

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.041

· 技术与方法 ·

宫颈癌中 EGFR 启动子甲基化荧光偏振技术检测方法研究 *

姜英浩¹ 张 潍² 俞青苗³ 强少盈⁴ 梁 平¹ 程 红⁵ 高艳娥³ 赵星烨¹ 张 菊^{1△}

(1 第四军医大学药理学系基因诊断技术研究所 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710033;

3 西安交通大学医学院第二附属医院妇产科 陕西 西安 710004; 4 第四军医大学西京医院肿瘤科 陕西 西安 710033;

5 第四军医大学基础部病理科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:建立一种基于荧光偏振技术的宫颈癌组织标本中 EGFR 启动子甲基化检测的新方法。**方法:**设计通用引物,在封闭管中同时扩增 EGFR 启动子甲基化与非甲基化等位基因片段,再同时用序列特异的 FAM 或 TAMRA 荧光标记探针扩增产物进行杂交检测,利用荧光偏振仪检测扩增杂交反应的荧光偏振值,确定 EGFR 启动子甲基化状态。应用荧光偏振法检测 63 例宫颈癌组织样本,并与直接测序法进行对比验证。**结果:**本方法检测 EGFR 启动子甲基化结果与直接测序法结果无统计学差异,且最低检测浓度为 50 拷贝/μl,最低检测含量可达 10%,敏感度高。**结论:**本方法检测 EGFR 启动子甲基化灵敏度与准确度较高,为临床宫颈癌个体化治疗相关检测提供了新技术。

关键词: 荧光偏振检测; 宫颈癌; 表皮生长因子受体; 甲基化**中图分类号:** R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)11-2162-04

A Novel EGFR Promoter Methylation Status Assay Based on Fluorescence Polarization in Cervical Cancer Tissue Samples*

JIANG Ying-hao¹, ZHANG Wei², YU Qing-miao³, QIANG Shao-ying⁴, LIANG Ping¹, CHENG Hong⁵, GAO Yan-e³, ZHAO Xing-ye¹, ZHANG Ju^{1△}

(1 Department of Pharmacogenomics, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Gynecology and Obstetrics, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710033, China;

3 Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Medical School of Xian Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China; 4 Department of Oncology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710033, China;

5 Department of Pathology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To develop the novel assay detecting the EGFR promoter methylation status in cervical cancer tissue samples by using a hybridization-fluorescence polarization(FP) technique. **Methods:** A pair of primers was used to amplify a 156 bp fragment in the promoter region of EGFR. Two probes specific for either methylated or unmethylated EGFR promoter DNA labeled with different fluorophores hybridized, respectively, with their target amplicons. The EGFR promoter methylation status was determined by the FP values. A total of 63 cervical cancer tissue samples were analyzed by using the new assay technique and sequencing in parallel. **Results:** The results of new assay showed no statistically significant difference with the results of sequencing. The minimum detection level established with the new assay was 50 copies/mL, and it was able to detect the minor population of the EGFR promoter methylation status even when its contents were as low as 10%. **Conclusions:** The novel hybridization-FP assay for evaluating the EGFR promoter methylation status was suitable for the clinical setting and would provide an applicable pharmacogenomic tool for individualized management of cervical cancer patients.

Key words: Fluorescence polarization; Cervical cancer; Epithelial growth factor receptor(EGFR); Methylation**Chinese Library Classification(CLC):** R737.33 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)11-2162-04

前言

宫颈癌是目前世界上危害女性健康的第二大疾病。在中国,宫颈癌的发病率正逐年上升,并且宫颈癌的死亡率已升至所有肿瘤的第一位^[1]。表皮生长因子受体(Epithelial Growth Factor Receptor, EGFR)是原癌基因 c-erbB1 的表达产物,是表

皮生长因子受体(HER)家族成员之一^[2]。目前 EGFR 已被作为包括宫颈癌在内的多种上皮粘膜肿瘤的药物研究和药物治疗靶点^[3]。在宫颈癌中抑制 EGFR 的策略主要包括抗 EGFR 抗体和酪氨酸激酶抑制剂等^[4,5]。然而,宫颈癌中 EGFR 启动子甲基化导致该基因沉默,从而使部分宫颈癌对 EGFR 抑制治疗不敏感。因此,EGFR 启动子甲基化水平检测对于宫颈癌个体化治

