

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01083

· 论 著 ·

肽核酸钳制-PCR/*K-ras* 突变检测方法在结直肠癌组织中的诊断应用

李泉江^{1△}, 胡佳佳^{1△}, 金晶¹, 吴洪玉¹, 满晓华¹, 朱玲², 高军^{1*}, 李兆申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

2. 上海体育学院中国乒乓球学院, 上海 200433

[摘要] **目的** 确定本实验室建立的肽核酸钳制(PNA)-PCR/*K-ras* 突变检测方法的阳性判断标准, 并评价其对结直肠癌组织的诊断价值。**方法** 将含 *K-ras* 基因 12 密码子突变的质粒和野生质粒以不同比例(突变/总体: 0, 1/3 200, 1/1 600, 1/800, 1/400, 1/200, 1/100)混合作为标准样品, 独立配制 6 个批次并分别进行 PNA-PCR/*K-ras* 突变检测, 收集 *K-ras* 突变 CT 值及 *K-ras* 总体 CT 值, 计算 Δ CT 值(突变 CT 值-总体 CT 值), 采用 ROC 曲线分析突变 CT 值和 Δ CT 值诊断 *K-ras* 突变的最适 Cut-off 值, 联合两者最适 Cut-off 值, 设定该方法的最终阳性判断标准。分别采用该方法和直接测序法对 35 例结直肠癌组织及对应癌旁组织进行 *K-ras* 突变检测并比较分析。**结果** 突变模板浓度为 1/800 及以上的标准样品突变 CT 值和 Δ CT 值与阴性标准品之间差异存在统计学意义($P < 0.05$); 突变 CT 值和 Δ CT 值的最适 Cut-off 值分别为 41.7 和 15.4。最终阳性判断标准为突变 CT 值 ≤ 41.7 或 Δ CT 值 ≤ 15.4 , 对应的 ROC 曲线下面积为 0.955($P = 0.001$), 以此判断标准, 各标准样品 (0, 1/3 200, 1/1 600, 1/800, 1/400, 1/200, 1/100)的阳性检测率分别为 0%、66.7%、83.3%、100%、100%、100%、100%, 检测下限为 1/800。在结直肠癌及癌旁组织标本中, 该方法阳性检测率为 45.7%(32/70), 与直接测序法(18.6%, 13/70)比较差异具有统计学意义($P = 0.000$)。**结论** PNA-PCR/*K-ras* 突变检测方法具有较高的检测灵敏度, 在结直肠癌组织样本中具有较直接测序法更高的阳性检出率。

[关键词] *K-ras* 基因; 突变; 肽核酸类; 聚合酶链反应

[中图分类号] R 735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)10-1083-05

Detection of *K-ras* mutation by PNA-PCR/*K-ras* method in diagnosis of colorectal cancer tissues

LI Quan-jiang^{1△}, HU Jia-jia^{1△}, JIN Jing¹, WU Hong-yu¹, MAN Xiao-hua¹, ZHU Ling², GAO Jun^{1*}, LI Zhao-shen^{1*}

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

2. The China Table Tennis College, Shanghai University of Sport, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To determine the positive judgement standard of *K-ras* mutation detection method peptide nucleic acid (PNA)-PCR/*K-ras* (previously established in our laboratory) and to assess its diagnostic value for colorectal cancer tissues. **Methods** Plasmids with *K-ras* codon 12 mutation and plasmids with *K-ras* wild-type plasmids were mixed and serially diluted into standard samples (mutation/total: 0, 1/3 200, 1/1 600, 1/800, 1/400, 1/200, 1/100) for six independent tests. The mutation CT, total CT and Δ CT (mutation CT - total CT) values were obtained by PNA-PCR/*K-ras* method. After the cut-off values of the mutation CT and Δ CT for *K-ras* diagnosis were identified by ROC analysis, the diagnostic criteria for *K-ras* mutation was defined by combining both the cut-off values of the mutation CT and Δ CT. A comparison was made between *K-ras* diagnostic rate by PNA-PCR/*K-ras* method and direct sequencing for 35 colorectal cancer tissues and their corresponding adjacent noncancerous tissues. **Results** The mutation CT and Δ CT values for 1/800 and the above standard samples were significantly different from those of the negative samples($P < 0.05$), with the optimum cut-off values of mutation CT and Δ CT being 41.7 and 15.4, respectively. The diagnostic criteria (mutation CT ≤ 41.7 or Δ CT ≤ 15.4) for *K-ras* mutation was set up as AUC-ROC 0.955 ($P = 0.001$). According this diagnostic criteria, the *K-ras* mutation diagnostic rates in each concentration

[收稿日期] 2013-02-21

[接受日期] 2013-07-22

[基金项目] 国家自然科学基金(30910103911, 81272663), 上海市重点科技攻关项目(11441901800), 国家科技支撑计划(2006BAI02A12). Supported by National Natural Science Foundation of China (30910103911, 81272663), Shanghai Project for Tackling Key Problems (11441901800), and National Sci-Tech Supporting Plan (2006BAI02A12).

