DOI:10.16016/j.1000-5404.202101070

新型十万目六边形微腔芯片数字 PCR 对肺癌基因突变的绝对定量分析

冯 攀[1],郭铭静[1],李 刚[2],谢腾宝[2],张立群[1],刘 飞[1],蒲晓允[1] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院检验医学中心[1];400044 重庆,重庆大学光电技术及系统教育部重点实验室,新型微纳器件与系统技术国防重点学科实验室[2]

[**摘要**] **目的** 以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)G719S 突变为对象,建立用于肺癌基因突变绝对定量分析的新型十万目六边形微腔芯片(novel 100 000 hexagonal microchamber chip,NHMC)数字 PCR(digital PCR,dPCR)平台。**方法** 首先构建并优化适用于 EGFR G719S 突变的 PCR 检测体系;然后用 NHMC-dPCR 平台检测 8 个浓度梯度的 EGFR G719S 标准品质粒和 4 种干扰物质,评估该方法的灵敏度、特异性和抗干扰能力;最后分别用 NHMC-dPCR、液滴式数字 PCR(droplet digital PCR,ddPCR)和 DNA 测序法检测 6 例 EGFR G719X 突变的肺癌组织样本,验证 NHMC-dPCR 在临床样本检测中的可靠性。**结果** NHMC-dPCR 对 EGFR G719S 的最低检测浓度为 3.01 copies/μL,检测值与期望值的线性方程为 Y=0.725X−0.581,相关系数 R^2=0.984。该平台检测 4 种干扰物未发现阳性拷贝,检测 G719S 突变及其与 4 种干扰物混合的结果分别为 23 194.4 copies 和 22 095.7 copies。NHMC-dPCR、ddPCR 和 DNA 测序 3 种方法检测 6 例临床样本的定性结果符合率为 100%,其中 2 例由 NHMC-dPCR 定量的结果为 1 822.4 copies 和 451.7 copies,其对应由 ddPCR 定量的结果为 1 581.8 copies 和 218.3 copies。**结论** 本研究建立的核酸绝对定量技术——NHMC-dPCR 具有成本低、操作简单、速度快、抗干扰能力强等优点,可用于肺癌基因突变的绝对定量分析。

[**关键词**] 微流控芯片;数字 PCR;肺癌;基因突变;核酸检测
[**中图法分类号**] R446.61; R730.43; R734.2 [**文献标志码**] A

Novel 100 000 hexagonal microchamber chip digital PCR for absolute quantification of gene mutations in lung cancer

FENG Pan[1], GUO Mingjing[1], LI Gang[2], XIE Tengbao[2], ZHANG Liqun[1], LIU Fei[1], PU Xiaoyun[1] [1]Center of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [2]Key Laboratory of Optoelectronic Technology and Systems of Ministry of Education, Defense Key Disciplines Lab of Novel Micro-Nano Devices and System Technology, Chongqing University, Chongqing, 400044, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a novel 100 000 hexagonal microchamber chip (NHMC) digital PCR (dPCR) platform for absolute quantification analysis of gene mutations in lung cancer based on epidermal growth factor receptor (EGFR) G719S mutation as an object. **Methods** First, a PCR detection system for EGFR G719S mutation was constructed and optimized. And then 8 concentration gradients of EGFR G719S standard plasmids and 4 interfering substances were detected by the NHMC-dPCR platform, and the sensitivity, specificity and anti-interference ability of the platform were evaluated. Finally, 6 tissue samples of lung cancer with EGFR G719X mutation were detected by NHMC-dPCR, droplet digital PCR (ddPCR) and DNA sequencing, and the reliability of NHMC-dPCR in clinical sample testing was verified. **Results** The minimum detection concentration of EGFR G719S detected by NHMC-dPCR is 3.01 copies/μL. The linear

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81772284);重庆市技术创新应用示范项目(CSTC2018jscx-mszdX0073)
[**通信作者**] 蒲晓允,E-mail: puxiaoyong63@sina.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

equation between the detected value and the expected value is Y = 0.725X − 0.581, and the correlation coefficient is R^2 = 0.984. Four interfering substances were tested by this platform and no positive holes were found. The results of the G719S mutant plasmids and the mixture of 4 interferences were 23 194.4 copies and 22 095.7 copies, respectively. The qualitative results of 6 clinical samples tested by NHMC-dPCR, ddPCR and DNA sequencing had a coincidence rate of 100%. Among them, the quantitative results of 2 cases by NHMC-dPCR were 1 822.4 copies and 451.7 copies, and their corresponding quantitative results by ddPCR were 1 581.8 copies and 218.3 copies, respectively. **Conclusion** The nucleic acid absolute quantification technology established in this study, namely NHMC-dPCR, has the advantages of low cost, simple operation, fast speed, and strong anti-interference ability, and can be used for absolute quantification analysis of gene mutations in lung cancer.

