

• 论 著 •

T-ARMS PCR 多重检测方法研究*

陶明丽^{1,2}, 李莹雪^{1,2}, 李 豪^{1,2}, 张 威², 李传宇², 周连群^{1△}, 李金泽^{2▲}

1. 中国科学技术大学生命科学与医学部生物医学工程学院(苏州), 江苏苏州 215123;

2. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏苏州 215163

摘 要:目的 建立有错配的加尾双引物扩增受阻突变体系聚合酶链反应(T-ARMS PCR)多重检测的方法, 实现针对肝细胞癌常见基因突变位点 TP53 R249S、TP53 R273H、CTNNB1 S45F 的多重检测。方法 针对 3 个基因突变位点进行引物设计, 每个基因突变位点所设计引物序列的 5' 端不加一段 DNA 序列(Tail Free Primer)或者所设计的引物序列 5' 端加一段相同的 DNA 序列(Tailed Primer), 利用实时荧光定量 PCR 仪分别检测并比较 3 个基因突变位点的不同引物序列形成的单重体系、三重体系的扩增结果, 研究 T-AMRS PCR 方法对突变型基因位点突变负荷的检测限、特异性和多靶标检测能力。结果 3 个基因突变位点 Tailed Primer 单重体系扩增结果显示, 突变型质粒的扩增均优于野生型质粒, 野生型质粒的扩增均被有效抑制, 突变负荷检测限低至 0.10%, 特异性良好。Tailed Primer 三重体系减少了引物二聚体的产生, 调控 CTNNB1 S45F、TP53 R249S、TP53 R273H 的解链温度分别为 81.11 °C、82.36 °C、86.35 °C, 实现不同突变位点的显著区分。与 Taqman 探针基因分型方法相比, T-AMRS PCR 方法野生型和突变型基因的 Ct 值差异更显著, 单荧光通道即可实现突变基因检测。结论 运用 T-ARMS PCR 进行一管三重检测, 分析熔解曲线, 能有效检测到目的基因突变, 抑制野生型模板的扩增, 并区分不同的基因突变位点; 同时, Tailed Primer 设计减少了多重情况下引物二聚体的产生。该方法为临床中肝细胞癌的早期筛查、预后预测、病情监测提供理论依据。

关键词:有错配的加尾双引物扩增受阻突变体系聚合酶链反应; 多重检测; 熔解曲线分析; 基因突变; 肝细胞癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.22.001

中图法分类号:R753.7

文章编号:1673-4130(2022)22-2689-06

文献标志码:A

Study on multiplex detection method of T-ARMS PCR*

TAO Mingli^{1,2}, LI Yingxue^{1,2}, LI Hao^{1,2}, ZHANG Wei², LI Chuanyu², ZHOU Lianqun^{1△}, LI Jinze^{2▲}

1. School of Biomedical Engineering (Suzhou), University of Science and Technology of China Life Sciences and Medicine, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, Jiangsu 215163, China

Abstract: Objective To establish a multiple detection method of tailed-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (T-ARMS PCR) with mismatched dual primers, and to realize multiple detection for common gene mutation sites TP53R249s, TP53R273H, CTNNB1 S45F in hepatocellular carcinoma. **Methods** Primers were designed for three gene mutation sites. For each gene mutation site, the 5' end of the designed primer sequence was not added a DNA sequence (Tail Free Primer), or the 5' end of the designed primer sequence was added with the same DNA sequence (Tailed Primer). The amplification results of single and triple systems formed by different primer sequences of three gene mutation sites were detected by real time fluorescent quantitative PCR and compared, and the detection limit for mutation load of mutant gene sites, specificity and multi target detection ability of T-AMRS PCR were studied. **Results** The amplification results of the Tailed Primer single system of three gene mutation sites showed that the amplification of mutant plasmids was better than that of wild type plasmids, and the amplification of wild type plasmids was effectively inhibited. The detection limit of mutation load was as low as 0.10%, and the specificity was good.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(61874133、61901469、22005331);江苏省科技项目(BE2019684、BE2020768);江苏省苏州市基础研究试点项目(SJC2021019)。

