

EGFR 基因 T790M 突变 COLD-PCR 扩增体系的 T_c 值筛选*

罗 凯, 王 倩, 仇秦威, 贺智敏[△](广州医科大学附属肿瘤医院/广州医科大学肿瘤研究所, 广州 510095)

【摘要】 目的 筛选表皮生长因子受体(EGFR)基因 T790M 突变 PCR 扩增体系的 T_c 值并初步建立具 T790M 突变富集效果的低变性温度下的复合聚合酶链反应(COLD-PCR)体系,同时探讨 T_c 值的筛选策略以及注意事项。**方法** 以肺癌 MSTO-211H、NCI-H1975 细胞为 T790M 突变野生型和突变型标准样品,通过目标片段关键变性温度筛选实验、COLD-PCR 反应模式比较实验以及 T_c 值的验证实验,确定 COLD-PCR 体系的 T_c 值并初步验证其效果。**结果** 本实验体系 T790M 突变的扩增片段关键变性温度低于野生型片段,据此体系反应模式选择为快速 COLD-PCR 反应模式,同时确定 T_c 值为 89.6 °C,验证实验显示本体系可检出 1% 的 T790M 突变,较常规 PCR 提高 5 倍。至此 T790M 突变富集 COLD-PCR 扩增体系已成功建立。**结论** 成功完成体系 T_c 值的筛选并建立 T790M 突变富集 COLD-PCR 扩增体系。

【关键词】 表皮生长因子受体基因; T_c 值; 低变性温度下的复合聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)10-1328-03

Screening of T_c value for COLD-PCR amplification system of EGFR gene T790M mutation* LUO Kai, WANG Qian, QIU Qin-wei, HE Zhi-min[△] (Affiliated Tumor Hospital, Guangzhou Medical University/Tumor Research Institute, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510095, China)

【Abstract】 Objective To screen the T_c value of COLD-PCR amplification system of the epidermal growth factor receptor(EGFR) gene T790M mutation, to preliminarily establish the COLD-PCR system with the T790M mutation enrichment effect under low denatured temperature and to investigate the screening strategy of T_c value and the matter needing attention. **Methods** The lung cancer cell line MSTO-211H and NCI-H1975 were taken as the wild-type and mutation type standard samples respectively. The T_c value of T790M mutation detection COLD-PCR system was found and verified through screening experiment of key denaturation temperature of target amplicon, reaction pattern comparison experiment and verification test of T_c value. **Results** The pattern of fast COLD-PCR was chosen as standard reaction pattern because the key denaturation temperature of mutation amplicon was lower than wild type amplicon and 89.6 °C was founded as the T_c value of this system. The T790M mutation enrichment COLD-PCR system was established, which had higher sensitivity than traditional PCR and could detect 1% of T790M mutation, and was increased by 5 times compared with the conventional PCR. **Conclusion** The T_c value screening of the system is successfully completed and the T790M mutation enrichment COLD-PCR system is also established.

【Key words】 epidermal growth factor receptor; T_c value; COLD-PCR

跨膜受体蛋白表皮生长因子受体(EGFR)是一个重要的抗肿瘤治疗靶点。目前,靶向 EGFR 胞内酪氨酸激酶活性区的小分子抑制剂(EGFR-TKI)已进入临床使用。多项研究表明,在非小细胞肺癌中存在 EGFR 酪氨酸激酶活性区编码基因突变,且此突变与 EGFR-TKI 疗效的获得呈正相关^[1]。因此,非小细胞肺癌患者 EGFR-TKI 治疗前检测 EGFR 基因突变状态对于患者选择与疗效预测具有重要意义。另有研究显示,非小细胞肺癌患者在使用 EGFR-TKI 治疗后最终将出现继发耐药,而近半数继发耐药患者会出现 EGFR 基因 20 外显子的 T790M 突变,故尽早检出 T790M 突变对于患者的 EGFR-TKI 治疗耐药预测具有重要意义^[2-3]。