[**Key words**] microfluidic chip; dPCR; lung cancer; gene mutation; nucleic acid detection

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81772284) and the Technical Innovation and Application Demonstration Program of Chongqing (CSTC2018jscx-mszdX0073). Corresponding author: PU Xiaoyun, E-mail: puxiaoyong63@sina.com

肺癌是恶性肿瘤致死的主要病因[1],分子靶向治疗是肺癌治疗的一线手段。而肺癌基因突变的精准定量是提高靶向治疗效果和实现精准医疗的重要环节。目前,基因突变的检测方法主要有直接测序法[2]、扩增受阻基因突变系统(amplification refractory mutations system, ARMS)[3]、实时荧光定量 PCR 法[4]及高分辨率溶解曲线分析法[5]等多种方法。但这些方法都只能定性或相对定量,难以精准绝对定量。

数字 PCR(digital PCR,dPCR)是可以高敏特异地对核酸样本进行数字化绝对定量分析的第 3 代 PCR 技术,在稀有突变检测和表达量微小差异鉴定方面具有无可比拟的优势[6]。然而市面上的许多数字 PCR 技术都需要依赖大型昂贵检测仪器,检测成本高。因此,本研究建立基于新型十万目六边形微腔芯片(novel 100 000 hexagonal microchamber chip, NHMC)的数字 PCR 平台用于肺癌基因突变绝对定量,以丰富微流控式数字 PCR 技术,并为肿瘤基因突变检测提供新的方法选择。

1 材料与方法

1.1 临床病例

收集 2020 年 1-10 月陆军军医大学第二附属医院通过 AmoyDx 基因检测试剂盒(艾德生物,厦门,中国)确诊的 6 例 EGFR G719X 突变肺癌患者的组织切片,每例各 10 张。纳入标准:①影像学、病理学及体征确诊为原发性肺癌患者;②心电图、血常规、肝肾功能、骨髓功能基本正常;③患者及家属知情同意。排除标准:①意识障碍,精神病患者;②具有其他严重基础性疾病,如糖尿病、高血压、肺心病、甲亢等;③怀孕或哺乳期妇女。本研究经陆军军医大学第二附属医院伦理委员会审批(2021-研第 020-01)。

1.2 肺癌组织切片 DNA 提取

将 6 例肺癌组织样本随机编号为 F1~F6,并使用核酸提取试剂盒(上海生物芯片,上海,中国)从肺癌组织中提取基因组 DNA,具体步骤详见试剂盒说明书。

1.3 质粒制备

用 TE 缓冲液(北京天根,北京,中国)将 1 007 ng/μL G719S 突变质粒按 10 倍梯度稀释至 3.01×10^0、3.01×10^1、3.01×10^2、3.01×10^3、3.01×10^4、3.01×10^5、3.01×10^6、3.01×10^7 copies/μL,并依次编号为 1~8 号。用 TE 缓冲液分别将 100 ng/μL L858R 突变质粒、codon12 突变质粒及 H19-1 突变质粒稀释至 3.20×10^8、3.01×10^8、2.88×10^8 copies/μL。

1.4 PCR 引物探针设计及体系构建

选取 EGFR 包含 G719S 突变位点的 19 号外显子上的 341 个碱基,使用 Primer premier 5 软件(Premier,加拿大)选出得分最高的引物和探针,探针引物序列见表 1。序列均由上海生物工程有限公司合成。使用 Premix *Ex Taq*™(Probe qPCR;TaKaRa,东京,日本)试剂,按照 12.5 μL PreMix、6.375 μL ddH_2O、0.625 μL 20 mg/mL BSA、2.5 μL 样本、前后引物及探针各 1 μL 配制总体积为 25 μL 的 PCR 反应体系。扩增条件如下:95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 40 s,56 ℃退火延伸 40 s,共 45 个循环;4 ℃保温。

1.5 NHMC 制作与结构设计

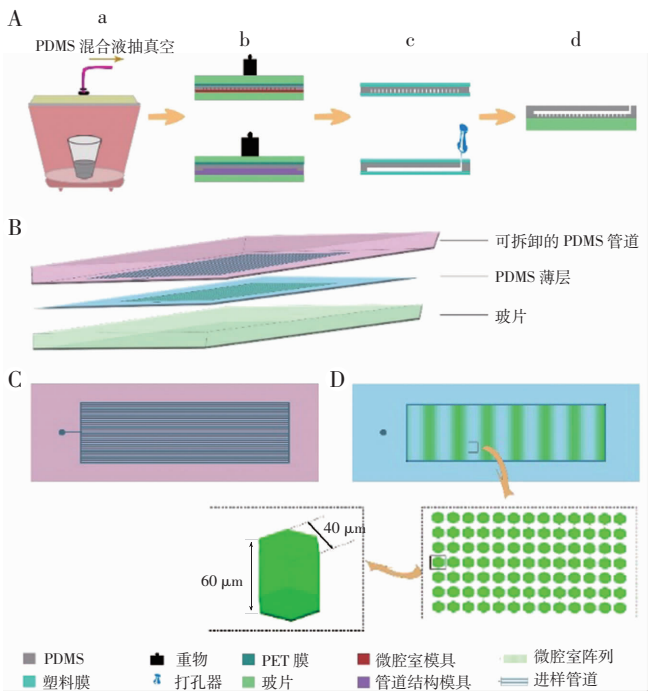
芯片制作过程如图 1 所示:①将聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS;Dow Corning,米德兰德,美国)A、B 和 Triton X-100(Sigma-Aldrich,圣路易斯,美国)以一定质量比配制,混匀后脱气 20 min(图 1Aa);②将混合液倒在刻有微腔室的硅基母模及用于输送样

本的微流体通道母模上,并在其上方依次加盖 PET 膜、玻璃片和重物,75 ℃加热固化(图 1Ab);③移除重物及玻璃片,从母模上剥离 PET/PDMS 薄层和 PDMS 管道,并用 2 mm 的打孔器在 PDMS 管道进样口处打孔(图 1Ac);④将等离子处理后的 PDMS 薄层的非结构面与干净玻片键合,同时将结构面与 PDMS 管道层结构面相贴备用(图 1Ad)。