[作者简介] 李泉江, 博士生. E-mail: liriuiia@126.com; 胡佳佳, 硕士生. E-mail: 15921404402@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31161358, E-mail: gaojunaaa@gmail.com; Tel: 021-31161335, E-mail: lizhaoshen111@gmail.com

gradient of the standard samples (0, 1/3 200, 1/1 600, 1/800, 1/400, 1/200, and 1/100) were 0%, 66.7%, 83.3%, 100%, 100%, 100%, and 100%, receptivity, with the upper diagnostic limit being 1/800. The diagnostic rates of *K-ras* mutation by our method and by direct sequence method for colorectal cancer tissues were 45.7% (32/70) and 18.6% (13/70), respectively, showing significant difference ($P=0.000$). **Conclusion** PNA-PCR/*K-ras* method has higher sensitivity and positive detection rate than direct sequencing method for colorectal cancer tissues.

[Key words] *K-ras* gene; gene mutation; peptide nucleic acids; polymerase chain reaction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10):1083-1087]

K-ras 基因的突变与癌症发生密切相关,其在胰腺癌中突变率高达 90%以上^[1],在结直肠癌、肺癌和膀胱癌中为 30%~40%^[2-4]。*K-ras* 突变表现为热点突变,尤其是 2 号外显子的 12、13 密码子(二者突变率占 90%)和 3 号外显子的 61 密码子^[5-8]。目前,*K-ras* 基因突变检测已成为肿瘤患者实施表皮生长因子受体(EGFR)单抗个体治疗的必检项目^[9-11],诊断技术对患者生存与生活质量有重要的影响^[12]。肿瘤组织中 *K-ras* 基因突变属于体细胞突变,从临床相关标本中提取获得的 DNA 样品中往往含有大量的野生型 *K-ras* 基因,理想的检测方法应该避免野生模板对突变模板检测的干扰作用,同时具有高灵敏的检测下限及临床可接受的准确率。本实验室前期研发了一种肽核酸钳制(PNA)-PCR/*K-ras* 突变检测方法,在抑制野生型 *K-ras* 模板扩增的情况下,可同时检测 *K-ras* 基因 2 号外显子 12、13 密码子突变,并可用于检测相关癌症组织 *K-ras* 基因的突变情况^[13-14]。本研究在前期工作的基础上,进一步明确该检测方法的检测下限及阳性判断标准,并在结直肠癌组织中与直接测序法进行比较,评价其诊断价值。

1 材料和方法

1.1 标本来源及患者资料 与患者签署知情同意后,收集第二军医大学长海医院普通外科 2012 年 6 月至 2012 年 10 月结直肠癌手术切除标本 35 例,相应癌旁组织取自距肿瘤边缘 2 cm 以上的结直肠组织,所有肿瘤标本均经病理检查证实为结直肠癌。其中,男性 20 例,女性 15 例,年龄 39~94 岁,平均(64.9±13.3)岁,中位年龄 65 岁。肿瘤分期参照国际抗癌协会(UICC)的 TNM 分期标准。手术切除后立即切取标本,快速液氮冷冻,−80℃保存。

1.2 DNA 提取 取约 50 mg 组织,清洗后剪碎,液氮中研碎,按常规细胞裂解、酚-氯仿抽提及乙醇沉淀获得 DNA 样品。核酸微量测量仪(NanoDrop1000 型)测定 DNA 浓度,以 D_{260}/D_{280} 比值判定其纯度。每个

