周翠兰, 陈婕, 许云思, 等. 限制性内切酶酶切后去磷酸化联合蓝白斑筛选检测 KRAS 基因第12 位稀有突变[J]. 中南医学科学杂志, 2024, 52(1): 26-30.

・基础医学・

DOI:10. 15972/j. cnki. 43-1509/r. 2024. 01. 006

限制性内切酶酶切后去磷酸化联合蓝白斑筛选检测 KRAS 基因第 12 位稀有突变

周翠兰^{1,2},陈婕^{1,2},许云思^{1,2},付乙人^{1,2},彭翠英^{1,3,4}

南华大学衡阳医学院 1.基础医学院应用解剖学与生殖医学研究所, 2.生态健康与人类重要疾病防控 湖南省高校重点实验室, 3.生物毒理与生态修复衡阳市重点实验室, 4.有色金属矿区耕地重金属 污染生态阻抗技术研究所衡阳市重点实验室,湖南衡阳 421001

[摘 要]目的研究限制性内切酶酶切后去磷酸化联合蓝白斑筛选检测 KRAS基因第12位密码子稀有突变的可行性。 方法将采用限制性内切酶酶切后去磷酸化联合蓝白斑筛选检测方法作为实验组,限制性内切酶酶切联合蓝白斑筛选检测 方法作为对照组。对照组将 KRAS基因第12位密码子突变型(MUT)/野生型(WT)(MUT/WT 12)质粒按0:1、1:300、 1:1000、1:3000的比例混合,限制性内切酶酶切 PCR产物,酶切后产物进行蓝白斑筛选。实验组将 MUT/WT 12质粒按 0:1、1:3000、1:10000、1:30000的比例混合,在对照组方法的基础上酶切产物去磷酸化后再蓝白斑筛选。比较两组蓝白 斑克隆数。限制性内切酶酶切鉴定实验组 MUT/WT 12为1:30000的阳性克隆,一代测序阳性克隆验证插入片段的序列。 采用限制性内切酶酶切后去磷酸化联合蓝白斑筛选验证26例肺癌病例游离 DNA 的 KRAS基因第12位稀有突变。结果 对 照组1:3000的培养皿上白色克隆17个,蓝色克隆2329个,白色/蓝色克隆为1/137;而实验组1:30000的培养皿上白色 克隆23个,蓝色克隆394个,白色/蓝色克隆为1/17,1:30000实验组白色/蓝色克隆为1/137;而实验组1:30000对照组。实验 组1:30000培养血上5个阳性克隆酶切鉴定出3个阳性,其插入片段为 KRAS第12位突变片段。限制性内切酶酶切后去磷 酸化联合蓝白斑筛选26例肺癌病例可检测出2例为 KRAS基因第12位密码子突变。结论 采用限制性内切酶酶切后去磷 酸化联合蓝白斑筛选可检测出1:30000 KRAS基因稀有突变。

[关键词] 限制性内切酶酶切 KRAS 基因; 蓝白斑技术; 去磷酸化; 稀有突变 [中图分类号] Q782 [文献标识码] A

Detection of KRAS rare mutation of codon 12 blue/white colony screening coupled with dephosphorylation of enzymatic products

ZHOU Cuilan^{1,2}, CHEN Jie^{1,2}, XU Yunsi^{1,2}, FU Yiren^{1,2}, PENG Cuiying^{1,3,4}

1. Clinical Anatomy and Reproductive Medicine Application Institute, School of Basic Medicine, 2. The Key Laboratory of Ecological Environment and Critical Human Diseases Prevention of Hunan Province Department of Education, 3. The Key Laboratory of Hengyang City on Biological Toxicology and Ecological Restoration, 4. The Key Laboratory of Hengyang City on Ecological Impedance Technology of Heavy Metal Pollution in Cultivated Soil of Nonferrous Metal Mining Area, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

