

· 技术与方法 ·

一种 EGFR 基因突变检测方法的建立及初步应用

王倩¹, 罗凯^{2△}

(1. 广州市中医医院病理科, 广东广州 510130; 2. 广州医科大学附属肿瘤医院, 广东广州 510095)

摘要:目的 建立一种表皮生长因子受体(EGFR)基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测方法, 并初步探讨其临床应用价值。方法 以 EGFR 基因热点突变区域 19、21 外显子为研究位点设计特异性扩增、测序引物, 利用已知野生型、突变型样品, 以 TA 克隆技术构建相应质粒作为标准品, 建立 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测方法, 并进行方法学和应用评估。结果 成功构建了 EGFR 基因 19、21 外显子野生型、突变型质粒。建立了 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测方法, 该方法灵敏度高(10^1 copy/ μ L), 重复性好(19、21 外显子实时荧光定量 PCR 部分批内、批间变异系数分别为 1.42%、3.52% 和 0.97%、2.44%)。该法与传统 Sanger 测序法同时检测 20 份临床样品, 结果完全相符。结论 成功建立了可用于临床样品检测的 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测方法。

关键词:受体, 表皮生长因子; 突变; 基因测序; 实时荧光定量聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)11-1351-03

Establishment of a method for detecting EGFR gene mutations and its preliminary application

Wang Qian¹, Luo Kai^{2△}

(1. Department of Pathology, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510130 China;

2. Affiliated Cancer Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510095, China)

Abstract: Objective To establish a method for detecting the EGFR gene mutations by the real-time fluorescence quantification PCR combined with Sanger sequencing and to preliminarily explore its clinical application value. Methods With EGFR gene hotspot mutations region exon 19 and 21 as the research locus, the specific amplification and the sequencing primer were designed, the known wild-type and mutant samples were utilized to construct the corresponding plasmid as the standard substance by the TA clone technique. Then the EGFR gene mutation detection method by the real-time fluorescence quantification PCR combined with Sanger sequencing was established and the methodological and the application evaluation were performed. Results The wild-type and mutant standard plasmids of the EGFR gene exon 19 and 21 were constructed successfully. The EGFR gene mutations detection method of the real-time fluorescence quantification PCR combined with Sanger sequencing was established, which had high sensitivity(10^1 copies/ μ L) and good repeatability(intra-assay CV and inter-assay CV of the real-time fluorescence quantification PCR of exon 19 and 21 were 1.42% /3.52% and 0.97% /2.44%, respectively). 20 clinical samples were simultaneously detected by this method and the traditional Sanger sequencing, the results were completely consistent. Conclusion The EGFR gene mutations detection method of the real-time fluorescence quantification PCR combined with Sanger sequencing is successfully established, which can be used in the clinical sample detection.

Key words: receptor, epidermal growth factor; mutation; gene sequencing; real-time polymerase chain reaction

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因位于人类 7 号染色体短臂 7P12-14 区, 含 28 个外显子, 编码相对分子质量为 170×10^3 的跨膜糖蛋白受体。当 EGFR 与相应配体结合后可引起自身细胞内酪氨酸激酶区的磷酸化, 然后通过多条下游信号通路将信号传递到细胞核内, 介导细胞生长、增殖、分化等一系列过程。在人类许多上皮性肿瘤中 EGFR 常常表现为异常激活, 这种激活与肿瘤细胞的增殖、转移、侵袭和新生血管生成等过程相关, 因此, EGFR 已成为肿瘤靶向治疗的重要靶点之一。目前, 晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者预后较差, 采用常规化疗药物治疗平均生存期小于 1 年^[1]。近来, 以 EGFR 细胞内酪氨酸激酶区为靶点的小分子靶向药物酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)已应用于晚期 NSCLC 的治疗。相关研究表明, NSCLC 患者体细胞 EGFR 基因酪氨酸激酶区突变与 TKI 治疗的敏感性相关, 突变患者有效率达 70%, 非突变患者仅 10%^[2-3]。因此, NSCLC 患者 TKI 治疗前检测 EG-

