

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00762

应用肽核酸钳制 PCR 技术检测胰腺癌 K-ras 基因突变

林 寒,李兆中*,高 军,龚燕芳,金 晶

第二军医大学长海医院消化内科,上海 200433

[摘要] **目的:**应用肽核酸钳制 PCR 技术检测胰腺癌 K-ras 基因突变,探讨其诊断价值。**方法:**结合特异性肽核酸(针对野生型序列)与实时定量 PCR 技术建立一步 K-ras 基因检测法,与传统限制性片段长度多态性 PCR 法检测结果进行比较,评价新方法的诊断价值。**结果:**肽核酸钳制 PCR 法可同时对胰腺癌标本中 K-ras 基因的第 12、13 密码子突变情况进行检测,操作简便;可在 10^5 倍的野生型 K-ras 基因背景下检测出突变,灵敏度为 0.001%,可检测突变基因最低限为 10^2 拷贝;该方法可同时进行较大规模的样品检测,单次检测时间仅需 1 h。而传统方法可检测的突变基因最低限为 10^3 拷贝,检测灵敏度为 0.01%;需花费约 2 d 完成同样数量的样本检测。**结论:**肽核酸钳制实时定量 PCR 法较限制性片段长度多态性 PCR 法有明显优势,适用于胰腺癌大规模临床样本的 K-ras 基因突变检测,可作为胰腺癌筛查的有效手段。

[关键词] 胰腺肿瘤;肽核酸;K-ras 基因;实时定量 PCR

[中图分类号] R 735.9

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2009)07-0762-05

Peptide nucleic acid-mediated one-step PCR assay in detection of K-ras mutation

LIN Han, LI Zhao-shen*, GAO Jun, GONG Yan-fang, JIN Jing

Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a peptide nucleic acid-mediated one-step PCR assay for detecting K-ras mutation, and to evaluate its diagnostic value. **Methods:** We developed a one-step polymerase chain reaction (PCR) approach with melting curve analysis using wild-type specific peptide nucleic acid (PNA) and fluorescent dye SYBR Green I to determine the genotypes in codon 12 and 13 of K-ras oncogene. The result of our method was compared with that of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. **Results:** Our method simultaneously examined codon 12 and 13 of K-ras oncogene, and was easy to perform. The sensitivity of our method was 0.001% when in a 10^5 -fold excess of wild-type K-ras DNA. The detection limit was 10^2 copies. Our method could be used for large sample test, with the time of a single test being 1 hour. The limit of traditional method was 10^3 copies and the sensitivity was 0.01%. The testing time was about 2 days for samples which needed only 1 hour using our method. **Conclusion:** Our method has obvious advantage over RFLP analysis; it is suitable for detecting K-ras mutation in large samples and can be used as an effective method for early diagnosis of pancreatic cancer.

[KEY WORDS] pancreatic neoplasms; peptide nucleic acid; K-ras gene; real-time quantitative PCR

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7):762-766]

近年来,肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)作为一种基因检测探针被广泛应用^[1-4]。PNA 是一种合成的 DNA 类似物,由 2-氨基乙基甘氨酸骨架取代了核酸原本的磷酸二酯链。PNA 以其独特的构像决定了其具有以下特性:不被已知的蛋白酶和核酸酶降解,且不被 Taq 酶识别,不能作为 PCR 引物介导 PCR 扩增;与完全互补的 DNA 或 RNA 序列杂交有极强的特异性和热稳定性,在同样杂交条件下, PNA/DNA 与同样序列的 DNA/DNA 双链相比,每增加一个碱基, Tm 值将会提高 1℃ 以上,因此可阻碍 PCR 引物的退

火或延伸;同时,一个 PNA/DNA 分子,在其中间段出现一个错配碱基时, Tm 值降低 8~10℃,两个碱基错配则完全不能杂交^[2,5],这也正是 PNA 钳制 PCR 法用于单一碱基突变检测的基本原理。

胰腺癌是目前预后较差的恶性肿瘤之一,其发病率与病死率几乎相等,5 年生存率不到 5%^[6]。外科手术切除是治愈胰腺癌的唯一方法。因此,早期发现具有手术机会的胰腺癌患者是胰腺癌获得良好预后的最有效手段。Cerny 等^[7]研究发现 75%~100% 的胰腺癌存在 K-ras 基因第 12、13 密码子突

