

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *KRAS* В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ С ПОМОЩЬЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ

© 2011 г. М. А. Емельянова<sup>1</sup>, Ф. А. Амосенко<sup>2</sup>, А. В. Чудинов<sup>1</sup>, С. А. Суржигов<sup>1</sup>, Т. П. Казубская<sup>3</sup>, Л. Н. Любченко<sup>3</sup>, Т. В. Наседкина<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

<sup>2</sup>Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

<sup>3</sup>Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

Поступила в редакцию 08.12.2010 г.

Принята к печати 20.01.2011 г.

Соматические мутации в гене *KRAS* являются важными маркерами некоторых видов опухолей, например рака поджелудочной железы, и могут применяться для ранней диагностики этого заболевания. Разработан биологический микрочип, позволяющий выявлять 13 наиболее частых мутаций в кодонах 12, 13 и 61 гена *KRAS*. Для повышения чувствительности метода и обнаружения минорных фракций опухолевых клеток в клинических образцах амплификацию нуклеотидных последовательностей гена *KRAS* дикого типа в ходе ПЦР подавляли с помощью LNA-олигонуклеотидов. Продукт LNA-блокирующей ПЦР далее гибридизовали с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными в геле на поверхности биочипа. Биочип проверен на 42 клинических образцах ДНК, полученных от больных с опухолями поджелудочной железы, в основном, протоковыми аденокарциномами. В качестве референс-методов использовали ПДРФ-анализ и секвенирование. Метод с использованием биочипов позволяет с высокой достоверностью обнаруживать мутации в гене *KRAS*, если доля клеток, несущих мутацию, составляет не менее 1%.

**Ключевые слова:** соматические мутации, опухоль, ген *KRAS*, биочипы.

DETECTION OF *KRAS* MUTATIONS IN TUMOR CELLS USING BIOCHIPS, by M. A. Emelyanova<sup>1</sup>, F. A. Amosenko<sup>2</sup>, A. V. Chudinov<sup>1</sup>, S. A. Surzhikov<sup>1</sup>, T. P. Kazubskaya<sup>3</sup>, L. N. Lubchenko<sup>3</sup>, T. V. Nasedkina<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: nased@biochip.ru; <sup>2</sup>Research Center for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia; <sup>3</sup>Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). Somatic mutations in the *KRAS* gene are important markers of some types of tumors, for example, pancreatic cancer, and may be useful in early diagnostics. A biochip has been developed which allows determining most frequent mutations in 12, 13 and 61 codons of the *KRAS* gene. To increase the sensitivity of the method and to make possible the analysis of minor fractions of tumor cells in clinical samples the method of blocking a wild type sequence PCR amplification by LNA-oligonucleotides has been used. The product of LNA-clamp PCR was further hybridized with oligonucleotide probes, immobilized on biochip. Biochip was tested with 42 clinical DNA samples from patients with pancreatic cancer, mostly ductal adenocarcinomas. As reference methods, the RFLP analysis and sequencing were used. The developed approach allows detecting somatic mutations in the *KRAS* gene if the portion of tumor cells with mutation is at least 1% of whole cell population.

**Keywords:** somatic mutations, tumor, gene *KRAS*, biochips.

Рак поджелудочной железы (ПЖ) в подавляющем большинстве случаев представлен аденокарциномой протоковых эпителиальных клеток. Это чрезвычайно злокачественное новообразование, частота которого составляет 6–10 на 100000 человек [1]. Большинство больных погибают в течение года после постановки диагноза, а 5-летняя выживаемость не превышает 5% [2, 3]. Развитие рака ПЖ от-

четливо прослеживается от нормальных клеток протокового эпителия через несколько стадий неинвазивных протоковых изменений PanIN (Pancreatic intraepithelial neoplasia) к карциноме *in situ* и инвазивному раку [4]. Предполагается, что именно мутации в гене *KRAS* инициируют развитие этого вида опухолей [5]. Эти изменения обнаруживаются как на стадии PanIN, так и при хроническом панкреатите, и представляют собой независимый фактор риска развития рака ПЖ. При развернутой кар-

\* Эл. почта: nased@biochip.ru

тине заболевания мутации в гене *KRAS* находят уже у 90% больных, что делает их молекулярным маркером рака ПЖ [6]. Обнаружение мутаций может иметь значение при ранней диагностике рака ПЖ и при разработке новых эффективных методов терапии, а также при определении чувствительности к действию ряда таргетных препаратов (антагонистов рецептора эпидермального фактора роста EGFR) как клеток рака ПЖ, так и опухолей другой локализации, например метастатического колоректального рака [7–9].