FR 基因酪氨酸激酶区突变具有重要意义。EGFR 基因酪氨酸激酶区突变主要发生在 18~21 号外显子上, 其中 19、21 号外显子突变约占 90%, 是 EGFR 基因酪氨酸激酶区突变的主要检测位点^[4-5]。传统 Sanger 测序法是基因突变检测的经典方法, 可检测已知与未知突变, 具有结果准确、重复性好等优点, 但同时也存在灵敏度低、步骤多、耗时长、易污染的缺点^[6]。因此, 对传统 Sanger 测序突变检测方法进行优化十分必要。SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法是一种简便、快速、灵敏、成本低的基因扩增检测方法^[7]。本研究以 EGFR 基因 19、21 外显子为检测靶点, 将 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法与 Sanger 测序法相结合, 拟建立 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测方法并探讨其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集已确诊的 NSCLC 患者 20 例, 男 13 例, 女 7 例; 年龄 38~82 岁, 中位 54 岁。20 份肿瘤组织样品中石蜡切片样品 15 份, 新鲜组织样品 5 份。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 DNA 提取试剂盒为北京天根的口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒;实时荧光定量 PCR 试剂为大连宝生物的 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒;测序试剂为美国 ABI 的 BigDye 3.1 试剂盒;实时荧光 PCR 仪为美国 ABI 的 7500Fast;测序仪为美国 ABI 的 3130xl。

1.2.2 实验引物 依据 GENE BANK 中 EGFR 基因的参考序列(NG_007726.2),利用 Primer 5.0 设计 EGFR 基因 19、21 外显子扩增引物,并以上游引物作为测序引物,由上海 Invitrogen 公司合成。19 外显子上游引物:5'-TAT CAG CCT TAG GTG CG-3',下游引物:5'-CTG CCA GAC ATG AGA AAA-3',产物长度 314 bp;21 外显子上游引物:5'-CGT TCG CCA GCC ATA A-3',下游引物:5'-TGA CCT AAA GCC ACC TCC-3',产物长度 305 bp。

1.2.3 标准品制备 取已经测序鉴定为 EGFR 基因 19 外显子(Del E746→A750,Del2236G→2250A)、21 外显子(L858R,Sub2573T→G)突变的 NSCLC 样品各 1 份,PCR 扩增相应突变样品的 19、21 外显子,产物割胶纯化后克隆于大连宝生物 PMD-19 质粒,测序鉴定克隆成功与否并分离野生型与突变型质粒分别作为野生型标准品和突变型标准品。

1.2.4 性能评价实验 分别取 19、21 外显子野生型标准品按 10 倍比例稀释为标准品梯度,各梯度做批间重复性实验 3 次,每次批间实验设置 3 个复管,PCR 产物测序鉴定,以此评估实验的灵敏度、批间和批内重复性。取同浓度(10^5 copy/ μ L)19 外显子突变型标准品和野生型标准品按一定比例混合制备含不同突变比例的模板系列(突变比例:100%、50%、30%、20%、10%、5%、1%、0%),进行实时荧光定量 PCR-Sanger 测序法检测,以评价其检测突变杂合比例的范围。取 21 外显子突变型标准品和野生型标准品做相同实验。

1.2.5 样品 DNA 提取 按试剂盒说明书提取样品 DNA,微量分光光度计测定样品 DNA 含量与纯度。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 反应及产物纯化 反应体系:SYBR Premix Ex Taq 10 μ L、ddH₂O 4 μ L、上游引物(5 pmol/ μ L)2 μ L、下游引物(5 pmol/ μ L)2 μ L、样品 DNA 2 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s(采集荧光),45 个循环;融解曲线。产物纯化:取 PCR 产物 5 μ L 加入 2 μ L 北京鑫诺 SAP 酶混合物混匀,37 $^{\circ}$ C 1 h,80 $^{\circ}$ C 15 min。

1.2.7 PCR 产物测序 测序反应体系:纯化 PCR 产物 3 μ L、Bigdye3.1 1 μ L、上游引物(5 pmol/ μ L)2 μ L。反应条件:96 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;96 $^{\circ}$ C 变性 10 s,50 $^{\circ}$ C 退火 5 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 4 min,25 个循环;12 $^{\circ}$ C 恒温,醋酸钡乙醇纯化测序反应产物。

1.2.8 测序结果分析 所得序列图采用 Chromas 2.23 软件通过与 NCBI 基因库 EGFR 基因标准序列比对,分析测序结果。与传统 Sanger 测序法进行比对;以北京鑫诺 EGFR 基因突变测序检测试剂盒平行检测 20 份临床样品,对比分析结果。

