

基于微流控芯片的温度梯度毛细管电泳检测 大肠癌石蜡标本中 *K-ras* 基因突变*

张惠丹 王晓楠 周 喆 马 倩 方 瑾**

(中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室, 医学细胞生物学教育部重点实验室, 细胞生物学教研室, 沈阳 110001)

摘要 *K-ras* 基因突变检测可用于大肠癌的早期筛查与诊断, 并有利于筛选出抗表皮生长因子受体靶向药物治疗有效的大肠癌患者, 以实现肿瘤的个体化治疗. 采用以倾斜式热辐射原理建立的微流控温度梯度毛细管电泳(temperature gradient capillary electrophoresis, TGCE)基因突变检测系统, 实现了对 98 例石蜡包埋大肠癌组织中 *K-ras* 基因突变的高灵敏度筛查, 突变阳性检出率为 47.96%, 显著高于 PCR 产物直接测序的 23.47%. 克隆测序显示该方法至少能检测到 2.08% 的 *K-ras* 基因突变体. *K-ras* 基因突变与临床病理学参数的关系分析显示, 直肠癌中 *K-ras* 基因突变率明显高于结肠癌($P < 0.05$), 而与年龄、性别、组织学类型和肿瘤分期等无显著相关性. 该检测方法为肿瘤早期诊断和指导临床用药提供了一种灵敏度高、检测速度快、便于大规模筛查的有效手段.

关键词 微流控芯片, 温度梯度毛细管电泳(TGCE), *K-ras* 基因, 突变, 大肠癌, 石蜡包埋组织

学科分类号 Q75, Q81, R44

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00029

基因突变检测在肿瘤早期诊断和分子标记辅助靶向治疗中有非常重要的应用价值. *K-ras* 基因是与人类肿瘤发生关系最为密切的原癌基因之一, 编码的 P21 蛋白与跨膜信号转导过程有关, 影响细胞的增殖与分化^[1]. *K-ras* 基因的激活突变是人类肿瘤中最常见的基因改变, 普遍存在于各种肿瘤中, 在胰腺癌、结肠癌、肺癌和甲状腺癌中的发生率分别为 90%、50%、30%和 50%^[2], 多以点突变为主, 即第 1 外显子的 12、13 位密码子和第 2 外显子的 61 位密码子, 并以 12 位密码子突变率最高. 由于突变位点的相对集中, 更有利于其成为肿瘤筛查的理想靶点^[3]. 近期的研究表明, *K-ras* 基因突变可作为表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)靶向治疗大肠癌、非小细胞肺癌和头颈部鳞癌的疗效预测标志物^[4], 因此, 建立适合临床大规模筛查的 *K-ras* 基因突变检测方法极为重要. 但目前采用的各种方法均不同程度存在灵敏度低、样品用量大、操作繁琐、检测速度慢、费用高等缺陷, 难以实现高效检测. 为此, 本研究将温度梯度毛细管电泳(temperature gradient capillary electrophoresis, TGCE)与微流控芯片技术结合而建立的微流控

TGCE 系统^[5]用于 *K-ras* 基因突变的筛查, 成功实现了对大肠癌石蜡切片标本中 *K-ras* 基因突变的快速、高灵敏度检测, 为临床大规模筛查建立了良好的平台.

1 材料和方法

1.1 材料

选择 *K-ras* 基因杂合性突变大肠癌细胞 (LS174T) 及无突变大肠癌细胞 (HT29), 在含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中于 37℃, 5% CO₂ 条件下培养. 收集 1998~2008 年中国医科大学第一临床医院和沈阳市肛肠医院手术切除的原发性大肠癌组织 98 例, 甲醛固定石蜡包埋后贮存于室温, 所有组织均经病理检查证实, 取材前患者均未接受

* 国家自然科学基金资助项目(20875103, 20375047, 30901727), 辽宁省教育厅高等学校重点实验室项目(20060907)和辽宁省教育厅高等学校科学技术研究项目(05L558).