При анализе опухолевого материала довольно часто возникает ситуация, когда доля клеток с соматическими мутациями в образце опухолевой ткани невелика. В подобных случаях определение мутаций затруднено, они могут не выявляться на фоне большого количества “нормальной” ДНК. Наиболее распространенный подход к решению этой проблемы состоит в избирательном выявлении мутантного аллеля [10, 11] или в подавлении амплификации последовательностей дикого типа при проведении ПЦР [12, 13]. В частности, для обогащения образца последовательностью определенного типа используют LNA-блокирующую ПЦР [14]. LNA (locked nucleic acid) – это синтетический аналог РНК, имеющий дополнительную связь между 2'-О и 4'-С, которая блокирует рибозу в N-конформации, подобно A-форме РНК. Такая “закрытая” конформация способствует увеличению термодинамической стабильности совершенного дуплекса ДНК-LNA [15]. В результате присутствия в смеси для ПЦР LNA-олигонуклеотида, который специфически узнает последовательность дикого типа и связывается с ней, препятствуя ее амплификации, происходит преимущественное увеличение числа копий мутантной последовательности гена [14].

В нашей работе использование LNA-блокирующей ПЦР позволило увеличить чувствительность метода по сравнению с обычной ПЦР, а совмещение с гибридизацией на биочипе сделало возможным проведение одновременного анализа 13 соматических мутаций в гене *KRAS*. В результате разработана высокоэффективная тест-система, которую в дальнейшем можно использовать для скрининга больных раком ПЖ, кишечника, а также с опухолями другой локализации. Достоверное определение мутаций позволяет проводить раннюю диагностику прежде всего рака ПЖ, а также индивидуально подбирать схему противоопухолевой терапии, исходя из генетического портрета опухоли.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве клинического материала использовали образцы опухолей, полученные от 42 больных, прооперированных в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. В выборку вошли в основном больные аденокарциномами ПЖ: 33 протоковых, одна ацинарная и одна муцинозная

цистаденокарцинома. В эту группу входили больные в возрасте от 40 до 73 лет. У одной больной с протоковой аденокарциномой диагностирован первично-множественный рак, а также опухоль левой молочной железы. Кроме того, в выборку были включены больной раком щитовидной железы (22 года), больной с доброкачественным образованием ПЖ (16 лет), больной раком правой почки и метастазом в хвост ПЖ (43 года), больной с вненадпочечниковой параангиомой (18 лет), двое больных с раком фатерова соска (59 и 62 года) и один с атрофией ткани ПЖ с очагами некроза (79 лет).

**Выделение ДНК.** Образцы опухолевых и нормальных тканей ПЖ получали из операционного материала с помощью ручной микродиссекции под гистологическим контролем. Геномную ДНК из образцов опухолевых и нормальных клеток ПЖ, а также из лимфоцитов периферической крови выделяли с использованием набора QIAamp DNA Tissue Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit фирмы “QIAGEN”, следуя соответствующим протоколам [16].

**Сайт-направленный мутагенез.** Для тестирования биологического микрочипа все интересующие нас варианты мутантных последовательностей гена *KRAS* с однонуклеотидными заменами в кодонах 12, 13 и 61 получены посредством сайт-направленного мутагенеза [17, 18].

**Дизайн олигонуклеотидных зондов.** При создании биочипа выбирали наиболее частые мутации в кодонах 12, 13 и 61 гена *KRAS*, которые служат диагностическими маркерами, а также имеют важное прогностическое значение при назначении химиотерапии. Нуклеотидная последовательность гена *KRAS* получена из базы данных NCBI (NG\_007524.1).

Мы выбрали шесть олигонуклеотидов, комплементарных различным вариантам последовательностей, имеющим однонуклеотидные замены в кодоне 12. Для анализа более редких мутаций в кодонах 13 и 61 мы выбрали пять и два олигонуклеотида. Олигонуклеотидные пробы представляют собой фрагмент гена *KRAS* длиной 15–20 п.н., несущий варибельный нуклеотид в центральном положении. Фрагменты гена *KRAS*, с анализируемыми заменами приведены в табл. 1.

**Синтез олигонуклеотидов и изготовление биочипов.** Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе синтезировали на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer (“Applied Biosystems”) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры. На 3'-конце олигонуклеотидов находился спейсер со свободной аминогруппой, который вводили при синтезе с помощью 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 (“Glen Research”, США).

Биочипы изготовлены с помощью фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов полиакриламидного геля, как описано ранее [19].

**Подбор LNA-олигонуклеотидов.** LNA-олигонуклеотиды моделировали с помощью on-line приложения (<http://www.exiqon.com/oligo-tools>). В их состав входили как LNA, так и ДНК-нуклеотиды, 3'-конец молекулы фосфорилировали для предотвращения удлинения олигонуклеотида Taq-полимеразой. Нуклеотидные последовательности LNA-олигонуклеотидов могут быть предоставлены по запросу.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Интересующие нас участки гена *KRAS* амплифицировали с помощью двухэтапной мультиплексной ПЦР. Для каждого фрагмента гена подбирали и синтезировали две пары праймеров. Нуклеотидные последовательности праймеров можно получить по запросу.