[收稿日期] 2009-02-10

[接受日期] 2009-04-16

[作者简介] 林 寒,硕士生,助教. E-mail: babyhan831@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873241, E-mail: zhsl@81890.net

变。因此,检测血液或粪便中 K-ras 基因的突变情况有助于胰腺癌的 diagnosis 与随访,以及进行早期胰腺癌的筛查。然而,临床样本中往往存在大量的野生型 DNA,形成干扰背景,大大增加了检测难度,传统 K-ras 基因检测的灵敏度无法满足要求;且传统方法检测成本高、检测方法复杂,不易在临床开展。因此,需要寻找一种更敏感、简便、廉价的 K-ras 基因检测方法。本研究应用针对野生型序列的特异性肽核酸,选择 SYBR Green I 作为实时定量 PCR 的荧光染料,建立一种新型的更为敏感、快速的实时定量 PCR 法 (real-time quantitative PCR, RQ-PCR),用于检测胰腺癌标本中 K-ras 基因第 12、13 密码子突变情况,为大规模临床样本胰腺癌筛查奠定基础。

1 材料和方法

1.1 PNA 及引物合成 根据 K-ras 基因第 1 外显子的序列 (NC_000012),设计合成片段大小为 216 bp 的引物。针对野生型序列的特异性 PNA 片段与其中第 10~14 密码子完全互补,由韩国 Panagene 公司合成。引物及 PNA 序列如下,Forward primer (F): 5'-TAC TGG TGG AGT ATT TGA TA-3'; Reverse primer (R): 5'-CAA GAT TTA CCT CTA TTG TT-3'; PNA: NH₂-CCT ACG CCA CCA GCT CC-Hac。

1.2 DNA 模板 将已知含有不同基因型 K-ras 基因的胰腺癌细胞株培养于含 10% 小牛血清及链霉素的 DMEM 培养液中,37℃、5% CO₂ 培养箱中体外培养。其中细胞株 BxPC-3 为野生型 (其第 12、13 密码子序列为 GGTGGC),Panc-1 为第 12 密码子突变 (GGTGGC→GATGGC),SW1990 为第 13 密码子突变 (GGTGGC→GGTGAC)。构建出野生型及突变型质粒 (分别为 pTA2-Bx、pTA2-Panc、pTA2-SW),测序并经微量核酸分光光度计 (ND1000, 基因公司) 定量后,于 -20℃ 保存。同时,于本实验室胰腺癌组织库中随机选取 5 块石蜡包埋胰腺癌组织块,并用 QIAamp 组织抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 抽提 DNA,定量后于 -20℃ 保存。

1.3 PNA 钳制实时定量 PCR 检测及熔解曲线分析 实时定量 PCR 检测仪器为 ABI 7500 型 Light-Cycler,实验荧光显示剂为 SYBR Green I (中国宝生物有限公司)。反应条件为 95℃ 预变性 1 min; 95℃ 变性 15 s, 70℃ PNA 结合 10 s, 60℃ 引物退火及延伸 1 min。扩增 40 个循环,在每一循环的 60℃ 步骤末收集荧光信号。反应结束后进行熔解曲线分析: 95℃ 持续 15 s, 冷却至 65℃ 保持 1 min, 并以 0.3℃/s 的速度逐渐升温至 95℃ 持续 15 s。仪器软

件 (ABI 7000 系列 SDS 软件, 版本 1.3.1) 自动分析出 Ct 值, 即 SYBR Green I 检测荧光信号显著高于背景信号时的循环数。PCR 产物纯化后并测序。

1.4 限制性片段长度多态性 PCR 法 本研究同时参照文献^[2], 应用巢式二步限制性片段长度多态性 PCR 法 (restriction fragment length polymorphism PCR, RFLP/PCR) 进行 K-ras 基因突变检测。具体方法如下: K-ras 基因经上游引物错配扩增后, 在第 12 外显子位置产生内切酶 *Bst*NI 酶切位点 (CCTGG), 而当第 12 密码子发生突变时, 则无法形成这一位点, 不能被内切酶切断。经第二步 PCR 扩增后, 突变型基因得以富集, 所有 PCR 产物再次用 *Bst*NI 酶切。最后通过 PCR 产物电泳即可区分野生型 (100 bp 片段) 与突变型基因 (129 bp 片段)。