作者简介:陶明丽,女,博士研究生在读,主要从事多重突变检测方面的研究。△ 通信作者, E-mail: zhoulq@sibet.ac.cn。▲ 共同通信作者, E-mail: lijz@sibet.ac.cn。

The Tailed Primer triple system reduced the production of primer dimer, regulated the unwinding temperature of CTNNB1 S45F, TP53 R249S and TP53 R273H at 81. 11 °C, 82. 36 °C and 86. 35 °C, respectively, and achieved significant differentiation of different mutation sites. Compared with Taqman genotyping method, T-AMRS PCR method showed a more significant difference in Ct values between wild type and mutant genes, and mutant genes could be detected by single fluorescence channel. **Conclusion** By using T-ARMS PCR to conduct one-tube triple detection and analyze the melting curve, the mutation of the target gene can be effectively detected, the amplification of wild type template can be inhibited, and the mutation sites of different genes can be differentiated. At the same time, the Tailed Primer design reduces the production of primer dimers under multiple conditions. This method provides a theoretical basis for early screening, prognosis prediction and disease monitoring of hepatocellular carcinoma in clinical practice.

Key words: tailed-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction with mismatched dual primers; multiplex detection; analysis of melting curve; gene mutation; hepatocellular carcinoma

肝细胞癌(简称肝癌)是一种高度恶性肿瘤。2020 年中国癌症中肝癌发病率位居男性第 3 位,女性第 7 位,死亡率位居恶性肿瘤相关死亡的第 3 位^[1-2]。到 2030 年,将有超过 100 万人死于肝癌^[3],使其成为全球最致命的癌症类型之一。因此,肝癌的早期诊断、病情监测及预后评估是提高肝癌患者治愈率,降低病死率的关键。肝癌的诊断常使用甲胎蛋白(AFP)水平检测或使用无创成像检查,如超声检查、计算机断层扫描(CT)和磁共振(MRI),但是这些方法由于灵敏度低,只有在恶性肿瘤晚期时才能检测到肿瘤的存在,从而导致治疗方案选择有限且预后不佳^[4]。通过早期检测和监测治疗后可能的肝癌复发,可以显著提高治疗有效性。肝细胞癌变离不开单核苷酸多态性(SNP)突变,SNP 检测常用 Taqman 探针基因分型法,等位基因富集法则是新兴的一种方法^[5]。等位基因富集法能在大量野生型等位基因存在的情况下检测突变型等位基因,减弱野生型背景的干扰,具有用于临床诊断的潜力。

等位基因富集可以通过去除野生型等位基因或通过选择性扩增突变型等位基因来实现。振荡电泳能够有效去除野生型序列^[6-7];野生型特异探针和双链特异核酸酶被用于选择性降解野生型 DNA 分子^[8],通过耗尽野生型等位基因来改善突变型等位基因的扩增。突变型等位基因的选择性富集通常是通过聚合酶链反应(PCR)实现的,其中野生型 DNA 序列 PCR 扩增被阻止,其方法包括 PCR 阻断剂^[9]、锁核酸和肽核酸钳 PCR^[10-11]、改良型完全富集低变性温度下的复合 PCR(ICE-COLD PCR)^[12-13]和阻断剂置换扩增^[14]。尽管这些等位基因富集的方法已多种多样,但是鲜有能实现多重基因突变检测的。

多重 PCR 检测技术仅在一支反应管中就可检测出多个靶标,使得检测时间和检测试剂用量减少,具有高效便捷、经济节约、特异度和灵敏度高等优点,具

有普通单重 PCR 方法不可比拟的优越性^[15]。肝癌相关的基因突变位点是多个的,难以预测的,若能一次检测多个位点,将对肝癌的临床诊治带来极大便捷。因此,多重 PCR 检测技术对肝癌诊治以及临床研究有重大意义和价值。

本研究提出有错配的加尾双引物扩增受阻突变体系 PCR(T-ARMS PCR)的方法,该方法通过熔解曲线和扩增曲线分析即可得出结果,是一种能实现多重检测的等位基因富集方法,能有效地抑制野生型 DNA 序列的扩增,达到富集突变型 DNA 序列的目的,同时能解决多重情况下引物二聚体干扰的问题,为动态监测肝癌患者的病情状况、早期检测肝细胞癌变以及肝癌肿瘤复发的实时评估等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究使用的质粒是由安徽通用生物股份有限公司合成的野生型质粒和突变型质粒。