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81071435)

作者简介:姜英浩(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向:基于荧光偏振技术的肿瘤标志物检测,

电话:15877447597, E-mail: yhjiang1227@126.com

△通讯作者:张菊, E-mail: jianzhong@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-12 接受日期:2013-12-05)

疗及预后判断具有重要价值^[9]。

EGFR 启动子甲基化检测传统方法主要包括: 测序法、芯片法、甲基化特异性的 PCR (methylation-specific PCR, MS-PCR)、结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)等方法^[7-10]。但以上检测方法或反应时间长、或检测成本较高,不能方便地作为常规临床检测工具应用,妨碍了宫颈癌 EGFR 抑制剂个体化应用的临床进程。荧光偏振检测技术是一种液相的分子相互作用检测技术,它操作简单快捷,检测灵敏度及抗干扰性较高,在小分子检测领域具有很强的优势^[11]。因此,研究并建立宫颈癌中 EGFR 启动子甲基化荧光偏振技术检测新方法,将为宫颈癌的针对性和预见性个体化临床治疗提供重要方法支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

荧光偏振检测仪 Victor2 Wallac (Perkin Elmer); 基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen); EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Orange, CA); SssI 甲基转移酶 (New England Biolabs); pGEM-T easy 载体、Taq DNA 聚合酶、Wizard DNA Miniprep Kit (Promega)。宫颈癌标本收集于第四军医大学西京医院妇产科和西安交通大学第二附属医院妇产科的住院患者(2010 年 3 月至 2012 年 3 月)。

1.2 实验材料与方法

1.2.1 DNA 提取与亚硫酸氢钠修饰 每例宫颈癌标本均分成两部分:一部分用于病理组织学鉴定,另一部分用于分子生物学分析。后一部分组织 DNA 提取严格按照 TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒说明书操作进行,产物经紫外分光光度计测量纯度和浓度后放置于 -20 °C 保存。使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit 试剂盒进行基因组 DNA 甲基化的亚硫酸氢盐转变操作,按照说明书进行,经过亚硫酸氢盐转变后回收产物。使未发生甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而发生甲基化的胞嘧啶则保持不变。转变后的 DNA 溶于 10 μ l Tris-HCl (1 mmol/L, pH 8.0),保存于 -70 °C,用于后续检验。

1.2.2 引物与探针设计 根据 GeneBank 确定 EGFR 启动子区的基因片段序列(X17054.1),设计引物和探针序列,由上海生工有限公司合成:EGFR 正向引物 5'-ggtttttgatttygttagtattg-3'; EGFR 反向引物 5'-ccttacctttcttctctcca-3'; EGFR 启动子甲基化特异探针 egfrmp: 5'-cggagcgagttttcggggagcagcg-FAM3'; EGFR 启动子非甲基化特异探针 egfnpro: 5'-tggagt-gagtttttggggagtagtg-TAMRA 3'。

1.2.3 标准品的构建 取健康志愿者外周血淋巴细胞,按说明书要求提取 DNA,并进行亚硫酸氢盐转变操作。将 DNA 分成两份,将其中一份用 SssI 甲基转移酶处理后,进行 PCR 扩增,将 156 bp 的产物接入 pGEM-T easy 载体,构建重组质粒,另一份直接 PCR 扩增,将 156 bp 的产物接入 pGEM-T easy 载体,构建重组质粒,测序验证。重组质粒中载有 156 bp 甲基化 EGFR 序列的 pGEM-T-methylated-EGFR 用作甲基化阳性标准品对照;而载有 156bp 未甲基化 EGFR 序列的 pGEM-T-unmethylated-EGFR 用作未甲基化阳性标准品对照。使用 pGEM-T-easy 空载体分别作为以上甲基化与未甲基化的阴性对照。