1.5 统计学处理 所有数据使用统计学软件 SPSS 13.0 进行分析。

2 结果

2.1 PNA 钳制实时定量 PCR 法的抗干扰效果 以含有野生型 K-ras 基因的质粒 BxPC-3 作为野生型模板, 以质粒 pTA2-Panc 和 pTA2-SW 作为突变型模板。熔解曲线分析结果 (图 1) 提示, 未加入 PNA 时, 野生与突变两种类型的 K-ras 基因的扩增效率相当, T_m 值约为 83.5℃, 故无法区分两种基因; 当加入少量 PNA (1.25 μmol/L), 不足以完全抑制野生型基因扩增, 此时野生型的 T_m 值为 83.3℃, 扩增效率较未加入 PNA 时明显降低, 而对突变型基因扩增无影响, 但其 T_m 下降为 80℃, 二者的 T_m 差值达 3.4℃, 此时可将两种类型的基因区分开。由此可见, 适量的 PNA 可有效抑制野生型基因扩增, 通过熔解曲线的分析能够简便准确地野生型 K-ras 基因背景下检测出突变型基因。统计学分析结果提示野生型与突变型基因的 T_m 值分别为 (83.5±0.5)℃ 及 (80.8±0.6)℃ (n=20)。

2.2 PNA 的最适检测浓度 结果 (图 2) 表明: 0.25~8.0 μmol/L 浓度范围内, 当 PNA 浓度低于 3.75 μmol/L 时, 野生型模板的熔解曲线上出现野生特异性扩增峰 (接近 83.3℃), 表明野生型基因背景未完全抑制, 此时无法判断是否存在突变基因; 当 PNA 浓度在 3.75~4.0 μmol/L 时, 突变型模板经 PCR 扩增后的熔解曲线可观察到突变峰 (约 80.5℃), 而野生型只有引物二聚体峰, 即野生型模板完全被抑制无法扩增; 随着 PNA 浓度的增加, 可观察到无论是野生型还是突变型模板的扩增效率均逐渐降低, 当 PNA 浓度高于引物 40 倍, 达 8.0 μmol/L 时, 所有的

模板均受抑制而无任何扩增峰存在。

2.3 PNA 钳制实时定量 PCR 法的检测敏感性 将突变型质粒 pTA2-Panc($10^2\sim10^7$ 拷贝/L)与一定量的野生型质粒 pTA2-Bx 按一定比例(1:1、1:10、1:100、1:1 000、1:10 000、1:100 000)混合,将混合液加入 3.75 $\mu\text{mol/L}$ PNA 进行 PCR 反应。

溶解曲线分析结果(图 3)显示所有野生型与突变型模板混合物 PCR 产物的 T_m 值均出现于突变特异峰位置(80.8 ± 0.6) $^{\circ}\text{C}$ 。结果表明该方法可检测的突变 K-ras 基因最低拷贝数为 10^2 ,突变基因与野生基因的比例为 1:10⁵,即检测灵敏度为 0.001%。

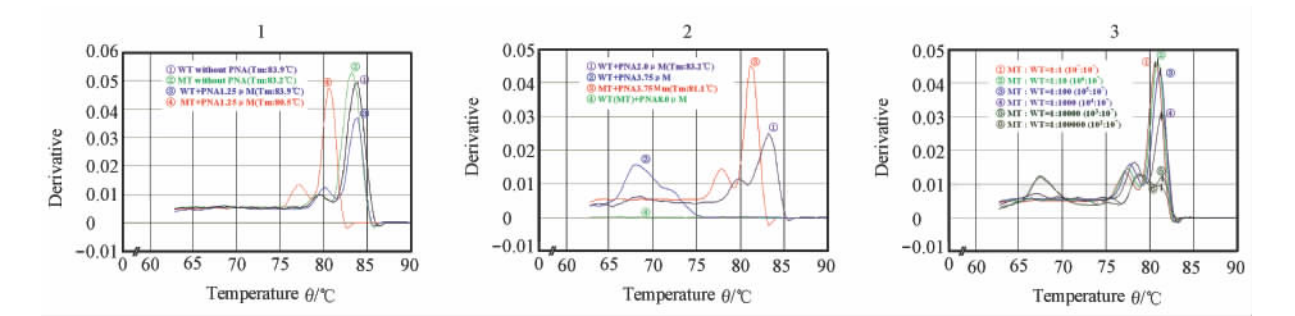


图 1 不同条件下野生型与突变型 K-ras 基因溶解曲线图

Fig 1 PNA differentiated mutant K-ras gene from wild-type K-ras

Without PNA, the T_m of wild-type (WT) templates was very close to the mutants (MT) (curve 1,2); with 1.25 $\mu\text{mol/L}$ PNA, the difference between the T_m of WT and MT was up to 3.4 $^{\circ}\text{C}$, so the two genes could be differentiated (curve 3,4)