** 通讯联系人.

Tel: 024-23256666-5347, E-mail: jfang61@netease.com

收稿日期: 2010-01-14, 接受日期: 2010-03-18

放、化疗。患者年龄 32~84 岁, 平均 61.2 岁, 其中男 62 例, 女 36 例。高、中、低分化腺癌分别为 35 例、57 例和 6 例。大肠癌按 Dukes 评定标准分为 A 期 42 例, B 期 14 例, C 期 20 例, D 期 22 例。直肠癌 42 例, 结肠癌 56 例。

聚乙烯吡咯烷酮 [Poly(vinylpyrrolidone) PVP, 分子质量 360 000] 为 Sigma 公司产品; YOYO-1 (激发波长 473 nm, 发射波长 509 nm) 购自 Molecular Probes 公司; Pyrobest DNA 聚合酶, pMD18-T Vector 和感受态细胞 DH5 α 购自 Takara 公司; QIAamp DNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司; 凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天漠科技发展有限公司。T1 型 PCR 扩增仪购自 Biometra 公司。引物序列合成由南京金斯特公司完成, DNA 序列测定由 Invitrogen 公司完成。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

细胞培养至对数生长期, 胰酶消化, 离心收集细胞, 应用 QIAamp DNA Mini Kit 提取细胞基因组。将蜡块切成厚 10 μm 切片, 放入 2 ml 无菌离心管中, 加入 1 ml 二甲苯, 置 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中振荡脱蜡 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 16 000 r/min 10 min, 弃上清。加入 1 ml 无水乙醇颠倒洗涤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 16 000 r/min 5 min, 弃上清。重复脱蜡 - 洗涤 2 次。室温干燥后加入 150 μl 消化液 (500 $\mu\text{g/L}$ 蛋白酶 K, 1% Tween-20, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3), 在 56 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 3 h, 消化中每 0.5 h 振荡混合一次。煮沸 10 min 灭活蛋白酶 K, 16 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清至另一离心管中作为 PCR 模板, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增包含 *K-ras* 基因第 1 外显子第 12、13 密码子长度为 293 bp 的片段, PCR 引物: 上游引物, 5' GGTACTGGTGG-AGTATTTGATAGTG 3'; 下游引物, 5' AAAGA-ATGGTCCTGCACCAGTAATA 3'。为提高突变检出率, 在上游引物 5' 端引入 40 bp 的 GC-clamp 序列^[9]。PCR 反应体系为 50 μl : 2 μl 基因组 DNA, 1 $\times$ PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L KCl), 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物, 5U Pyrobest DNA 聚合酶。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min $\rightarrow$ 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段后, 按照如下温度程序使 PCR 产物经过变性 - 复性过程形成异源双链: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 将温度从 95 $^{\circ}\text{C}$ 降到 25 $^{\circ}\text{C}$, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min, 最后降温到 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 微流控 TGCE 系统的搭建

在长沙韶光铬版公司 SG2506 型铬版玻璃上, 采用标准光刻、湿法刻蚀和高温键合技术制成十字交叉玻璃微流控芯片, 其中样品池、样品废液池和缓冲液池到十字交叉点均为 5 mm, 十字交叉点到缓冲液废液池为 45 mm, 即有效分离长度为 45 mm, 微通道宽约 70 μm , 深约 20 μm ^[6]; 四路数控高压电源为本室自制; 激光诱导荧光检测器 (laser induced fluorescence detector, LIF) 按照参考文献[7]自行组装; 输出信号采用 Kipp&Zonen 公司 BD11 型记录仪进行记录。参照文献[4]搭建基于倾斜式热辐射的微流控芯片空间温度梯度形成系统: 即在芯片表面自下向上放置由具有较高热容的铝块和 7104 型半导体加热片 (天津精易工贸公司) 组成的加热模块。在微流控芯片分离通道与铝块之间的上游放置一绝热材料使铝块与芯片平面形成一定角度的倾角, 采用 National Instruments 公司 Labview 软件程序对加热模块进行升温, 达到设定温度后铝块上的高精度 Pt100 温度传感器反馈控制加热电压, 使铝块维持于设定温度。由于加热铝块与芯片之间存在一定的倾斜角度, 沿分离通道方向的辐射热会逐渐增加, 由此形成连续的空间温度梯度^[9]。