目前,临床应用的 EGFR 基因突变检测方法主要有直接测序法和 ARMs 法,其中直接测序法是突变检测的金标准,但

仅能检出突变片段比例达 20% 以上样品,灵敏度较低的问题限制了其应用^[4-5]。低变性温度下的复合聚合酶链反应(COLD-PCR)是一种利用在野生型、突变型混合样品体系中完全匹配的同源双链,较野生型与突变型的杂合双链解链温度高从而设定变性温度处于临界变性温度(T_c;较杂合双链解链温度高却低于纯合双链解链温度的临界变性温度)以达到富集扩增序列上突变片段的 PCR 方法^[6]。其与传统直接测序法的联合应用不仅可有效提高突变检测效率还简便、经济,因此具有重要的实用价值。而 T_c 值的筛选是一个成功 COLD-PCR 的关键,但目前就遵循何种步骤有效确定 T_c 值以及在确定 T_c 值时的注意事项和主要影响因素尚缺少系统认识和足够的重视。因此本研究以 EGFR 基因 20 外显子 T790M 突变为靶点,拟通过筛选 T_c 值以建立可富集 T790M 突变的 COLD-

* 基金项目:广东省广州市卫生和计划生育委员会医药卫生科技项目(20141A011096)。

作者简介:罗凯,男,博士,副主任技师,主要从事肿瘤靶向治疗耐药机制以及相关分子靶向检测研究。△ 通讯作者,E-mail: hezhimin2005@yahoo.com。

PCR 扩增体系,同时探讨恰当的 Tc 值筛选方法及注意事项。

1 材料与与方法

1.1 样品来源 分别以肺癌 NCI-H1975、肺癌 MSTO-211H 细胞(购自中科院上海细胞库)作为 T790M 突变的阳性和阴性标准样品,T790M 突变状态由北京鑫诺 EGFR 基因突变测序检测试剂盒测序鉴定。提取 NCI-H1975、MSTO-211H 两株细胞基因组 DNA 并稀释至 20 ng/μL,以此作为突变型和野生型标准样品,同时将两株细胞稀释后 DNA 等比例混合后作为混合突变型样品。另收集本院非小细胞肺癌患者 T790M 突变阳性组织样品 3 例和阴性组织样品 20 例用于 Tc 值的验证。

1.2 仪器与试剂 DNA 提取试剂盒、PCR 反应液、测序试剂 BigDye3.1 分别购自美国 OMEGA、美国赛默飞世尔科技公司和美国 life 公司。Veriti 梯度 PCR 仪、遗传分析仪 3130xl 均购自美国 life 公司。

1.3 DNA 提取及浓度测定 依试剂盒说明书提取样品 DNA;微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

1.4 引物设计及验证 依据 EGFR 基因参考序列(Genebank:NG_007726.2)利用 Primer 5.0 引物设计软件设计 20 外显子扩增与测序引物,交深圳华大基因合成,具体序列,见表 1。合成的引物经与北京鑫诺 EGFR 基因突变测序检测试剂盒平行检测 NCI-H1975、MSTO-211H 20 外显子突变状况验证其设计的有效性。PCR 反应条件如下:(1)体系,Dream Taq Green PCR Master Mix(2×)10 μL、上游引物(10 pmol/μL)1 L、下游引物(10 pmol/μL)1 μL、纯水 7 μL、DNA 1 μL。(2)反应条件,94℃ 3 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45 s,40 个循环;72℃ 7 min。其余实验步骤参照试剂盒说明书进行。

表 1 EGFR 基因 T790M 突变扩增、测序引物表

引物类型	引物名称	序列(5'→3')	长度(bp)
PCR 引物	上游引物	ACGTCCCTGTGCTAGGTC	18
	下游引物	CCATGGCAAACCTCTTG	16
测序引物	测序引物	AAACTCAAGATCGCATTCA	19

1.5 Tc 值的筛选

1.5.1 常规 PCR 扩增有效变性温度的筛选 以引物设计软件预测的 PCR 产物的 Tm 值 89.8℃ 的整数为基点,1℃ 为单位,向上、下两个方向延伸设定实验变性温度(下文以 A 代替)的筛选范围为 86~91℃。按反应条件(94℃ 3 min;A℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45 s,共 40 个循环;后延伸 72℃ 7 min;)扩增野生型标准样品 DNA 进行有效变性温度筛选,反应体系同上。2%琼脂糖凝胶电泳,以出现目的扩增条带的最低变性温度作为常规 PCR 扩增的有效变性温度。

1.5.2 不同 PCR 扩增模式的比较实验 以常规 PCR 扩增的有效变性温度为基点,0.1℃ 为单位,向上、下两个方向延伸共设定 6 个实验变性温度。按如下反应条件(预变性 94℃ 3 min;第 1 循环阶段:94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45 s,共 B 个循环;第 2 循环阶段:A℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45 s,共 C 个循环;后延伸 72℃ 7 min)扩增野生型标准样品 DNA,设置 B 与 C 循环数分别为 0:40,5:35,10:30 共 3 组,反应体系同上。评估前置数个常规 PCR 循环对 Tc 值筛选的影响并确定最终的实验 PCR 扩增模式。

