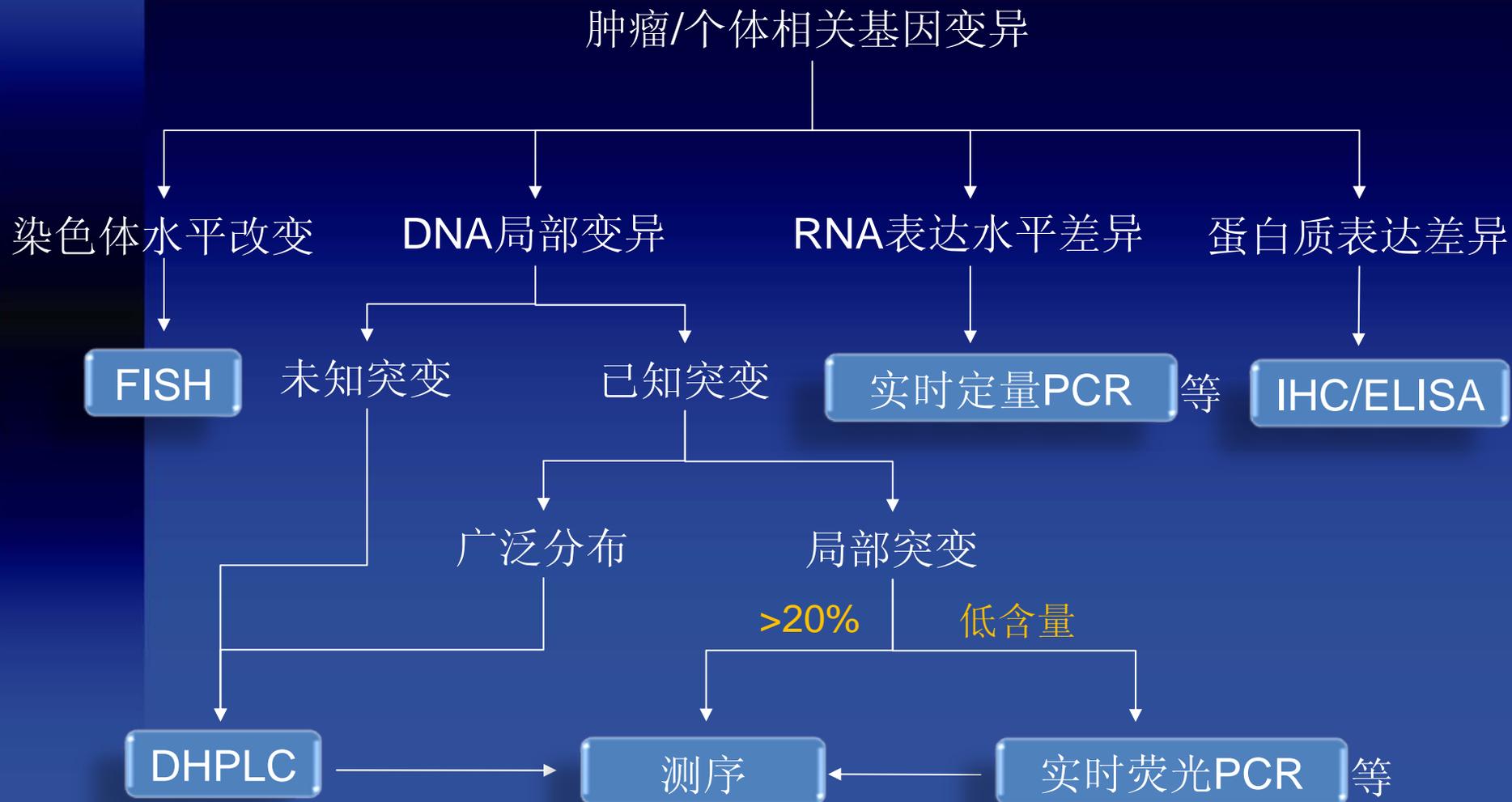


分子诊断在肿瘤诊断及个体化 治疗中的应用与进展

叶建伟

吴阶平医学基金会分子医学中心

肿瘤分子诊断策略 & 检测平台的综合应用



多层次检测平台的综合应用



分子生物学技术

Table 1. Methods for detecting *EGFR* mutations in lung cancer specimens

Technique	Reference	Sensitivity (% mutant DNA)	Mutations identified	Comprehensive detection of deletions and insertions?
Direct sequencing	Multiple	25	Known and new	Yes
PCR-SSCP	(10)	10	Known and new	Yes
TaqMan PCR	(11, 12)	10	Known only	No
Loop-hybrid mobility shift assay	(13)	7.5	Known only	Yes
Cycleave PCR	(14)	5	Known only	Yes
PCR-RFLP and length analysis	(15)	5	Known only	Yes
MALDI-TOF MS – based genotyping	(16)	5	Known only	No
PNA-LNA PCR clamp	(17)	1	Known only	No
Scorpions ARMS	(18)	1	Known only	No