1.4 微流控 TGCE 检测细胞系及临床标本中 *K-ras* 基因突变

先后用 0.2 mol/L HCl 和双蒸水冲洗芯片通道 10 min, 用 5 ml 注射器推入 3% PVP 筛分介质, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜以形成表面涂层。使用时, 推出筛分介质, 推入含有 1% YOYO-1 荧光染料的 3% PVP, PCR 产物变性复性后样品经 50 倍稀释加入样品池中, 其他储液池中加入含荧光染料的 3% PVP, 并保持各液面等高。采用 Wave2100 型变性高效液相色谱仪随机安装 DNA 解链曲线绘制软件, 计算该长度为 293 bp 的 *K-ras* 基因目的片段的 T_m 值为 56.9 $^{\circ}\text{C}$, 根据前期芯片测温结果^[9]将铝块温度设置为 73 $^{\circ}\text{C}$, 铝块倾角设置为 0.4 $^{\circ}$, 从而获得芯片分离通道内 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 的温度梯度。校准 LIF 检测器, 升高温度后进行微流控 TGCE 电泳分析。电泳过程分为进样阶段和分离阶段。在进样阶段, 样品池、样品废液池、缓冲液池和缓冲液废液池电压分别为: 0、400、200 和 300 V, 进样持续 80 s; 在分离阶段, 样品池、样品废液池、缓冲液池和缓冲液废液池电压分别为: 40、40、0 和 200 V, 分离持续至出峰完毕。芯片使用后, 同样用 0.2 mol/L HCl 和双蒸水冲洗, 推入 3% PVP 筛分介

质, 4℃ 保存备用, 以保持芯片表面的 PVP 修饰涂层, 维持电泳分离的稳定性。

1.5 DNA 直接测序及克隆测序

所有样品的 PCR 产物经凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收后, 应用 ABI377 测序仪进行直接测序验证, 对部分直接测序不能验证的样品进行 TA 克隆测序验证。

1.6 重现性分析

为考察微流控 TGCE 方法检测 *K-ras* 基因突变的重现性, 选择石蜡切片样品 G-23 在 55~60℃ 温度梯度下连续 3 次进样检测。记录该 293 bp 片段的电泳峰型及保留时间, 比较电泳分离度并计算保留时间的相对标准偏差, 即 RSD 值。

1.7 统计学分析

应用 SPSS13.0 统计软件, 采用单因素方差分析比较微流控 TGCE 法与直接测序法的检测结果, 采用 χ^2 检验分析大肠癌 *K-ras* 基因突变率与临床病理学参数的关系, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 微流控 TGCE 检测大肠癌细胞系中 *K-ras* 基因突变

根据 TGCE 原理, 无突变样品的电泳图表现为单峰峰型, 而突变样品表现为多峰峰型。HT29 大肠癌细胞为 *K-ras* 基因野生型细胞系, LS174T 大肠癌细胞为 *K-ras* 基因杂合突变型细胞系^[8], 两者在本系统的芯片电泳检测显示, 前者呈现单峰峰型, 即无突变峰型, 后者呈现多峰峰型, 即突变峰型(图 1), 提示系统能够准确检测出细胞样品中的 *K-ras* 基因突变。

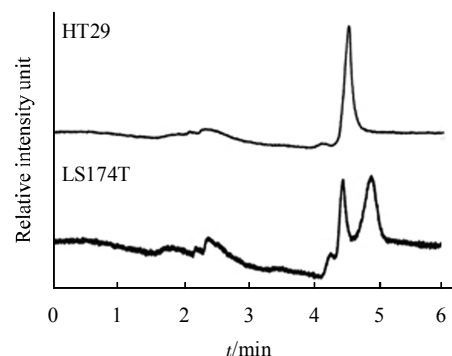


Fig. 1 Electropherograms of *K-ras* gene in 2 colon cancer cell lines with 5℃ temperature gradient from 55~60℃

Separations performed using 3% PVP in 1×TBE under electric field of 40 V/cm. Effective separation length 45 mm; temperature gradient length 30 mm.