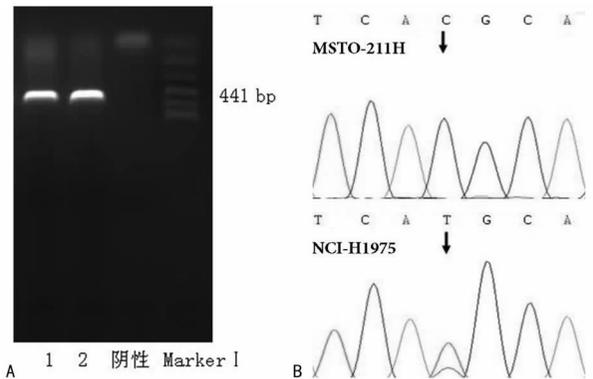
1.5.3 Tc 值的筛选 首先,以前述实验确定的有效变性温度为基点同时结合已优选的 PCR 扩增模式,按 0.3℃ 为单位,向上、下两个方向延伸设定实验变性温度分别扩增野生型、混合

突变型、突变型样品。观察各样品出现清晰目的扩增条带的最低变性温度,依据野生型、突变型、混合突变型样品间最低变性温度的差异评估突变是否导致了目的片段有效变性温度的下降,并据此选择恰当的 COLD-PCR 模式。如混合突变与突变样品的最低有效变性温度较野生型样品低,则应选择快速 COLD-PCR 模式,同时以野生型样品出现目的扩增条带的最低温度为新 Tc 值筛选基点。其次,选用快速 COLD-PCR 模式(基本反应条件同上,B:C 为 5:35),依据新筛选基点,按 0.1℃ 为单位,向上、下两个方向延伸设定实验变性温度同时扩增野生型、混合突变型与突变型样品。观察各样品最低有效变性温度,以野生型样品的最低有效变性温度到混合与突变型样品的最低有效变性温度为 Tc 值范围,根据范围宽窄选取中间温度为最终待验证 Tc 值。

1.6 Tc 值的验证 将相同浓度(20 ng/μL)突变型与野生型标准样品按 0%、1%、3%、5%、10%、20% 比例混合作为实验样品,利用常规 PCR 条件和以上实验确定的 COLD-PCR 条件分别扩增并测序检测系列混合实验样品,以此验证筛选所得的 Tc 值是否存在突变富集效应。另取已用商品测序试剂盒检测确定的 T790M 突变阳性和阴性样品平行检测以初步验证新体系突变检测效果。

2 结果

2.1 扩增及测序引物验证 以所设计的扩增引物扩增 T790M 野生型、突变型标准样品,电泳鉴定均可见 441 bp 目的条带。利用测序引物成功对 PCR 产物进行测序,野生型、突变型样品测序结果分别为野生型和 T790M 突变,与商品测序试剂盒检测结果一致。以上结果显示本实验所设计的引物可用于 EGFR 基因 T790M 突变检测。见图 1。



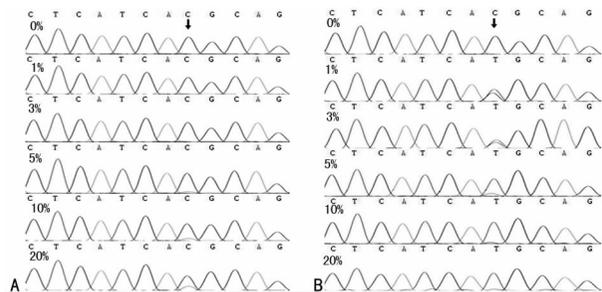
注:A 为 PCR 产物电泳鉴定图(1、2、阴性和 Marker I 分别代表 NCI-H1975 细胞、MSTO-211H 细胞、阴性对照和北京天根 DNA 标记物 I);B 为 PCR 产物测序鉴定图。

