

联合探针法快速检测 EGFR 突变

陈晓琦¹, 赵亚敏¹, 郑玉玲², 樊青霞¹

(¹ 郑州大学第一附属医院肿瘤科, 河南 郑州 450000; ² 河南中医学院, 河南 郑州 450000)

[摘要] 目的: 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变尤其是 19 外显子 E746_A750del 和 21 外显子 L858R 突变与接受 TKIs 治疗的非小细胞肺癌患者的临床预后相关, 这就意味着检测 EGFR 突变在临床治疗中起着重要作用。因此, 建立一种快速简单而经济的检测 EGFR 突变的方法能够有效缓解患者经济负担。**方法:** 通过不对称 PCR 和联合探针(APCR-JP)快速检测 EGFR 突变。本研究中收集 37 例非小细胞肺癌患者肿瘤组织进行 APCR-JP 检测。**结果:** 发现 17 例(45.9%) 19 外显子突变和 8 例(21%) 21 外显子突变, 此结果与测序结果一致。**结论:** APCR-JP 能够检测 EGFR 突变, 为临床治疗提供依据。

[关键词] 非小细胞肺癌; EGFR; 突变; 联合探针

[中图分类号] R735

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-253-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20140230

Rapid and sensitive detection of EGFR drug response mutation by Junction probe technology

Chen Xiaoqi¹, Zhao Yamin¹, Zheng Yuling², Fan Qingxia^{1*}

(¹Department of Internal Medicine-Oncology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000; ²Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation, particularly E746_A750del and L858R, is thought to be associated with clinical outcomes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) receiving TKIs treatment, suggesting that EGFR mutation test may play an important role in clinical decision. So, establishment of a rapid, simple and cost-effectiveness EGFR mutation test method can effectively relieve the financial burden of patients. **Methods:** We established a rapid and sensitive assay for detecting EGFR mutation by asymmetrical PCR and Junction Probe (APCR-JP). In this study, 37 NSCLC tissue samples were detected by APCR-JP assay. **Results:** Seventeen samples (45.9%) carried 19del mutation and 8 samples (21%) had L858R mutation, which are consistent with the results of direct sequencing. **Conclusion:** These results suggest that APCR-JP could be used in EGFR mutation detection and provide information for clinical decision.

[Key words] non-small cell lung cancer; EGFR; mutation; junction probe

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 253-259]

肺癌是当今世界最常见的恶性肿瘤之一,也是高致死率的癌症之一^[1-2]。新型抑制表皮生长因子受体(EGFR)的小分子在肺癌靶向治疗中取得了显著的进展^[3-5]。小分子酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼和厄洛替尼已批准用于晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗。酪氨酸激酶抑制剂能够结合在 EGFR 激酶结构域的 ATP-结合区,阻断激酶激活和下游信号转导^[6-7]。研究表明对吉非替尼反应良好的 NSCLC 患者存在 EGFR 基因突变^[8-9],而且突变集中在 18~21 外显子,靠近腺苷三磷酸结

合盒的区域。研究报道约 90% EGFR 突变位于 2 个热点区: 19 外显子框内缺失 15 bp 核苷酸(E746_A750del)和 21 外显子 858 密码子亮氨酸突变,成精氨酸(L858R)^[10]。EGFR 突变,尤其是 DEL 和 L858R 突变是吉非替尼敏感性强有力的预测因子,检测突变将为患者和医生采取最佳治疗措施提供重要信息^[11]。因此,建立检测突变方法,尤其是主要发生的两个突变的方法显得尤其重要。

EGFR 突变检测包括等位基因特异性 PCR 联合定量 PCR、PNA-LNA PCR clamp^[12-15]、ARMS^[12]、

TaqMan assay^[16]、qPCR using the Cycleave PCR core kit 和 specific probes^[17]、Nanofluidic Digital PCR Arrays^[18]和 high-performance liquid chromatography^[19]等。这些技术需要精密昂贵的荧光检测设备。DNA 测序被认为是金标准,但是仅能检测出 20%患者的突变。