DNA 样品的浓度调整为 50 ng/μL,−80℃保存。

1.3 PNA-PCR/*K-ras* 突变检测下限及阳性判断标准确定 将含 *K-ras* 12 密码子突变型质粒 pMD18-T-Panc(10^5 拷贝)和含野生型质粒 pMD18-T-Bx(10^5 拷贝)按照一定比例(0, 1/3 200, 1/1 600, 1/800, 1/400, 1/200, 1/100)混匀后作为标准样品。PCR 总反应体系 15 μL,包括模板 2.5 μL,MasterMix 7.5 μL,引物(10 pmol/μL) 1.5 μL,PNA(3 pmol/μL) 2.5 μL,MGB 探针(10 pmol/μL) 1 μL。在 ABI 7500 型实时定量 PCR 仪上进行反应检测。反应条件为 95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 10 s,76℃ PNA 结合 10 s,60℃ 退火及延伸 30 s,扩增 50 个循环,在每个循环的 60℃ 步骤末收集荧光信号。引物序列和 PNA 序列未列出(拟申请专利保护)。上述梯度稀释及检测实验独立重复 6 个批次。

1.4 样本 DNA 中 *K-ras* 突变肽核酸定量 PCR 检测 取组织样本 DNA 2.5 μL(50 ng/μL)作为检测模板,按照上述 PNA-PCR/*K-ras* 突变检测方法在 15 μL 反应体系中,进行实时定量 PCR 反应检测。

1.5 样本 DNA 中 *K-ras* 突变的测序检测 测序分析委托 Invitrogen 公司进行,反应体系为 25 μL,内含 10×PCR 缓冲液 2.5 μL,10 mmol/L dNTP 混合液 0.5 μL,50 mmol/L MgCl₂ 0.8 μL,DNA 模板 1 μL,Platinum[®] Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,加去离子水至 25 μL。*K-ras* 上游引物:5'-CTG GTG GAG TAT TTG ATA GTG TA-3',下游引物:5'-TGA AAA TGG TCA GAG AAA CCT TTA-3',引物各 1 μL。反应条件:94℃ 15 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,35 个循环;延伸 72℃ 30 s,终末延伸 72℃ 5 min。测序产物上 3730XL 型 DNA 测序仪进行测序(美国 ABI 公司),测序文件用 Polyphred 软件分析并结合人工校对记录后整理出结果。

1.6 统计学处理 各标准样品梯度模板下的突变 CT 值、总体 CT 值及 ΔCT 值(突变 CT 值-总体 CT 值)与阴性模板的比较采用 Dunnett-*t* 方法;Cut-off 值的选定采用 ROC 曲线分析法;在进行两种方

法及两组织样本之间的比较中, 由于 $b+c \leq 20$, 参考文献[15]方法进行配对四格表资料差别检验的精确概率计算及一致性检验 Kappa 值计算。采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 检测下限及阳性判断标准的确定 将 12 密码子突变型 *K-ras* 质粒与野生型 *K-ras* 质粒混合制成的含有不同突变拷贝数的标准样品, 独立配制 6 批次, 并独立 PCR 检测 6 次, 分别获得各梯度模板下的突变 CT 值、总体 CT 值及 Δ CT 值(突变 CT 值-总体 CT 值)。如图 1 所示, 突变模板为 1/800 及以上浓度梯度的 CT 值与阴性标准样品之间差异有统计学意义($P \leq 0.011$); 同时, 突变模板为 1/1 600 及以上浓度梯度的 Δ CT 值与阴性标准样品之间差异有统计学意义 $P \leq 0.024$; 而总体 CT 值在各浓度梯度之间差异均无统计学意义。应用 ROC 曲线下面积分别评估突变 CT 值和 Δ CT 值对 *K-ras* 突变的诊断价值(图 2), 发现突变 CT 值和 Δ CT 值的曲线下面积分别为 0.903 ($P = 0.004$) 和 0.952 ($P = 0.001$); 突变 CT 值诊断 *K-ras* 突变的 Cut-off 值为 41.7, 相应的敏感性和特异性分别为 83.3%(30/36) 和 100%(6/6), 在各浓度梯度标准样品(0、1/3 200、1/1 600、1/800、1/400、1/200、1/100) 的 6 批次检测中, 阳性检测率分别为 0%、50%、50%、100%、100%、100%、100%, 检测下限即为 1/400; Δ CT 值最适诊断的 Cut-off 值为 15.4, 相应的敏感性和特异性分别为 86.1%(31/36) 和 100%(6/6), 在各浓度梯度标准样品(0、1/3 200、1/1 600、1/800、1/400、1/200、1/100) 的 6 批次检测中, 阳性检测率分别为 0%、50%、83.3%、83.3%、100%、100%、100%, 检测下限即为 1/400。为提高检测下限, 我们设定诊断 *K-ras* 突变阳性的判断标准为突变 CT 值 ≤ 41.7 或 Δ CT 值 ≤ 15.4 , 计算 ROC 曲线下面积为 0.955 ($P = 0.001$, 图 2), 相应的敏感性和特异性分别为 91.7%(33/36) 和 100%(6/6)。据此判断标准, 在各浓度梯度标准样品的 6 批次检测中, 阳性检测率分别为 0%、66.7%、83.3%、100%、100%、100%、100%, 检测下限即为 1/800。上述结果表明, 我们同时取突变 CT 值和 Δ CT 值可提高检测 *K-ras* 突变的检测下限由 1/400 到 1/800。