dHPLC	(19–21)	1	Known and new	Yes
Single-molecule sequencing	(22)	0.2	Known and new	Yes
Mutant-enriched PCR	(23)	0.2	Known only	No
SMAP	(8)	0.1	Known only	No

Abbreviations: SSCP, single-strand conformation polymorphism; PNA-LNA: peptide nucleic acid–locked nucleic acid; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; ARMS, amplified refractory mutation system; dHPLC, denaturing high performance liquid chromatography.

Clinical Cancer Research 2007; 13(17): 4954–5

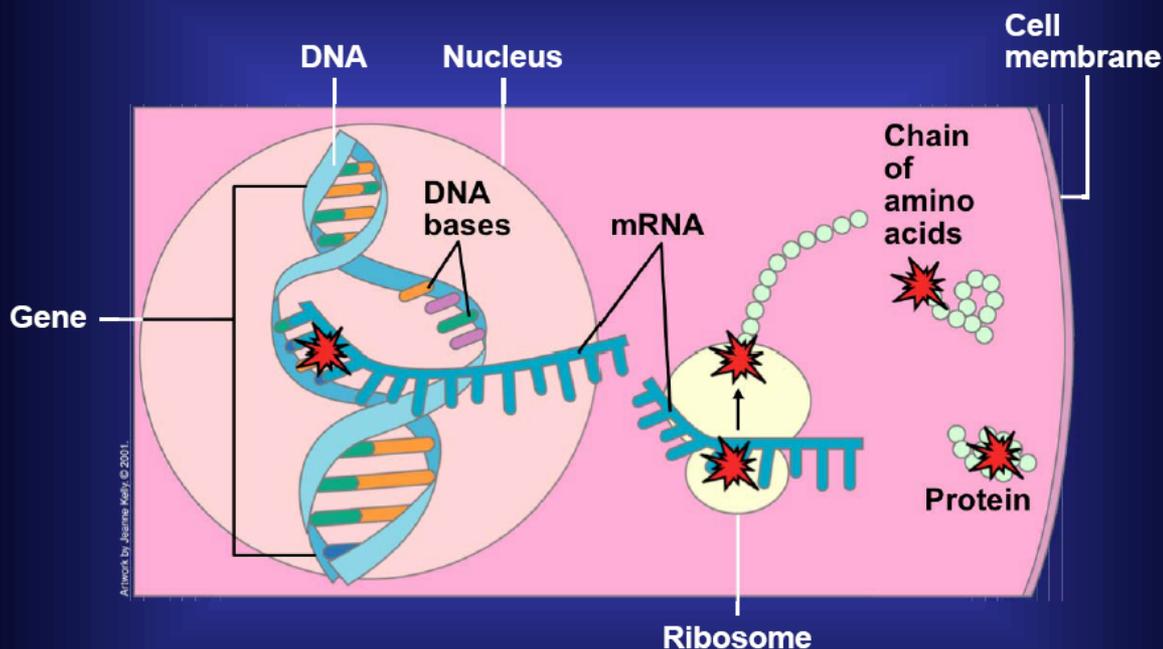
其他分子生物学技术：DHPLC+后荧光、突变富集PCR+DHPLC后荧光、突变富集PCR+RFLP+DHPLC后荧光、突变富集PCR+直接测序……

细胞生物学技术：FISH、FACS

蛋白质组学技术：IHC、ELISA、蛋白质指纹图谱

不同检测水平的综合应用

Altered DNA->Altered Protein



中心法则:

DNA



RNA

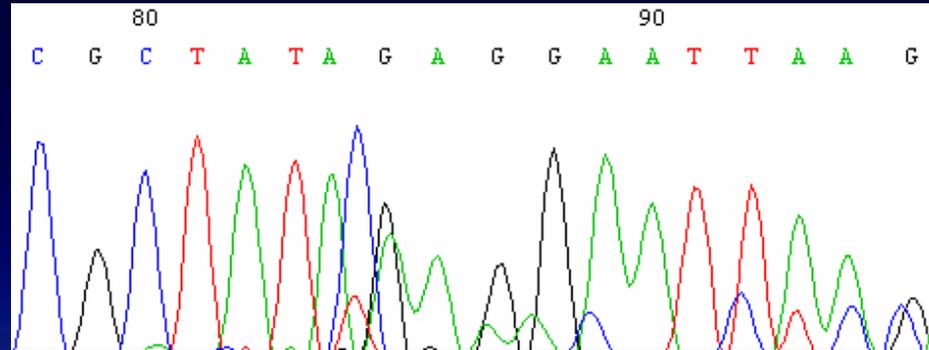


蛋白质

经典检测方法与结果示例

直接测序

- DNA提取
- PCR扩增
- 测序



EGFR exon19

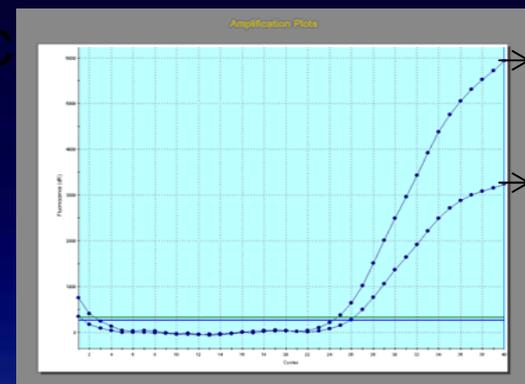
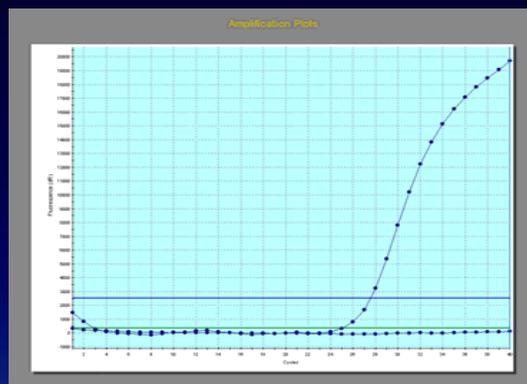
c.2231del (CAAGGAATTAAGAGAAGC) 18bp