本研究中,用非对称 PCR (asymmetrical PCR, APCR)和联合探针一起检测 EGFR 突变,尤其是检测 19 外显子 746-750 缺失和 21 外显子第 858 密码子错义突变。通过非对称 PCR 过程获得足够单链 DNA(ssDNAs),联合探针用于检测 DNA 中存在的突变。

1 材料和方法

1.1 材料

寡核苷酸(Invotrigen 公司,上海),Taq DNA 聚合酶(Promega 公司,美国),CviQ1(Bio Labs 公司,英国)。

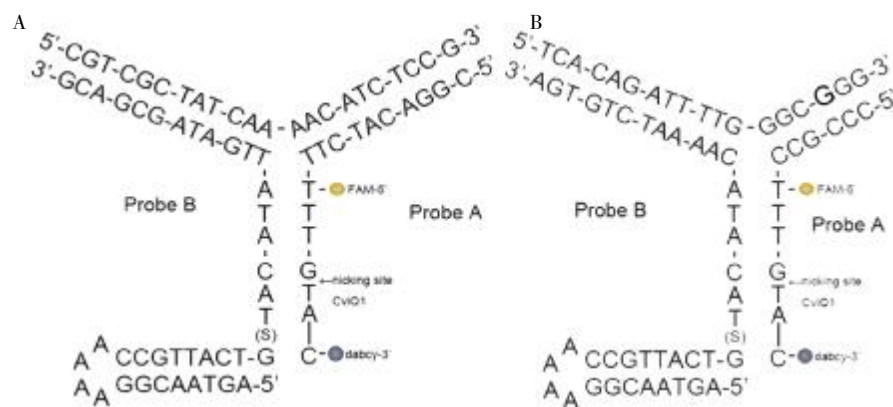
1.2 方法

1.2.1 联合探针

联合探针和模板见图 1,表 1。60 μl 反应体系:200 nmol/L B 探针,200 nmol/L A 探针,200 nmol/L 合成模板,100 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L 二硫苏糖醇,100 μg/ml BSA,1 U CviQ1。对照组不加合成模板。上述体系置于 37℃ 孵浴 20 min 后,荧光成像读板仪(Gemini EM, 美国)和单通道荧光仪(OP-162,Opulen Technology,中国)读取荧光强度。

1.2.2 APCR 方法

APCR 体系中,PCR 扩增产物越短越好。如果 APCR 扩增出来的模板 ssDNA 太长,容易形成二级



A:检测 19 外显子 E746~A750del 的联合探针;B:检测 21 外显子 L858R 突变的联合探针。

图 1 检测 EGFR 突变的引物探针体系

Figure 1 Junction probes designed for detection of EGFR mutations

结构影响联合探针与模板的结合。非对称 PCR 扩增 EGFR 19del 和 21 外显子 L858R 突变的引物见表 1。50 μl APCR 反应体系如下:30 ng 纯化的患者 DNA 样本作为模板,1.5 U Taq DNA 聚合酶,10 μl buffer 和不同浓度的上下游引物 (1:1、5:1、10:1、20:1、50:1、100:1、200:1 和 400:1), 对照组中不加模板 (图 2B)。PCR 反应条件:95℃,30 s;58℃,20 s;72℃,10 s;共 45 个循环。PCR 产物,采用 12%聚丙烯酰胺电泳,Sybgold 染色,凝胶成像系统分析。

1.2.3 组织样本收集和 DNA 提取

37 例福尔马林固定石蜡包埋肿瘤材料取自 37 例治疗前的确诊患者。组织样本 DNA 提取过程参照 Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 操作说明。