2.2 微流控 TGCE 及测序方法检测大肠癌石蜡切片标本中 *K-ras* 基因突变率

采用微流控 TGCE 法检测了 98 例石蜡包埋大肠癌标本中 *K-ras* 基因突变情况, 所有标本同时以 PCR 产物直接测序进行验证和比较。结果显示, 在直接测序中存在突变的 23 例样品在芯片检测中均表现为突变峰型。有 24 例芯片检测呈阳性的标本用直接测序法未能检出, 提示芯片检测方法具有更高的检测灵敏度。如表 1 所示, 芯片电泳的突变检出率为 47.96%, 明显高于 PCR 产物测序的 23.47% ($P < 0.05$)。

Table 1 Detection results for *K-ras* gene mutation in clinical samples by chip-based TGCE and PCR product sequencing

	Total (n)	Wild-type (n)	Mutation-type (n)	Mutation rate/%
Chip-based TGCE	98	51	47	47.96*
PCR product sequencing	98	75	23	23.47

* $P < 0.05$.

2.3 微流控 TGCE 检测低丰度 *K-ras* 基因突变

为进一步验证芯片检测结果的准确性, 在 24 例芯片检测表现为突变峰型而直接测序为阴性的样品中, 选取 4 个代表性样品进行了克隆测序, 结果均显示存在突变。图 2 显示, *K-ras* 突变体所占比

例分别为 16.67%、10.71%、7.94%和 2.08%, 提示芯片方法具有良好的检测准确性, 并可有效检测低丰度 *K-ras* 基因突变。此外, 在 Y-64 样品中除了检测出第 12 密码子 GGT→GGC 突变, 还发现了第 15 密码子 GGC→GGT 突变。

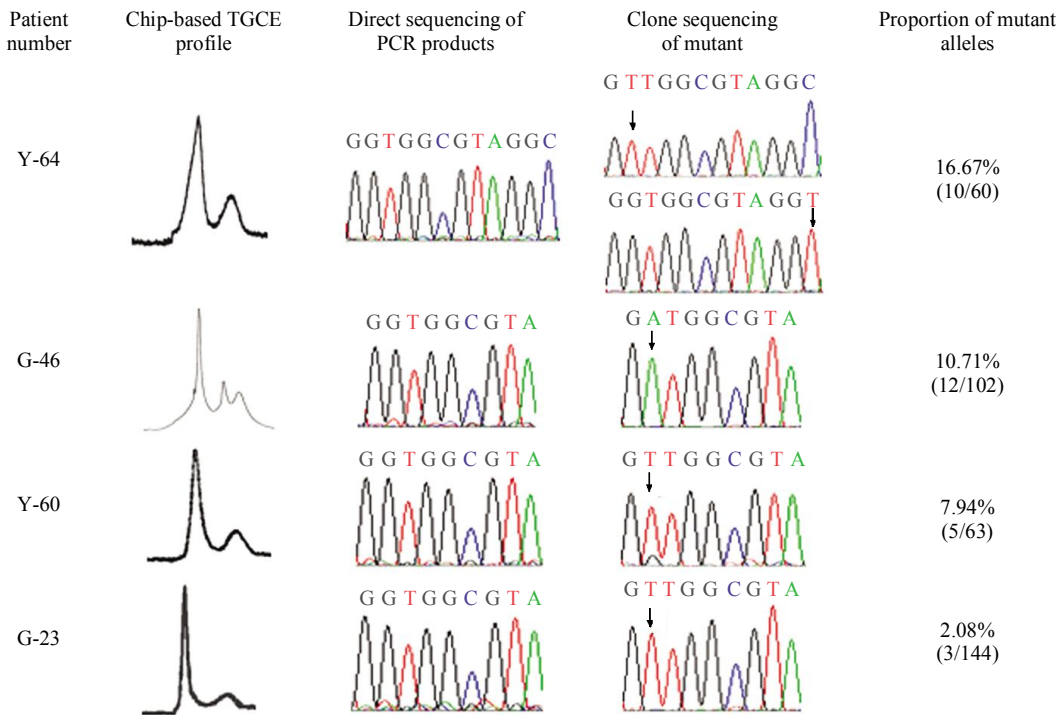


Fig. 2 *K-ras* gene mutation-positive tumors detected by chip-based TGCE but not by direct sequencing

2.4 重现性分析

为考察芯片方法的重现性, 选取样品 G-23 进行连续 3 次芯片 TGCE 检测, 结果显示, 分离度和保留时间均具有良好的重现性, 电泳保留时间的 RSD 为 0.7% (图 3).