- 优势：直接获取已知/未知DNA突变信息，准确可靠。金标准！
- 局限性：检测肿瘤组织的DNA变异时，最高灵敏度为20%。
- 适用范围：个体遗传学背景检测

大部分肿瘤组织、体液中肿瘤脱落细胞DNA变异检测

实时荧光PCR

- DNA提取
- Real-time PCR扩增

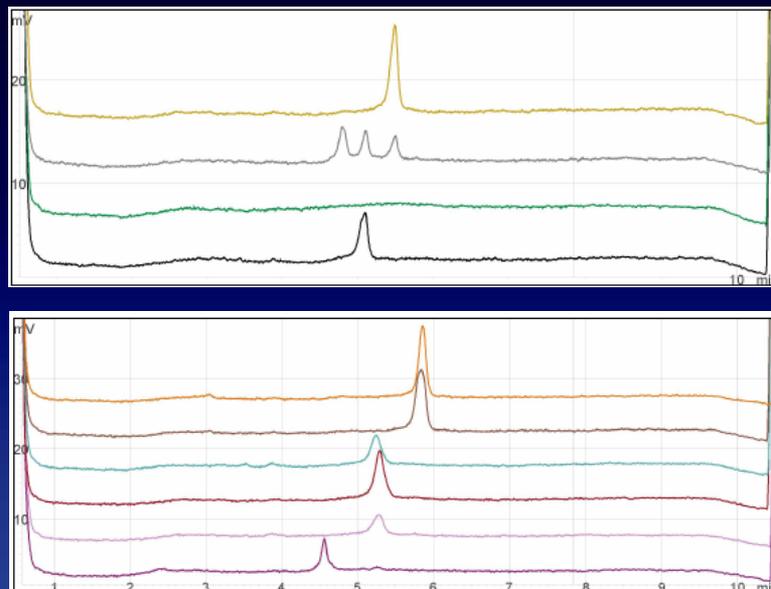


- 优势：快速，防污染，灵敏度极高，结果准确可靠。
- 局限性：仅针对已知变异。
- 适用范围：个体遗传学背景检测

肿瘤组织、体液中肿瘤脱落细胞、外周血游离肿瘤DNA变异测

突变富集PCR+DHPLC

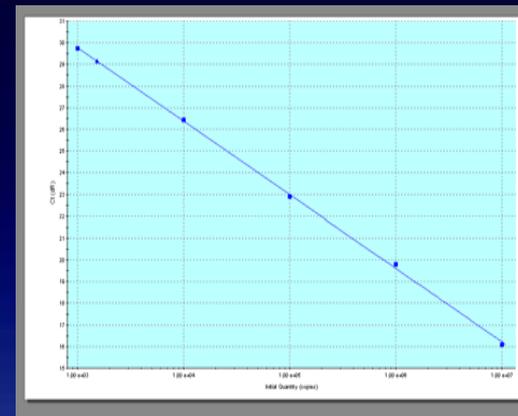
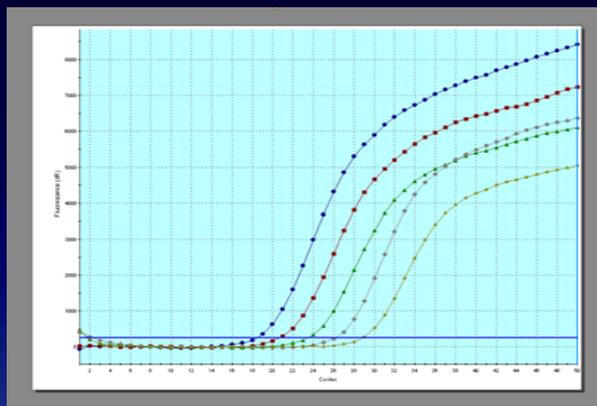
- 血浆游离肿瘤DNA提取
- 穿刺活检组织DNA提取
- 突变富集PCR
- DHPLC (+后荧光)