Мультиплексную ПЦР проводили на приборе Duad ("Bio-Rad"). ПЦР-смесь первого этапа общим объемом 25 мкл включала в себя: 67 мМ Трис-НСI (рН 8.6), 166 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Тритон X-100, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ каждого из dNTP ("Силекс", Россия), 2.5 ед. Taq-полимеразы ("Силекс", Россия), по 0.2 мкМ каждого из праймеров, 0.1 мкМ *KRAS*\_12-13\_LNA-олигонуклеотида и 0.06 мкМ *KRAS*\_61\_LNA-олигонуклеотида, 20–40 нг ДНК. Амплификацию проводили по следующей схеме: денатурация при 94°C (3 мин 30 с), далее 35 циклов: 94°C (30 с), 60°C (20 с), 72°C (10 с), затем элонгация при 72°C в течение 3 мин.

На втором этапе в качестве матрицы использовали продукт первого этапа ПЦР (2.5 мкл). Состав ПЦР-смеси был таким же, за исключением того, что она не содержала LNA-олигонуклеотидов и включала праймеры второго этапа – 0.2 мкМ прямых праймеров и 2 мкМ обратных. Также в ПЦР-смесь добавляли 0.2 нМ флуоресцентно меченного Cy5-dUTP, который встраивался в цепь в процессе амплификации. Таким образом, в результате ПЦР получали одноцепочечный флуоресцентно меченный ПЦР-продукт.

**Гибридизация меченого продукта на биочипе.** Гибридизационная смесь общим объемом 40 мкл содержала 25% формамида ("Serva"), 5 × SSPE ("Promega"), 50% ПЦР-продукта. Гибридизационную смесь денатурировали при 95°C (5 мин), охлаждали на льду (2 мин), наносили на биочип и оставляли на 12–18 ч при температуре 37°C. После этого биочип отмывали в растворе 1 × SSPE в течение 15 мин при комнатной температуре, ополаскивали дистиллированной водой и высушивали.

**Регистрация изображения.** Флуоресцентный сигнал от ячейки микрочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением Imageware ("Биочип-ИМБ", Россия), по описанной ранее методике с экспозицией 100–500 мс [20]. Поскольку все ячейки на биочипе дублированы, в расчетах использовали среднее значение сигнала от двух ячеек. Считали, что сигнал свидетельствует об образовании дуплекса, если интенсив-

**Таблица 1.** Мутации в гене *KRAS*, идентифицируемые на биологическом микрочипе

Кодон	Аминокислотный остаток	Нуклеотидная последовательность
12	Gly (WT)	GCTGGTGGC
	Ser	GCTAGTGGC
	Arg	GCTCGTGGC
	Cys	GCTTGTGGC
	Asp	GCTGATGGC
	Ala	GCTGCTGGC
13	Val	GCTGTTGGC
	Gly (WT)	GGTGGCGTA
	Asp	GGTGACGTA
	Val	GGTGTCGTA
	Ala	GGTGCCGTA
	Cys	GGTTGCGTA
61	Arg	GGTCGCGTA
	Gln (WT)	GGTCAAGAG
	Leu	GGTCTAGAG
	His	GGTCACGAG

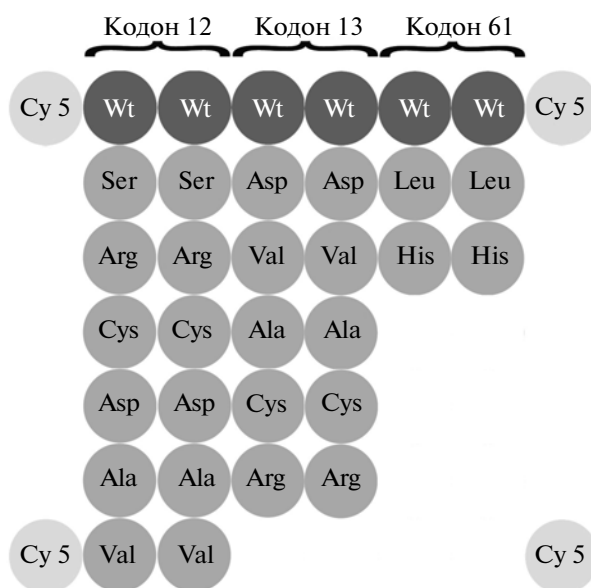
ность флуоресценции от соответствующей ячейки минимум в 5 раз превышала интенсивность флуоресценции фона. В зависимости от локализации сигнала на биочипе можно судить о присутствии той или иной мутации в образце. При амплификации интересующего нас фрагмента ДНК мы использовали LNA-блокирующую ПЦР. Поэтому ячейка, содержащая зонд с последовательностью дикого типа, могла иметь крайне низкий уровень флуоресцентного сигнала.