[ABSTRACT] Aim To study the feasibility of detecting rare mutations in the 12th codon of the KRAS gene through restriction endonuclease digestion followed by dephosphorylation combined with blue and white spot screening. Methods The experimental group employed restriction enzyme digestion, dephosphorylation, combined with blue-white screening, while the control group utilized restriction enzyme digestion followed by blue-white screening. In the control group, plasmids containing KRAS gene codon 12 mutant (MUT) and wild type (WT) (MUT/WT 12) sequences were mixed at ratios of 0 : 1, 1 : 300, 1 : 1 000, or 1 : 3 000, followed by restriction enzyme digestion and blue-white screening. In the experimental group, plasmids containing MUT/WT 12 were mixed at ratios of 0 : 1, 1 : 300, 1 : 1 000, or 1 : 3 000, followed by restriction enzyme digestion and blue-white screening.

[收稿日期] 2023-02-27

[修回日期] 2023-12-18

[基金项目] 湖南省自然基金(2020JJ4536,2021JJ30598);南华大学大学生创新课题(210XCX533,S202110555302);南华大 学博士科研启动金(2018XQD12)

[作者简介] 周翠兰,博士,讲师,研究方向为基因诊断,E-mail为406272538@qq.com。通信作者彭翠英,博士,教授,研究方向为基因诊断,E-mail为 pengcuiying2004@126.com。

tios of 0:1, 1:3000, 1:10000, or 1:30000. In addition to the methods used in the control group, the digested products in the experimental group were subjected to dephosphorylation before blue-white screening. The number of blue-white clones was compared between the two groups. The experimental group was identified as positive clones with a MUT/WT 12 ratio of 1:30000, and the sequences of the inserted fragments were verified through first-generation sequencing. Restriction enzyme digestion combined with dephosphorylation and blue-white screening were used to validate 12th codon mutations in rare KRAS gene in 26 cases of lung cancer. **Results** In the control group with a 1:30000 ratio, there were 17 white clones and 2 329 blue clones, resulting in a white-to-blue clone ratio of 1:137. In the experimental group with a 1:30000 ratio, there were 23 white clones and 394 blue clones, resulting in a white-to-blue clone ratio of 1:17. The white/blue clone ratio in the 1:30000 control group. Three positive clones were identified by enzymatic digestion of five positive clones on a 1:30000 culture dish in the experimental group. Restriction enzyme digestion combined with dephosphorylation and blue-white screening successfully identified 12th codon mutations in KRAS gene in 2 out of 26 cases of lung cancer. **Conclusion** The use of restriction enzyme digestion combined with dephosphorylation and blue-white screening successfully identified 12th codon mutations in KRAS gene in 2 out of 26 cases of lung cancer. **Conclusion** The use of restriction enzyme digestion combined with dephosphorylation and blue-white screening successfully identified 12th codon mutations in KRAS gene in 2 out of 26 cases of lung cancer.

[KEY WORDS] restriction endonuclease digestion; KRAS gene; blue-white screening; dephosphorylation; rare mutation

KRAS 基因突变与多种肿瘤的发生发展相关,据 COSMIC 体细胞突变数据库,绝大多数的 KRAS 基因 突变为点突变,较常见的为第 12 位、第 13 位密码子 突变,其野生型序列为 TGGTGG,其中第 12 位突变具 有较高的发病频率,最常见的突变类型为 TGATGG 与 TGGTGA^[1-2]。蓝白斑筛选原理为,外源性 DNA 片 段与含 lacZ 的载体连接,插入到其多克隆位点,破坏 lacZ 的阅读框架,导入宿主为缺陷菌株,致β-半乳糖 苷酶基因断裂而不能产生分解培养基中的 X-gal 的 β-半乳糖苷酶,所以克隆颜色呈白色^[34]。研究发现, 含终止密码子的外源性 DNA 片段(长度为3 的倍数) 插入到含 lacZ 的载体中,克隆颜色呈白色;不含终止 密码子的外源性核苷酸片段(长度为3 的倍数)插入 到含 lacZ 的载体中,呈蓝色克隆^[4]。