芯片分 3 层(图 1B):上层由 2 mm 厚的 PDMS 管道作为可拆卸的泵源,包含了几十条平行微流体通道(图 1C);中层由 500 μm 厚的包含 113 137 个微腔阵列的 PDMS 薄层作为数字分割室(图 1D),每个微腔室为六棱柱体,深度为 60 μm,上下底面的对边间距为 40 μm;下层由载玻片作为支撑层。

表 1 EGFR G719S 突变 PCR 引物探针序列

名称	序列(5′- 3′)	修饰
正向引物	TGAGGATCTTGAAGGAAACTGA	-
反向引物	CCTTATACACCGTGCCGAAC	-
突变型探针	AAGTGCT+GGGCTC	5′-FAM,3′-MGB
野生型探针	AGTGCT+GAGCTCC	5′-HEX,3′-MGB



A:NHMC 制备流程示意图 a:PDMS 混合液制备;b:PDMS 腔室层及管道层制备;c:PDMS 腔室层及管道层成品;d:NHMC 组装;B:NHMC 分解侧面示意图;C:PDMS 管道层俯视示意图;D:PDMS 腔室层俯视示意图

图 1 NHMC 的制备流程与结构设计示意图

1.6 NHMC-dPCR 检测

具体操作流程如下:①芯片抽真空:将 NHMC(图 1Ad)脱气 20 min;②样本进样:取出已脱气的 NHMC,立即将 PCR 预混液加入进样孔中,静置 5~30 s 即可实现液样在 113 137 个微腔阵列中的数字化分割;③加油密封:剥离 PDMS 管道层的同时加入 200 μL 硅油,冲洗管道中残余的液样并完成油性切割密封;④玻片密封:将涂有 PDMS 的玻片覆盖在油封后的 PDMS 薄层上,完成最后封装;⑤PCR 扩增:将封装好的芯片置于平板 PCR 仪(Eppendorf,汉堡,德国)上进行扩增;⑥芯片成像:用荧光显微镜(Nikon,东京,日本)对扩增后的芯片进行成像观察。

1.7 数据分析

根据泊松分布公式,推导出适用于 NHMC-dPCR 的理论公式[7]:

$$C=\frac{\ln\left[1-\frac{N_p}{n}\right]}{V_d} \qquad (1)$$

其中 N_p 为阳性孔数,n 为微腔数,V_d 为每个分区的体积。改进后的芯片由于腔室数量的变化,n 更改为 113 137,V_d 更改为 0.125 nL。将其代入公式(1),得到样品浓度(C)的计算公式:

$$C=-8\,000\times\ln\left[1-\frac{N_p}{113\,137}\right] \qquad (2)$$

通过 Image J 1.53c 版软件(National Institutes of Health,马里兰,美国)的计数功能,统计芯片扩增后阳性孔的数量。采用 OriginPro 2019b 版软件(OriginLab,北安普敦,美国)对计算结果进行分析。

2 结果

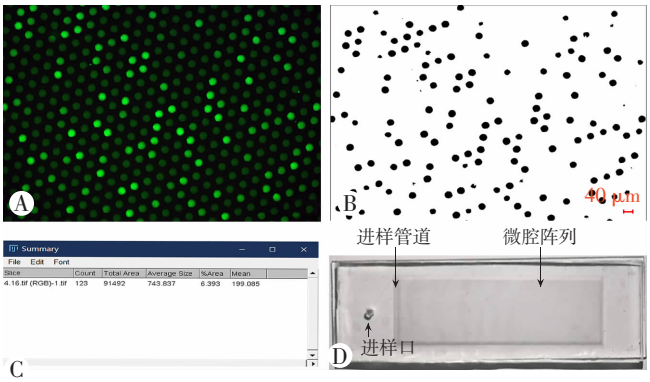
2.1 芯片成像与实物展示

图 2A 为一个代表性样本 X 经 NHMC-dPCR 检测的荧光显微图,可见不含目标序列的腔室显示低荧光水平(即“阴性信号”),而含目标序列的腔室显示高荧光水平(即“阳性信号”)。使用 Image J 软件将图 2A 转换为灰度(图 2B),以荧光占比 10%~12%(灰度条上荧光背景峰群起点处)为阈值区分阳性孔和背景;最终以直径和亮度两项指标对样本 X 阳性突变孔进行统计(图 2C)。NHMC 实物如图 2D 所示。

2.2 G719S 突变扩增体系的引物和探针浓度优化

由于 dPCR 技术的检测限受终点荧光值的影响,因此优化体系中引物、探针的浓度十分必要。在 56 ℃最佳退火温度下,加入 0.4 μmol/L 探针和 2.5 μmol/L

模板进行 PCR 扩增,以确定荧光值最高的最佳引物浓度。如图 3A 所示,在 0.1~0.9 μmol/L 范围内,荧光值与引物浓度呈正比;当引物浓度为 1 μmol/L 时荧光值略有下降。因此,以 0.9 μmol/L 作为引物的最佳浓度。同样,为了确定荧光值最高的最佳探针浓度,在 56 ℃最佳退火温度和 0.9 μmol/L 最佳引物浓度下,加入 2.5 μmol/L 模板进行 PCR 扩增。结果表明,在 0.1~0.5 μmol/L 浓度范围内,扩增曲线的相对荧光值与探针浓度呈反比(图 3B);原始曲线的绝对荧光值与探针浓度呈正比(图 3C)。扩增曲线的趋势与原始曲线相反,是因为探针添加越多,背景越高,相对增量越低。为保证最高的终点荧光值,确定 0.5 μmol/L 作为最佳探针浓度。