1.2 仪器与试剂 本研究使用的引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, Taq Pro HS Universal Probe Master Mix 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司, EveGreen(20× in water)购于上海翌圣生物科技有限公司, ABI QuantStudio7 实时荧光定量 PCR(qPCR)仪购于美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 方法

1.3.1 单重体系 qPCR 分别对肝细胞 RNA 的 TP53 R249S、TP53 R273H、CTNNB1 S45F 3 个基因突变位点进行分析,检测均采用染料法 qPCR,样品均设置 3 次重复和空白对照(NTC)组,质粒浓度均为 10^3 copy/ μ L。染料是 EveGreen,其具有极高的灵敏度且 PCR 抑制性极小,非常适合多重 PCR 以及高分辨率熔解曲线(HRM)的分析。均采用 30 μ L 体系,反应条件:95 °C 30 s 预变性 1 个循环;然后按 95 °C 10 s 变性,60 °C 30 s 退火/延伸,共 40 个循环;默认扩增曲线和熔解曲线荧光采集。引物序列 5'端不加

一段 DNA 序列(Tail Free Primer),采用扩增受阻突变体系 PCR(ARMS PCR)引物设计原理,具体序列见表 1。引物序列 5'端加一段相同的 DNA 序列(Tailed Primer),引物序列见表 2。

1.3.2 三重体系 qPCR 结果对照 将 Tail Free Primer 三重体系与 Tailed Primer 三重体系做对比。分别将 3 对 Tail Free Primer 及其对应模板、3 对 Tailed Primer 及其对应模板进行 PCR 扩增,均以野生型模板和突变型模板作对照,采用 30 μL 体系,qPCR 仪器设置的程序与 1.3.1 相同,将两组三重体系扩增结果做对比分析。

1.3.3 突变负荷的检测限及特异性检测 将野生型质粒与突变型质粒以不同比例混合,野生型质粒终浓度为 10⁴ copy/μL,得到突变型质粒与野生型质粒的浓度比(突变负荷)分别为 0.00%、0.05%、0.10%、

0.25%、1.00%的标本,进行 PCR 扩增,通过扩增曲线 Ct 值以及熔解曲线来分析在大背景为野生型质粒的情况下该方法对突变型质粒突变负荷的检测限,比较野生型质粒和有突变负荷的野生型质粒的 Ct 值大小,就可得出突变负荷的检测限,同时观察引物特异性。每份标本进行 3 次重复平行实验。

1.3.4 T-ARMS PCR 与 Taqman 探针基因分型方法的对比 Taqman 探针基因分型方法的具体引物及探针序列如表 3 所示,其针对的突变位点是 TP53 R249S。下划线的碱基是 SNP 位点处。反应体系有纯合子野生型、纯合子突变型、杂合子,均加入两种荧光探针,采用 30 μL 探针法 qPCR,样品均设置 3 次重复和 NTC 组。反应条件:95 ℃ 30 s 预变性 1 个循环;然后按 95 ℃ 10 s 变性,60 ℃ 30 s 退火/延伸,共 45 个循环;最后 60 ℃,1 min 延伸;默认荧光采集程序。

表 1 试验所用 Tail Free Primer

目的基因突变位点	引物	序列(5'—3')
TP53 R249S	正向引物	CAGTGTGATGATGGTGAGGAT <u>CTGA</u>
	反向引物	GGTGGTACAGTCAGAGCCAACC
TP53 R273H	正向引物	GACGGAACAGCTTTGAGGG <u>TCA</u>
	反向引物	CCAGGGAGCACTAAGCGAG
CTNNB1 S45F	正向引物	GCCACTACCACAGCTCCG <u>TT</u>
	反向引物	CCTTCACTCAAGAACAAGTAGCTG