1.2.4 建立荧光偏振检测反应 荧光偏振检测反应体系(25 μ l): 模板 DNA 2.5 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 $MgCl_2$) 2.5 μ l, 10mM dNTPs 0.5 μ l, 上游引物(0.05 uM) 0.5 μ l, 下游引物(0.5 uM) 0.5

μ l, 探针 (5 μ m) 0.25 μ l, Taq DNA 多聚酶 0.5 μ l, 17.75 μ l ddH₂O, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 20 s, 56 °C 40 s, 72 °C 20 s, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 1 min。将 pGEM-T-methylated-EGFR 与 pGEM-T-unmethylated-EGFR 标准品质粒按 5 倍梯度从 1.0×10^7 copies/ μ l 稀释至 1.0 copies/ μ l, 与 pGEM-T 阴性标准品、标本分别按以上条件进行检测。每例均设置副孔。**1.2.5 荧光偏振检测** 在 Victor2 Wallac (Perkin Elmer) 荧光偏振检测仪分别于激发波长 485 nm、吸收波长 530 nm 检测每个对照品及样本反应产物的 FAM 荧光的偏振值, 于激发波长 485 nm、吸收波长 590 nm 检测每个对照品及样本反应产物的 TAMRA 荧光偏振值, 以 mp 为单位。计算每个对照及样本的 FP 均值(Means)及标准偏差(SD)。根据参考文献^[12], 阳性标准品对照发生扩增反应, 荧光标记探针能够与扩增产物中待测靶基因单链同源互补杂交, 使荧光标记探针分子的分子量增加, 反映为检测到的 FP 值增加; 而阴性标准品对照未发生扩增反应, 荧光标记探针分子不能与模板结合, 保持游离状态, 因此分子量不变, 结果中 TAMRA 和 FAM 的 FP 值均较低。以 pGEM-T-methylated-EGFR 质粒为模板的阳性对照, FAM FP 值增加, TAMRA FP 值不增加, 表明 egfrmp 探针与单链扩增产物发生特异的杂交反应; 以 pGEM-T-unmethylated-EGFR 质粒为模板的阳性对照 TAMRA FP 值增加, 而 FAM FP 值不增加, 表明 egfnpro 探针与单链扩增产物发生特异的杂交反应; 将 pGEM-T-methylated-EGFR、pGEM-T-unmethylated-EGFR 两质粒混合作为模板的阳性对照, FAM 和 TAMRA 荧光的 FP 值同时增加, 表明两种探针均分别与单链扩增产物发生了特异杂交。通过分析 FP 值确定标准品及样本的甲基化程度。

1.2.6 标本检测 将提取的标本 DNA 进行亚硫酸氢钠处理后作为模板; pGEM-T-methylated-EGFR 作为甲基化阳性标准品模板; pGEM-T-unmethylated-EGFR 作为未甲基化阳性标准品模板; pGEM-T-easy 空载体作为阴性对照模板。按照(1.2.4)步条件的荧光偏振检测反应体系, 检测每例标本的 EGFR 启动子甲基化程度。测序 PCR 反应体系 (50 μ l): 模板 DNA 4 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 $MgCl_2$) 5 μ l, 10 mM dNTPs 1 μ l, 上游引物(0.5 uM) 1 μ l, 下游引物(0.5 uM) 1 μ l, Taq DNA 多聚酶 1 μ l, 37 μ l dd H₂O, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 20 s, 56 °C 40 s, 72 °C 20 s, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 1 min。PCR 反应结束后样品经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳验证, 使用紫外光凝胶成像系统观察结果, 此扩增产物送测序。

1.2.7 敏感性与稳定性分析 将 pGEM-T-methylated-EGFR 与 pGEM-T-unmethylated-EGFR 标准品质粒按 5 倍梯度从 1.0×10^7 copies/ μ l 稀释至 1.0 copies/ μ l, 分别进行检测; 将 pGEM-T-methylated-EGFR 与 pGEM-T-unmethylated-EGFR 标准品质粒按 1:99, 10:90, 25:75, 50:50, 75:25, 90:10, 99:1 比例混合后分别作为模板进行检测, 验证本反应的敏感性。在相同实验条件下, 随机抽取含量为 1, 10, 10², 10⁴, 10⁶ copies/ μ L 的 pGEM-T-methylated-EGFR 与 pGEM-T-unmethylated-EGFR 标准品质粒模板, 以本方法检测, 重复检测 10 次, 验证本反应的稳定性。

