生型模板结合强度高($T_m \approx 68^\circ\text{C}$),可以较强方式结合,而探针与突变型模板不能完全互补配对(突变位点位置错配),故二者结合强度较低($T_m \approx 59^\circ\text{C}$);同时延伸阻滞引物与野生型模板所得到的延伸产物可以形成“颈环”结构($T_m \approx 70^\circ\text{C}$),而突变模板的延伸产物则不能;由于 PCR 反应所用的聚合酶缺少 5' → 3' 外切酶活性,分子信标探针与模板的结合以及延伸阻滞引物二级结构的形成分别导致上游引物和延伸阻滞引物的延伸受到阻碍,这种阻碍作用主要对野生型模板起作用,而对突变型模板扩增几乎无影响,因此达到富集突变,

提高灵敏度的作用。在 PCR 反应完成后进行熔解曲线分析,通过熔解峰的 T_m 值便可以准确判断样本中是否发生了 KRAS 突变。

[0035] 图 1 为 KRAS 基因部分序列(含突变位点在内 120nt) 信息以及本发明中用到的分子信标探针和延伸阻滞引物的示意图;

[0036] 请参阅图 1-1 所示,为本发明中所涉及到 KRAS 序列信息及引物和探针位置示意图。标蓝碱基为引物对应的序列,其中左上方黑色半箭头指代上游引物,长度为 25nt;中下方折叠式半箭头指代延伸阻滞引物,其基础引物部分为 26nt,5' 端额外序列(颈环形成所需)为 12nt;箭头指示碱基(3 个 G)为 KRAS 突变发生位点,其上方图示为分子信标探针对应序列范围。本发明中所用的分子信标为双标记寡核苷酸探针,其 5' 末端标记荧光基团(椭圆标志),3' 末端标记淬灭基团(椭圆标志)。探针 5' 端有 2nt 不与模板互补,3' 端有 5nt 不与模板互补,与模板互补部分序列为 20nt。

[0037] 请参阅图 1-2 所示,为本发明中分子信标探针“颈环”结构示意图。其中“颈”为 6 个碱基互补配对形成, $T_m \approx 56^\circ\text{C}$;当颈环结构形成后,探针的荧光基团和淬灭基团基团空间距离靠近,不能被激发出荧光;

[0038] 请参阅图 1-3 所示,为本发明中延伸阻滞引物的延伸产物所形成的颈环结构示意图。其中“颈”由其 5' 端额外序列与其自身延伸产物(野生型模板)包含突变位点在内的序列互补配对形成, $T_m \approx 70^\circ\text{C}$ 。延伸阻滞引物与突变型模板延伸得到的产物在 PCR 延伸时不能形成类似二级结构。

[0039] 图 2 为该发明所涉及到的实验流程和设计原理示意图。

[0040] 请参阅图 2-1 所示,为本发明中检测 KRAS 基因突变的实验原理图。由于 PCR 反应体系中上游引物浓度为延伸阻滞引物(下游引物)的 10 倍,在 PCR 反应过程中,除正常的双链 PCR 产物形成外,同时还有大量上游引物延伸产生的单链 PCR 产物;这些单链可以和体系中的分子信标探针互补配对,当二者结合后,探针“颈环”结构打开,被激发出荧光信号。由于 PCR 反应过程中,单链产生数量随 PCR 循序呈倍数增加,所以被激发的荧光也呈现倍数增强现象。当 PCR 反应完成后,体系中存在的单链和探针结合,此时荧光强度最高。之后进一步升高温度,结合的探针会与单链产物脱离,荧光强度下降。当温度达到探针的退火温度(T_m)时,其与单链产物脱离的速率最快。如果对整个升温过程求取荧光强度和时间的导数(荧光变化速率),便可以得到熔解曲线图;其中的熔解峰指示了探针熔解的 T_m ,反应了探针与模板的结合强度。