本课题组利用蓝白斑筛选技术已完成了 KRAS 基因第 12 位密码子突变检测,可检测出千分之一的 稀有突变^[5],但不能满足肿瘤早期临床诊断的需 要。为降低突变检测的下限,本研究采用限制性内 切酶酶切后去磷酸化联合蓝白斑筛选对 KRAS 基因 第 12 位密码子突变进行检测,为临床肿瘤早期筛查 提供理论与技术支持。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

PCR 仪(A200 型) 购自中国杭州朗基公司, E Coli. DH5α菌株、100 bp DNA Ladder、PMD-19T 购 自中国北京天根公司。dNTP、BstNI、EcoRI、KpnI、 T4 连接酶购自美国 NEB 公司。质粒 DNA 提取试剂 盒购自中国大连 TaKaLa 公司。MixTaq 与 DNA Polymerase 购自美国 Thermo Scientific 公司。IPTG、X- gal、Amp、Tris-base 试剂购自中国长沙宏宇生物公司。 人工模板 KRAS 基因第 12 位密码子突变型(mutant type,MUT)与野生型(wild type,WT)质粒为本实验室 构建,插入长度为 102 bp(3 的倍数)的核苷酸片段, 第 12 位密码子 MUT 12 质粒其 TGG 突变成 TGA。

1.2 引物设计与合成

根据 COSMIC 体细胞突变数据库显示的 KRAS 基因第 12 位密码子热点突变,NCBI 网站(https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)显示的 KRAS 基因 序列,利用引物设计软件 Premier 5.0 设计引物,设 计引物主要考虑成功引入酶切位点,将引入突变的 碱基置于引物的 3'末端。设计一对引物:FS(正向 引物)、AS(反向引物)。FS 中 3'的 C 碱基为引入 BstNI 酶切序列的 C 碱基。FS 与 AS 扩增得到的产 物双酶切后用于亚克隆,双酶切后获得的插入片段 长度为 102 bp,插入片段的长度为 3 的倍数。AS 的 序列为 5'-CTACGGAATTCTTGGACCATATTCGTCC ACA-3',FS 的序列为 5'-ATACGAGGGTACCTGACTG CATACAAACTTGTGGTAGTTGGAC-3',引物序列 由 苏州金唯智公司合成。

1.3 PCR 扩增引入酶切位点

测定第 12 位密码子 MUT 与 WT 质粒光密度 (optical density, OD)值。依据 OD 值将 MUT/WT 12 按 0:1、1:3 000、1:10 000、1:30 000 的比例混 合以模拟人体循环血液中游离 DNA 作为实验组模 板,将 MUT/WT 12 质粒按 0:1、1:300、1:1 000、 1:3 000 的比例混合作为对照组模板,WT 质粒终 质量浓度为 0.02 μg/L^[6]。以混合的人工模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 50 μL, 5 μL 10×Tag buffer, 0.4 mmol/L dNTP, 引物 FS、AS 各 20 mmol/L, Tag 酶 0.25 U,模板 40 ng。PCR 扩增条件: 预变性 95 ℃ 3 min;变性 95 ℃ 22 s,退火 58 ℃ 22 s,延伸 72 ℃ 22 s,38 个循环;终延伸 72 ℃ 8 min。

1.4 限制性内切酶酶切

PCR 产物纯化试剂盒纯化回收引入酶切位点 的 PCR 产物,反应体系 150 µL, PCR 产物 2 µg, 12 µL 10×Cut Smart Buffer, 5 µL BstNI, 85 ℃反应 2 h。PCR 产物纯化试剂盒纯化回收酶切产物。野 生型片段含酶切位点,被酶切成两个小片段,去磷 酸化使 5'端去磷酸根,与线性化载体的连接被阻 断。突变型片段不含酶切位点,不能被酶切,去磷 酸化处理不影响突变型片段与线性化载体的连接。 因此,酶切后 PCR 产物去磷酸化。