**ПЦР-ПДРФ и секвенирование.** Для выявления мутаций в кодоне 12 гена *KRAS* проводили рестрикционный анализ продуктов ПЦР, используя эндонуклеазу BstN1 (сайт узнавания CCA/TGG). Фрагменты ДНК выявляли методом электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с окрашиванием бромистым этидием [16]. В качестве метода сравнения при определении нуклеотидной последовательности кодонов 12, 13 и 61 гена *KRAS* использовали LNA-блокирующую ПЦР с последующим секвенированием.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Анализ мутаций в гене KRAS с помощью биочипа*

На рис. 1 приведена схема биологического микрочипа. С целью повышения надежности и точности анализа каждую ячейку на биочипе дублировали. В верхнем ряду иммобилизованы олигонуклеотиды, соответствующие гену *KRAS* дикого типа. В



**Рис. 1.** Схема расположения олигонуклеотидных проб на микрочипе. Олигонуклеотиды в верхнем ряду соответствуют нуклеотидным последовательностям *KRAS* дикого типа. В двух первых столбцах нанесены олигонуклеотиды, соответствующие *KRAS* с наиболее частыми мутациями в кодоне 12, в третьем и четвертом столбцах – с мутациями в кодоне 13, в двух последних – в кодоне 61. В угловых позициях нанесены ячейки, содержащие флуоресцентный краситель Cy5, для ориентировки и контроля интенсивности свечения.

двух первых столбцах нанесены олигонуклеотиды, соответствующие наиболее частым мутациям в кодоне 12, в третьем и четвертом столбцах – наиболее частым мутациям в кодоне 13, в двух последних – в кодоне 61. Таким образом, разработанный нами биочип позволяет анализировать 13 наиболее часто встречающихся мутаций в гене *KRAS*. Ячейки в угловых позициях содержат флуоресцентный краситель Cy5 и перманентно светятся, что облегчает ориентировку на биочипе и позволяет контролировать интенсивность свечения.

На рис. 2 представлены гибридационные картины, полученные при анализе ДНК, выделенной из опухолевой ткани больных раком ПЖ. В одном образце представлен ген *KRAS* дикого типа (рис. 2а), другие содержат мутации: Gly12Asp (рис. 2б), Gly12Val (рис. 2в) и Gln61His (рис. 2г).

Мы проверили способность биологического микрочипа определять все 13 мутаций. С этой целью использовали клинические образцы с известными генотипами, установленными методом ПЦР-ПДРФ с последующим секвенированием. При отсутствии клинических образцов с нужной мутацией использовали нуклеотидные последовательности, полученные методом сайт-направленного мутагенеза.

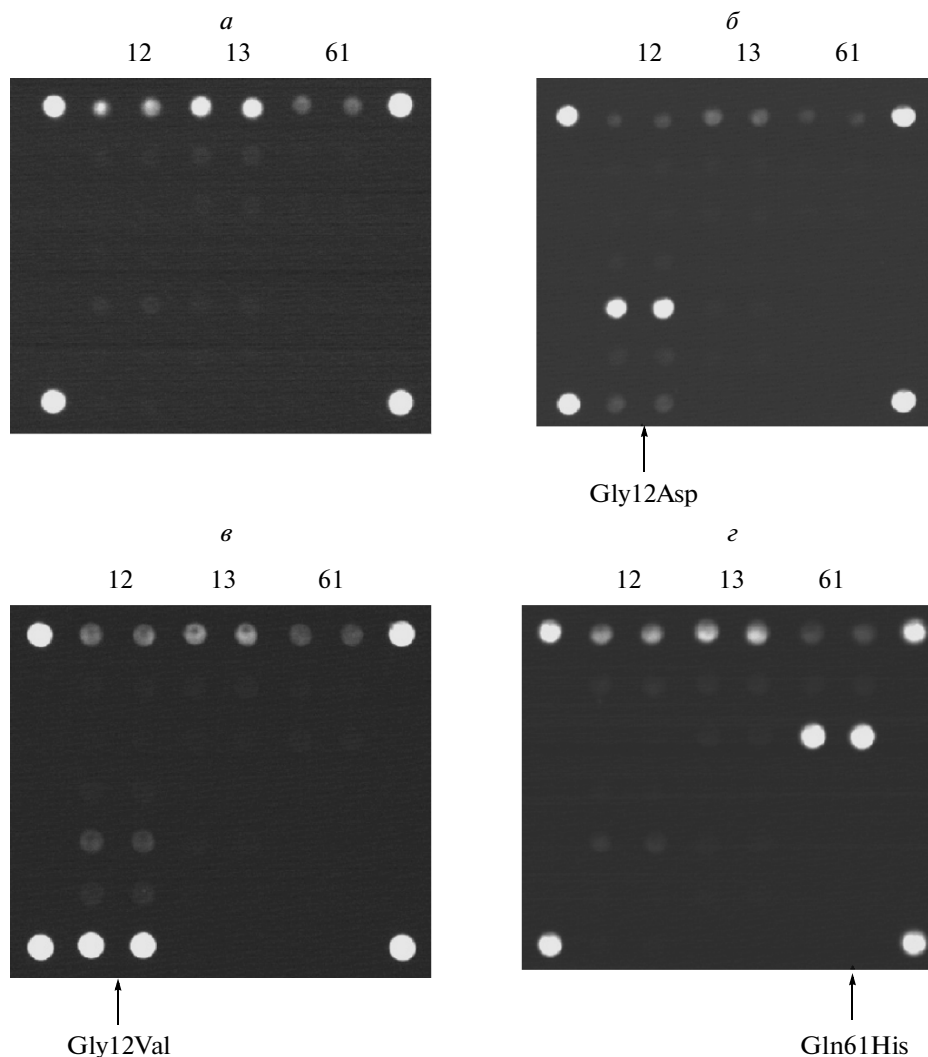
Аналитическую чувствительность метода определяли в серии опытов, в которых ДНК дикого типа соотносили с мутантной ДНК в следующих пропорциях: 10 : 1; 25 : 1; 50 : 1; 100 : 1; 200 : 1. В резуль-