2 结果

2.1 标准品的验证

将 PCR 扩增目的片段经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳验证, 使用紫外光凝胶成像系统观察结果可得 156 bp 片段条带(图 1)。重组

质粒送往上海生工公司测序,测序结果证明获得预期正确序列。

2.2 荧光偏振检测反应的 FP 临界值的建立

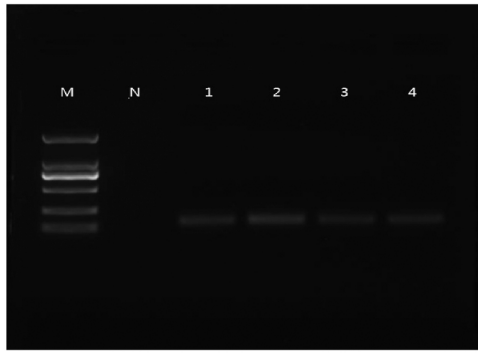


图1 宫颈癌组织 EGFR 基因目的片段的启动子扩增结果:M:DL2000 DNA Marker; N: 阴性对照;1-4: 宫颈患者 EGFR 启动子扩增结果(156bp)
Fig.1 PCR results of EGFR promoter in cervical cancer samples: M: DL2000 DNA Marker; N: Negative Control; 1-4: PCR results of EGFR promoter in cervical cancer samples

对荧光偏振检测反应结果应用 t 分布检验 (95 %可信区间), 可以发现阳性对照 pGEM-T-methylated-EGFR、pGEM-T-unmethylated-EGFR 的 FP 值分布与阴性对照 pGEM-T 存在显著差异, pGEM-T-methylated-EGFR 阳性反应 FAM 荧光 Cut-off 值为 42 mp, pGEM-T-unmethylated-EGFR 阳

性反应 TAMRA 荧光 Cut-off 值为 58 mp。

将每个标本反应后的 FAM、TAMRA 荧光的 FP 值分别与相应的 Cut-off 值比较,若 FAM 荧光 FP 值小于相应的 Cut-off 值,且 TAMRA 荧光 FP 值大于相应的 Cut-off 值,表明 EGFR 启动子区未发生甲基化;若 TAMRA 和 FAM 荧光 FP 值均大于相应的 Cut-off 值,表明 EGFR 启动子区发生甲基化(表 1)。

2.3 敏感性分析和稳定性验证

按照 1.2.7 步骤对本方法进行验证,发现本方法最低检测浓度为 50 copies/ μ l; 同时发现 EGFR 启动子甲基化的最低检测含量可达 10 %。证明本方法具有较高的敏感性。检测结果的相对标准偏差均小于 10 %。将 63 例标本使用本方法在不同日各重复 3 次试验。FP 值重复性变异系数小于 10 %。证明本方法具有较强的稳定性。

2.4 特异性分析

将 egfrmpo 与 egfrnpo 两种探针同时加入检测体系,分别单独加入 pGEM-T-methylated-EGFR 或 pGEM-T-unmethylated-EGFR 标准品质粒,检测两探针分别对其靶分子的特异性。结果发现,在检测反应中,当质粒浓度不超过 109 拷贝 / 毫升时,无交叉反应出现。证明检测反应对其靶分子有很强的特异性。

5. 荧光偏振检测与测序法检测标本结果比较

63 例宫颈癌标本中,18 例被检测为 EGFR 启动子发生甲基化。该结果与测序结果完全相符(表 2)。

3 讨论

表 1 标准品对照与标本的 FP 值(mP)($\bar{x} \pm s$)
Table 1 FP value of control and samples(mP)($\bar{x} \pm s$)