A:样本 X 的荧光显微图(×100);B:Image J 处理后样本 X 的灰度图;C:样本 X 阳性突变统计结果;D:NHMC 实物图

图 2 样本 X 的检测结果图与 NHMC 实物图

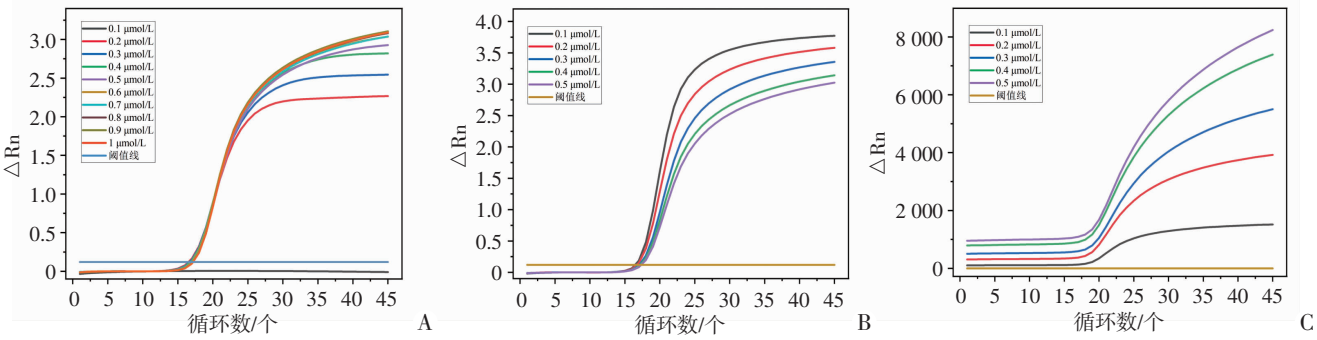
2.3 NHMC-dPCR 的性能验证与灵敏度

由 NHMC-dPCR 检测 1~8 号 G719S 突变质粒结果(图 4A~H)可知,突变阳性孔数与 PCR 混合液中质粒模板的浓度梯度呈正比。图 4I 显示了这 8 个浓度梯度质粒的测量浓度与其期望值之间关系。通过线性回归分析,获得在 8 个数量级动态范围内的线性方程 $Y=0.725X-0.581$ 和相关系数 $R^2=0.984$。这表明测量浓度和预期浓度具有良好的相关性。

当只有一个正分区时,根据 1.7 中的公式(2)可计算出 NHMC 的理论检测限为 0.070 copies/μL。然而,在实际核酸检测中,受吸附等多种因素的影响,芯片的检测限往往高于理论值。由图 4A 可知,NHMC 的灵敏度为 3.01 copies/μL,远远高于 DNA 测序、qPCR 和 ARMS 等。