- 优势：高度灵敏（1/1000~1/10000），快速，结果准确。
- 局限性：仅针对已知变异。
- 适用范围：低含量肿瘤DNA变异监测

实时定量PCR

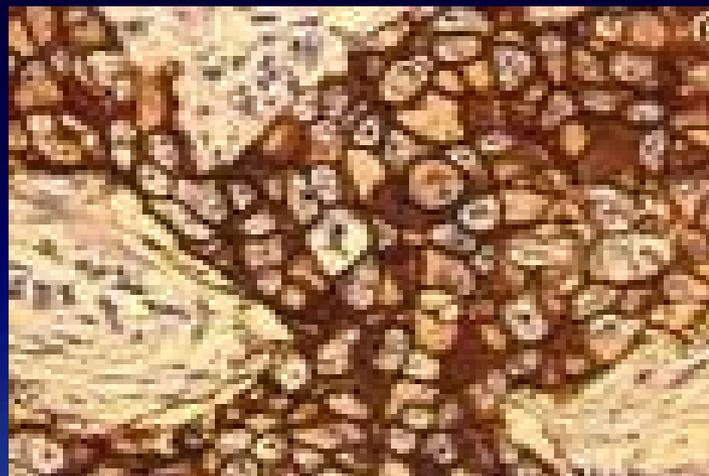
- FFPE中mRNA提取
- 反转录
- 荧光定量PCR



- 技术优势：快速，通量大，结果准确可靠。
- 局限性：样本处理及保存要求高。
- 适用范围：肿瘤组织中特定基因mRNA表达水平

IHC

- 石蜡包埋制片
- 免疫组化（IHC）
- 技术优势：快速，直观。
- 局限性：主观因素干扰，抗体来源限制。
- 适用范围：检测肿瘤组织相关蛋白质水平变化



乳腺癌：C-erbB2（+++）

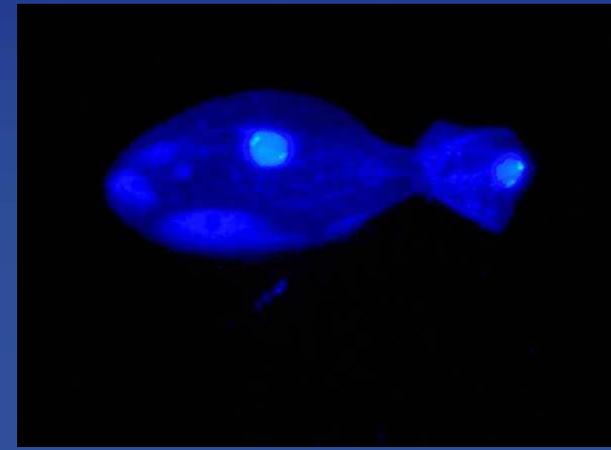
ELISA

- 抽取外周血
- 酶联免疫吸附试验（ELISA）
- 技术优势：快速，方便。
- 局限性：主观因素干扰，灵敏度受限。
- 适用范围：检测血清中肿瘤组织分泌的蛋白标记物

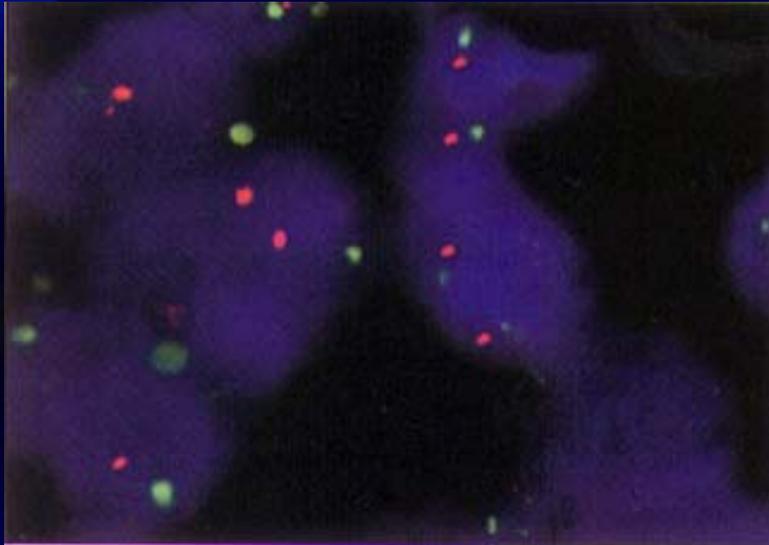


Fluorescence In Situ Hybridization

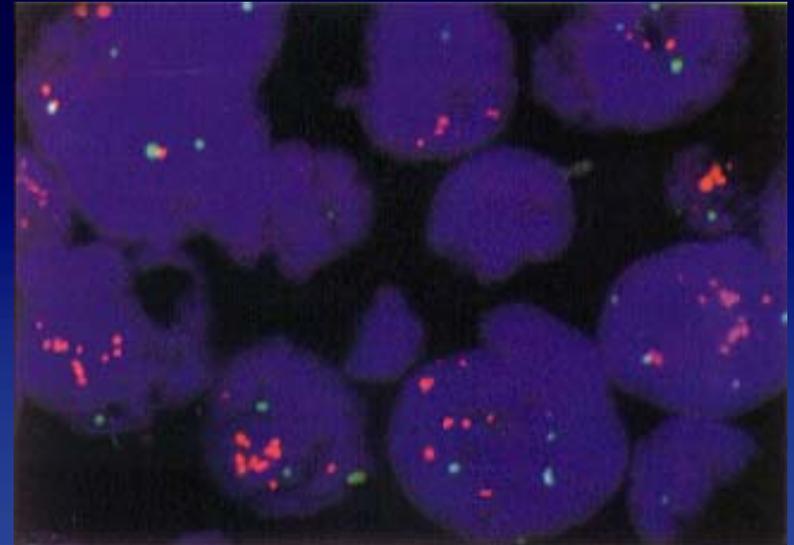
- ✓ 一项快速、准确、高灵敏度的细胞-分子生物学技术
- ✓ 在恶性肿瘤相关基因/染色体区域的大片段缺失、扩增、转位等方面具有重要诊断价值
- ✓ 是常规分子诊断技术的重要补充