图 2 不同浓度 PNA 下的溶解曲线图

Fig 2 Optimization of PNA concentrations

When the PNA concentration was 2.0 $\mu\text{mol/L}$, the WT could not be suppressed completely (curve 1). Adjusting the PNA in the range of 3.75-4.0 $\mu\text{mol/L}$, the mutant-specific peak (81.1 $^{\circ}\text{C}$) was observed in MT, but there was only peak of primer dimmer in WT (curve 2,3). When the concentration of PNA was 8.0 $\mu\text{mol/L}$, there was no fluorescence observed in both WT and MT PCR systems (curve 4)

图 3 肽核酸钳制 PCR 法在 K-ras 基因突变检测中的灵敏度分析

Fig 3 Sensitivity analysis of PNA-clamping PCR in detecting mutant K-ras genes

The MT/WT was from 1:1 to 1:10⁵. Melting curve analysis showed that there were mutant-specific peaks in all the mixture. And the fluorescence intensity gradually decreased with the decrease of the MT copy number

2.4 PNA 钳制实时定量 PCR 法检测结果的测序鉴定 将加入 3.75 $\mu\text{mol/L}$ PNA 的混合模板(野生质粒:突变质粒=1:1、10:1)的 PCR 产物进行测序,证实该产物中仅有突变型 K-ras 基因扩增片段存在(图 4A、4B);然而,同一模板在未加入 PNA 时进行 PCR 反应的产物在第 12 密码子部位出现双峰(图 4C、4D)。为了进一步验证该方法的可靠性,我

们自本实验室胰腺癌组织库中随机选取 5 份标本进行检测。根据上述检测及结果判定方法,判定其中 3 份标本(Ca53、Ca58、Ca79)中含有突变 K-ras 基因(T_m 值为 80.5 $^{\circ}\text{C}$),其余 2 份(Ca71、Ca91)因无扩增曲线出现,判定为野生型。PCR 产物的测序结果验证了以上的判断(图 4E、4F)。

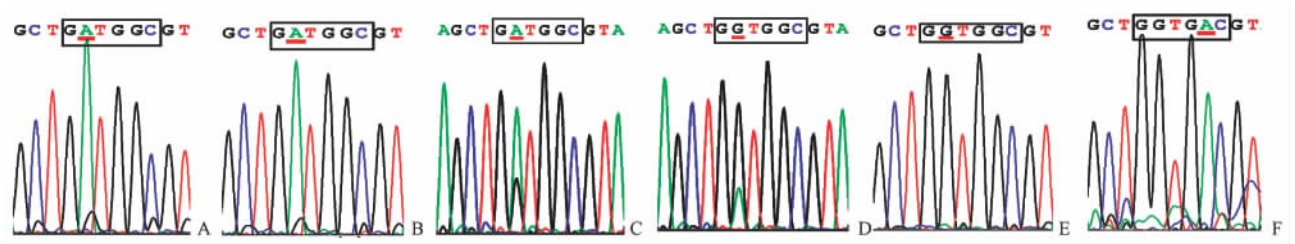


图 4 肽核酸钳制 PCR 法产物测序结果

Fig 4 Sequencing analysis result of PNA-clamping PCR

A: WT: MT=1:1 (with 3.75 $\mu\text{mol/L}$ PNA); B: WT: MT=10:1 (with 3.75 $\mu\text{mol/L}$ PNA); C: WT: MT=1:1 (without PNA); D: WT: MT=10:1 (without PNA); E: Ca71 (with 3.75 $\mu\text{mol/L}$ PNA); F: Ca58 (with 3.75 $\mu\text{mol/L}$ PNA)

2.5 PNA 钳制实时定量 PCR 与 RFLP/PCR 方法的比较

将 PNA 钳制实时定量 PCR 法与传统 RFLP-PCR 法进行比较,结果发现前者检测 K-ras 基因突变效果优于后者,具体见表 1。

表 1 PNA 钳制 PCR 法与传统 RFLP/PCR 法检测 K-ras 的比较

Tab 1 Comparison between PNA-clamping QR-PCR and RFLP/PCR in detecting K-ras mutation