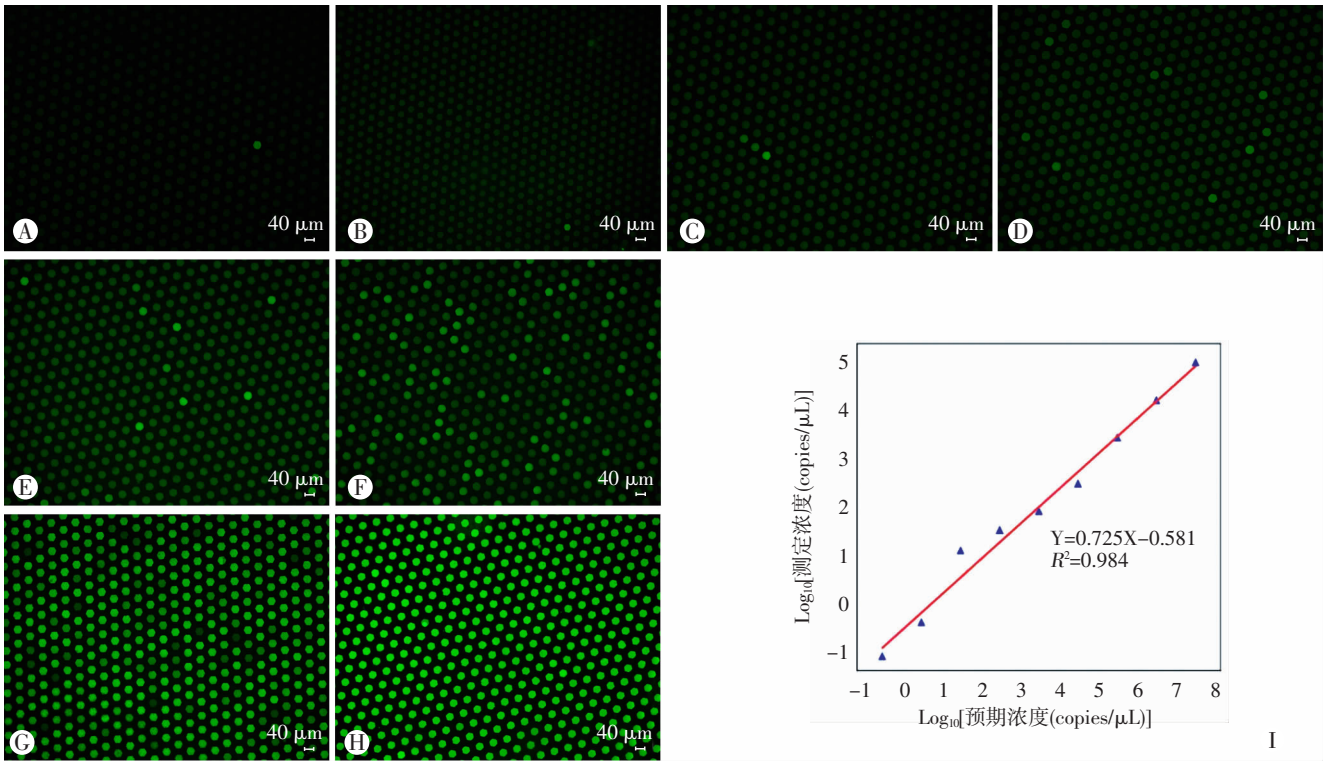
2.4 NHMC-dPCR 的特异性及抗干扰能力验证

为验证 NHMC-dPCR 系统的特异性及抗干扰能力,分别测定了 20.5 g/L 白蛋白标准溶液(血清中的主要物质),2.88×10^8 copies/μL H19-1 突变质粒(长链非编码 RNA 突变),3.20×10^8 copies/μL L858R 突变质粒(EGFR 突变),3.01×10^8 copies/μL codon12 突变质粒(KRAS 突变),3.01×10^5 copies/μL G719S 突变质粒以及用 4 种干扰物配制的浓度为 3.01×10^5 copies/μL 的 G719S 突变质粒混合液。其中 NHMC-dPCR 检测白蛋白标准溶液、H19-1 突变质粒、L858R 突变质粒和 codon12 突变质粒均未发现阳性拷贝。而 G719S 突变质粒及其与 4 种物质混合液的检测结果分别为 23 194.4 copies 和 22 095.7 copies;两者与其他 4 种干扰物的拷贝数相比,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 5)。结果表明该体系具有较好的特异性和较强的抗干扰能力。



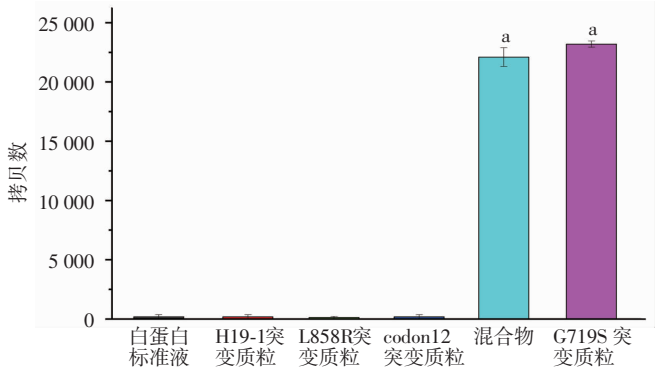
A:引物浓度优化的扩增曲线;B:探针浓度优化的扩增曲线;C:探针浓度优化的原始曲线

图 3 引物和探针浓度优化曲线图



A~H:1~8 号稀释质粒的荧光显微图;I:8 个浓度梯度质粒测量浓度与其期望值之间线性关系

图 4 8 个 10 倍梯度突变质粒的荧光图及其测量值与期望值之间的线性关系



a: $P<0.01$,与白蛋白标准液、H19-1 突变质粒、L858R 突变质粒及 codon12 突变质粒比较

图 5 NHMC-dPCR 检测 G719S 及其他干扰物质拷贝数

2.5 在检测肺癌组织样本中的应用

为了验证 NHMC-dPCR 在临床样本中的实际应用,分别用 NHMC-dPCR、液滴式数字 PCR(droplet digital PCR,ddPCR)和 DNA 测序 3 种方法对 6 例 EGFR G719X 突变的肺癌组织样本进行检测并比较方法间的一致性。3 种方法均测得 F2 和 F5 有 EGFR G719S 阳性突变,F1、F3、F4 及 F6 为阴性。其中 NHMC-dPCR 和 ddPCR 均可快速直观地观察到阳性突变并大致判断突变浓度(图 6、7),还可对目的序列进行绝对定量;而 DNA 测序需要仔细比对碱基从而得出目标突变位点(图 8),不如前两种方法直观,且无法对突变基因进行定量。NHMC-dPCR、ddPCR 和 DNA 测序的检测结果显示,3 种方法一致性较好,阳性符合率及阴性符合率均为 100%,NHMC-dPCR 与 ddPCR 定量结果一致(表 2),NHMC-dPCR 绝对定量能力达到了传统 ddPCR 的水平。

表 2 NHMC-dPCR、ddPCR、DNA 测序检测结果比较

样本	DNA 测序	ddPCR(copies)	NHMC-dPCR(copies)
F1	定性(-)	0	0
F2	定性(+)	1 581.8	1 822.4
F3	定性(-)	0	0
F4	定性(-)	0	0
F5	定性(+)	218.3	451.7
F6	定性(-)	0	0