тате установили, что для эффективной идентификации всех мутаций, имеющихся на биочипе, ДНК, выделенная из опухоли, должна содержать не менее 1% мутантной последовательности гена *KRAS*.

#### Генотипирование больных с опухолями поджелудочной железы

Разработанный нами протокол генотипирования использовали для поиска мутаций в гене *KRAS* в 42 клинических образцах. Результаты генотипирования суммированы в табл. 2. С помощью биочипов мутации в гене *KRAS* обнаружены у 32 (76%) больных, а методом ПЦР-ПДРФ – у 25 (64%). Наиболее частой была миссенс-мутация Gly12Asp (47% от общего числа мутаций), часто встречалась и замена Gly12Val (37%). Из мутаций в кодоне 12 у трех больных обнаружена мутация Gly12Arg (10%) и у одного – Gly12Ala (3%). Мутации в кодоне 13 не выявлены, но найдена одна мутация в кодоне 61 – Gln61His. Методом ПЦР-ПДРФ тип мутации не определялся.

Анализ мутационного статуса гена *KRAS* в опухолях различного типа показал, что основная часть мутаций приходится на протоковые аденокарциномы (табл. 3). Из 33 больных протоковой аденокарциномой ПЖ у 30 (91%) мутации выявлены методом гибридизации на биочипе и у 26 (79%) методом ПЦР-ПДРФ. Мутации найдены и в аденокарциномах ПЖ другого типа – Gly12Asp у больного с муцинозной цистаденокарциномой и Gly12Val у одного



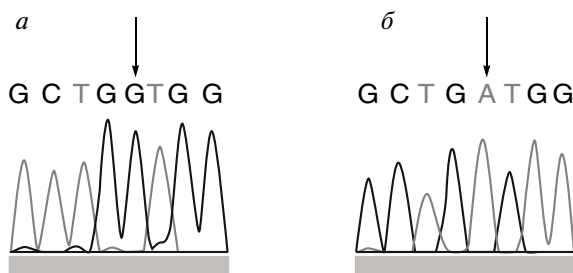
**Рис. 2.** Гибридизационные картины, полученные при анализе образцов с различным генотипом. *а* – Клинический образец, не содержащий анализируемых мутаций (Wt). *б* – Клинический образец с мутацией Gly12Asp; *в* – Gly12Val; *г* – Gln61His.

из двух больных с аденокарциномой фатерова соска, тогда как в клетках ацинарной аденокарциномы мутации не обнаружены. В опухолях другой локализации (рак щитовидной железы, рак почки с мета-

стазом в хвост ПЖ, вненадпочечниковая параганглиома) и при доброкачественных изменениях ПЖ (опухоль и атрофия ткани ПЖ с очагами некроза) мутации не обнаружены.