1.2.4 PCR 扩增和直接测序

扩增和直接测序简述如下:50 μl PCR 反应体

系包括 100 ng 样本 DNA,1.5 U GoTaq[®] DNA 聚合酶,1×PCR buffer,250 mmol/L dNTP,500 nmol/L 上下游引物,2.5 mmol/L MgCl₂; 引物序列和扩增条件如前述。PCR 产物纯化后,测序反应、纯化后上机,ABI 3730 (Applied Biosystems,美国)完成测序。测序结果与 GenBank 中人类 EGFR 基因序列(no. NG_007726.3)比对分析。

1.2.5 细胞系和滴定法

用稀释法在 3 株肺癌细胞系 NCI-H1650、NCI-H1975 和 NCI-A549 进行灵敏性研究。H197 细胞存在 Del 突变 (DelE746-A750)。H1795 细胞包含 L858R 突变,A549 细胞存在野生型 EGFR(22),3 株细胞 EGFR 拷贝数分别是 2、3 和 2.480 用 A549 细胞稀释 EGFR 突变细胞 (H1650 或 H1975)成不同浓度:100% (无 A549 细胞)、25%、10%、5%、1%和

表 1 检测 19del 和 L858R 突变的引物和探针
Table 1 Primers and probes for detection of 19del and L858R mutation

引物和探针	5'→3'
检测 19 del	
APCR 引物	
上游引物	ATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTA
下游引物	CATCGAGGATTCCTTGTG
直接测序引物	
上游引物	CATGTGGCACCATCTCACA
下游引物	GACCCCCACACAGCAAAG
联合探针和模板	
探针 A	CGGACATCTTT(FAM)TTGTAC(DABCY)
探针 B	AGTAACGGAAAACCGTACTG(S)TACATATTGATAGCGACG
野生型模板 (WT)	TCCCCGTCGTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGC
突变型模板 (MT)	CCCGTCGTATCAAAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC
检测 L858R	
APCR 引物	
上游引物	TGAAAACACCGCAGCATGTCA
下游引物	TCTCTTCGGCACCCAGCAGT
直接测序引物	
上游引物	CCTCACAGCAGGGTCTTCTCTG
下游引物	TGGGTGACCTAAAGCCACCTC
联合探针和模板	
探针 A	CCC GCC T(FAM)TT GTA C(DABCY)
探针 B	AGTAACGGAAAACCGTACTG(S)TACATATTGATAGCGACG
野生型模板 (WT)	CAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCTGGGTGCC
突变型模板 (MT)	CAAGATCACAGATTTTGGGCGGGCCAAACTGCTGGGTGCC

0% (无突变细胞 1)。提取不同浓度下细胞中的 DNA 用于后续 PCR。

1.2.6 APCR 和联合探针检测 EGFR 突变

50 μl APCR 反应体系包括 200 nmol/L 上游引物和 10 nmol/L 下游引物, 4 mmol/L MgCl₂, 250 mmol/L dNTPs, 1×PCR buffer, 5% 甘油, 0.3 μl *Taq* DNA 聚合酶和 50 ng 样本 DNA 或等量水。PCR 条件如下: 95 °C 预变性, 2 min, 95 °C 变性, 30 s, 58 °C 退火, 20 s, 72 °C 延伸, 10 s, 45 循环。结束后, 加入 200 nmol/L 探针, 5×buffer, 100×BSA, 1 U CviQ1, 混合物置于 37 °C 30 min, 迷你荧光仪读取荧光强度。