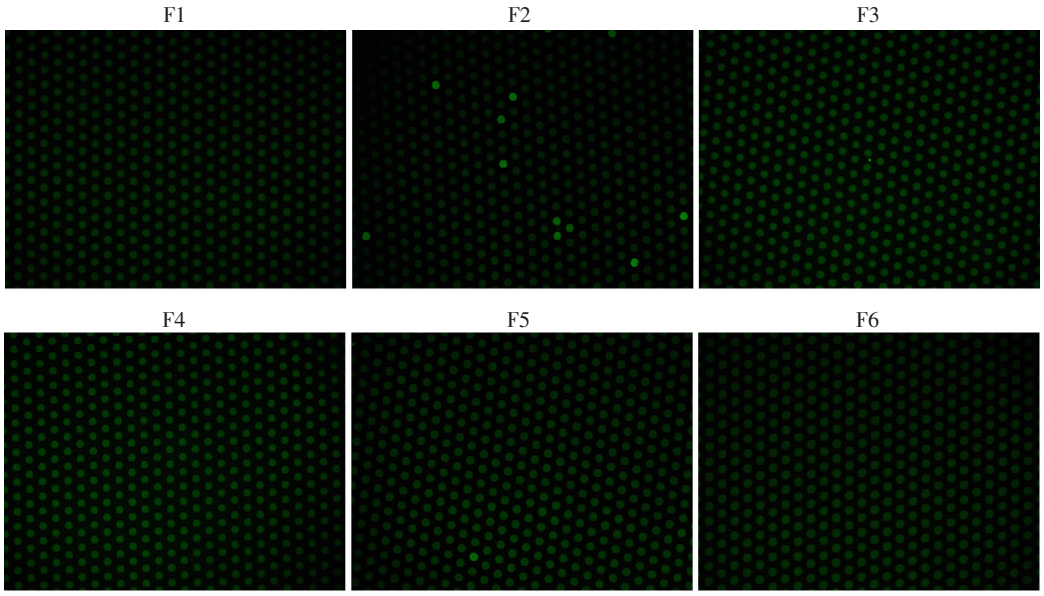
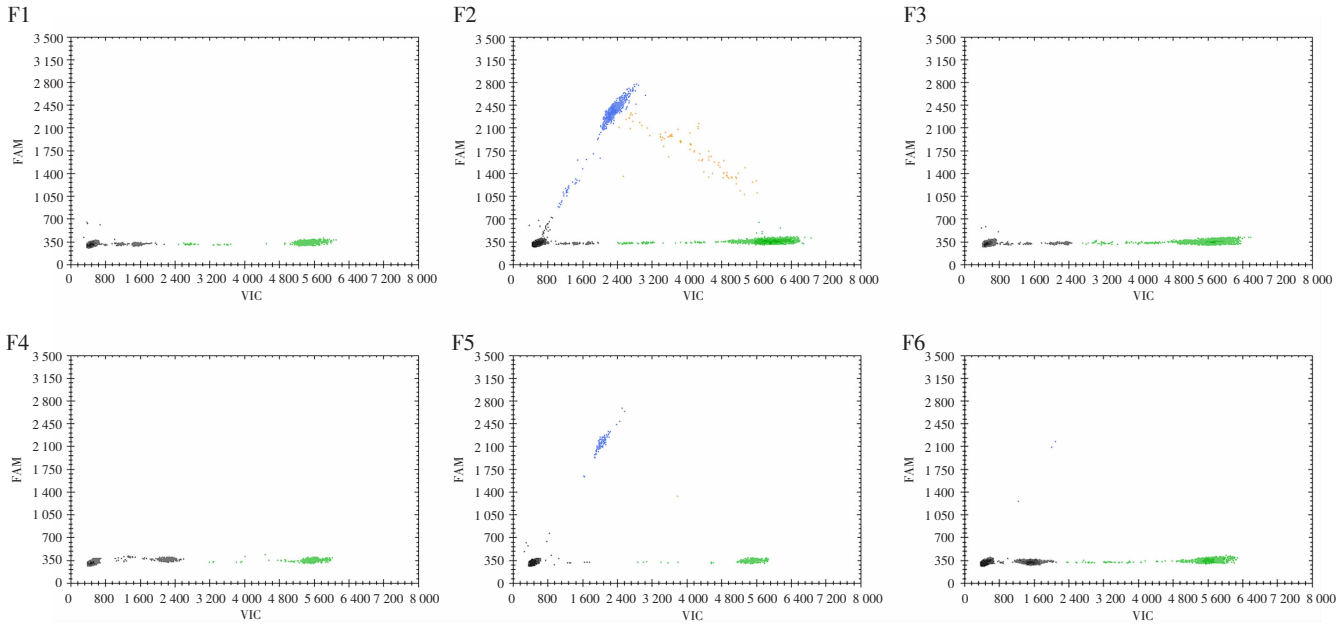


图 6 F1~F6 肺癌组织样品 NHMC-dPCR 检测的荧光显微观察 (×100)