注:下划线的碱基代表错配碱基。

表 2 试验所用 Tailed Primer

目的基因突变位点	引物	序列(5'—3')
TP53 R249S	正向引物	TGTATGATTAGATTACTA CAGTGTGATGATGGTGAGGAT <u>CTGA</u>
	反向引物	TGTATGATTAGATTACTA GGTGGTACAGTCAGAGCCAACC
TP53 R273H	正向引物	TGTATGATTAGATTACTA GACGGAACAGCTTTGAGGG <u>TCA</u>
	反向引物	TGTATGATTAGATTACTA CCAGGGAGCACTAAGCGAG
CTNNB1 S45F	正向引物	TGTATGATTAGATTACTA CTATCGCCACTACCACAGCTCCG <u>TT</u>
	反向引物	TGTATGATTAGATTACTA CCTTCACTCAAGAACAAGTAGCTG

注:加粗部分 DNA 序列即为引物 5'端引入的一段 DNA 序列,下划线的碱基代表错配碱基。

表 3 针对突变位点 TP53 R249S 的基因分型引物及探针序列

引物/探针类型	序列(5'—3')
正向引物	AGTCTTCCAGTGTGATGATGG
反向引物	GTTGGCTCTGACTGTACCAC
野生型探针	FAM-ATGGGG <u>ACT</u> CCGGTTC-MGB
突变型探针	VIC-ATGGGG <u>CCT</u> CCGGTTC-MGB

注:下划线的碱基是 SNP 位点处。

2 结 果

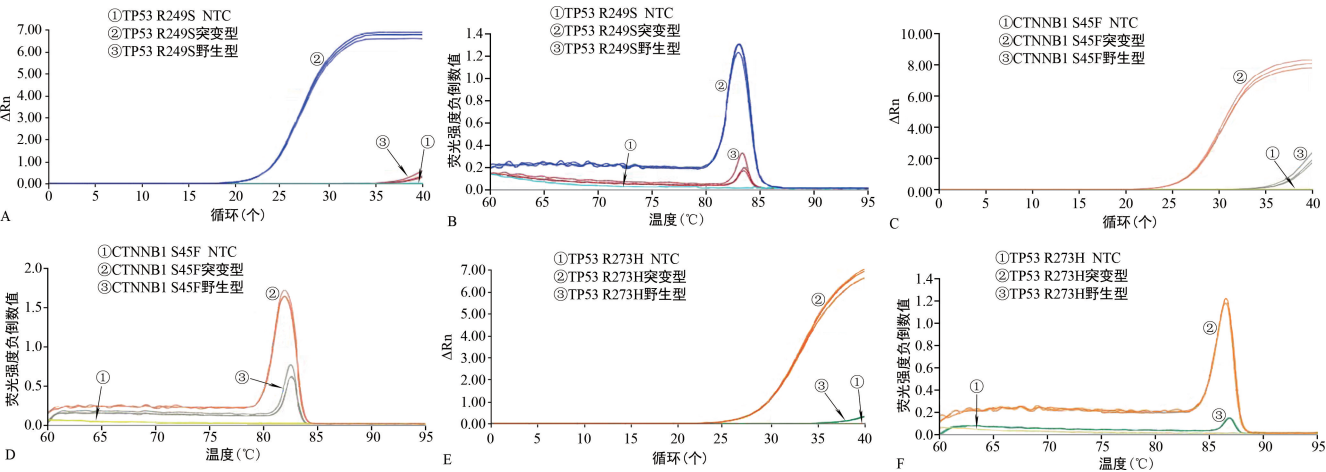
2.1 3 个基因突变位点 Tailed Primer 单重体系扩增结果 TP53 R249S 突变型质粒扩增的 Ct 值为

24.23,野生型质粒无 Ct 值(图 1A);突变型质粒解链温度(Tm)为 83.06 ℃,NTC 组无峰值(图 1B)。CTNNB1 S45F 突变型质粒扩增的 Ct 值为 26.99,野生型质粒 Ct 值为 38.02(图 1C);突变型质粒 Tm 为 81.96 ℃,NTC 组无峰值(图 1D)。TP53 R273H 突变型质粒扩增的 Ct 值为 29.52,野生型质粒 Ct 值为 39.02(图 1E);突变型质粒 Tm 为 86.45 ℃,NTC 组无峰值(图 1F);3 个基因突变位点 Tailed Primer 单重体系突变型质粒的扩增均优于野生型质粒,野生型质粒的扩增均被有效抑制。