	PNA-clamping QR-PCR	<i>Bst</i> NI RFLP/PCR
Reagent	SYBR Green I PNA Primers	<i>Bst</i> NI Primers Purification kit, agarose gel, etc.
Procedure	QR-PCR→Melting curve analysis	PCR→Electrophoresis→Purification→ Enzymatic reaction→PCR→Electrophoresis→ Purification→ Enzymatic reaction →Electrophoresis
Time consumed(hours/time)	1. 5-2	12-15
Detectable genotype of K-ras gene	Mutation of codon 12 and 13 simultaneously	Mutation of codon 12 only
The lower limit(copies/ml)	10 ²	10 ³
Sensitivity	0. 001%	0. 01%
Quantitative method	Absolute quantitation	Demi-quantitation
Post-PCR procedure	One-step method, no contamination to lab, low false positive rate	Multistep method, high false positive rate

3 讨 论

近年来, K-ras 基因突变的检测被作为辅助胰腺癌诊断的一项重要指标, 已经在临床实验室中广泛开展, 检测物包括细针穿刺物、胰液、胆汁、血液及粪便等^[8-12]。现有的突变检测方法很多, 既往研究^[13-17]表明, 这些检测方法具有较高的特异性(63%~100%), 结合 CA19-9 后特异性更可高达 80% 以上, 但灵敏度却差强人意, 仅为 27%~81%, 多数在 50% 左右。因此, 需要建立一种更为快速、简便且敏感的 K-ras 基因检测方法, 适用于辅助胰腺癌的早期诊断。

本研究将 PNA 钳制实时定量 PCR 检测法与 RFLP-PCR 法进行了比较, 新方法具有许多优点, 具体表现在以下几个方面: 首先, 仅需 1 对引物和 1 条 PNA, 通过熔解曲线分析, 即可将 K-ras 基因第 12、13 密码子所有可能的突变型与野生型区分开。其次, 通过一步反应, 可解决 PCR 扩增、突变富集及定量整个过程, 无需诸如电泳、杂交、酶切等后续步骤, 大大简化了实验过程, 整个反应过程在密封管内完成, 最大限度地减少了污染的可能, 降低假阳性率。最后, 检测灵敏度为 0. 001%, 可检测的突变 K-ras 基因最低拷贝数为 10²/ml, 较传统方法高。

目前更多的研究在进行 PNA 钳制实时定量 PCR 法检测时, 选用针对 K-ras 基因第 12 密码子的 TaqMan 探针作为荧光显示物。该方法虽然特异性

高, 但是是一种探针只能检测第 12 或 13 密码子的一种类型的突变。既往研究^[18]证实, K-ras 基因第 12、13 密码子突变类型多, 即使在同一肿瘤标本中也可能存在多种类型的突变, 因此若选择 TaqMan 探针法, 则需要使用多条特异性探针分别进行检测, 实验成本高且复杂, 无法满足大样本量临床筛查的要求。因此本研究选择 SYBR Green I 作为荧光染料, 可同时检测第 12、13 密码子任意一种突变, 灵敏度高。虽然该方法不能直接对具体突变类型进行判断, 但可在需要时加入测序步骤即可。且目前尚无研究表明 K-ras 基因的突变类型与胰腺癌的病理类型、病情程度或预后等具有相关性。因此, 本研究认为该方法在 K-ras 基因突变筛查方面具有更重要的价值。另一方面, 只要 PCR 引物设计合理, 同时反应退火温度足够高, 以至能够抑制非特异性扩增, SYBR Green I 能够满足该实验检测要求, 方法的可重复性、准确性、灵敏度以及特异性与 TaqMan 探针法相当^[19]。SYBR Green I 价格低廉, 还将大大降低检测成本。

本检测方法的关键在于选择适合的 PNA 浓度, 过量的 PNA 会对野生及突变基因的扩增均造成影响。既往研究^[4, 20]认为 PNA 钳制 PCR 法的 PNA 与引物浓度比为 1. 5 : 1~11. 4 : 1 时能达到最好的扩增抑制效果, 本实验最适合的 PNA/引物为 15 : 1, 考虑最适 PNA 与引物比例的不同可能与引物及 PNA 长度及碱基序列的不同有关。同时, 在实验结