2 结果

2.1 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测法的建立 以经测序鉴定为 19 外显子 Del E746→A750 突变、21 外显子 L858R 突变的 NSCLC 样品各 1 份为模板分别进行相应指标的实时荧光定量 PCR 扩增,可见 19、21 外显子的阳性扩增曲线和对应的单一溶解曲线峰(19、21 外显子扩增产物解链温度分别为:86.25、87.94 $^{\circ}$ C);2%琼脂糖电泳鉴定 PCR 产

物可见 314 bp 和 305 bp 的单一电泳条带;PCR 产物继续上机测序可见所测序列与 EGFR 基因目标扩增序列完全相符,同时可见相应样品 19 外显子 Del E746→A750 突变、21 外显子 L858R 突变。以上结果表明,EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测法已初步建立,见图 1~4。

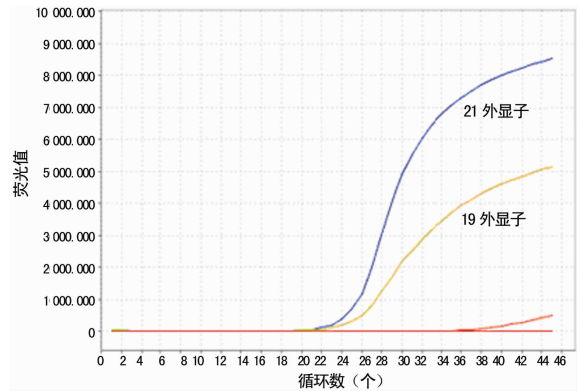


图 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线图

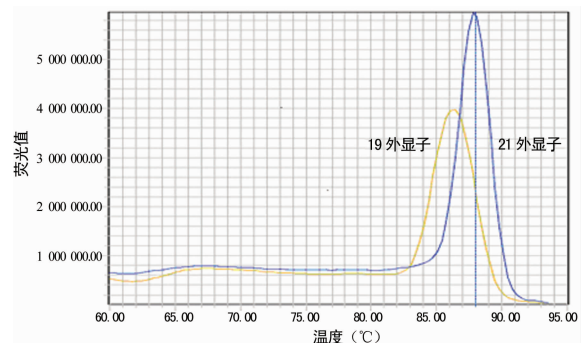
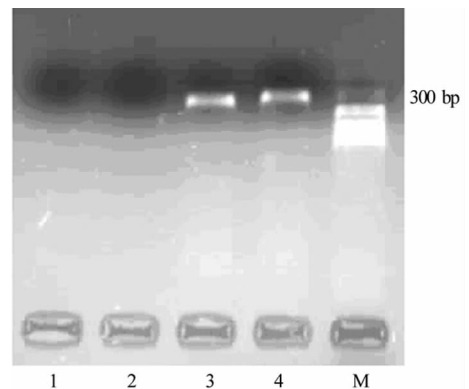


图 2 融解曲线图



1:19 外显子阴性对照;2:21 外显子阴性对照;3:19 外显子样品;4:21 外显子样品;M:标记物。

图 3 PCR 产物电泳鉴定图(北京天根 Marker I)

2.2 标准品的鉴定 测序鉴定 19、21 外显子野生型重组质粒标准品插入片段序列与 EGFR 基因参考序列(NG_007726.2)完全一致,换算浓度为 3.09×10^{10} copy/ μ L、 7.34×10^{10} copy/ μ L。测序鉴定 19、21 外显子突变型重组质粒标准品插入片段分别为 EGFR 基因 19 外显子 Del E746→A750 突变片段和 21 外显子 L858R 突变片段,换算浓度为 4.78×10^{10} copy/ μ L、 1.79×10^{10} copy/ μ L。

2.3 检测范围与灵敏度分析 将 19、21 外显子野生型标准品分别按 10 倍稀释为 $3.09 \times 10^7 \sim 3.09 \times 10^1$ copy/ μ L 和 $7.34 \times 10^7 \sim 7.34 \times 10^1$ copy/ μ L 浓度梯度,做实时荧光定量