HER-2 扩增/过表达: FISH



Normal breast cells



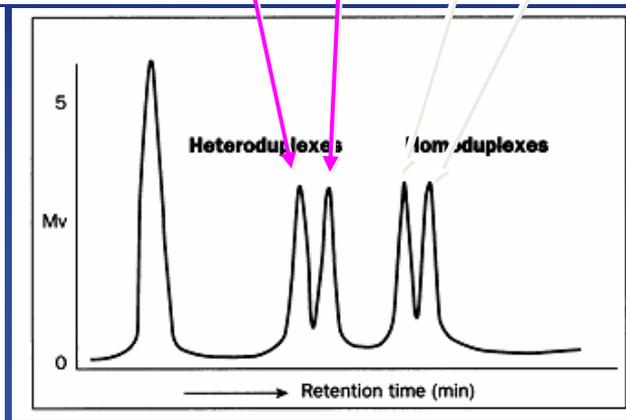
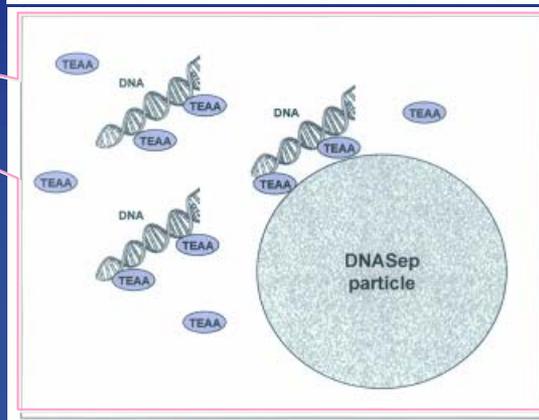
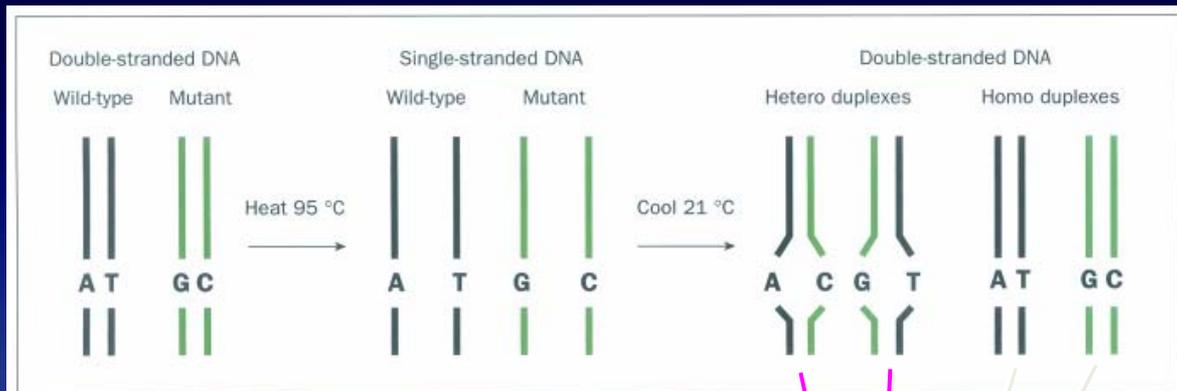
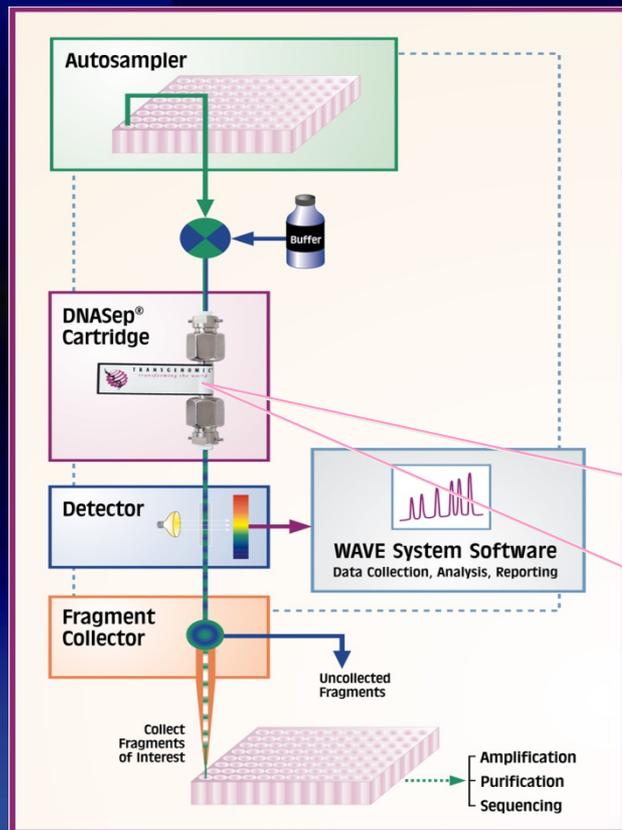
Cancer breast cells