Group	FAM*	TAMRA*
Standard Substance		
Negative control	55.4 $\pm$ 7.4	61.5 $\pm$ 6.9
pGEM-T-unmethylated-EGFR	60.8 $\pm$ 7.2	183.6 $\pm$ 9.7
pGEM-T-methylated-EGFR	177.1 $\pm$ 8.3	67.9 $\pm$ 9.0
Samples		
Methylation positive	176.5 $\pm$ 9.3	209.5 $\pm$ 9.1
Methylation negative	79.4 $\pm$ 6.9	182.2 $\pm$ 9.6

注:与阴性对照比较,* P<0.05

Note: Compared with negative control, * P<0.05

表 2 荧光偏振检测方法与测序法结果比较
Table 2 Comparison between the results from fluorescence polarization assay and sequencing

FP	Sequencing		
	Methylated	Unmethylated	Total
Methylated	18	0	18
Unmethylated	0	45	45
Total	18	45	63

DNA 甲基化是表观遗传学的重要修饰方式之一,一般与基因的转录沉默相关^[13]。正常的 DNA 甲基化对维持细胞分化、胚胎发育等生理功能是必需的,而 DNA 甲基化的异常则会导致疾病的发生。肿瘤发生时基因组 DNA 常会出现甲基化紊乱状态,即基因组整体低甲基化和启动子局部区域高甲基化,从而导致相关基因表达的降低或缺失,影响肿瘤的生物活性及药物敏感性^[14]。

EGFR 是表皮细胞生长因子(EGF)增殖信号传导的受体。

EGFR 与血管生成、肿瘤细胞增殖、侵袭、转移及细胞凋亡等有关,其活化状态会影响肿瘤病人的预后及生存^[15]。既往的研究表明在多数宫颈癌病例中存在 EGFR 的高表达^[16]。但在部分宫颈癌中 EGFR 启动子的高甲基化会导致 EGFR 的转录沉默,从而使其发生异常去活化^[17],导致临床应用 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(TKI)疗效不明显。因此及时检测宫颈癌中 EGFR 启动子甲基化的程度将对临床宫颈癌个体化用药具有重要指导意义,并有助于影响治疗与预后水平。

当前普遍应用于 EGFR 启动子甲基化检测的几种方法中,测序法虽被公认为甲基化程度检测的“金标准”,但测序周期较长,不易即时得到结果,且测序法的通量较低。而如芯片法,COBRA 法等步骤又过于复杂,耗费时间和精力。因此均不适宜用于需要快速、便捷的临床检测中。荧光偏振 (FP) 检测技术是一种荧光标记检测技术,它把荧光标记在特定物质分子,同时在光路分别加上起偏器和检偏器可测出待测物的偏振荧光强度。FP 法不需分离游离和结合的示踪物,而且所有测定在溶液中进行,因而具有快速、简单和准确灵敏等特点^[11,18-20]。

本研究设计了一对通用引物,在同一封闭管中同时非对称扩增宫颈癌中 EGFR 启动子甲基化与非甲基化等位基因片段,再用两种被不同荧光标记的甲基化序列特异探针和未甲基化序列特异探针,分别与其扩增产物杂交,利用荧光偏振仪检测扩增杂交标记反应的荧光偏振值。阳性对照发生扩增反应,荧光标记探针与扩增产物中待测靶基因单链分子同源互补杂交,FP 值会随荧光标记分子的分子量增加而增加;反之阴性对照品未发生扩增反应,荧光标记探针分子游离,所以荧光标记分子的分子量不变,FP 值较阳性对照低^[19]。因此 pGEM-T-unmethylated-EGFR 质粒与未甲基化标本的 TAMRA 荧光 FP 值高;pGEM-T-methylated-EGFR 与甲基化标本的 FAM 荧光 FP 值高。由于甲基化序列特异探针和未甲基化序列特异探针可以在同一封闭管中同时分别检测,从而宫颈癌中 EGFR 启动子甲基化与非甲基化等位基因可以同时确定。比传统方法更节约试剂,也更节约时间。并且本方法灵敏度较高,在 EGFR 启动子甲基化程度低至 10% 时仍可检测出。因此本研究为宫颈癌中 EGFR 启动子甲基化提供了一种简单、准确且高效的检测方法。