**Таблица 2.** Результаты генотипирования клинических образцов методом гибридизации на биологическом микрочипе и их сравнение с данными ПЦР-ПДРФ-анализа

Мутационный статус гена <i>KRAS</i>	Анализ с помощью биочипа ( <i>n</i> = 42)	Метод ПЦР-ПДРФ ( <i>n</i> = 42)
Дикий тип Wt	10/42 (24%)	14/42 (33%)
Мутации, всего	32/42 (76%)	28/42 (64%)
Тип мутации:		Не определялся
Gly12Asp	15/32 (47%)	
Gly12Val	12/32 (37%)	
Gly12Arg	3/32 (10%)	
Gly12Ala	1/32 (3%)	
Gln61His	1/32 (3%)	



**Рис. 3.** Фрагменты гена *KRAS*, включающие кодон 12, из одного и того же образца. Секвенирование выполнено после ПЦР без добавления LNA-олигонуклеотида (а) и с добавлением (б). Стрелкой отмечена позиция, в которой происходит замена G → A, что ведет к аминокислотной замене Gly12Asp.

Данные генотипирования, полученные с помощью биочипа и посредством ПЦР-ПДРФ, совпали в 88% случаев. В одном образце мы не обнаружили мутацию в гене *KRAS*, в то время как метод ПЦР-ПДРФ выявил ее на границе чувствительности метода. В остальных случаях расхождение результатов, полученных двумя методами, заключалось в том, что мутации обнаруживались с помощью гибридизации на биологическом микрочипе и не обнаруживались методом ПЦР-ПДРФ. Во всех случаях несовпадения результатов мы провели ПЦР в присутствии LNA-олигонуклеотидов с последующим секвенированием. Картины секвенирования подтвердили присутствие мутаций, определенных ранее с помощью биочипа (рис. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основная цель нашей работы состояла в разработке высокочувствительного метода скрининга соматических мутаций в гене *KRAS* в клинических образцах опухолей. В настоящее время существует большое число методов определения мутантной

нуклеотидной последовательности в присутствии большого количества ДНК дикого типа. К ним относятся аллель-специфичная ПЦР [10], избирательное расщепление ДНК дикого типа рестриктазами [21–23], аллель-специфичная лигазная реакция [24], анализ изменений конформации или длины последовательности посредством гель-электрофореза [11, 25, 26], денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [13, 27], определение коротких фрагментов методом масс-спектрометрии [13, 28], анализ кривых плавления [29], гибридизация на микрочипах (microarray) [30]. Методы, основанные на электрофоретическом разделении мутантного аллеля и аллеля дикого типа [11, 25, 26], не относятся к достаточно чувствительным. Другие методики могут быть чувствительными и эффективными, но в некоторых случаях достаточно трудоемкими, а часть из них нуждается в дорогостоящем оборудовании, как, например, масс-спектрометрический анализ или ВЭЖХ. Поэтому они не всегда удобны для рутинной клинической диагностики. Разработанный нами метод генотипирования мутаций в гене *KRAS* с использованием LNA-блокирующей ПЦР и гибридизации на биологическом гидрогелевом микрочипе представляет интерес при скрининге большого количества образцов. Мультиплексная ПЦР проходит в одной пробирке, при этом биочип позволяет выявлять широкий спектр нуклеотидных замен в кодонах 12, 13 и 61 гена *KRAS*. Анализ с помощью биочипов проводится с использованием недорогого устройства – портативного анализатора биочипов (ООО “Биочип-ИМБ”, Россия).

Добавление LNA-олигонуклеотида в ПЦР-смесь существенно повышает чувствительность метода, позволяя обнаружить мутации там, где обычная ПЦР оказывается неэффективной (рис. 3). Это заметно также при сравнении метода гибридизации на биочипе с традиционным ПЦР-ПДРФ-анализом. При помощи биочипа нами выявлены мутации

**Таблица 3.** Мутационный статус гена *KRAS* в опухолях различного типа

Тип опухоли	Мутационный статус гена <i>KRAS</i>	Анализ с помощью биочипа	ПЦР-ПДРФ
Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы ( $n = 33$ )	Wt	3/33 (9%)	7/33 (21%)
	mut	30/33 (91%)	26/33 (79%)
Другие типы аденокарцином поджелудочной железы (муцинозная и ацинарная) ( $n = 2$ )	Wt	1/2 (50%)	1/2 (50%)
	mut	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Аденокарцинома фатерова соска ( $n = 2$ )	Wt	1/2 (50%)	1/2 (50%)
	mut	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Опухоли другой локализации ( $n = 3$ )	Wt	3/3 (100%)	3/3 (100%)
	mut	–	–
Доброкачественные изменения поджелудочной железы ( $n = 2$ )	Wt	1/1 (100%)	1/1 (100%)
	mut	–	–

в 76% образцов, а методом ПЦР-ПДРФ только в 64%. Во всех случаях секвенирование после LNA-блокирующей ПЦР подтвердило результаты, полученные методом гибридизации на биочипе, что свидетельствует об их высокой достоверности. Кроме того, метод ПЦР-ПДРФ позволяет установить факт наличия/отсутствия мутации, но не определяет мутантный вариант нуклеотидной последовательности и, соответственно, тип аминокислотной замены.