[0041] 请参阅图 2-2 所示,为本发明中延伸阻滞引物对突变模板进行富集的示意图。图中左部分为延伸阻滞引物与突变型模板产生的延伸产物,由于其额外序列与产物序列不能完全互补(突变位点错配),在延伸时不能形成“颈环”结构,所以上游引物可以正常的延伸。右部分所示为延伸阻滞引物与突变型模板产生的延伸产物,其额外序列可以和产物序列完全互补,在延伸时形成了“颈环”结构,同时因聚合酶缺少 5' \rightarrow 3' 外切酶活性,上游引物的延伸受到阻碍,PCR 不能正常进行。因此,样本中的突变型模板可以得到富集,而野生型模板的扩增受到了抑制。

[0042] 请参阅图 2-3 所示,为本发明中分子信标探针对突变模板进行富集的示意图。如图中所示,分子信标探针与野生型模板完全互补,在 PCR 延伸时可以与模板很好的结合,由于聚合酶缺少 5' \rightarrow 3' 外切酶活性,下游引物的延伸受到了阻碍,PCR 不能正常进行。而分

子信标探针与突变型模板不能完全互补(突变位点错配),在PCR延伸时不能与模板良好结合,引物的延伸可以正常进行。所以,样本中的突变型模板可以得到富集,而野生型模板的扩增受到了抑制。

[0043] 综合上述两种作用,在PCR反应过程中突变型模板可以得到很好的富集。

[0044] 针对被测样本,本发明的快速检测KRAS基因突变的方法,包括以下步骤:(1)分子信标探针和模板扩增引物的设计及合成

[0045] 上游引物(25nt):

[0046] 5'-GATAGTGTATTAACCTTATGTGTGA-3'

[0047] 延伸阻滞引物(38nt):

[0048]



[0049] 5'-分子信标探针(27nt):

[0050]



[0051] (2) 提取被测样本的KRAS基因组DNA;

[0052] (3) 配制反应体系

[0053] 在反应管中加入被测样本的KRAS基因组DNA、上游引物、延伸阻滞引物、UNG酶(尿嘧啶-N-糖基化酶)、5'→3'外切酶活性缺失聚合酶(TIANNIUM™ Taq DNA Polymerase), dNTPs(脱氧核糖核苷三磷酸)、dUTP(脱氧尿苷三磷酸)、分子信标探针、10×PCR Buffer(TIANNIUM™ Taq PCR Buffer);

[0054] 以单管反应体系25μl计,上游引物500nM,延伸阻滞引物50nM,UNG酶0.2U,5'→3'外切酶活性缺失聚合酶0.5U,dNTPs200μM,dUTP400μM,分子信标探针250nM,10×PCR Buffer2.5μl,ddH₂O补足体积25μl;

[0055] (4) PCR反应

[0056] 将配制好的反应体系在荧光实时定量PCR仪上进行扩增和熔解,反应参数设置如下:50℃,2~5min;95℃,12~15min;95℃,2~5sec;56℃,0~1sec;65℃,0~1sec;55~65个循环;熔解:95℃,1~5min;50℃→72℃每秒收集荧光15~20次,0.02~0.05℃梯度升温。PCR反应完成后进行熔解曲线分析,通过熔解峰的T_m值判断出被测样本中是否发生了KRAS突变。

[0057] 以下是采用本发明所提出的方法对KRAS G12V(35G>T)突变进行检测的示例,以进一步体现本发明的技术效果。

[0058] 将培养的SW480细胞(KRAS G12V)基因组DNA进行提取,使用Nanodrop核酸定量仪定量;取部分G12V基因组DNA与野生型基因组DNA按1:19比例混合。同时将G12V基因组DNA,野生型基因组DNA和混合型DNA作为三种模板。

[0059] 实时荧光PCR的扩增体系为25μl,有两组,每组三个反应管,每管中均加入上游引物500nM,普通下游引物或延伸阻滞引物50nM,UNG酶(尿嘧啶-N-糖基化酶)0.2U,