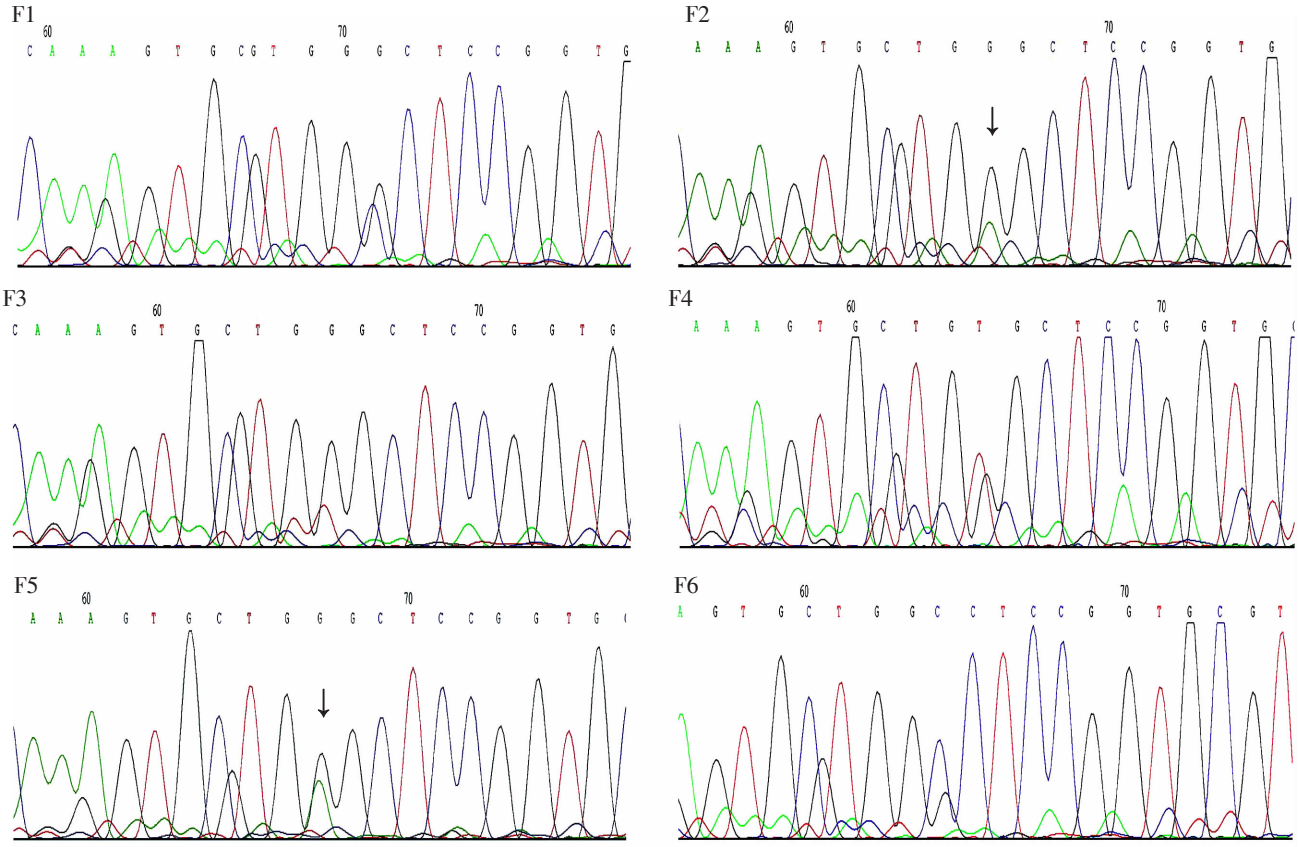


横轴为 VIC 通道荧光增量,纵轴为 FAM 通道荧光增量;微滴在坐标系内聚类为 4 簇:左下黑色为无模板微滴,左上蓝色为仅有 FAM 信号的液滴,右下为仅有 VIC 信号的微滴,右上为同时发出 FAM 与 VIC 信号的双阳性微滴

图 7 F1~F6 肺癌组织样品 ddPCR 检测结果

3 讨论

精确测定 EGFR 突变的种类及含量,有针对性地选择靶向药是提高肺癌疗效、降低癌症死亡率的重要途径之一[8]。对于突变丰度低的样本,检测方法的灵敏度和特异性对突变序列定量结果的准确性有很大影响。数字 PCR 技术最明显的优势在于单分子 PCR 扩增,目前已广泛应用于癌症治疗监测[9]、单细胞分析[10]、寄生虫诊断[11]及环境监测[12]等分子生物学领域。其基本原理是将样品分割成许多独立的子反应单元,每个子单元包含一个或没有目标分子,是 dPCR 的关键环节。基于样本的分散方式,dPCR 通常分为磁珠模式、微滴模式和芯片模式,其中芯片模式是基于腔室的微流控分区技术实现样本的数字化分割。



箭头示样本核酸序列中的 EGFR G719S 阳性突变位点(G→A)

图 8 F1~F6 肺癌组织样品 DNA 测序检测结果

PDMS 材料具有良好的透光透气性、强生物兼容性、易倒模复制等特点,是制作多阵列微腔室的理想材料[13]。最近,本项目组基于 PDMS 软光刻技术结合微流控加工技术设计了一种“三明治型”dPCR 芯片,并对其自进样分割方式及抗水分挥发方法等不断改进和优化;已在 H1975 肺癌细胞系 EGFR gDNA 初步检测中有稳定表现[7, 14]。本研究中的新型十万目六边形微腔芯片是在前期芯片基础上多次改良的版本,具有更多优点:①将连接微腔的进样管道去除,设计成可拆卸的 PDMS 管道,避免由于 PDMS 透气性不够导致的油冲洗不充分问题。②微腔室由原来的圆柱体空腔改为六棱柱空腔设计,使在相同尺寸的微阵列中空腔数量由 20 000 个增加至 113 137 个。5 倍多空腔数量的增加不仅大大提高了样本的数字化分割效率,而且在 PDMS 透气性一致的情况下,可使进样时间由 1~2 min 减少至 5~30 s。③在芯片制作与扩增体系中添加比例更合适的 Triton X-100 和 BSA,较大程度减少样品的吸附,使检测结果更接近于真实值。