上述研究结果显示,在 63 例宫颈癌组织中有 18 例检测到 EGFR 基因启动子甲基化,甲基化率为 28%。甲基化状态与患者的 TNM 分期无明显相关,提示 EGFR 启动子甲基化可能伴随整个宫颈癌发生和发展过程。因此它可以作为宫颈癌诊断和危险人群筛查的分子标志。

4 结论

本方法操作简单、无需专用试剂盒。在本方法的反应中,单标记探针合成费用低;与需要沉淀、转移过滤的固相方法相比,本方法在液相中进行测定,不需分离游离和结合的示踪物,效率高;结果判断仅需对数字进行比较,无需专用设备,易控制;利用 384 孔荧光偏振读数板,可实现大样本高通量并行分析。因此本方法检测 EGFR 启动子甲基化程度具有快速、便捷,灵敏度高,重复性强的特点,为宫颈癌患者快速临床检测和个体化治疗提供了新方法。

参考文献(References)

- [1] Mu oz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 348 (6):518-527
- [2] Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 59(2 Suppl):21-26
- [3] Noordhuis MG, Eijssink JJ, Ten Hoor KA, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(23):7389-7397
- [4] Goncalves A, Fabbro M, Lhomme C, et al. A phase II trial to evaluate gefitinib as second-or third-line treatment in patients with recurring loco regionally advanced or metastatic cervical cancer [J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(1):42-46
- [5] Woodworth CD, Diefendorf LP, Jette DF, et al. Inhibition of the epidermal growth factor receptor by erlotinib prevents immortalization of human cervical cells by human papillomavirus type 16[J]. Virology, 2011, 421(1):19-27
- [6] Montero AJ, Diaz-Montero CM, Mao L, et al. Epigenetic inactivation of EGFR by CpG island hypermethylation in cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(11):1494-1501
- [7] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18):9821-9826
- [8] G m ri E, Pa' l J, Kova' cs B, et al. Concurrent hypermethylation of DNMT1, MGMT and EGFR genes in progression of gliomas[J]. Diagn Pathol, 2012, 7:8
- [9] Scartozzi M, Bearzi I, Mandolesi A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene promoter methylation and cetuximab treatment in colorectal cancer patients[J]. Br J Cancer, 2011, 104(11):1786-1790
- [10] Du P, Zhang X, Huang CC, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis[J]. BMC Bioinform, 2010, 11:587-590
- [11] 倪原, 张菊, 陈国绍, 等. 基于荧光偏振技术的基因检测分析系统 [J]. 生命科学仪器, 2008, 6:59-61
- [12] Liu WC, Li XH, Xue Y, et al. Detection of ERCC1 118 polymorphisms in non-small-cell lung cancer by an improved fluorescence polarization assay[J]. Diagn Mol Pathol, 2010, 19(3): 164-168
- [13] Das P M, Singal R. DNA methylation and cancer [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(22):4632-4642
- [14] Feinberg A P, Tycko B. The history of cancer epigenetics[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(2): 143-153
- [15] Soonthornthum T, Arias-Pulido H, Joste N, et al. Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer [J]. Ann Oncol, 2011, 22(10):2166-2178
- [16] Lee MY, Chou CY, Tang MJ, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(15): 4743-4750
- [17] Chen XN, Leanna L, Kwok PY. Fluorescence Polarization in Homogeneous Nucleic Acid Analysis [J]. Genome Res, 1999, 9(5): 492-498
- [18] 强少盈, 张菊, 姜英浩, 等. 肺癌患者 EGFR 基因启动子甲基化状态研究[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(10):2045-2048
- [19] 李丁, 张菊, 颜真, 等. 荧光偏振技术分析全血 XPD 基因单核苷酸多态性的研究[J]. 分析化学, 2010, 38(4):585-588
- [20] 赵晨, 张亮, 倪原. 荧光偏振技术在生命科学中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(16):3154-3156
- [21] Zhao Chen, Zhang Liang, Ni Yuan. Development of Fluorescence Polarization in Life Sciences [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(16):3154-3156