Green probe: chromosome 17 centromere

Red probe: HER2/NEU gene locus

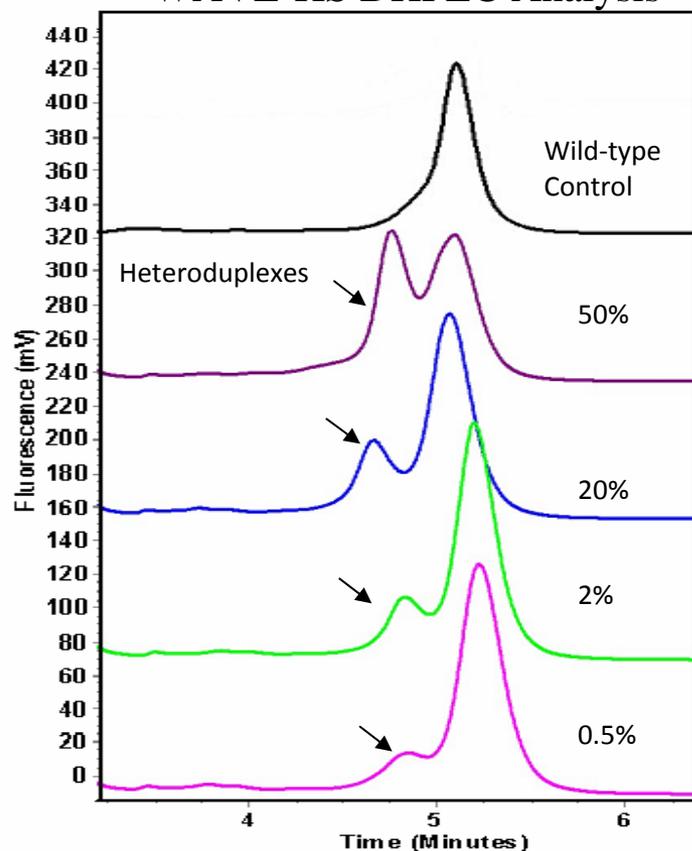
DHPLC在分子诊断中的应用

DHPLC突变检测原理

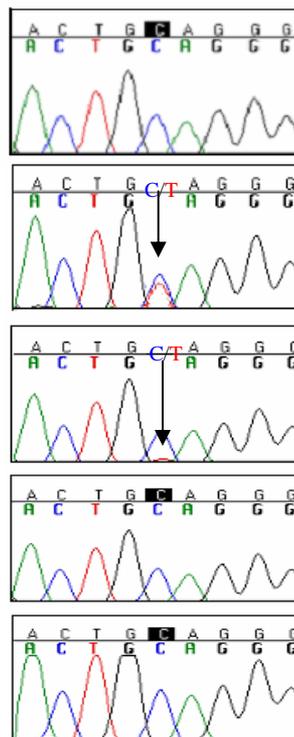


后荧光技术

WAVE-HS DHPLC Analysis



Direct Sequencing



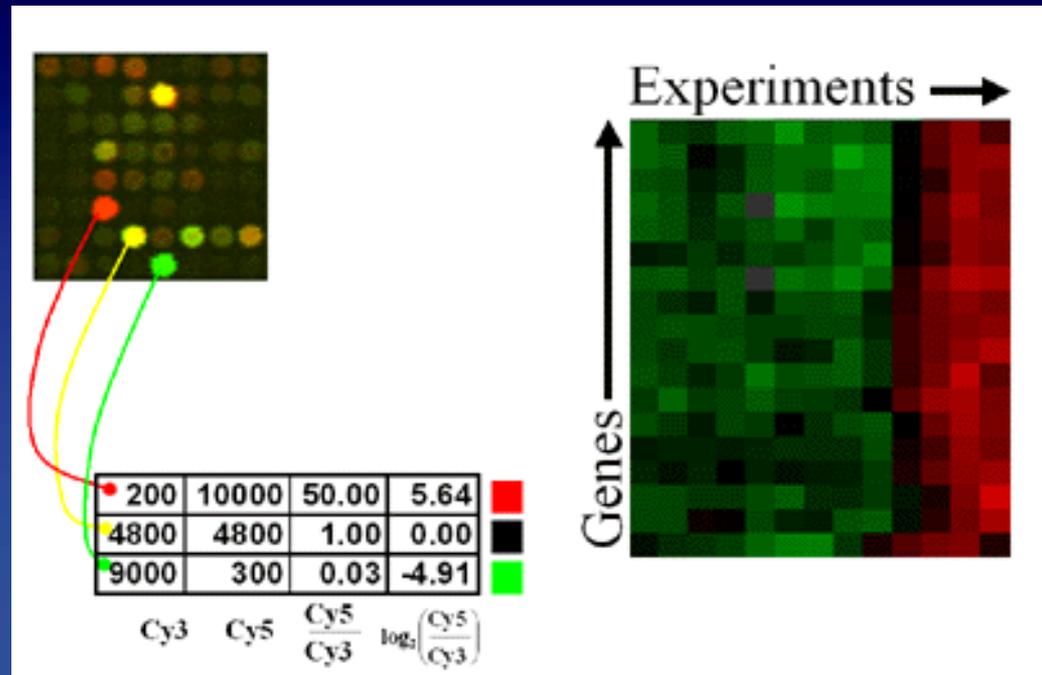
- Genomic DNA from control and colorectal tumor cell-lines were mixed a various ratios from 1:1 to 1:499 (wild-type:mutant)

- A 300 bp region from the APC mutation cluster region (MCR) of exon 15 was amplified by PCR using Optimase™ Polymerase

- PCR products were analyzed by DHPLC using the WAVE-HS System

基因芯片在肿瘤分子诊断中的应用

- DNA芯片：
 - 遗传易感性 (P450)
- 表达谱芯片：
 - 肿瘤预后和复发评估 (乳腺癌)