图 1 EGFR 基因 T790M 突变扩增与测序引物效果鉴定图

2.2 Tc 值的筛选与确定 通过常规 PCR 扩增有效变性温度筛选实验确定常规 PCR 扩增条件下本引物体系的有效变性温度为 91℃。不同 PCR 扩增模式的比较实验显示,当 B 相对于 C 的循环数增加时,有效变性温度可出现 0.1~0.2℃ 的下降。最终选择 B:C 为 5:35 的反应模式作为后续实验的反应模式。Tc 值的筛选实验显示:(1)T790M 突变目的片段的有效变性温度较野生型降低,选择快速 COLD-PCR 反应模式为后续实验反应模式。(2)当变性温度位于 89.6~89.7℃ 时,野生型样品的目的条带扩增情况明显弱于突变型样品和混合突变样品,因此选择 89.6℃ 作为待验证 Tc 值进行后续实验。(3)最终确定的反应条件:预变性 94℃ 3 min;第 1 循环阶段,94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45s,共 5 个循环;第 2 循环阶段,

89.6 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 35 个循环; 后延伸 72 °C 7 min。

2.3 T_c 值的验证 利用 89.6 °C 作为 T_c 值的 COLD-PCR 成功扩增了混合比例为 0%、1%、3%、5%、10%、20% 的突变型与野生型混合样品, 且除 0% 外所有样品均检测为 T790M 突变。常规 PCR 反应条件也成功扩增并测序了该系列所有样品, 但仅突变比例在 5% 以上样品检出 T790M 突变。见图 2。以 89.6 °C 作为 T_c 值的 COLD-PCR 成功扩增并测序检测了 22 例样品 (1 例 T790M 突变阴性样品检测失败)。其中 3 例 T790M 突变阳性样品检测为阳性; 19 例 T790M 突变阴性样品检测出 1 例 T790M 突变阳性, 18 例为阴性。与商品试剂盒相比, 本 COLD-PCR 联合测序体系 T790M 突变检测阳性率较高而检测成功率略低。



注: A 为常规 PCR-测序; B 为 COLD-PCR 测序。

图 2 T_c 值的验证

3 讨 论

相关研究显示, 在部分 EGFR-TKI 治疗前的非小细胞肺癌患者中已存在敏感突变 19Del 或 L858R 与耐药突变 T790M 共存的情况^[7]。同时利用高灵敏度的检测方法也在治疗前的部分非小细胞肺癌患者中发现了 T790M 突变微克隆的存在。而治疗前检出的伴随敏感突变共存的 T790M 突变对 EGFR-TKI 靶向治疗的无进展生存期有明显的负面影响^[8]。同时在约 40%~50% 的非小细胞肺癌患者 EGFR-TKI 治疗直至耐药的过程中, 肿瘤细胞出现继发耐药相关的 T790M 二次突变。因此敏感而准确地检测肿瘤的微量 T790M 突变对于非小细胞肺癌患者的 EGFR-TKI 靶向治疗疗效预测和评估具有重要意义。

COLD-PCR 是一种高效的突变富集方法, 其与直接测序法联用可有效提高直接测序法的突变检出比率。T_c 值是一个成功 COLD-PCR 的关键, 其与多种影响因素相关, 包括突变对目标片段解链温度的影响、COLD-PCR 的反应模式等。目前较少见专门探讨 T_c 值筛选策略与注意事项的文献。

PCR 扩增任何 DNA 序列时都有一个关键变性温度, 当变性温度低于该温度时, PCR 扩增效率大大下降或非特异性扩增明显增多。关键变性温度的高低与目的片段的序列构成、二级结构和突变相关。本实验体系利用常规 PCR 模式和两步式 PCR 模式扩增 EGFR 基因 20 外显子时, 两步式 PCR 模式较常规 PCR 模式其关键变性温度出现了 0.1~0.2 °C 的下降。究其原因可能为在高变性温度下, 基因组 DNA 充分解链, 其二级结构及空间位阻不会影响引物的结合, PCR 扩增效率得到保障。而在低变性温度下, 除了目标 DNA 序列本身外的解链情况外, 目标序列附近的二级结构及空间位阻均可能影响引物的结合效率从而降低扩增效率。故使用常规 PCR 模式筛选出的有效变性温度可能略高。而两步式 PCR 模式在第 1 步就已有有效扩增了目标序列, 第 2 步可直接以第 1 步的扩增子为靶

序列进行扩增, 从而避免了基因组二级结构和空间位阻的影响。但如模板 DNA 附近无明显的二级结构及空间位阻, 则两种模式筛选的有效变性温度可无差异。相关研究显示, 两种 PCR 反应模式均被用于不同 COLD-PCR 体系的 T_c 值筛选^[9-10]。COLD-PCR 利用突变、野生型目的片段的关键变性温度差异来实现突变的富集, 因此应尽可能避免引入其他的影响因素。故在进行 COLD-PCR 的 T_c 值筛选时应前置数个常规 PCR 循环为宜。