本研究开发的 NHMC-dPCR 技术最低检测浓度为 3.01 copies/μL,检测值与期望值之间高度一致($Y = 0.725X - 0.581$, $R^2 = 0.984$),在微量丰度基因突变的应用中具有良好的性能和较高的价值。NHMC-dPCR 检测白蛋白标准液、H19-1 突变质粒、L858R 突变质粒及 codon12 突变质粒未发现阳性孔,检测 G719S 突变质粒及其与以上 4 种干扰物混合的结果相差不大;证明在检测 EGFR G719S 突变的应用中特异性高、抗干扰能力较强。NHMC-dPCR 与 ddPCR、DNA 测序方法比较显示,3 种方法对 6 例临床肺癌组织样本定性结果吻合度高,而 NHMC-dPCR 在基因突变绝对定量上与传统的 ddPCR 结果一致;证明建立的 NHMC-dPCR 技术在临床样本检测中具有较高的准确性和可靠性。其中 DNA 测序技术仅能定性,且具有耗时长、操作过程复杂、结果观察不够直观等缺点。而 ddPCR 存在液滴数目限制和管路堵塞问题,在检测之前需要评估样本状态并测定核酸浓度。ddPCR 检测的样品核酸浓度若超过液滴范围,则需要在检测前对样品进行不同程度的稀释,操作步骤的增加可能会影响定量结果;蛋白质残留、热循环等导致的液滴聚集和管路阻塞,还会

导致目的序列定量失败。相比之下,NHMC-dPCR 技术不受核酸浓度和液滴数的限制,无需提前对样本核酸浓度进行评估和稀释,除去制作芯片的时间,整个检测过程仅需 1.5 h 左右。且样本的自进样分割、PCR 扩增及结果观察均在一个芯片中完成,摆脱了对液滴振荡仪、液滴流式计数仪等大型昂贵仪器的依赖,大大简化了操作步骤,减少了检测成本。此外,基于 PDMS 材料本身的多孔透气特性,本技术所需的 NHMC 还可提前大批量制备并抽真空备用,在多场合实现随时对核酸样本进行快速绝对定量检测。

综上,NHMC-dPCR 无需依赖标准曲线、内参基因及大型贵重仪器即可实现对样品的实时绝对定量,具有成本低、操作简单、速度快、抗干扰能力强等优点。NHMC-dPCR 的建立不仅丰富了微流控式芯片数字 PCR 技术,也为其他样本检测的临床应用和科学研究提供了另一种选择。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al*. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.

[2] IMYANITOV E N, IYEVLEVA A G, LEVCHENKO E V. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives[J]. Crit Rev Oncol Hemat, 2021, 157: 103194. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.103194.

[3] SIGGILLINO A, ULIVI P, PASINI L, *et al*. Detection of EGFR mutations in plasma cell-free tumor DNA of TKI-treated advanced-NSCLC patients by three methodologies: scorpion-ARMS, PNAClamp, and digital PCR[J]. Diagnostics, 2020, 10(12): 1062. DOI: 10.3390/diagnostics10121062.

[4] SHIN S, KIM J, KIM Y, *et al*. Assessment of real-time PCR method for detection of EGFR mutation using both supernatant and cell pellet of malignant pleural effusion samples from non-small-cell lung cancer patients[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(12): 1962-1969. DOI: 10.1515/cclm-2016-0851.

[5] JOY R A, THELAKKATTUSSERRY S K, VIKKATH N, *et al*. Somatic mutation detection efficiency in EGFR: a comparison between high resolution melting analysis and Sanger sequencing[J]. BMC cancer, 2020, 20(1): 902. DOI: 10.1186/s12885-020-07411-1.

[6] SUGIMORI M, SUGIMORI K, TSUCHIYA H, *et al*. Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy[J]. Cancer Sci, 2020, 111(1): 266-278. DOI: 10.1111/cas.14245.

[7] CUI X, WU L, WU Y, *et al*. Fast and robust sample self-digitization for digital PCR[J]. Anal Chim Acta, 2020, 1107: 127-134. DOI: 10.1016/j.aca.2020.02.010.

[8] OSOEGAWA A, HASHIMOTO T, TAKUMI Y, *et al*. Acquired resistance to an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) in an uncommon G719S EGFR mutation[J]. Invest New Drug, 2018, 36(6): 999-1005. DOI: 10.1007/s10637-018-0592-y.

[9] WOOD-BOUWENS C M, HASLEM D, MOULTON B, *et al*. Therapeutic monitoring of circulating DNA mutations in metastatic cancer with personalized digital PCR[J]. J Mol Diagn, 2020, 22(2): 247-261. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.10.008.

[10] LIU X M, NOLL L, SHI X R, *et al*. Single-cell-based digital PCR detection and association of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups and major virulence genes[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(3): e01684-19. DOI: 10.1128/jcm.01684-19.

[11] POMARI E, PIUBELLI C, PERANDIN F, *et al*. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections[J]. Clin Microbiol Infec, 2019, 25(12): 1510-1516. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.06.009.

[12] STALEY Z R, BOYD R J, SHUM P, *et al*. Microbial source tracking using quantitative and digital PCR to identify sources of fecal contamination in stormwater, river water, and beach water in a great lakes area of concern[J]. Appl Environ Microb, 2018, 84(20): e01634-18. DOI: 10.1128/aem.01634-18.

[13] AHRBERG C D, CHOI J W, LEE J M, *et al*. Plasmonic heating-based portable digital PCR system[J]. Lab Chip, 2020, 20(19): 3560-3568. DOI: 10.1039/d0lc00788a.

[14] NING Y, CUI X, YANG C, *et al*. A self-digitization chip integrated with hydration layer for low-cost and robust digital PCR[J]. Anal Chim Acta, 2019, 1055: 65-73. DOI: 10.1016/j.aca.2018.12.029.

(收稿:2021-01-07;修回:2021-02-05)

(编辑 汪勤俭)