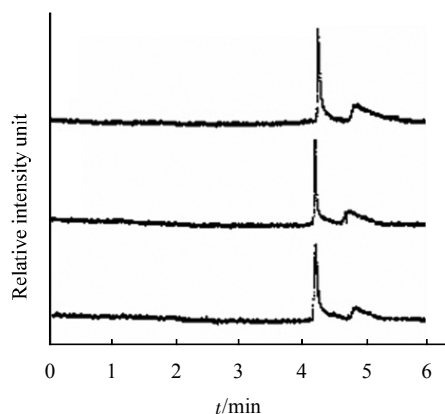


Fig. 3 Three replicate electropherograms of sample G-23 employing a temperature gradient of 55~60°C

Other conditions as in Figure 1.

2.5 分析 *K-ras* 基因突变与大肠癌临床病理学参数的关系

分析 98 例石蜡包埋大肠癌组织中 *K-ras* 基因

突变和临床病理学参数的关系如表 2 所示, 由微流控 TGCE 和直接测序检测出的直肠癌中的 *K-ras* 基因突变率显著高于结肠癌的突变率 ($P < 0.05$). 虽然直接测序法显示, 老年患者 (年龄 > 53 岁) 的 *K-ras* 基因突变率明显高于年龄 ≤ 53 岁的患者, 但微流控 TGCE 检测结果显示 *K-ras* 基因突变与患者年龄无关. 此外, *K-ras* 基因突变与性别、组织学类型和肿瘤分期等因素无关.

3 讨 论

TGCE 是一种基于毛细管电泳的基因突变检测方法, 它利用野生型与突变型基因片段之间可形成同源双链和异源双链, 两者的 T_m 值存在微小差别, 在程序变温的毛细管电泳中表现为电泳迁移速度的差别, 有突变者呈现多峰峰型, 通过峰型变化可判断突变的存在^[9]. 在毛细管电泳系统中, 实现快速、高效分离的有效手段是施加高场强, 但普通的毛细管电泳由于通道的面积 / 体积比小, 散热性能相对较差, 高场强产生的焦耳热不能有效分散, 反而影响分离效率. 微流控芯片是一种新的微型分析系统, 可将分离通道刻蚀在玻璃、石英、塑料等基材上, 形成微通道或通道网络, 具有样品用量小、

Table 2 *K-ras* gene mutation rate and clinicopathological parameters

Characteristics of patients		Total (<i>n</i>)	Direct sequencing of PCR products		Chip-based TGCE	
			Positive (<i>n</i>)	Mutation rate/%	Positive (<i>n</i>)	Mutation rate/%
Age						
	> 53	68	20	29.41*	36	52.94
	≤53	30	3	10	11	36.67
Gender						
	Male	62	12	19.35	29	46.77
	Female	36	11	30.56	18	50
Histology ¹⁾						
	W.D	35	10	28.57	17	48.57
	M.D	57	13	22.81	28	50.88
	L. D	6	1	16.67	2	33.33
Dukes stage						
	A	42	8	19.05	18	42.86
	B	14	2	14.29	7	50
	C	20	6	30	12	60
	D	22	7	31.82	10	45.45
Tumor location						
	Colon	42	16	38.1*	26	59.52*
	Rectum	56	7	12.5	19	39.29

¹⁾W. D: Well-differentiated adenocarcinoma; M. D: Moderately differentiated adenocarcinoma; L. D: Low- differentiated adenocarcinoma.

* $P < 0.05$.

分析速度快、便于集成化自动化的特点,重要的是芯片微通道的面积/体积比大,加之使用散热作用较好的玻璃基材,可采用高场强,由此获得快速、高效分离^[10].本研究在前期工作中将TGCE移植到微流控芯片上进行,创建了基于倾斜式热辐射的微流控芯片TGCE系统,并成功地对SNP样品进行了高效检测,在6 min内即可完成分离检测,样品每次注入量仅为纳升级^[4].在此基础上,本研究将其进一步应用于大肠癌临床标本中*K-ras*基因的突变检测.分析结果显示,芯片对标本中*K-ras*基因突变的检出率明显高于直接测序方法,而且测序显示存在突变的样品在芯片检测中均呈现突变峰型,部分芯片检测有峰型变化但直接测序未得到验证的样品在进一步的克隆测序中证实了突变的存在,对芯片未出现峰型改变的部分样品克隆测序结果表明无突变存在(结果未列出).虽因工作量较大,没能对所有的样品进行克隆测序,但结果仍可提示本系统具有高度的检测准确性.