2 结果

2.1 JP 体系检测灵敏性和特异性

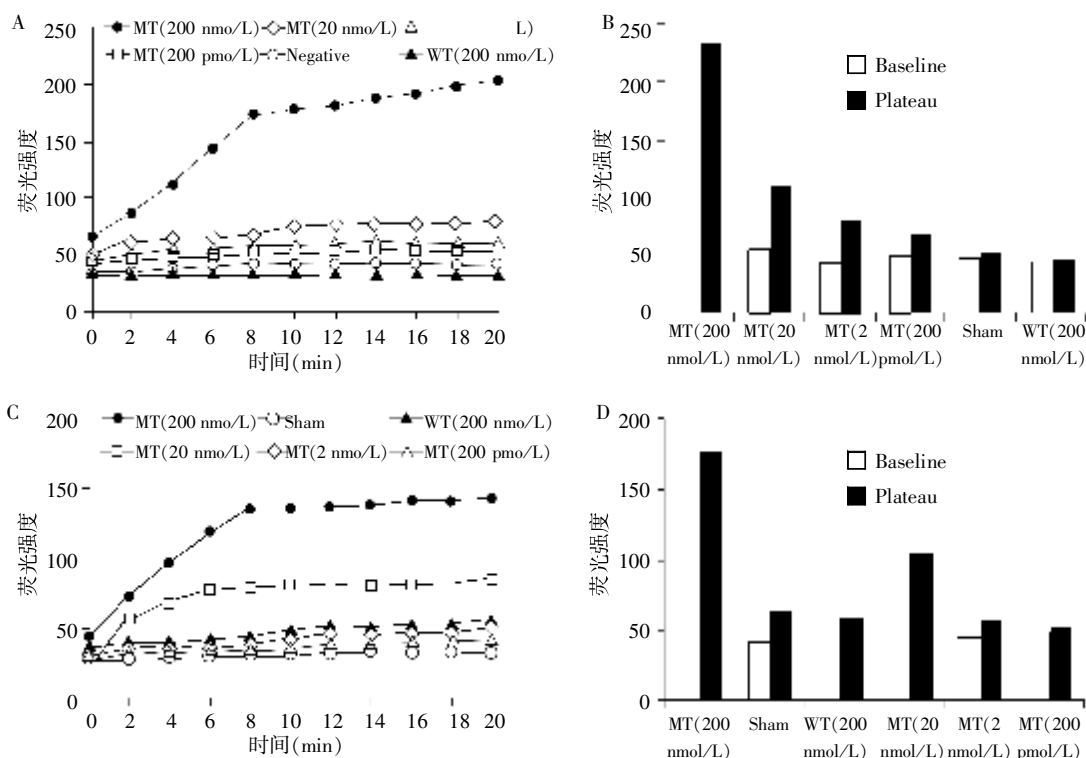
为了检测联合探针的特异性, 合成了含 L858R (图 2C, D)、19del 突变的单链 DNA 及野生型模板对照 (图 2A, B)。联合探针检测 L858R 和 19Del 突变模板的荧光强度是野生型模板的 3 倍。这些探针不能检测到野生型模板, 检测野生型模板的荧光强度与对照组相比不超过 1.5 倍, 对照组不加模板。联合

探针检测 L858R 和 19del 突变情况如图 2。联合探针反应迅速, 反应 10 min 荧光强度达到平台期 (图 2A, C)。把 PCR 管放入荧光仪读取荧光强度。荧光仪和 GM 仪一样灵敏但更方便 (图 2B, D)。

为了检测联合探针系统的灵敏性, 将合成模板 200 nmol/L 到 200 fmol/L 做 10 倍的稀释。JP 技术能够检测到 200 nmol/L 水平的模板 (图 2), 当模板浓度不到 20 nmol/L, 对照组和加模板组荧光强度无差异, 跟之前 50 pmol/L 的报道不同。探针 A 和探针 B 最佳比率是 1:1, 增加探针浓度和反应时间没有显著提高荧光强度, 当探针 A 浓度越高, 背景干扰越强烈。因此 JP 技术应用于分子诊断是一个不错的信号系统。

2.2 扩增和 APCR-JP 检测 EGFR 突变

JP 技术缺陷是灵敏度低, 在信号系统中, 最低检测线为 nmol/L 水平的单链。样本中提取的 DNA 浓度很低, 很难达到 JP 技术的最低检测线。然而, 通过 APCR 能够方便有效的获得成千上万的单链 DNA。APCR 产物越短越好, 较长的单链 DNA 更易于形成二级结构阻止联合探针与目的模板结合。考