1.5 酶切产物去磷酸化

纯化回收 PCR 酶切产物,反应体系 60 μL,6 μL 10×碱性磷酸酶缓冲液,3 μL 碱性磷酸酶,37 ℃ 1 h, 80 ℃ 20 min 以灭活碱性磷酸酶。PCR 产物纯化试 剂盒纯化回收去磷酸化产物。EcoRI 与 KpnI 双酶切 PMD-19T 载体与 PCR 产物,纯化回收线性化载体与 PCR 酶切产物。紫外分光光度计测定 OD 值。

1.6 蓝白斑筛选检测稀有突变及蓝白斑菌落计数

测定 PCR 酶切产物的 OD 值, PCR 酶切产物与 载体连接。将连接后的产物导入 E Coli. DH5α 菌 株。培养物涂抹于含 X-gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂 平板培养基上,琼脂平板置于 5% 二氧化碳培养箱, 37 ℃培养 16 h。将培养皿平分为4 个部分,肉眼计 数1 个部分的白色克隆与蓝色克隆,将所得计数的 克隆数乘以4 既为培养皿上的白色克隆或蓝色克隆 的个数。

1.7 菌液 PCR 酶切鉴定插入片段

在突变与野生为1:30 000 琼脂培养皿上挑取 5 个白色克隆,进行菌液 PCR 酶切鉴定。引物 AS 与 FS 进行菌液 PCR 扩增以引入酶切位点,BstNI 酶 切,酶切产物琼脂糖凝胶电泳,将酶切鉴定为阳性 的克隆一代测序,验证其插入片段的序列。

1.8 肺癌患者游离 DNA 验证

于南华大学附属第一医院采集 26 例肺癌患者 外周血 8 mL,血液置于 EDTA 抗凝管中。参照凯杰 游离 DNA 提取试剂盒提取血中游离 DNA^[7]。利用 限制性内切酶酶切联合去磷酸化与蓝白斑技术对 26 例肺癌患者游离 DNA 进行检测。

2 结 果

2.1 质粒引入酶切位点

BstNI 酶切 PCR 产物,其电泳图见图1。野生型

片段 PCR 扩增产物含 CCWGG(W 为 A、C、T、G 中 任何一个碱基),为 BstNI 的酶切位点;突变型片段 的 PCR 扩增产物不含 CCWGG,不含酶切位点。 PCR 产物送金唯智公司测序,其序列图见图 2。



图1 质粒引入酶切位点酶切电泳图

M 为 100 bp 的 Marker;1 为 PCR 产物未酶切;2~5 为 MUT/WT 12 分别为0:1、1:3 000、1:10 000、1:30 000 酶切产物。

A CT CTT GCCTACGCCACCAG GT CCAACTACCACAA
B CT CTT GCCTACGCCATCAGGT CCAACTACCACAA

图 2 人工模板引入酶切位点测序图

A 为野生型片段引入酶切位点; B 为突变型片段引入酶切位点。

2.2 两组不同比例混合模板克隆结果

两组培养皿上均可见白色克隆与蓝色克隆。 实验组酶切产物去磷酸化,被酶切成两个小片段的 野生型片段与线性化载体的连接受到阻碍,突变片 段为一完整片段,去磷酸化不影响突变片段与线性 化载体的连接,与对照组相比较,白色/蓝色克隆大 幅提升(图3)。

2.3 蓝白斑菌落计数

对照组1:3000 培养皿上白色克隆17个,蓝 色克隆2329个,白色/蓝色克隆为1/137;而实验组 1:30000的培养皿上白色克隆23个,蓝色克隆 394个,白色/蓝色克隆为1/17;1:30000实验组白 色/蓝色克隆比例明显高于1:3000对照组(表1)。

2.4 菌液 PCR 酶切鉴定结果

实验组1:30 000 培养皿上的5个阳性克隆酶 切鉴定出3个阳性克隆(图4A)。一代测序进一步 验证插入片段的序列,其序列见图4B。野生型扩增 片段为BstNI的酶切位点,被BstNI消化为80 bp与 50 bp的两个DNA片段,这两个片段不能被琼脂糖 电泳检测(可以用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测)。