临床标本的主要特点即高度异质性,突变体被大量的正常细胞所掩盖,相关研究显示,在肿瘤组织中通常存在约70%的正常细胞^[11],因此,能够有

效检测出低丰度突变体是突变检测方法应用性的关键.本研究选取了在芯片检测中峰型变化较小的样品进行了克隆测序,结果表明,系统至少可检测出突变体只占2.08%的样品中的*K-ras*基因突变.目前,系统的准确检出限虽需进一步测定,但从峰型变化上分析应该有更高的检测灵敏度,这也在一定程度上反映了标本中细胞异质性的实际情况,因此,本系统可基本满足临床标本中低丰度样品的检测.在本方法中要取得高的灵敏度,一方面需要检测系统具有对DNA样品的良好信号反应,另一方面需要分离体系对同源双链和异源双链的良好分离度.实验中我们使用了LIF检测系统,对DNA的检出限达到了1 mg/L,而系统的高效分离能力除了芯片的本身优势及筛分介质的优化外,主要来自所构建的温度梯度控制系统能够形成稳定、均匀的温度梯度.另外,根据TGCE分离原理,纯合突变样品的检测需与无突变样品混合以形成异源双链,但因临床标本的高度异质性,在标本内部可形成异源双链,无需检测前的混合处理.

以98例临床标本检测结果分析了大肠癌组织中*K-ras*基因突变与临床病理学参数之间的关系.

目前有关两者的关系看法不一. 有人认为二者间无显著相关性, 也有人认为其与年龄、性别、临床分期、肿瘤部位和组织学类型等因素有关^[12-14]. 本研究结果显示, *K-ras* 基因突变仅与肿瘤部位有关, 即在直肠中较易发生 *K-ras* 基因突变, 而与其他因素无关. PCR 产物直接测序显示高年龄组(年龄 > 53 岁)中 *K-ras* 基因的突变检出率显著高于低年龄组(年龄 ≤ 53 岁), 而微流控 TGCE 法检测显示, 这种差异虽仍存在, 但并无统计学意义, 检测结果的差异主要源于芯片方法更高的灵敏度. *K-ras* 基因突变与年龄无关进一步提示我们对高危人群进行早期筛查的必要性.

大肠癌是发病率最高的恶性肿瘤之一, 早期大肠癌手术后的 5 年存活率超过 90%, 晚期癌手术后则低于 10%, 建立有效的大肠癌筛查与早期诊断方法, 以实现早期治疗成为提高患者生存率的关键^[15]. Vogestein 研究小组^[16]发现, *K-ras* 基因突变发生于早期腺瘤向中期腺瘤的转变阶段, 可能是大肠腺恶变的始动基因, 而且其在大肠癌患者中的发生率明显高于大肠腺瘤和正常人群, 因此可以作为筛查与早期诊断的指标. 最近的研究还表明, *K-ras* 基因野生型大肠癌患者的抗 EGFR 治疗效果良好, 因此 *K-ras* 基因检测有利于筛选出抗 EGFR 的药物治疗有效的大肠癌患者, 从而实现大肠癌患者的个体化治疗, 延长患者的生存期, 并大大降低治疗的毒性和不必要的费用^[2, 17-18].

本研究建立了一种高效的 *K-ras* 基因突变检测方法, 具有检测速度快、样品用量小、灵敏度高的特点, 可实现对低丰度突变样品的有效检测, 同时, 通过多通道并行检测, 有可能实现检测的高通量, 有望为临床的大规模基因筛查提供高效的分析平台.