5' → 3' 外切酶活性缺失聚合酶 (TIANNIUM™ Taq DNA Polymerase) 0.5U, dNTPs (脱氧核糖核苷三磷酸) 200 μ M, dUTP (脱氧尿苷三磷酸) 400 μ M, 分子信标探针 250nM, 10×PCR Buffer (TIANNIUM™ Taq PCR Buffer) 2.5 μ l, ddH₂O 补足体积 25 μ l。每组中三管分别加入野生型模板, G12V 突变型模板和混合型模板 (G12V5%)。将配制好的体系在荧光实时定量 PCR 仪上进行扩增和熔解。反应参数设置如下: 50°C, 2~5min; 95°C, 12~15min; 95°C, 2~5sec, 56°C, 0~1sec, 65°C 0~1sec, 55~65 个循环; 熔解: 95°C, 1~5min, 50°C → 72°C 每秒收集荧光 15~20 次, 0.02~0.05°C 梯度升温。观察样品的熔解曲线。结果如图 3 所示。

[0060] 请参阅图 3-1 所示, 当使用普通引物时, G12V 突变模板对应熔解峰 T_m 为 58°C 左右, 野生型模板对应熔解峰 T_m 为 68°C 左右, 而 5%G12V 突变型模板熔解峰仅在对应野生型熔解峰处明显, 在 58°C 处不明显; 请参阅图 3-2 所示, 当使用延伸阻滞引物时, G12V 突变型模板和野生型模板的熔解峰 T_m 没有改变, 而 5%G12V 突变型模板则呈现出“双熔解峰”形式, 且其对应的突变型熔解峰 (T_m 58°C) 非常明显, 证明突变得到了富集, 与理论结果完全符合。

[0061] 对于典型的其他突变类型 (如 G12S、G12R、G12C、G12A、G12D、G13D) 的样本检测, 同样符合本发明的检测理论; 经实验, 也均可以达到预期效果。

[0062] 请参阅图 4 所示, 使用本发明对 5 例结直肠癌患者肿瘤样本 DNA 进行检测, 证实样本 5 为 KRAS 野生型, 样本 1、2、3、4 为突变型。

[0063] 以上实施例不应视为对本发明保护范围的限制, 本发明在模板的准备和实时荧光 PCR 的环节确定了最佳的实施方式和参数, 但本领域技术人员基于本发明技术思想和设计的引物体系, 按照常规的操作方式 (如试剂配比、扩增过程参数等) 足以快速检测 KRAS 突变, 较之于现有技术有显著进步。