果分析时,应先进行熔解曲线分析,明确待测样本的基因类型,再进行突变型基因的定量分析。

综上所述,本实验提供了一种快速、敏感的 K-ras 基因突变检测方法,应用此方法进行 K-ras 基因检测有望成为胰腺癌筛查的有效手段;而且,该方法也能够用于检测其他基因的缺失或插入突变。

[参考文献]

- [1] Nielsen P E, Egholm M, Berg R H, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide[J]. *Science*, 1991, 254: 1497-1500.
- [2] Thiede C, Bayerdörffer E, Blasczyk R, Wittig B, Neubauer A. Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 983-984.
- [3] Mrozikiewicz P M, Landt O, Cascorbi I, Roots I. Peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping allows allelic allocation of CYP1A1 mutations[J]. *Anal Biochem*, 1997, 250: 256-257.
- [4] Demers D B, Curry E T, Egholm M, Sozer A C. Enhanced PCR amplification of VNTR locus DIS80 using peptide nucleic acid (PNA)[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 3050-3055.
- [5] Taback B, Bilchik A J, Saha S, Nakayama T, Wiese D A, Turner R R, et al. Peptide nucleic acid clamp PCR: a novel K-ras mutation detection assay for colorectal cancer micrometastases in lymph nodes[J]. *Int J Cancer*, 2004, 111: 409-414.
- [6] Evans D B, Abbruzzese J L, Cleary K R, Buchholz D J, Fenoglio C J, Collier C, et al. Preoperative chemoradiation for adenocarcinoma of the pancreas; excessive toxicity of prophylactic hepatic irradiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995, 33: 913-918.
- [7] Cerny W L, Mangold K A, Scarpelli D G. K-ras mutation is an early event in pancreatic duct carcinogenesis in the Syrian golden hamster[J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 4507-4513.
- [8] Tada M, Komatsu Y, Kawabe T, Sasahira N, Isayama H, Toda N, et al. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration; clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor[J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97: 2263-2270.
- [9] Boadas J, Mora J, Urgell E, Puig P, Roca M, Cussó X, et al. Clinical usefulness of K-ras gene mutation detection and cytology in pancreatic juice in the diagnosis and screening of pancreatic cancer[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 13: 1153-1159.
- [10] Nakamura Y, Onda M, Uchida E. Analysis of K-ras codon 12 point mutations using duodenal lavage fluid for diagnosis of pancreatic carcinoma[J]. *Pancreas*, 1999, 18: 133-140.
- [11] Mora J, Urgell E, Farr A, Comas L, Montserrat E, González-Sastre F. Agreement between K-ras sequence variations detected in plasma and tissue DNA in pancreatic and colorectal cancer[J]. *Clin Chem*, 2006, 52: 1448-1449.
- [12] Sawabu N, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K, Motoo Y. Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2004, 28: 263-267.
- [13] Haug U, Hillebrand T, Bendzko P, Löw M, Rothenbacher D, Stegmaier C, et al. Mutant-enriched PCR and allele-specific hybridization reaction to detect K-ras mutations in stool DNA; high prevalence in a large sample of older adults[J]. *Clin Chem*, 2007, 53: 787-790.
- [14] Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, Yaros M J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. *Cancer Res*, 1977, 37: 646-650.
- [15] Castells A, Puig P, Móra J, Boadas J, Boix L, Urgell E, et al. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma; diagnostic utility and prognostic significance[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17: 578-584.
- [16] Uemura T, Hibi K, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Okochi O, et al. Detection of K-ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients[J]. *J Gastroenterol*, 2004, 39: 56-60.
- [17] Dianxu F, Shengdao Z, Tianquan H, Yu J, Ruqing L, Zurong Y, et al. A prospective study of detection of pancreatic carcinoma by combined plasma K-ras mutations and serum CA19-9 analysis[J]. *Pancreas*, 2002, 25: 336-341.
- [18] Däbritz J, Hänfler J, Preston R, Stieler J, Oettle H. Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92: 405-412.
- [19] Marchese R, Muleti A, Pasqualetti P, Bucci B, Stigliano A, Brunetti E, et al. Low correspondence between K-ras mutations in pancreatic cancer tissue and detection of K-ras mutations in circulating DNA[J]. *Pancreas*, 2006, 32: 171-177.
- [20] Orum H, Nielsen P E, Egholm M, Berg R H, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 5332-5336.

[本文编辑] 贾泽军