2.2 PNA-PCR 与直接测序法在结直肠癌及其癌旁组织中 *K-ras* 突变检出率比较 在结直肠癌和相应

癌旁组织同时分别采用 PNA-PCR 与直接测序法进行 *K-ras* 12 密码子和 13 密码子突变检测。结果如表 1 所示。

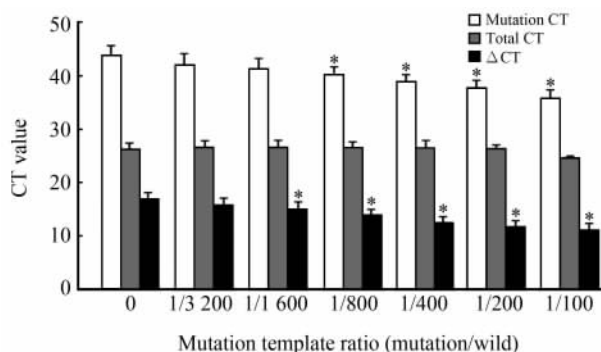


图 1 PNA-PCR/*K-ras* 方法对不同配比浓度梯度模板 (突变模板/野生模板) 检测的 CT 值、总体 CT 值及 Δ CT 值的差异比较

Fig 1 Comparison of CT, total CT and Δ CT values in series dilutions containing different mutations by PNA-PCR/*K-ras* PNA: Peptide nucleic acid. Δ CT = mutation CT - total CT. * $P < 0.05$ vs the negative samples. $n = 42$, $\bar{x} \pm s$

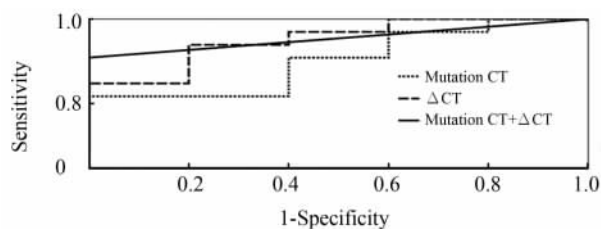


图 2 在不同配比浓度梯度模板 (突变模板/野生模板) 中 PNA-PCR/*K-ras* 方法测定的突变 CT 值和 Δ CT 值诊断突变的 ROC 曲线分析

Fig 2 ROC curve analysis of mutation CT and Δ CT values for *K-ras* mutation diagnosis in series dilutions containing different mutations by PNA-PCR/*K-ras*

PNA: Peptide nucleic acid; Δ CT = mutation CT - total CT

PNA-PCR/*K-ras* 方法在癌组织中 *K-ras* 12、13 密码子突变和总突变(12 密码子+13 密码子)的检出率分别为 57.1%(20/35)、14.3%(5/35)和 65.7%(23/35), 直接测序法的突变检出率分别为 34.3%(12/35)、0(0/35)和 34.3%(12/35), 两种方法在癌组织中的总突变检出率差异有统计学意义 ($P = 0.001$), Kappa 值为 0.428 ($P = 0.002$)。在癌旁组织中, PNA-PCR/*K-ras* 方法的 *K-ras* 12、13 密码子突变和总突变检出率分别为 20.0%(7/35)、5.7%(2/35)和 25.7%(9/35), 直接测序法的突变检出率分别为 0(0/35)、2.9%(1/35)和 2.9%(1/35), 两种

方法在癌旁组织中的总突变检出率差异有统计学意义($P=0.004$)。汇总所有癌与癌旁组织中突变检测情况,PNA-PCR/*K-ras* 方法的 *K-ras* 12、13 密码子突变和总突变检出率分别为 38.6%(27/70)、10.0%

(7/70)和 45.7%(32/70),直接测序法的突变检出率分别为 17.1%(12/70)、1.4%(1/70)和 18.6%(13/70),两种方法的总突变检出率差异存在统计学意义($P=0.000$),Kappa 值为 0.426($P=0.000$)。