PCR 反应并拟合定量标准曲线, 19、21 外显子标准曲线的 R² 值分别为 0.996 和 0.995, 可见该荧光定量 PCR 体系为 10⁷ ~ 10¹ copy/μL 线性良好, 灵敏度达 10¹ copy/μL。同时各野生型标准品梯度 PCR 产物均成功完成后续测序检测。以上结果显示本 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测方法的灵敏度达 10¹ copy/μL。

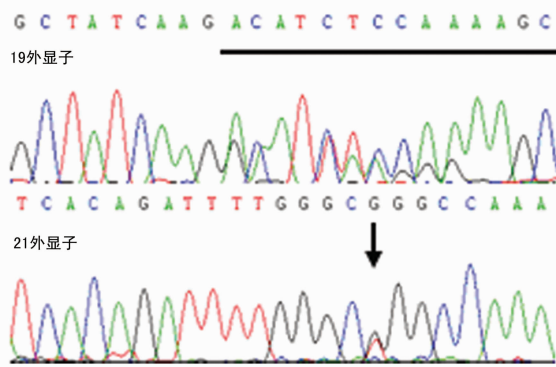


图 4 PCR 产物测序鉴定图

2.4 重复性分析 在荧光定量 PCR 体系为 10⁷ ~ 10² copy/μL 梯度时, 19 外显子野生型标准品各反应曲线 CT 值的批内、批间平均变异系数分别为 1.42%、3.52%; 21 外显子野生型标准品各反应曲线 CT 值的批内、批间平均变异系数分别为 0.97%、2.44%。19、21 外显子重复性实验中各随机抽取一组标准品梯度的 PCR 产物均成功完成后续测序检测。结果表明该法具有良好的重复性。

2.5 突变杂合比例的检出能力分析 当突变杂合比例在 20% 以上时, 测序图谱中的突变信号清晰可辨, 而低于 20% 时, 则仅见野生型序列信号。可见, 本荧光定量 PCR-Sanger 测序法可检出低至 20% 的突变存在。

2.6 比对实验结果 实时荧光定量 PCR-Sanger 测序法、常规 Sanger 测序法平行检测 NSCLC 样品 20 份, 两种方法检测结果完全相符。其中 19 外显子 Del E746 → A750 (Del2235G → 2249C) 突变 2 例、Del E746 → A750 (Del2236G → 2250A) 突变 1 例, 21 外显子 L858R (Sub2573T → G) 突变 5 例, 总体突变率为 40%。

3 讨论

在很多恶性肿瘤中存在突变型 EGFR, EGFR 突变后往往呈现配体非依赖性的异常持续活化, 导致下游信号传导通路的异常激活。异常激活的信号传导通路一方面促进细胞不断增殖、凋亡受阻, 另一方面促进大量新生血管的生成, 从而在肿瘤细胞的形成、增殖、转移和侵袭中发挥重要作用。近年来 EGFR 已成为抗肿瘤靶向治疗的主要靶点之一。目前, EGFR 基因突变检测对于 TKI 治疗晚期 NSCLC 的疗效预测具有重要意义。NCCN 肿瘤学临床实践指南中国版 (2011 版) 指出复发和转移的晚期 NSCLC 患者均推荐检测 EGFR 基因突变状态。

当前, 检测基因突变的主要方法有 Sanger 直接测序法、实时荧光 PCR 法 (Taqman 实时荧光定量 PCR、探针扩增阻滞突变系统等)、高分辨率溶解曲线分析法等, 这些方法各有优缺点, 对于哪种方法更有优势尚未达成共识^[8]。其中 Sanger 直接测序法是已进入临床并被广泛应用的方法。在 Sanger 直接测序法检测肿瘤组织基因突变时, 由于肿瘤组织具有异质性且常有正常细胞掺杂, 当野生型 DNA 比例过高时可能会导致突变型 DNA 无法检出。相关文献报道, 直接测序法可检出样品

中 10% ~ 25% 的突变基因^[8-9]。本研究建立的 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测法可检出样品中 20% 的突变基因, 与传统直接测序法一致。