A,B:检测 EGFR L858R;C,D:检测 EGFR 19del;A,C:动态检测 JP 反应体系中荧光强度;B,D:反应达到平台期时,迷你酶标仪检测到的荧光强度。

图 2 联合探针(JP)检测 EGFR 突变的特异性和灵敏度

Figure 2 Specificity and sensitivity of Junction probes designed to detect EGFR mutations

考虑到PCR 限制及引物设计要求, 选择了 66 bp 的 L858R 扩增子和 90 bp 的 19del 扩增子。为达到最大效率地扩增单链 DNA, 上游引物浓度保持在 300 nmol/L, 50 μ l 反应体系中上下游引物比率为: 1:1、5:1、10:1、20:1、50:1、100:1、200:1 和 400:1, 用 12% 的凝胶电泳和 Sybgold 染色分析产物。当引物比率为 5:1、10:1、20:1 和 50:1 时, 能明显观察到单链 DNA, 因为 90 bp 的 19del 单链 DNA 产物, 二级结构较 90 bp 双链 DNA 复杂, 电泳过程中, 移动速率比较慢, 因此电泳图上, 90 bp 单链出现于双链上方 (图 3C)。L858R 扩增子比较短(约 70 bp), 因此单链泳动速度快于双链 DNA (图 3A)。联合探针技术非对称 PCR 产物, 当引物浓度比为 10:1 时, 荧光强度达到最大, 高于阳性对照组, 是阴性对照组的至少 3 倍; 当浓度比率为 1:1 时, 能观察到少量单链 DNA, 荧光强度与阴性对照相同。因此确定上下游引物最佳比率是 10:1, 即 50 μ l APCR 反应体系中上下游引物浓度是 300 nmol/L 和 30 nmol/L (图 3)。

对于细胞系和滴定法, APCR-JP 法能够检测到 5% 突变细胞 (图 4)。而直接测序法难于检测到少于 25% 突变细胞, 如图 4A 所示, 突变细胞含量为 25%

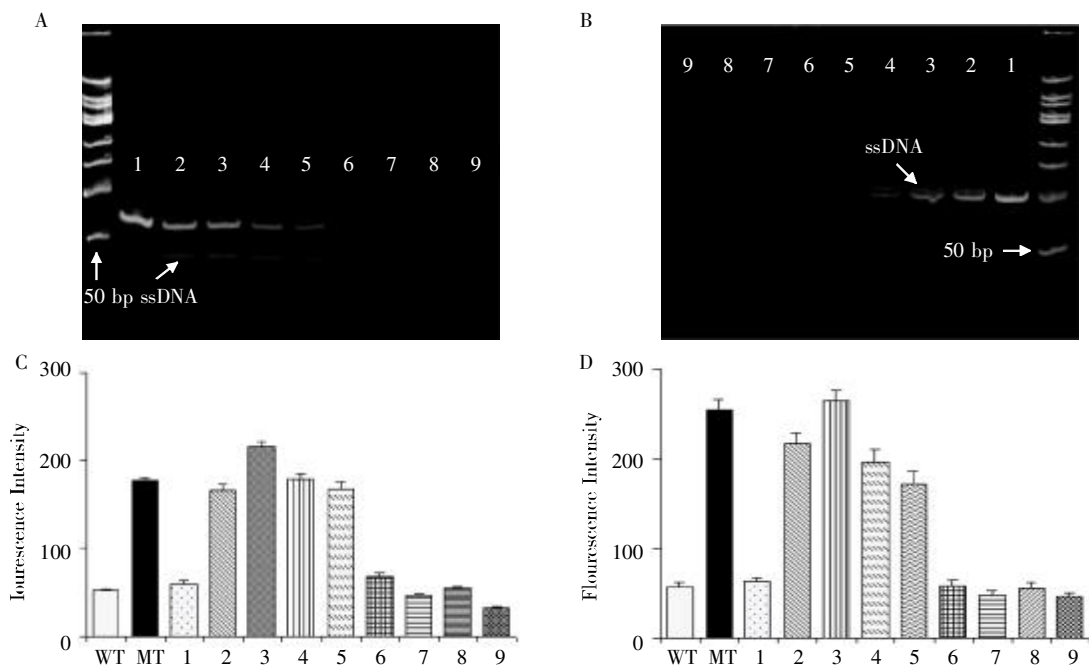
时, T>G 杂合峰出现; 突变细胞少于 25%, 杂合峰几乎看不见; 实际上, 直接测序只能清楚分辨 50% 的突变细胞, 而且复杂耗时。总之, APCR-JP 法简单快速经济。