表 1 PNA-PCR/*K-ras* 突变检测方法与直接测序法在结直肠癌及癌旁组织中阳性检出结果的比较

Tab 1 Comparison of positive results of *K-ras* mutations by PNA-PCR/*K-ras* and direct sequencing for colorectal cancer and adjacent noncancerous tissues

Tissue	N	Mutation for PNA-PCR n(%)			Mutation for direct sequencing n(%)			P value ^b	Kappa value
		Codon-12	Codon-13	Total	Codon-12	Codon-13	Total		
Cancer	35	20(57.1)	5(14.3)	23 ^c (65.7)	12(34.3)	0(0)	12(34.3)	0.001	0.428($P=0.002$)
Adjacent normal	35	7(20.0)	2(5.7)	9(25.7)	0(0)	1(2.9)	1(2.9)	0.004	-
Cancer+adjacent normal	70	27(38.6)	7(10.0)	32 ^d (45.7)	12(17.1)	1(1.4)	13(18.6)	0.000	0.426($P=0.000$)
P value ^a		0.002	0.125	0.001	0.000	-	0.002		

PNA; Peptide nucleic acid. ^a: Cancer vs adjacent normal; ^b: PNA-PCR method vs direct sequencing method; ^c and ^d: Included 2 cases with both *K-ras* codon-12 and -13 mutation

PNA-PCR/*K-ras* 方法可检出癌组织和相应癌旁组织中 *K-ras* 12 密码子突变率分别为 57.1%(20/35)和 20.0%(7/35),总突变率分别为 65.7%(23/35)和 25.7%(9/35),差异均有统计学意义(P 分别为0.002、0.001)。13 密码子分别为 14.3%(5/35)和 5.7%(2/35),差异无统计学意义($P=0.125$)。直接测序法可检出癌组织和相应癌旁组织中 *K-ras* 12 密码子突变率分别为 34.3%(12/35)和 0(0/35),13 密码子分别为 0(0/35)和 2.9%(1/35),但两组无法进行统计学比较,总突变率分别为 34.3%(12/35)和 2.9%(1/35),12 密码子突变和总突变检出率差异有统计学意义(P 分别为0.000、0.002)。结果表明,PNA-PCR/*K-ras* 方法与直接测序法具有一定程度的一致性,但前者较后者阳性检出率更高。

3 讨论

近年来,*K-ras* 突变检测广泛应用于肿瘤辅助诊断和指导用药。《美国国立综合癌症网络(NCCN)结直肠癌临床实践指南》2013 年第 3 版指出^[16],所有转移性结直肠癌患者都应检测 *K-ras* 基因状态,只有野生型 *K-ras* 患者才建议接受 EGFR 抑制剂(如西妥昔单抗和帕尼单抗)治疗。另外,《NCCN 非小细胞肺癌临床实践指南》2013 年第 2 版指出^[17],当患者 *K-ras* 基因发生了突变,则不建议使用厄洛替尼进行分子靶向治疗。目前在欧、美等国家和地区,在进行结直肠癌的抗 EGFR 靶向治疗前,必须常规进行 *K-ras* 基因突变检测,并且成为

能否报销相关抗 EGFR 治疗费用的依据。

既往报道的 *K-ras* 基因突变检测方法较多,主要有 PCR 产物直接测序法、焦磷酸测序方法、突变特异性扩增系统(ARMS)、高分辨率熔解曲线分析法(HRM)和 StripAssay 方法。这些方法的灵敏度各有差异,而且许多方法存在或繁琐、或灵敏度不够、或需要大型设备等不足,难以在临床实践中便捷、可靠应用。Jancik 等^[18]、Tsiatis 等^[19]和 Ogino 等^[20]等应用含突变型和野生型 *K-ras* 的肿瘤细胞株 DNA 制备含有不同突变拷贝数的梯度模板,测定了上述 5 种 *K-ras* 突变检测方法的检测下限,直接测序法为 25%~30%,焦磷酸测序方法为 5%~10%,ARMS 为 1%,HRM 为 5%~10%,StripAssay 方法小于 1%。Tsiatis 等^[19]分析了上述各方法的下限判断方法,认为直接测序法、HRM 法及 StripAssay 方法在样品检测值接近下限时主观因素干扰,较大的灰色检测区,焦磷酸测序方法和 ARMS 方法虽然判读者主观因素干扰较小,但灵敏度有待提高。目前我国获得国家食品药品监督管理局(CFDA)批准的 *K-ras* 突变检测试剂盒主要有厦门艾德、北京金菩嘉和上海源奇,其主要基于荧光 PCR 方法,灵敏度在 1%左右。本研究建立的 PNA-PCR/*K-ras* 突变检测方法灵敏度可高达 0.125%,但此灵敏度是在采用梯度稀释的质粒混合模板测定获得,下一步有待用细胞株 DNA 进一步验证。