图 3 不同比例混合模板的克隆形成图

A 从左到右依次为 MUT/WT 12 质粒比例分别为 0:1、1:300、1:1 000、1:3 000 克隆形成图; B 从左至右依次为 MUT/WT 12 质粒比例分别为 0:1、1:3 000、1:10 000、1:30 000 克隆形成图。

分组	MUT/WT 12 质粒	白色 克隆/个	蓝色 克隆/个	白色克隆/ 蓝色克隆
对照组	0:1	13	1 899	1/146
	1:300	29	1 870	1/64
	1:1000	15	1 980	1/132
	1:3 000	17	2 329	1/137
实验组	0:1	2	299	1/155
	1:3 000	76	412	1/5
	1 : 10 000	78	804	1/10
	1:30 000	23	394	1/17

表1 蓝白斑菌落计数



图 4 菌液 PCR 酶切电泳图

A 为菌液 PCR 酶切电泳图(箭头所指为阳性克隆); B 为阳性克隆 插入片段序列图。a 为 80 bp 片段; b 为 50 bp 片段。

2.5 肺癌患者游离 DNA 验证结果

26 例肺癌患者游离 DNA 检测出 2 例游离 DNA 为 KRAS 基因第 12 位密码子突变,其克隆形成图如 图 5A,测序验证其插入序列如图 5B。

3 讨论

利用游离 DNA 进行肿瘤早期诊断与肿瘤切除



术后复发监测时,富集低丰度突变 DNA 片段至关重 要。微滴数字 PCR 检测热点突变能够在一万野生 拷贝中检测出单一拷贝^[8-9],但成本高,操作系统繁 琐,现无法在基层医院推广为普通的体检项目。二 代测序不能对肿瘤进行早期或超早期诊断,且测序 费用高,不易被普通百姓接受^[10-13]。Zhang 等^[14-5] 发明的高保真聚合酶介导的引物 3'末端硫化修饰 技术虽检测下限可达到千分之一甚至更低,但具有 假阳性并存的缺点。

蓝白斑筛选联合一代测序可检测千分之一的 稀有突变,更适合于肿瘤切除术后复发监控^[5]。对 于一些体细胞突变,其野生型片段含酶切位点,突 变引起酶切位点消失;或其野生型片段可经 PCR 扩 增引入酶切位点,而突变型片段不能被引入酶切位 点,可利用限制性内切酶酶切 PCR 扩增产物,去磷 酸化,再与线性化载体连接,一代测序对阳性克隆 的插入片段序列进行确定。野生型片段被酶切成 两个小片段,去磷酸化处理,5′末端去磷酸基团的产 物不能与线性化载体连接。对涉及终止密码子的

突变,可通过克隆颜色对稀有突变进行初步区分。 实验组 MUT/WT 12 为1:30 000 的培养皿上白色/ 蓝色克隆为 1/17, 而对照组 MUT/WT 12 为 1:3000的培养皿上其白色/蓝色克隆为1/137, 1:30 000 实验组白色/蓝色克隆比例明显高于 1:3 000 对照组。野生型片段的 PCR 产物经限制 性内切酶酶切,在T4连接酶的作用下,与线性化载 体连接。蓝白斑筛选高效率与假阳性并存,对照组 的培养皿上白色/蓝色克隆的比例高于实质模板比 例,考虑为载体的自连。将实验组培养皿上的阳性 克隆进行酶切鉴定,再将酶切鉴定为阳性克隆的一 代测序以确定插入片段的序列可避免假阳性。本 研究结果显示,限制性内切酶酶切后去磷酸化联合 蓝白斑筛选可检测出1:30 000 KRAS 基因稀有突 变,证明了限制性内切酶酶切后去磷酸化联合蓝白 斑筛选可提高对稀有突变的检测能力。本实验结 果表明限制性内切酶酶切后去磷酸化联合蓝白斑 筛选在恶性肿瘤的早期或超早期诊断具有较大的 应用潜力。