2.3 APCR-JP 检测临床样本

37 例样本收集于郑大一附院胸外科, 行 APCR-JP 技术和直接测序法检测突变。17 例 (45.9%) 存在 A746~E750del 突变, 8 例 (21%) L858R 突变, 结果与直接测序一致 (表 2)。

3 讨论

联合探针技术通过模板增强杂交过程(template enhanced hybridization process, TeHyP) 来实现, 联合探针采用 2 个探针, 即探针 A 和探针 B, 探针 A 和 B 之间有 7 个碱基互补序列, 这个序列包含一个 CviQ1 酶切位点 (图 1), 在小于 40 $^{\circ}$ C 的温度时彼此不杂交, 限制性内切酶不能发挥作用; 当有目的模板存在的时候, 探针 A 和 B 与模板结合, 形成类似于字母“Y”形结构, 酶切位点产生, 限制性内切酶识别酶切位点并切下淬灭探针, 信号产生^[20-21], 此技术发展成熟并被应用^[23-24]。探针 B 起锚定作用, 与目的核酸稳定杂交, 促使探针 A 发挥功能。探针 A 可以命



L858R(A) 和 19del(B)分别设计引物;引物浓度(1~8)1:1、5:1、10:1、20:1、50:1、100:1、200:1、400:1,9 是 PCR 阴性对照;浓度为 5:1、10:1、20:1 和 50:1 时,很容易检测到 ssDNA;浓度为 10:1 时,荧光强度最大,L858R(C),19del(D)。

图 3 APCR-JP 方法扩增和检测 EGFR 突变

Figure 3 Amplification and detection of EGFR mutations by APCR-JP assay.

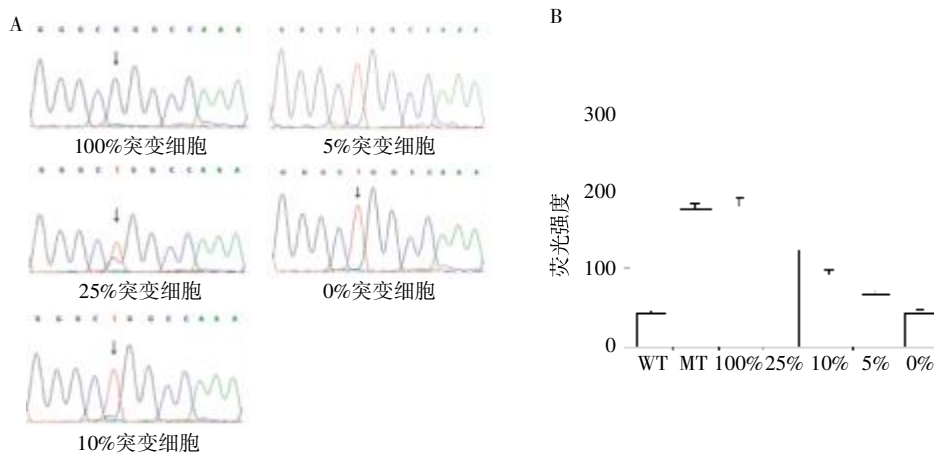


图 4 直接测序法(A)和 APCR-JP 体系(B)检测 L858R 细胞含量

Figure 4 Titration assay of L858R cell line was detected by directly sequencing (A) and APCR-JP system (B)