2.2 三重体系 qPCR 熔解曲线比较 在 Tail Free Primer 三重体系熔解曲线(图 2A)中,3 个突变型质

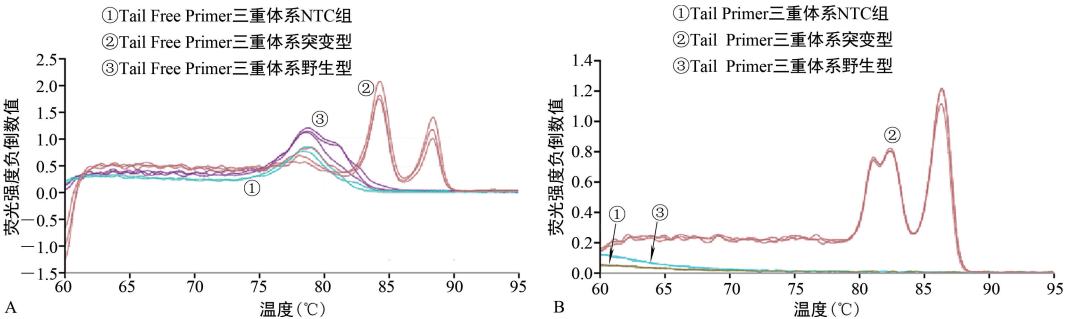
粒反应体系熔解曲线出现 2 个明显的峰值且有引物二聚体,未能体现出 3 个峰值,2 个 T_m 分别为 84.3 $^{\circ}\text{C}$ 和 88.4 $^{\circ}\text{C}$;3 个野生型质粒反应体系熔解曲线出现的峰值为引物二聚体,野生型质粒几乎未扩增;NTC 组有引物二聚体的峰值出现,表明 Tail Free Primer 三重体系中有非特异性扩增产物。在 Tailed Primer 三重体系熔解曲线(图 1B)中,3 个突变型质粒

反应体系熔解曲线出现分明的 3 个峰值, T_m 依次为 81.11 $^{\circ}\text{C}$ 、82.36 $^{\circ}\text{C}$ 、86.35 $^{\circ}\text{C}$,分别对应 CTNNB1 S45F、TP53 R249S、TP53 R273H,该三重体系的 3 个 T_m 与单重体系的 T_m 均吻合;野生型质粒和 NTC 组反应体系熔解曲线均未出现峰值,无引物二聚体,无非特异性扩增产物。突变型质粒扩增明显优于野生型质粒扩增。



注:ΔRn 为每点测量的荧光强度与荧光基线强度的差值。A、B 分别为 TP53 R249S 的单重体系扩增曲线、熔解曲线;C、D 分别为 CTNNB1 S45F 的单重体系扩增曲线、熔解曲线;E、F 分别为 TP53 R273H 的单重体系扩增曲线、熔解曲线。

图 1 三个基因突变位点的 Tailed Primer 单重体系扩增结果



注:A 为 Tail Free Primer 三重体系熔解曲线;B 为 Tailed Primer 三重体系熔解曲线。

图 2 三重体系 qPCR 熔解曲线结果

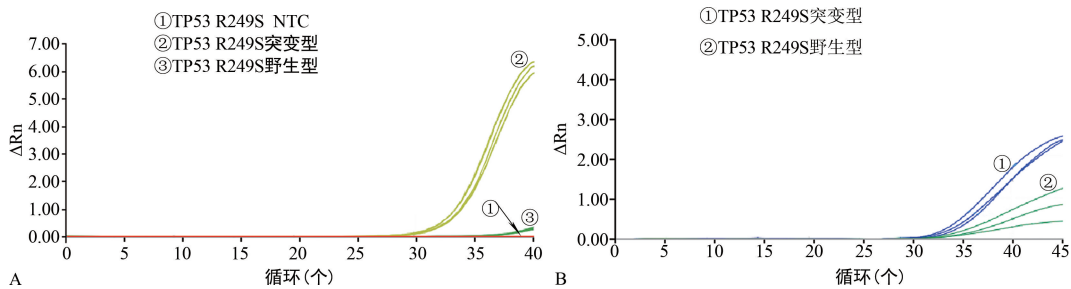
2.3 3 个基因突变位点突变负荷的检测限及特异性检测结果 3 个基因突变位点突变负荷的检测限检测结果如表 4 所示,将没有添加突变型质粒与添加了不同比例突变型质粒的 C_t 值进行比较,表中 C_t 值均为 3 个重复平行实验的均值,TP53 R249S 和 R273H 突变负荷的最低检测限可达 0.05%,CTNNB1 S45F 突变负荷的最低检测限可达 0.10%。熔解曲线均为单一峰, T_m 值唯一,特异性好。