本研究对前期建立的 PNA-PCR/*K-ras* 突变检测方法的检测下限和 Cut-off 值进行了确定研究,并

在临床结肠癌标本与直接测序方法进行了比对分析,表明本实验室前期建立的 PNA-PCR/*K-ras* 突变检测方法具有较好的敏感性和特异性,在临床标本中具有较直接测序法更高的阳性检出率,具有临床实际应用前景。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant *c-K-ras* genes[J]. Cell, 1988, 53: 549-554.
- [2] De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, and *PTEN* mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer[J]. Lancet Oncol, 2011, 12: 594-603.
- [3] Kalikaki A, Koutsopoulos A, Trypaki M, Souglakos J, Stathopoulos E, Georgoulas V, et al. Comparison of *EGFR* and *K-ras* gene status between primary tumours and corresponding metastases in NSCLC [J]. Br J Cancer, 2008, 99: 923-929.
- [4] Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler K W, Vogelstein B, Velculescu V E. Tumorigenesis: *RAF/RAS* oncogenes and mismatch-repair status [J]. Nature, 2002, 418: 934.
- [5] Bos J L. *Ras* oncogenes in human cancer: a review [J]. Cancer Res, 1989, 49: 4682-4689.
- [6] Adjei A A. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93: 1062-1074.
- [7] Ma E S, Wong C L, Law F B, Chan W K, Siu D. Detection of *KRAS* mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis [J]. J Clin Pathol, 2009, 62: 886-891.
- [8] Whitehall V, Tran K, Umapathy A, Grieu F, Hewitt C, Evans T J, et al. A multicenter blinded study to evaluate *KRAS* mutation testing methodologies in the clinical setting [J]. J Mol Diagn, 2009, 11: 543-552.
- [9] Allegra C J, Jessup J M, Somerfield M R, Hamilton S R, Hammond E H, Hayes D F, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for *KRAS* gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy [J]. J Clin Oncol, 2009, 27: 2091-2096.
- [10] Wierzbicki R, Jonker D J, Moore M J, Berry S R, Loehrer P J, Youssoufian H, et al. A phase II, multicenter study of cetuximab monotherapy in patients with refractory, metastatic colorectal carcinoma with absent epidermal growth factor receptor immunostaining [J]. Invest New Drugs, 2011, 29: 167-174.
- [11] Krens L L, Baas J M, Gelderblom H, Guchelaar H J. Therapeutic modulation of *K-ras* signaling in colorectal cancer [J]. Drug Discov Today, 2010, 15(13-14): 502-516.
- [12] Jancik S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of *KRAS* in human cancers [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 150960.
- [13] 林寒, 李兆申, 高军, 龚燕芳, 金晶. 外周血 *K-ras* 基因突变检测在胰腺癌诊断中的应用 [J]. 中华胰腺病杂志, 2009, 9: 312-314.
- [14] 林寒, 李兆申, 高军, 龚燕芳, 金晶. 应用肽核酸钳制 PCR 技术检测胰腺癌 *K-ras* 基因突变 [J]. 第二军医大学学报, 2009, 30: 762-766.
- Lin H, Li Z S, Gao J, Gong Y F, Jin J. Peptide nucleic acid-mediated one-step PCR assay in detection of *K-ras* mutation [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30: 762-766.
- [15] 刘玉秀, 刘钧. 配对四格表资料差别检验的精确概率方法 [J]. 南京大学学报: 数学半年刊, 1998: 627-631.
- [16] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. V. 3. 2013. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf
- [17] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-small cell lung cancer. V. 2. 2013. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf
- [18] Jancik S, Drabek J, Berkovcova J, Xu Y Z, Stankova M, Klein J, et al. A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, High resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the *K-ras* StripAssay for detecting *KRAS* mutations in non small cell lung carcinomas [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31: 79.
- [19] Tsiatis A C, Norris-Kirby A, Rich R G, Hafez M J, Gocke C D, Eshleman J R, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of *KRAS* mutations: diagnostic and clinical implications [J]. J Mol Diagn, 2010, 12: 425-432.
- [20] Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive sequencing method for *KRAS* mutation detection by Pyrosequencing [J]. J Mol Diagn, 2005, 7: 413-421.