KRAS 热点突变见于多种恶性肿瘤,其中,突变 率最高的为胰腺癌,其次为直结肠癌、胆管癌及肺 癌^[7]。本课题组利用限制性内切酶酶切后去磷酸 化联合蓝白斑筛选对 KRAS 基因第 12 密码子突变 的人工模板进行检测,同时对26 例肺癌患者游离 DNA 进行稀有突变检测以验证此技术的可行性。 游离 DNA 检测为无创性检测,患者接受的意愿高。 这一研究对涉及终止密码子的其他热点突变的检 测具有潜在的临床应用价值,可为临床恶性肿瘤的 诊断提供一种快速、准确的检测方法,对临床早期 及超早期诊断肿瘤、确定治疗方案以及肿瘤的预后 具有较重要的临床应用价值。此外,本方法操作简 单,所需要的分子生物学试剂成本低廉,所需的仪 器 PCR 仪、琼脂糖凝胶电泳等,均为分子生物学基 本仪器,对操作人员的技术要求不高,有利于在基 层医院普及。此项检测可纳入为常规的体检项目, 为肿瘤的早期和超早期诊断提供一种低廉、低检测 下限的检测方法,可以作为早期肿瘤筛查的检测 技术。

[参考文献]

[1] JUDD J, ABDEL KARIM N, KHAN H, et al. Characterization of

KRAS mutation subtypes in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2021, 20(12): 2577-2584.

- [2] ZHANG T F, LI N, YUAN Y Z, et al. Blue-white colony selection of virus-infected isogenic recipients based on a chrysovirus isolated from penicillium italicum [J]. Virol Sin, 2019, 34(6): 688-700.
- [3] ZHOU J X, ZHAO Z, ZHEN J C, et al. An external substrate-free blue/white screening system in escherichia coli[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(9): 3811-3820.
- [4] DROSTEN M, BARBACID M. Targeting the MAPK pathway in KRAS-driven tumors[J]. Cancer Cell, 2020, 37(4): 543-550.
- [5] 温博雅,彭翠英,徐畅,等. 蓝白斑联合 Sanger 测序技术检测
 KRAS 基因 12 位密码子突变[J]. 中南医学科学杂志, 2020, 48
 (6): 647-650, 667.
- [6] ZHOU C L, PU W Y, YIN Y Y, et al. A novel assay coupling dephosphorylation and blue/white colony screening for the G > A hotspot mutation at codon 13 of KRAS gene[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2018, 18(1): 538-543.
- [7] KOTANI D, OKI E, NAKAMURA Y, et al. Molecular residual disease and efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with colorectal cancer[J]. Nat Med, 2023, 29(1): 127-134.
- [8] KUHLMANN K, CIESELSKI M, SCHUMANN J. Relative versus absolute RNA quantification: a comparative analysis based on the example of endothelial expression of vasoactive receptors [J]. Biol Proced Online, 2021, 23(1): 6.
- [9] DEMEKE T, ENG M. Effect of endogenous reference genes on digital PCR assessment of genetically engineered canola events[J]. Biomol Detect Quantif, 2018, 15: 24-29.
- [10] HU T S, CHITNIS N, MONOS D, et al. Next-generation sequencing technologies: an overview [J]. Hum Immunol, 2021, 82 (11): 801-811.
- [11] YU G C, ZHAO W C, SHEN Y Q, et al. Metagenomic next generation sequencing for the diagnosis of tuberculosis meningitis: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2020, 15 (12): e0243161.
- [12] LI Y Y, SCHMIDT R J, MANNING D K, et al. Contamination assessment for cancer next-generation sequencing [J]. Arch Pathol Lab Med, 2022, 146(2): 227-232.
- [13] MITCHELL S L, SIMNER P J. Next-generation sequencing in clinical microbiology: are we there yet? [J]. Clin Lab Med, 2019, 39(3): 405-418.
- [14] ZHANG J, LI K, LIAO D F, et al. Different applications of polymerases with and without proofreading activity in single-nucleotide polymorphism analysis[J]. Lab Invest, 2003, 83(8): 1147-1154.
- [15] ZHANG J, LI K, PARDINAS J R, et al. Proofreading genotyping assays mediated by high fidelity exo + DNA polymerases [J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(2): 92-96.
- (此文编辑 蒋湘莲)