2.4 T-ARMS PCR 与 Taqman 探针基因分型方法的结果比较 TP53 R249S 基因突变位点 T-ARMS PCR 结果显示,野生型与突变型质粒浓度均为 10^3 copy/ μL ,突变型质粒扩增明显优于野生型,野生型质粒扩增被抑制(图 3A)。TP53 R249S 基因突变位点

Taqman 探针基因分型方法扩增结果显示,野生型与突变型质粒混合的浓度均为 10^3 copy/ μL ,以 1:1 混合得到杂合子,2 个等位基因的探针分别标记 FAM 和 VIC 的荧光,野生型和突变型质粒的 C_t 值的大小相差 1.8,扩增效率差异不大(图 3B)。

表 4 3 个基因突变位点不同突变负荷的 C_t 值

基因突变位点	不同突变负荷的 C_t 值				
	0.00%	0.05%	0.10%	0.25%	1.00%
TP53 R249S	35.68	31.24	30.57	30.13	27.37
TP53 R273H	35.64	33.25	33.08	32.96	30.00
CTNNB1 S45F	33.48	33.52	32.06	31.26	28.24



注:ΔRn 为每点测量的荧光强度与荧光基线强度的差值。A 为 T-ARMS PCR 方案的扩增曲线;B 为 Taqman 探针基因分型方法的扩增曲线。

图 3 TP53 R249S 的 T-ARMS PCR 与 Taqman 探针基因分型方法的扩增曲线

3 讨 论

T-ARMS PCR 研究方案的原理如图 4 所示。图 4A 中,引物均增加相同的 DNA 序列,若两引物互补延伸,由于引物尾巴序列相同,提高退火温度时则形成颈环结构,阻止引物二聚体的扩增。图 4B 是 T-ARMS PCR 方法抑制野生型等位基因扩增的原理图,传统的 ARMS PCR 需要两对引物,本研究 T-ARMS PCR 方法只用一对引物,进一步减少引物二聚体形成的可能。引入错配碱基能阻止野生型等位基因的扩增,起到富集突变型等位基因的目的。

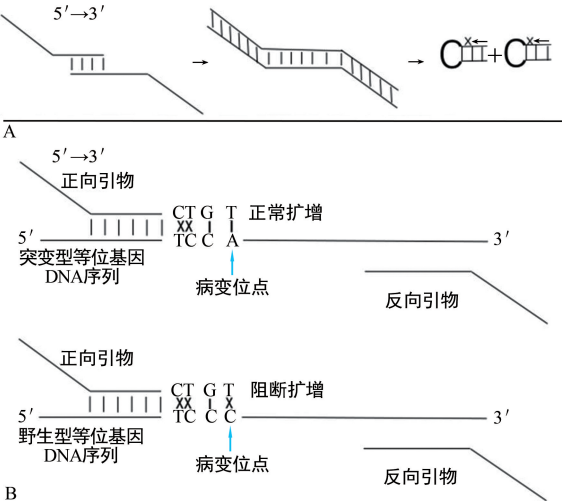


图 4 T-ARMS PCR 多重检测方法原理

本研究以 TP53 R249S、TP53 R273H、CTNNB1 S45F 3 个基因突变热点进行研究,具有一定实际意义。TP53 的表达与肝癌中的 R249S 突变显著相关^[16-17]。而 R273H 是 TP53 上与肝癌相关的另一个突变热点。CTNNB1 是肝癌最显著变异基因之一,其编码 β-catenin 蛋白,参与 Wnt 信号通路调控,对于肝癌的机制发生和发展起着重要的作用。有报道显示,肝癌中大约 90% 的 CTNNB1 突变发生在两个热点区域,密码子 32~37 和 41~45,分别占肝癌中所有 CTNNB1 突变的 55% 和 34%^[18-19],S45F 为其突变热点之一^[20]。