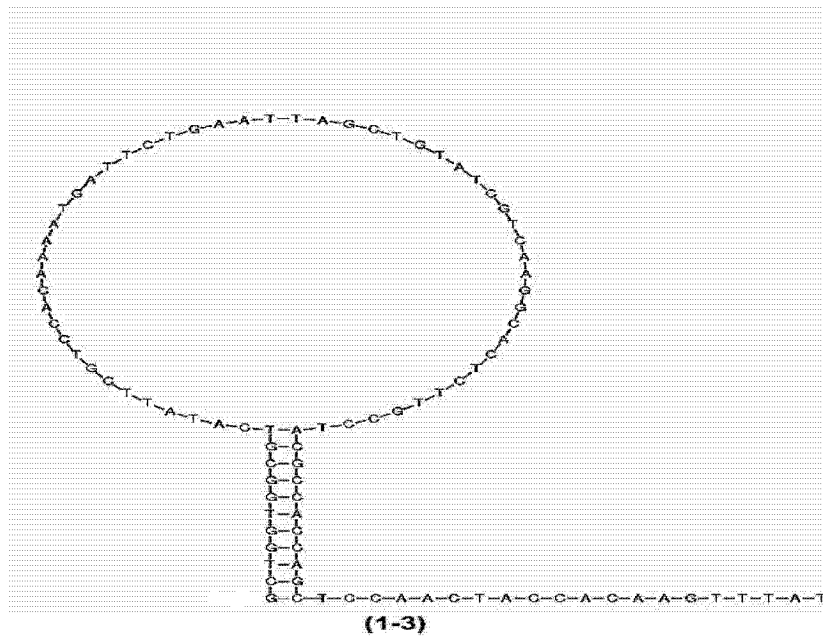
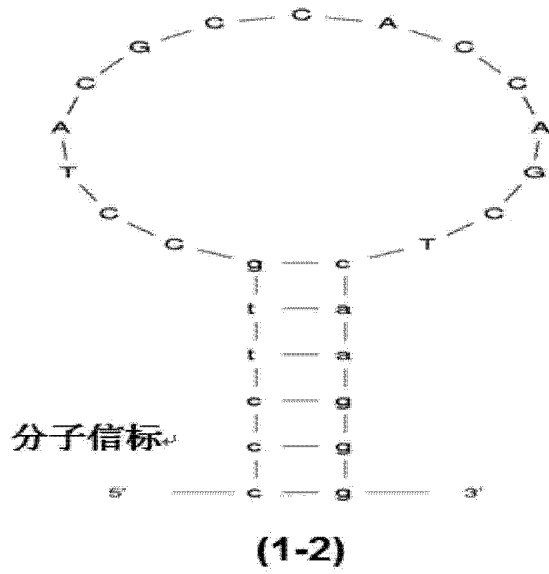
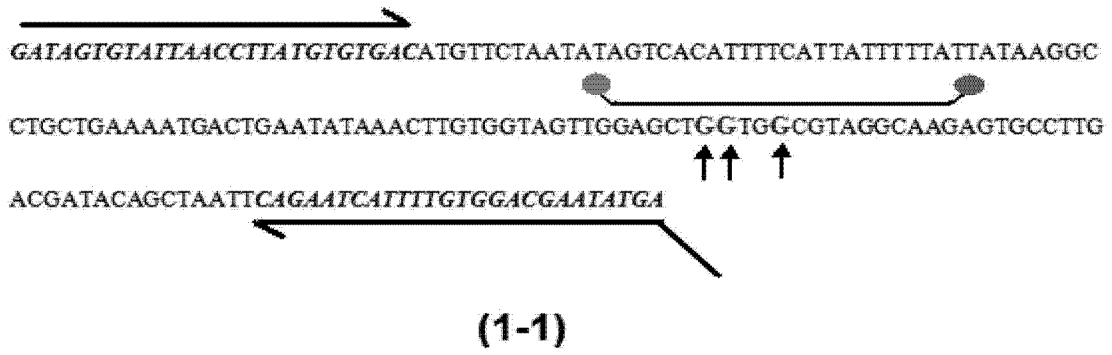