参 考 文 献

- [1] Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007, **7**(4): 295-308
- [2] Ma W W, Adjei A A. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 2009, **59**(2): 111-137
- [3] Okulczyk B, Piotrowski Z, Kovalchuk O, *et al.* Evaluation of K-RAS gene in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol*, 2003, **41**(2): 97-100
- [4] Zhang H D, Zhou J, Xu Z R, *et al.* DNA mutation detection with chip-based temperature gradient capillary electrophoresis using a slantwise radiative heating system. *Lab Chip*, 2007, **7**(9): 1162-1170
- [5] Sheffield V C, Cox D R, Lerman L S, *et al.* Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(1): 232-236
- [6] Jia Z J, Fang Q, Fang Z L. Bonding of glass microfluidic chips at room temperatures. *Anal Chem*, 2004, **76**(18): 5597-5602
- [7] Fang Q, Xu G M, Fang Z L. A high-throughput continuous sample introduction interface for microfluidic chip-based capillary electrophoresis systems. *Anal Chem*, 2002, **74**(6): 1223-1231
- [8] Gayet J, Zhou X P, Duval A, *et al.* Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene*, 2001, **20**(36): 5025-5032.
- [9] Li Q, Liu Z, Monroe H, *et al.* Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis*, 2002, **23**(10): 1499-1511
- [10] Buch J S, Kimball C, Rosenberger F, *et al.* DNA mutation detection in a polymer microfluidic network using temperature gradient gel electrophoresis. *Anal Chem*, 2004, **76**(4): 874-881
- [11] Gerry N P, Witowski N E, Day J, *et al.* Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol*, 1999, **292**(2): 251-262
- [12] Andreyev H J, Norman A R, Cunningham D, *et al.* Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*, 1998, **90**(9): 675-684
- [13] Samowitz W S, Curtin K, Schaffer D, *et al.* Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, **9**(11): 1193-1197
- [14] Chang Y S, Yeh K T, Chang T J, *et al.* Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2009, **9**(1): 179
- [15] Weinberg D S. In the clinic. Colorectal cancer screening. *Ann Intern Med*, 2008, **148**(3): ITC2-1-ITC2-16
- [16] Wood L D, Parsons D W, Jones S, *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 2007, **318** (5853): 1108-1113
- [17] 王晓艳, 沈守荣, 刘 芬, 等. 结肠癌中 NGX 抑制 EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 信号通路的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(5): 570-576
- [18] Wang X Y, Shen S R, Liu F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35** (5): 570-576
- [19] Allegra C J, Jessup J M, Somerfield M R, *et al.* American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*, 2009, **27** (12): 2091-2096

Mutation Detection of K-*ras* Gene in Paraffin-embedded Colorectal Cancer Tissues by Using Chip-based TGCE*

ZHANG Hui-Dan, WANG Xiao-Nan, ZHOU Zhe, MA Qian, FANG Jin**

(Department of Cell Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, and Key Laboratory of Medical Cell Biology, Ministry of Education, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract K-*ras* gene mutation is generally regarded as a significant indicator for colorectal cancer screening and early diagnosis and in favor of filtering out colorectal cancer patients benefiting from epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapy. The chip-based temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE) was successfully used to detect K-*ras* gene mutation in 98 cases of paraffin-embedded colorectal cancer tissues with high sensitivity. Mutation-positive detection rate from chip-based TGCE (47.96%) was significantly higher than that from the PCR product direct sequencing (23.47%). Clone sequencing showed that this detection system could detect at least 2.08% of the mutant K-*ras* gene. Analysis of the relationship between K-*ras* gene mutation and clinical pathological parameters revealed that K-*ras* gene mutation rate in rectum cancer was significantly higher than that of colon cancer ($P < 0.05$), but no remarkable correlation between K-*ras* gene mutation rate with age, gender, histological type and tumor stage was observed. Therefore chip-based TGCE is very sensitive and rapid method for mutation detection, and it can be applied for large-scale screening, early diagnosis and guiding clinical treatment.

Key words microfluidic chip, temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE), K-*ras* gene, mutation, colorectal cancer, paraffin-embedded tissues

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00029

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (20875103, 20375047, 30901727) and Higher Education Institutions Key Laboratory Projects and Scientific-Technological Research Projects of Liaoning Province Education Department (20061014, 05L558).

**Corresponding author.

Tel: 86-24-23256666-5347, E-mail: jfang61@netease.com

Received: January 14, 2010 Accepted: March 18, 2010