多重 PCR 检测技术是一种简单和经济的基因突变检测方法,能在一定程度上解决多重 PCR 产生引物二聚体的问题。引物序列 5'端加一段 DNA 序列的

方法,能调控产物 Tm 使不同产物更易区分,只扩增突变型等位基因,使得在多重情况下能减少 Tm 通道占用,增加检测靶标数。本研究中,采用 ARMS PCR 的原理设计上游引物,由于多重 PCR 扩增始终存在引物二聚体的干扰,故采用 Tailed Primer 的方法,来消除引物二聚体的影响^[21]。ARMS PCR 是检测 SNP 基因型的一种简单和经济的方法,传统的 ARMS PCR 使用 4 个引物,扩增完成后进行凝胶电泳获取结果^[22]。本研究在此基础上对该方法进行了一定的创新,使用一对引物即可,正向引物引入错配碱基使野生型序列扩增受到抑制,只扩增突变型,结合荧光定量 PCR 染料法分析其扩增曲线以及熔解曲线可得到最后结果。相同反应体系,质粒浓度均为 10³ copy/μL,只是模板差异,野生型质粒扩增曲线的 Ct 值明显大于突变型质粒的 Ct 值,NTC 组无非特异性产物,则可判断野生型模板扩增受到有效抑制,而突变型扩增产物被放大。另外,本研究将 Tail Free Primer 体系和 Tailed Primer 体系进行比较,可以明确引物 5'端加尾能阻止引物二聚体的产生。

Taqman 探针基因分型方法是最常见的 SNP 检测方法,通过相应仪器检测荧光值的变化就可以得到基因分型的结果。该方法每个位点需要合成一对探针,探针合成费用高,且野生型和突变型的扩增效率差别不大,每次只能检测一个 SNP 位点,通量低。而本研究使用的方法能有效抑制野生型的扩增从而减少一个通道占用,可同时检测多个 SNP 位点,节约时间和成本,且操作简便。

本研究中 3 个突变基因位点突变负荷的检测限与特异性检测结果显示,TP53 R249S 和 TP53 R273H 突变负荷的最低检测限可达到 0.05%,CTNNB1 S45F 突变负荷的最低检测限可达 0.10%,且特异性均表现良好,无引物二聚体干扰。通常,qPCR 突变负荷的检测限低至 1%,ARMS PCR 低至 0.1%^[23],本研究中 T-ARMS PCR 突变负荷的检测限可达 0.10%。未来计划进一步将该方法应用于临床样本,获得更真实可靠的结果。

本研究方法还有待改进,下一步实验方案应考虑将其应用于多种临床标本,并采用全基因组测序的方

法对 T-ARMS PCR 实验方法的突变负荷的检测限、特异性和重复性进行验证,同时对于更多重的检测方案和灵敏度的提高方面还可以进行进一步的探索。在患者发病早期甚至还未发病前进行干预,有利于患者得到及时的治疗和减少不恰当的诊疗,提高生存率。而高灵敏度的检测方法带来的也可能是更多的干扰,多重 PCR 的非特异性扩增以及引物二聚体的存在等问题的解决仍需进一步探讨。

综上所述,运用 T-ARMS PCR 熔解曲线的方法进行一管三重检测,能有效检测到目的基因突变,抑制野生型模板的扩增,并区分不同的基因突变位点。同时 Tailed Primer 设计,减少了多重情况下引物二聚体的产生。该方法有望为临床中肝癌的早期筛查、预后评估、病情监测提供理论依据。

参考文献

[1] 樊蓉,侯金林. 行动起来,全力推动肝癌早筛早诊早治[J]. 中华肝脏病杂志,2019,27:817-821.