Анализ частоты мутаций в опухолях различного гистологического типа и локализации показывает, что мутации, как правило, ассоциированы с протоковой аденокарциномой ПЖ (91%). Это подтверждает важную роль мутаций в гене *KRAS* как диагностического маркера рака ПЖ [31]. Мутации в гене *KRAS* часто встречаются также при раке легкого [32] и при колоректальном раке [33, 34], где определение мутационного статуса *KRAS* необходимо для назначения таргетной терапии.

Предложенный нами метод позволяет быстро и с высокой достоверностью определять 13 наиболее частых мутаций в гене *KRAS*, на долю которых приходится около 99% от общего количества мутаций в этом гене (<http://www.sanger.ac.uk/per1/genetics>). В отличие от многих коммерческих наборов, устанавливающих лишь факт присутствия мутаций, разработанный биочип позволяет определить, какую именно мутацию содержит опухоль. В дальнейшем это позволит исследовать, насколько течение заболевания и эффективность противоопухолевой терапии зависят от того, какая мутация содержится в гене *KRAS* в опухоли данного больного. В настоящее время при назначении ряда противоопухолевых средств рекомендуется проводить молекулярно-генетический анализ мутаций в гене *KRAS*, поэтому наш биочип можно использовать при выборе схемы химиотерапии, учитывающей генетические особенности опухолевых клеток данного больного, что позволит избежать применения неэффективных препаратов и лишних материальных затрат.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-01480 и 08-04-01371).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Thun M.J. 2007. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.* **57**, 43–66.
- Schneider G., Siveke J.T., Eckel F., Schmid R.M. 2005. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*. **128**, 1606–1625.
- Maitra A., Hruban R.H. 2008. Pancreatic Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 157–188.
- Hruban R.H., Adsay N.V., Albores-Saavedra J., Compton C., Garrett E.S., Goodman S.N., Kern S.E., Klimstra D.S., Kloppel G., Longnecker D.S., Luttges J., Offerhaus G.J. 2001. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* **25**, 579–586.
- Schneider G., Schmid R.M. 2003. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol. Cancer*. **2**, 15–22.
- Konner J., O'Reilly E. 2002. Pancreatic cancer: epidemiology, genetics, and approaches to screening. *Oncology*. **16**, 1615–1622.
- Raponi M., Winkler H., Dracopoli N.C. 2008. *K-RAS* mutations predict response to EGFR inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 413–418.
- Lievre A., Bachet J.-B., Le Corre D., Boige V., Landi B., Emile J.-F., Cote J.-F., Tomasic G., Penna C., Ducreux M., Rougier P., Penault-Llorca F., Laurent-Puig P. 2006. *KRAS* mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992–3995.
- Massarelli E., Varella-Garcia M., Tang X., Xavier A.C., Ozburn N.C., Liu D.D., Bekele B.N., Herbst R.S., Wistuba I.I. 2007. *KRAS* mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2890–2896.
- Iinuma H., Okinaga K., Adachi M., Suda K., Sekine T., Sakagawa K., Baba Y., Tamura J., Kumagai H., Ida A. 2000. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of *p53* and *K-ras* genes in patients with colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. **89**, 337–344.
- Nishikawa T., Maemura K., Hirata I., Matsuse R., Morikawa H., Toshina K., Murano M., Hashimoto K., Nakagawa Y., Saitoh O., Uchida K., Katsu K. 2002. A simple method of detecting *K-ras* point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using one-step polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis. *Clin. Chim. Acta.* **318**, 107–112.
- Milbury C.A., Li J., Makrigiorgos G.M. 2009. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. *Clin. Chem.* **55**, 632–640.
- Sun X., Hung K., Wu L., Sidransky D., Guo B. 2002. Detection of tumor mutations in the presence of excess amounts of normal DNA. *Nat. Biotechnol.* **20**, 186–189.
- Beranek M., Jandik P., Sacha M., Rajman M., Sakra L., Stumr F., Soudkova E., Zivny P., Havlicek K. 2006. LNA clamped PCR: A specific method for detection of *Ki-ras* gene mutations in patients with sporadic colorectal carcinomas. *Klin. Biochem. Metab.* **14**, 217–220.
- Sanjay K., Singh S.K., Nielsen P., Koshkin A.A., Wengel J. 1998. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.* **4**, 455–456.
- Амосенко Ф.А., Казубская Т.П., Громыко О.Е., Матвеева Т.И., Корчагина Е.Л., Наседкина Т.В., Гарькавцева Р.Ф., Калинин В.Н. 2009. Мутации в генах *K-ras*, *BRCA1/2*, *CHEK2* и микросателлитные маркеры (потеря гетерозиготности в локусах 9p, 17p и 18 q) при спорадических аденокарциномах поджелудочной железы. *Молекуляр. биология.* **43**, 414–421.
- Ke S.-H., Madison E.L. 1997. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3371–3372.