名为分辨探针,含有 7~8 个碱基与模板结合,联合探针系统能够鉴别单碱基错配。检测 L858R 突变,探针 A 与模板的杂交序列减少至 6 个碱基,因为 GC 含量高(图 1A)。检测 19del 突变,探针 A 易于设计(图 1B)。另一个相似的技术是 3wj(three way junction)引物技术,引物和模板形成 Y 形连接。检测单碱基错配,联合探针更灵敏。因此发展联合探针来检测单碱基错配。

EGFR 在多种肿瘤中起着重要的作用,包括肺,而且在肿瘤进展中表现出关键性的作用。小分子酪

氨酸激酶抑制剂吉非替尼和厄洛替尼靶向 EGFR 治疗进展期非小细胞肺癌已被批准。这些抑制剂通过完全与激酶结构域 ATP-结合区结合靶向 EGFR 激酶受体,因此阻断激酶激活和下游信号通路。主要在 19 外显子 E746~A750Del 和 21 外显子 L858R 的 EGFR 突变存在潜在的预测值。处于进展期的 EGFR 突变患者接受 TKI 治疗受益更大^[8-9,18,26]。

我国 19del 和 L858R 突变非常普遍,其他突变如 T790M、G719A/S 很少。因此本研究主要研究检测这 2 个突变的方法。标准 DNA 测序法“Sanger”测

表2 APCR-JP法和直接测序法检测临床样本

Table 2 Comparison of APCR-JP system and direct sequencing in detection Clinical samples

EGFR 突变	直接测序法	APCR-JP 法
L858R		
患者总数	37	37
突变	8	8
未突变	29	26
未检测出	0	3
19del		
患者总数	37	37
突变	17	17
未突变	20	19
未检测出	0	1

序检测突变需要 10%~25% 的丰度范围,这要依赖于肿瘤组织和 DNA 材料的质量^[27]。其他方法例如焦磷酸测序、荧光定量 PCR (qPCR)、包含 loop-hybrid PCR 法; 等位基因特异性 PCR 联合 qPCR、肽核酸 (PNA)-锁核酸 (LNA) PCR clamp^[12-15]、ScorpionTM amplification-refractory 突变系统^[12]、TaqMan 法^[16]、qPCR 应用 Cycleave PCR core kit 和特异探针^[17]、Nanofluidic 数字 PCR 法^[18]和高效液相层析^[19]等。所有以上方法,DNA 测序和 qPCR 有着相似的特点即费用高、需要精密仪器和建立平台。因此研究一种快速经济的检测 19del 和 L858R 突变方法很必要。

联合探针是一种等温扩增技术,与其他等温 DNA 扩增如 SDA、TMA、Cross Primer、NASBA 等相比,能在更低的杂交温度(37℃)检测单碱基错配^[20-21]。但联合探针技术不能检测到双链 DNA,而且单链 DNA 浓度低于 20 nmol/L,荧光强度变化不显著。为了获得大量单链 DNA,APCR 用于扩增单链 DNA,联合探针系统用于检测。为了扩增 EGFR19del 和 L858R 突变,采用 APCR 获得的单链 DNA,L858R 约 70 bp,19del 约 90 bp,越短越好,因为较长的单链 DNA 易于形成二级结构阻止检测。本研究发现当上下游引物比为 5:1、10:1、20:1 和 40:1 时,能观察到单链 DNA,然后用联合探针分析,当引物比为 10:1 的时候,荧光强度达到最大。因此当上游引物浓度为 300 nmol/L 下游引物为 30 nm 时能获得大量的单链 DNA 和荧光强度(图 3)。评估灵敏性,APCR-JP 法能够检测到 5% 突变细胞。而直接测序法难以检测到 25% 以下的突变细胞。实际上,直接测序法仅能检测高达 50% 突变细胞,而且过程复杂耗时。总之,APCR-JP 法简单且高灵敏性,可以用于分子诊断。37 例样本中,APCR-JP 检测到 17 个样本