[2] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Cancer statistics for the year 2020:an overview[J]. Int J Cancer,2021,149(4):778-789.

[3] MARAVELIA P, SILVA D N, ROVESTI G, et al. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: opportunities and challenges for immunotherapy[J]. Cancers (Basel),2021,13(17):4334.

[4] TZARTZEVA K, OBI J, RICH N E, et al. Surveillance imaging and alpha fetoprotein for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis:a meta-analysis[J]. Gastroenterology,2018,154(6):1706-1718.

[5] SONG P, WU L R, YAN Y H, et al. Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics[J]. Nat Biomed Eng,2022,6(3):232-245.

[6] PEL J, BROEMELING D, MAI L, et al. Nonlinear electrophoretic response yields a unique parameter for separation of biomolecules[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2009,106(35):14796-14801.

[7] KIDESS E, HEIRICH K, WIGGIN M, et al. Mutation profiling of tumor DNA from plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation detection platform[J]. Oncotarget, 2015, 6 (4): 2549-2561.

[8] SONG C, LIU Y, FONTANA R, et al. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment[J]. Nucleic acids res, 2016, 44 (19): e146.

[9] TAN S, LIU H. Unravel the hidden protistan diversity: application of blocking primers to suppress PCR amplification of metazoan DNA[J]. Appl microbiol Biotechnol, 2018,102(1):389-401.

[10] ARCILA M, LAU C, NAFA K, et al. Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma: roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and

broad-spectrum mass spectrometry genotyping[J]. J Mol Diagn,2011,13(1):64-73.

[11] BRODYAGIN N, KATKEVICS M, KOTIKAM V, et al. Chemical approaches to discover the full potential of peptide nucleic acids in biomedical applications[J]. Beilstein J Org Chem,2021,17(1):1641-1688.

[12] MILBURY C A, LI J, MAKRIGIORGOS G M. Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations[J]. Nucleic Acids Res,2011,39(1):e2.

[13] ZUO Z, CHEN S S, CHANDRA P K, et al. Application of COLD-PCR for improved detection of KRAS mutations in clinical samples[J]. Mod Pathol,2009,22(8):1023-1031.

[14] WU L R, CHEN S X, WU Y, et al. Multiplexed enrichment of rare DNA variants via sequence-selective and temperature-robust amplification[J]. Nat Biomed Eng, 2017,1(9):714-723.

[15] EDWARDS M C, GIBBS R A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications[J]. PCR Methods Appl,1994,3(4):S65-S75.

[16] BARNOUD T, PARRIS J L D, MURPHY M E. Common genetic variants in the TP53 pathway and their impact on cancer[J]. J Molecular Cell Biol,2019,11(7):578-585.

[17] HUSSAIN S P, SCHWANK J, STAIB F, et al. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer [J]. Oncogene, 2007,26(15):2166-2176.

[18] KASPER B, GRUENWALD V, REICHARDT P, et al. Correlation of CTNNB1 mutation status with progression arrest rate in RECIST progressive desmoid-type fibromatosis treated with imatinib: translational research results from a phase 2 study of the German Interdisciplinary Sarcoma Group (GISG-01)[J]. Ann Surgical Oncol,2016,23(6):1924-1927.

[19] LIN S Y, CHANG T T, STEFFEN J D, et al. Detection of CTNNB1 hotspot mutations in cell-free DNA from the urine of hepatocellular carcinoma patients[J]. Diagnostics (Basel), 2021,11(8):1475.

[20] COLOMBO C, MICELI R, LAZAR A J, et al. CTNNB1 45F mutation is a molecular prognosticator of increased postoperative primary desmoid tumor recurrence: an independent, multicenter validation study[J]. Cancer, 2013, 119(20):3696-3702.

[21] BROWNIE J, SHAWCROSS S, THEAKER J, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR[J]. Nucleic acids res,1997,25(16):3235-3241.

[22] MEDRANO R F V, DE OLIVEIRA C A. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development[J]. Mol Biotechnol,2014,56(7):599-608.

[23] TANG J C, FENG Y L, GUO T, et al. Circulating tumor DNA in hepatocellular carcinoma: trends and challenges [J]. Cell Biosci,2016,6:32.