图 1

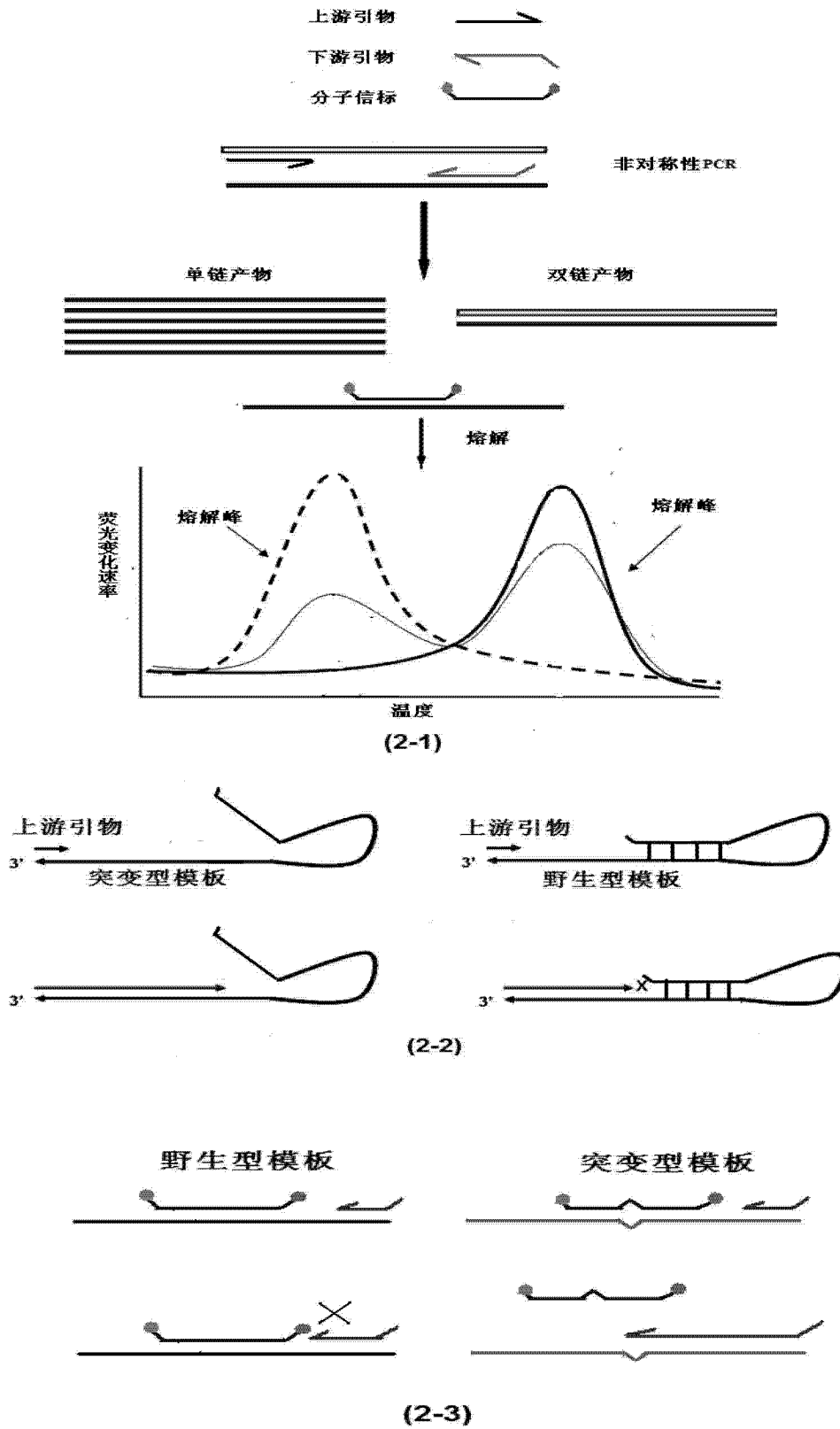


图 2

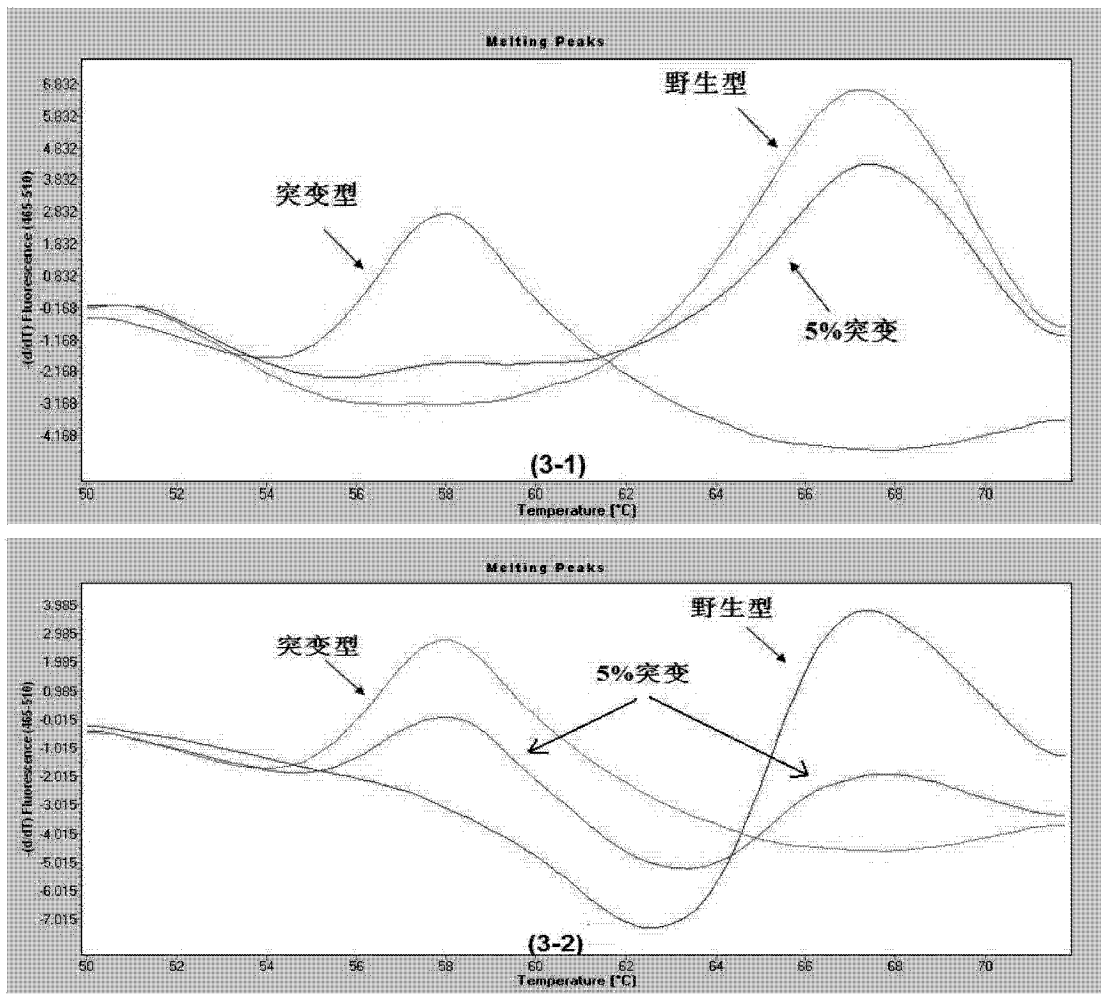