18. Luo J.-D., Chan E.-C., Shih C.-L., Chen T.-L., Ying Liang Y., Hwang T.-L., Chiou C.-C. 2006. Detection of rare mutant *K-ras* DNA in a single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe. *Nucl. Acids Res.* **34**, e12.
19. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. 2004. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* **325**, 92–106.
20. Плотов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Э., Юрасов Р.А., Суржиков С.А., Паньков С.В., Чудинов А.В., Баранов В.С., Заседателев А.С. 2005. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации. *Молекуляр. биология.* **39**, 403–412.
21. Dieterle C.P., Conzelmann M., Linnemann U., Berger M.R. 2004. Detection of isolated tumor cells by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for *K-ras* mutations in tissue samples of 199 colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **10**, 641–650.
22. Jacobson D.R., Mills N.E. 1994. A highly sensitive assay for mutant ras genes and its application to the study of presentation and relapse genotypes in acute leukemia. *Oncogene.* **9**, 553–563.
23. Norheim Andersen S., Breivik J., Lovig T., Meling G.I., Gaudernack G., Clausen O.P., Schjolberg A., Fausa O., Langmark F., Lund E., Rognum T.O. 1996. *K-ras* mutations and HLA-DR expression in large bowel adenomas. *Br. J. Cancer.* **74**, 99–108.
24. Nickerson D.A., Kaiser R., Lappin S., Stewart J., Hood L., Landegren U. 1990. Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 8923–8927.
25. Toyooka S., Tsukuda K., Ouchida M., Tanino M., Inaki Y., Kobayashi K., Yano M., Soh J., Kobatake T., Shimizu N., Shimizu K. 2003. Detection of codon 61 point mutations of the *K-ras* gene in lung and colorectal cancers by enriched PCR. *Oncol. Rep.* **10**, 1455–1459.
26. Imai M., Hoshi T., Ogawa K. 1994. *K-ras* codon 12 mutations in biliary tract tumors detected by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis. *Cancer.* **73**, 2727–2733.
27. Lilleberg S.L., Durocher J., Sanders C., Walters K., Culver K. 2004. High sensitivity scanning of colorectal tumors and matched plasma DNA for mutations in *APC*, *TP53*, *K-RAS*, and *BRAF* genes with a novel DHPLC fluorescence detection platform. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1022**, 250–256.
28. Lleonart M.E., Ramon y Cajal S., Groopman J.D., Friesen M.D. 2004. Sensitive and specific detection of *K-ras* mutations in colon tumors by short oligonucleotide mass analysis. *Nucl. Acids Res.* **32**, e53.
29. Nakao M., Janssen J.W., Seriu T., Bartram C.R. 2000. Rapid and reliable detection of *N-ras* mutations in acute lymphoblastic leukemia by melting curve analysis using LightCycler technology. *Leukemia.* **14**, 312–315.
30. Maekawa M., Nagaoka T., Taniguchi T., Higashi H., Sugimura H., Sugano K., Yonekawa H., Satoh T., Horii T., Shirai N., Takeshita A., Kanno T. 2004. Three-dimensional microarray compared with PCR-single-strand conformation polymorphism analysis/DNA sequencing for mutation analysis of *K-ras* codons 12 and 13. *Clin. Chem.* **50**, 1322–1327.
31. Slebos R.J.C., Hoppin J.A., Tolbert P.E., Holly E.A., Brock J.W., Zhang R.H., Bracci P.M., Foley J., Stockton P., McGregor L.M., Flake G.P., Taylor J.A. 2000. *K-ras* and *p53* in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevention.* **9**, 1223–1232.
32. Pao W., Wang T.Y., Riely G.J., Miller V.A., Pan Q., Ladanyi M., Zakowski M.F., Heelan R.T., Kris M.G., Varmus H.E. 2005. *KRAS* mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med.* **2**, 57–61.
33. Loupakis F., Ruzzo A., Cremolini C., Vincenzi B., Salvatore L., Santini D., Masi G., Stasi I., Canestrari E., Rulli E., Floriani I., Bencardino K., Galluccio N., Catalano V., Tonini G., Magnani M., Fontanini G., Basolo F., Falcone A., Graziano F. 2009. *KRAS* codon 61, 146 and *BRAF* mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in *KRAS* codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* **101**, 715–721.
34. Rouleau E., Spyrtos F., Dieumegard B., Guinebretiere J.M., Lidereau R., Bieche I. 2008. *KRAS* mutation status in colorectal cancer to predict response to EGFR targeted therapies: the need for a more precise definition. *Br. J. Cancer.* **99**, 2100.