Stanford 乳腺癌微矩阵 (Perou et al. 1999)

其他新技术与进展

- 全基因组水平/未知基因的系统发现：高通量测序
- Solexa、SOLiD和Roche 454、单分子测序等
- 应用：
 - 全基因组重测序：诊断、药物敏感性/毒性预测
 - 肿瘤RNA Seq：基因表达分析
 - 肿瘤基因组计划：病因学研究

其他新技术与进展

- 待测基因的深度分析：低含量突变检测技术
 - 突变富集
 - COLD-PCR
 - SMAP
- 检测平台的扩展与延伸：分支DNA检测平台
 - 液相芯片检测系统
 - Panomics/Affymetrix检测试剂盒
 - RNAscope™：mRNA原位表达检测技术

针对不同来源标本的系统解决方案



- 石蜡标本
 - DNA提取：肿瘤组织体细胞突变（测序、实时荧光PCR）
 - RNA提取：肿瘤组织RNA表达异常（荧光定量PCR）
 - 石蜡切片：染色体水平异常（FISH）
 - 石蜡切片：蛋白质表达差异（IHC）
- 新鲜肿瘤（来源）标本
 - 肿瘤组织穿刺标本：肿瘤组织体细胞突变（突变富集PCR+DHPLC）
 - 胸、腹水：肿瘤组织体细胞突变（突变富集PCR+DHPLC）
- 外周血
 - PMBC：个体基因多态性（PCR+测序、实时荧光PCR）
 - 血浆游离DNA：肿瘤早期诊断、治疗检测（突变富集PCR+DHPLC）
 - 血清：肿瘤标志物（ELISA、蛋白质指纹图谱）

谢
谢！