图 3

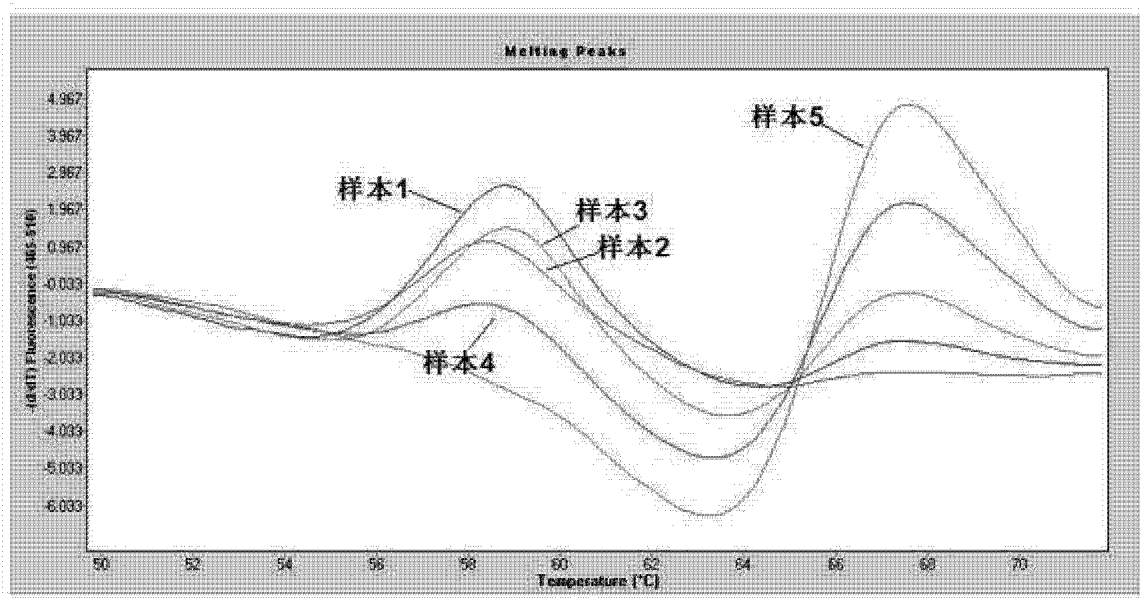


图 4