(45.9%) 19del 突变和 8 个样本(21%) L858R 突变,结果与直接测序法一致。尽管 APCR-JP 法没有 ARMS 技术 1% 的检测精度灵敏,而且依赖于荧光检测突变,但是该法只需要简单经济的 PCR 和迷你荧光仪而非精密昂贵的荧光检测设备如 ABI 7500 PCR。

本研究设计联合探针检测 EGFR 突变并验证联合探针技术是检测单碱基错配的信号系统,可以与其他方法联合例如 APCR,获得足够单链 DNA,将会是一种简单经济应用广泛的分子诊断技术。

[参考文献]

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2):74-108
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2):71-96
- [3] Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers[J]. Int J Cancer, 2006, 118(2):257-262
- [4] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3):169-181
- [5] Ciardiello F, Tortora G. Egfr antagonists in cancer treatment[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11):1160-1174
- [6] Rachid Z, Macphee M, Williams C, et al. Design and synthesis of new stabilized combi-triazenes for targeting solid tumors expressing the epidermal growth factor receptor (egfr) or its closest homologue her2[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(18):5505-5509
- [7] Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, et al. Egfr targeting of solid tumors[J]. Cancer Control, 2007, 14(3):295-304
- [8] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med, 2004, 350(21):2129-2139
- [9] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. Egfr mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676):1497-1500
- [10] Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. Egf receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(36):13306-13311
- [11] Riely GJ, Politi KA, Miller VA, et al. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24):7232-7241
- [12] Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, et al. Detection of

- epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12 (13):3915-3921
- [13] Sutani A, Nagai Y, Udagawa K, et al. Gefitinib for non-small-cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor gene mutations screened by peptide nucleic acid-locked nucleic acid pcr clamp [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(11):1483-1489
- [14] Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, et al. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98 (2):246-252
- [15] Nagai Y, Miyazawa H, Huqun, et al. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid pcr clamp [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (16): 7276-7282
- [16] Hsieh MH, Fang YF, Chang WC, et al. Complex mutation patterns of epidermal growth factor receptor gene associated with variable responses to gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2006, 53(3):311-322
- [17] Yoshida K, Yatabe Y, Park JY, et al. Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2007, 2 (1): 22-28
- [18] Wang J, Ramakrishnan R, Tang Z, et al. Quantifying egfr alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital pcr arrays [J]. *Clin Chem*, 2010, 56(4):623-632
- [19] Janne PA, Borras AM, Kuang Y, et al. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(3 Pt 1):751-758
- [20] Nakayama S, Yan L, Sintim HO. Junction probes - sequence specific detection of nucleic acids via template enhanced hybridization processes [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(38):12560-12561
- [21] Yan L, Nakayama S, Yitbarek S, et al. Isothermal detection of rna with restriction endonucleases [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2011, 47(1):200-202
- [22] Nomoto K, Tsuta K, Takano T, et al. Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high-resolution melting analysis [J]. *Am J Clin Pathol*, 2006, 126(4):608-615
- [23] Ji H, Yan F, Lei J, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of nucleic acids by template enhanced hybridization followed with rolling circle amplification [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(16):7166-7171
- [24] Li J, Qi XJ, Du YY, et al. Efficient detection of secondary structure folded nucleic acids related to alzheimer's disease based on junction probes [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 36(1):142-146
- [25] Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M. Sensitive rna detection by combining three-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(3):e22
- [26] Armour AA, Watkins CL. The challenge of targeting egfr: Experience with gefitinib in nonsmall cell lung cancer [J]. *Eur Respir Rev*, 2010, 19(17):186-196
- [27] Gately K, O'Flaherty J, Cappuzzo F, et al. The role of the molecular footprint of egfr in tailoring treatment decisions in nscl [J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(1):1-7

[收稿日期] 2013-08-13