传统的 Sanger 直接测序法检测突变首先利用定性 PCR 将目的片段扩增, 然后电泳鉴定扩增效果, 如见单一目的片段扩增产物条带, 则对产物进行测序分析, 如未见相应条带则无法进行后续测序实验。以上模式存在一些弊端影响临床应用: (1) 电泳鉴定 PCR 产物灵敏度低、易污染、步骤多。SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 是一种灵敏、简便、快速的基因扩增检测方法, 其利用在 PCR 反应体系中加入的 SYBR Green I 荧光染料只与双链 DNA 结合发出荧光从而实时显示反应体系中产物数量的原理实现了对 PCR 扩增效果的灵敏、实时的检测, 同时溶解曲线分析步骤还可监测反应的特异性。本研究利用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 替代传统的定性 PCR 加电泳步骤建立了实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测法。该法重复性好、过程简化、时间缩短、避免了电泳时可能产生的大量产物气溶胶污染, 其灵敏度达到了 10¹ copy/μL, 较传统 Sanger 直接测序法高, 可更好的检测低浓度样品。(2) 定性 PCR 加电泳模式无法定量检测样品模板量, 而测序反应中加入过多的 PCR 产物会导致测序峰图异常影响突变结果的分析。SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 可定量检测样品模板浓度从而指导测序反应步骤的产物加入量以获得理想的测序峰图。

相关研究报告显示, 亚裔人 NSCLC 患者的 EGFR 基因突变率约 30% 左右, 在中国人中可达 50%^[10-12]。本研究利用 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测法检测 20 例 NSCLC 患者样品, 突变率为 40%, 与相关报道相符。本研究还利用基于传统 Sanger 测序法的商品化突变检测试剂盒平行检测同批样品的 EGFR 基因突变情况, 两种方法结果完全相符。表明 EGFR 基因实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测法可用于临床样品的检测。

与传统 Sanger 测序突变检测方法相比, 实时荧光定量 PCR-Sanger 测序突变检测法具有步骤简、时间短、污染少、灵敏度高和可定量检测样品浓度等优点, 具有更好的临床应用价值。

参考文献:

- [1] 王鑫, 支修益. 2009 年非小细胞肺癌靶向治疗新进展[J]. 中国处方药, 2010, 8(4): 42-44.
- [2] 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.
- [3] Armour AA, Watkins CL. The challenge of targeting EGFR: experience with gefitinib in nonsmall cell lung cancer [J]. Eur Respir Rev, 2010, 19(117): 186-196.
- [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] Tam IY, Chung LP, Suen WS, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(5): 1647-1653.
- [6] 高云, 陈嘉昌, 朱振宇, 等. EGFR 基因 (下转第 1356 页)

3 讨 论

肺纤维化是成纤维细胞受到化学性或物理性伤害时分泌胶原蛋白进行的组织修复,肺间质组织由胶原蛋白、弹性素及蛋白糖类构成^[8-12]。目前还少有关直接反应肺纤维化检测程度的血清指标的报道。HYP 作为胶原蛋白中的主要成分之一,测定其在肺组织中的水平能反映胶原的代谢情况,进而能客观反应肺组织纤维化程度。寻找一种准确可靠的测定肺组织中 HYP 水平的方法,对于筛选预防与治疗肺纤维化的药物具有重要意义^[13-17]。

目前关于肺组织 HYP 水平测定的报道较少,本文在参考了文献[5-6]建立的 HYP 水平测定方法的基础上,对酸水解时间、氧化时间、显色时间等条件进行优化,研究发现,在 110 ℃ 条件下用 7.50 mol HCl 水解肺组织 16 h, HYP 测定水平即达到最高,与李文才等^[5]报道中 120 ℃ 条件下 6 mol HCl 水解 28 h 条件相比,提高了酸的浓度,缩短了水解时间。针对酸水解后溶液 pH 值对结果的影响,本研究采取了过夜烘干的方法,避免了调节溶液 pH 值的繁琐,操作更为简便,更适合大批量样本测定。关于氧化与显色时间,经过优化得出最佳条件为氯胺 T 常温氧化 10 min, 60 ℃ 显色 25 min, 与刑玉梅等^[6]关于尿 HYP 测定方法报道中相比,氧化时间缩短了 10 min, 显色时间相近。酶标板上冷却与室温冷却 10 min 结果无差异,因此,本研究认为可以省去冰浴冷却的繁琐,室温冷却更为方便快捷。本研究方法灵敏度为 0.067 μg/mL, 回收率为 88.85%~110.88%, 批内与批间实验均显示重现性较好。本方法在博莱霉素诱导大鼠肺纤维化的研究中得到了很好的应用,经测定模型组 HYP 水平明显高于对照组,验证了博莱霉素的肺纤维化诱导作用。