当野生型序列出现突变时, 突变序列的解链温度可能降低、不变或升高, 但野生和突变序列形成的杂合双链其解链温度一般均出现小幅降低。因此, COLD-PCR 分为两种基本模式^[6]: (1) 快速 COLD-PCR 模式, 其可有效富集解链温度降低的突变, 特点为仅利用低变性温度的 3 步常规 PCR 程序就可以实现突变的富集, 而无需每个循环均形成野生、突变杂合双链。(2) 完全 COLD-PCR 模式, 其特点为在突变富集阶段每一循环均需增加额外的高温变性和低温复性步骤以形成杂合双链再利用低变性温度的 3 步 PCR 程序对杂合双链进行选择性的扩增, 该模式对解链温度不变、升高或降低的突变均可有效扩增。本研究结果显示 T790M 突变导致了目的序列的解链温度降低, 故本实验体系采取快速 COLD-PCR 模式。

由于突变型与野生型片段的序列差异多仅在 1 至数个核苷酸, 因此两种片段的有效变性温度差异也仅在 0.2~1.5 °C 左右^[6], 故筛选 T_c 值时应选择合适的起筛温度和温度梯度跨度才会更有序、省时。本研究选择了野生型目标片段的关键变性温度作为起筛温度, 并逐步将温度梯度跨度由 0.3 °C 收窄至 0.1 °C, 最终顺利获得了 T_c 值。相关研究曾利用定性 PCR 加产物电泳分析、荧光 PCR 反应曲线分析等多种实验方式来进行 T_c 值筛选^[10-11]。但这些方法均存在一定的实验误差, 单凭条带有无或扩增曲线有无不能确定所得到的 T_c 值是否有效。只有通过测序验证扩增片段序列的正确性、系列混合突变样品的检出率有提高且突变峰信号增高才能证实筛选所得 T_c 值的有效性。

综上所述, 明确突变对解链温度的影响并选择正确的 COLD-PCR 反应模式是成功筛选 T_c 值的关键; 选择恰当的起筛温度、温度梯度跨度和筛选实验模式则是快速筛选 T_c 值的基础; 最后筛选所得的 T_c 值必须通过实验验证。

参考文献

- [1] Lin CC, Yang JC. Optimal management of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor mutations[J]. *Drugs*, 2011, 71(1): 79-88.
- [2] 郑江南, 朱晔涵. EGFR-TKIs 在非小细胞肺癌治疗中耐药机制及应对策略的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2015, 35(2): 157-160.
- [3] Lin Y, Wang X, Jin H. EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies [J]. *Am J Cancer Res*, 2014, 4(5): 411-435.
- [4] 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家组. 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家共识[J]. *中华病理学杂志*, 2011, 40(10): 700-702.
- [5] Liu C, Lin J, Chen H, et al. Detection of hepatitis B virus genotypic resistance mutations by coamplification at lower denaturation temperature-PCR coupled(下转第 1333 页)

rmtC、rmtD、rmtE、npmA^[6]。对氨基糖苷类抗菌药物常用的种类有庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素,本研究显示其耐药率分别为 93.5%、80.6% 和 53.2%。头孢菌素类抗菌药物的耐药率几乎为 100.0%。喹诺酮类抗菌药物如环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星,其耐药率分别为 100.0%、85.5% 和 64.5%。鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物耐药是因为编码旋转酶和拓扑异构酶 IV 的 GyrA 和 PraC 基因发生突变,GyrA 发生突变时表现为中度耐药,GyrA 和 PraC 同时发生突变与高水平耐药密切相关^[7]。本研究还发现,MDRAB 只有对少数抗菌药物有较低的耐药性,如替加环素、多黏菌素、氨基西林/舒巴坦、米诺环素的耐药率分别为 3.2%、12.9%、14.5%、17.7%,舒巴坦能不可逆地结合不动杆菌 PBPs,有直接杀菌能力,因此可以考虑选用含舒巴坦制剂或联合使用抗菌药物,或许能使其耐药率降低。Dinc 等^[8]研究发现对于 MDRAB 引起的严重感染,选用大剂量多黏菌素 B 联合利福平或头孢哌酮/舒巴坦联合米诺环素进行治疗,其耐药性大幅降低。