参考文献:

- [1] 刘芳,李德富,林炜. 羟脯氨酸水平的测定方法与应用[J]. 中国皮革, 2007, 36(15): 51-54.
- [2] Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, et al. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition[J]. J Biomed Master Res, 1980, 14(2): 107-132.
- [3] Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein sample containing small proportions of this amino acid[J]. Arch Biochem Biophys, 1961(93): 440-447.
- [4] 魏东,陈文慧. 羟脯氨酸水平的测定方法优化[J]. 现代中

西结合杂志, 2005, 14(18): 2479-2480.

- [5] 李文才,张锦生,李华,等. 肝组织羟脯氨酸水平测定方法的优化[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(4): 295-297.
- [6] 刑玉梅,白薇. 尿羟脯氨酸测定方法的质量控制[J]. 山西医药杂志, 2001, 30(3): 264-265.
- [7] 郭勇,邵士俊,何丽君,等. Meso-四甲基-meso-四对氨基苯基杯[4]吡咯的合成及表征[J]. 化学试剂, 2002, 24(6): 344-345.
- [8] Samah M, El-Aidy Ael-R, Tawfik MK, et al. Evaluation of the antifibrotic effect of fenofibrate and rosiglitazone on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 689(1/2/3): 186-193.
- [9] 齐曼古丽. 吾守尔,夏宇,巴哈尔古丽. 米吉提,等. 博莱霉素致大鼠肺纤维化模型的建立方法及比较[J]. 新疆医科大学学报, 2005, 28(6): 495-498.
- [10] 蒋之,万珂,肖霞. 苦参碱对肺纤维化大鼠肺组织 HYP 与 HGF 表达的影响[J]. 实用预防医学, 2011, 18(6): 998-1001.
- [11] 曾鸣,刘丹. 雾化吸入布地奈德对肺纤维化大鼠肺组织羟脯氨酸和 I、III 星胶原 mRNA 表达的影响[J]. 四川医学, 2008, 29(10): 1293-1295.
- [12] 柴文成,李永春,刘玉玲,等. 博莱霉素致肺纤维化大鼠形态学变化的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(2): 77-80.
- [13] 陈丽,吴本清,涂惠英. 博莱霉素制备新生 SD 大鼠慢性肺部疾病模型[J]. 广东医学, 2012, 33(8): 1087-1089.
- [14] Babin AL, Cagnet C, Gérard C, et al. Noninvasive assessment of bleomycin-induced lung injury and the effects of short-term glucocorticosteroid treatment in rats using MRI[J]. J Magn Reson Imaging, 2011, 33(3): 603-614.
- [15] 刘凤民,李同树. 鸡肉羟脯氨酸水平测定及其嫩度比较[J]. 中国禽业导刊, 2003, 20(6): 17.
- [16] 王再华. 血清羟脯氨酸测定及影响因素[J]. 医学检验进修杂志, 1997, 4(4): 158-159.
- [17] 许志勤,高兰兴. 组织羟脯氨酸测定方法的改进[J]. 解放军预防医学杂志, 1990, 8(1): 40-42.

(收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2013-12-12)

(上接第 1353 页)

- 突变及其检测方法的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1): 51-57.
- [7] 王梁燕,洪奇华,张耀洲. 实时定量 PCR 技术及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(1): 62-67.
- [8] 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.
- [9] 张树鹏,赖仁胜,林路加,等. 直接测序法检测结肠癌 K-ras 基因的灵敏度确认及评估[J]. 山东医药, 2011, 51(11): 31-33.

- [10] Sahoo R, Harini VV, Babu VC, et al. Screening for EGFR mutations in lung cancer, a report from India[J]. Lung Cancer, 2011, 73(3): 316-319.
- [11] Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2006, 11(3): 190-198.
- [12] 陈慧娟,喻长顺,李洪波,等. 广东地区非小细胞肺癌 EGFR 基因的突变研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1): 29-32.

(收稿日期: 2013-09-05 修回日期: 2013-12-07)