PFGE 将 62 株耐药菌株分为 4 型,A 型和 B 型为主要克隆株。A 型包括 4 个亚型共 32 株,分布在 ICU、呼吸内科、神经外科、骨科、血液科 5 个病区,特别是 ICU。B 型有 2 个亚型共 19 株,分布在 ICU、呼吸内科、消化内科、儿科 4 个病区。说明 MDRAB 克隆株在医院内克隆播散,从而造成多重耐药菌株不断增加。可能和患者在住院期间使用的湿化瓶、呼吸机管道、床单、被褥、医护人员使用过的手套,以及医院内其他物品表面有关,并且鲍曼不动杆菌形成的生物膜和芽孢使其能在干燥的物体表面存活数周,这些都是院内感染的重要原因^[9]。因此要有效控制医院感染的发生,在制订更加严格的医院感染控制措施时应注意更多细节:医护人员保持良好的手卫生,对存在潜在的污染环境进行彻底的清洁消毒,对更换工作服严格消毒,对已经感染的患者进行单间隔离,限制进入 ICU,同时限制广谱抗菌药物的使用,并加强环境的监测,从而防止及减少医院感染的发生^[10]。

参考文献

[1] Badave GK, Kulkarni D. Biofilm producing multidrug resistant acinetobacter baumannii; an emerging challenge [J]. J Clin Diagn Res. 2015, 9(1): 8-10.
 [2] 周宁莉, 张之烽, 陈俊根, 等. 鲍曼不动杆菌分布及耐药性分析[J]. 徐州医学院学报, 2009, 29(8): 548-549.
 [3] Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, et al. Characterization of epidemiologically unrelated Acinetobacter bauman-

nii isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla(OXA-51-like) genes[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(7): 2476-2483.

[4] Pogue JM, Mann T, Barber KE, et al. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: epidemiology, surveillance and management[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013, 11(4): 383-393.
 [5] Aliakbarzade K, Farajnia S, Karimi Nik A, et al. Prevalence of aminoglycoside resistance genes in acinetobacter baumannii Isolates[J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(10): e11924.
 [6] Zhou Y, Yu H, Guo Q, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29(11): 1349-1353.
 [7] Liu YH, Kuo SC, Lee YT, et al. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2012, 45(2): 108-112.
 [8] Dinc G, Demiraslan H, Elmali F, et al. Antimicrobial efficacy of doripenem and its combinations with sulbactam, amikacin, colistin, tigecycline in experimental sepsis of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii[J]. New Microbiol, 2015, 38(1): 67-73.
 [9] 张晓兵, 刘星, 龚雅利, 等. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学及耐药机制的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5): 502-505.
 [10] Navoa-Ng JA, Berba R, Rosenthal VD, et al. Impact of an International Nosocomial Infection Control Consortium multidimensional approach on catheter-associated urinary tract infections in adult intensive care units in the Philippines; International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) findings[J]. J Infect Public Health, 2013, 6(5): 389-399.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-20)

(上接第 1330 页)

with sanger sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(8): 2933-2939.
 [6] 徐琳琳, 王文兵. COLD-PCR 技术的原理及应用[J]. 生物学杂志, 2012, 29(6): 84-86.
 [7] 仇秦威, 罗凯, 贺智敏. 华南地区 172 例非小细胞肺癌表皮生长因子受体和 KRAS 突变分析[J]. 实用医学杂志, 2015, 6(6): 947-950.
 [8] Ding D, Yu Y, Li Z, et al. The predictive role of pretreatment epidermal growth factor receptor T790M mutation on the progression-free survival of tyrosine-kinase inhibitor-treated non-small cell lung cancer patients: a meta-

analysis[J]. Oncol Targets Ther, 2014, 7(2): 387-393.

[9] 于韶荣, 候志波, 陈超, 等. 运用高灵敏度 COLD-PCR 法检测胰腺癌和结直肠癌患者 KRAS 基因突变[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(12): 1181-1184.
 [10] 张春燕. 外周血游离 DNA KRAS 基因突变检测方法的建立和临床应用[D]. 上海: 复旦大学, 2011.
 [11] 梁国威, 邵东华, 曹清芸, 等. TaqMan 探针结合 COLD-PCR 原理定量检测 JAK2 V617F 突变率研究[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(3): 398-401.

(收稿日期: 2015-11-05 修回日期: 2016-01-10)