

Высокочувствительное сканирование генных мутаций: зонды TaqMan как блокирующие агенты

И.В. Ботезату¹, И.О. Панчук¹, А.М. Строганова², А.И. Сендерович², В.Н. Кондратова¹,
В.П. Шелепов¹, А.В. Лихтенштейн¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Метод плавления ДНК весьма эффективен в клинической генодиагностике, прост в исполнении, производителен, экономичен и, кроме того, реализуется в «закрытом формате», сводящем к минимуму затраты времени, труда и риск перекрестного загрязнения образцов. Данный метод более чувствительный, чем секвенирование по Сэнгеру (предел обнаружения мутантных аллелей ~5 и ~15 % соответственно), однако уступает в этом отношении другим, более трудоемким и дорогим методам (в частности, капельной цифровой полимеразной цепной реакции (digital droplet PCR)). На гене BRAF (как прототипе) мы разработали оригинальный вариант метода плавления ДНК, основанный на способности зондов TaqMan затруднять движение Taq-полимеразы по матрице. Установлено, что эффект блокирования слабее выражен на мутантной матрице из-за присутствия в дуплексе зонд-ДНК неспаренного основания. Предложен протокол полимеразной цепной реакции, дискриминирующий амплификацию мутантных и нормальных аллелей и обеспечивающий существенное (10-кратное и более) повышение чувствительности мутационного сканирования.

Ключевые слова: сканирование мутаций, плавление ДНК, зонд TaqMan, ген BRAF

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-42–49

Highly sensitive scanning of gene mutations: TaqMan probes as blocking agents

I. V. Botezatu¹, I. O. Panchuk¹, A. M. Stroganova², A. I. Senderovich², V. N. Kondratova¹, V. P. Shelepov¹, A. V. Lichtenshtein¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;

24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Research Institute of Clinical Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

DNA Melting Analysis is very effective in clinical DNA diagnostics: it is simple to perform, high throughput, labor-, time- and cost-effective and is implemented in the “closed tube” format minimizing the risk of samples cross-contamination. Although more sensitive than sequencing by Sanger (mutant allele detection limit is ~5 and ~15 % respectively), it, however, is inferior in this respect to some other, more laborious and expensive methods (in particular, ddPCR (digital droplet PCR)). Using the BRAF gene as a prototype, we developed the original version of the DNA melting analysis, based on the ability of TaqMan probes to hamper the primer extension reaction by Taq-polymerase. It is found that the weaker blocking effect on the mutant template, which is due to the mismatch in the probe-DNA heteroduplex, permits enriched amplification of the mutant allele and provides a significant (10-fold or more) increase in sensitivity of mutation scanning.

Key words: mutation scanning, DNA melting analysis, TaqMan probe, BRAF gene

Введение

Идентификация генных мутаций в ДНК опухоли — важный этап исследования онкологического больного. По мере увеличения числа опухолей с секвенированным геномом роль клинической генодиагностики постоянно растет. В фундаментальных исследованиях определяются присущие конкретному типу опухоли драйверные мутации (например, мутации KRAS, NRAS, BRAF в меланоме, раке толстой кишки и легких) [1, 2]. Их обнаружение в клинических образцах облегчает дифференциальную диагностику и прогноз заболевания, определяет выбор терапии [3, 4].

Генодиагностика рака сталкивается с рядом трудностей. Во-первых, клон мутантных клеток, обуславливающих лекарственную устойчивость опухоли, зачастую крайне мал и его трудно выявить [5, 6]. Во-вторых, одиночный биоптат опухоли не дает полного представления о ее клональной гетерогенности и наборе драйверных мутаций [7]. В-третьих, после удаления основного очага, когда стандартная биопсия исключена, обеспечить мониторинг опухолевого роста (для оценки эффективности терапии и раннего выявления рецидива) может лишь жидкостная биопсия, т. е. анализ ДНК плазмы крови, обычно сильно фрагментированной.

ванной и с крайне низким содержанием мутантных аллелей [8].

Возможность преодоления этих трудностей определяется чувствительностью используемых методов анализа. У метода секвенирования по Сэнгеру («золотой стандарт» генотипирования в клинике) она невелика (предел обнаружения мутантных аллелей ~15 %), что обуславливает высокий уровень ложноотрицательных результатов (в частности, в случае *KRAS* это ведет к неадекватному и чреватому негативными последствиями назначению таргетной терапии). Поэтому важной задачей является внедрение в клиническую практику новых способов мутационного сканирования, более чувствительных, чем существующие, и в то же время простых, экономичных и производительных. В наибольшей степени удовлетворяет этим условиям недавно появившийся метод — анализ плавления ДНК (DNA Melting Analysis, DMA) с зондами TaqMan [9–11] (ранее они использовались исключительно для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (РВ) [12]).

В данной работе установлено, что зонды TaqMan, в дополнение к двум уже известным их функциям (мониторинг ПЦР-РВ и плавление ДНК), могут служить блокирующими агентами, избирательно подавляющими амплификацию аллелей «дикого» типа. Разработанный нами протокол асимметричной ПЦР-РВ, использующий это свойство зондов TaqMan, обеспечивает существенное (более чем 10-кратное) повышение чувствительности мутационного сканирования «горячих участков» генома, в частности гена *BRAF*, использованного в качестве прототипа.

Материалы и методы

Образцы ДНК. Образцы опухолевой ткани (рак легкого и толстой кишки, меланома) получали в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клетки карциномы толстой кишки RKO (ATCC® CRL 2577™) с гетерозиготной мутацией V600E (T1799A) были предоставлены В.В. Татарским (НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина). Смеси мутантного и «дикого» аллелей получали смешиванием ДНК «дикого» типа и клеток RKO.

ДНК клеток опухолевой ткани выделяли депротеинизацией фенолом и хлороформом, а из ткани, заключенной в парафиновые блоки, — с использованием коммерческого набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически (Nano-Drop 1000, Thermo Scientific).

Секвенирование обеих нитей ампликона осуществляли методом Сэнгера (Синтол, Россия).

Термодинамические расчеты температуры плавления ДНК (T_m), праймеров и зондов проводили с помощью программы MeltCalc [13].

Асимметричная ПЦР-РВ и плавление ампликонов. На рис. 1 представлены последовательные этапы DMA:

- 1) асимметричная ПЦР-РВ, в результате которой в инкубационной среде оказываются как двунитевые, так и одностебчатые ампликоны (только с последними могут гибридизоваться зонды TaqMan);
- 2) плавление гибридов, сопровождающееся падением флуоресценции;
- 3) построение пиков плавления (отрицательной производной изменений флуоресценции по темпера-

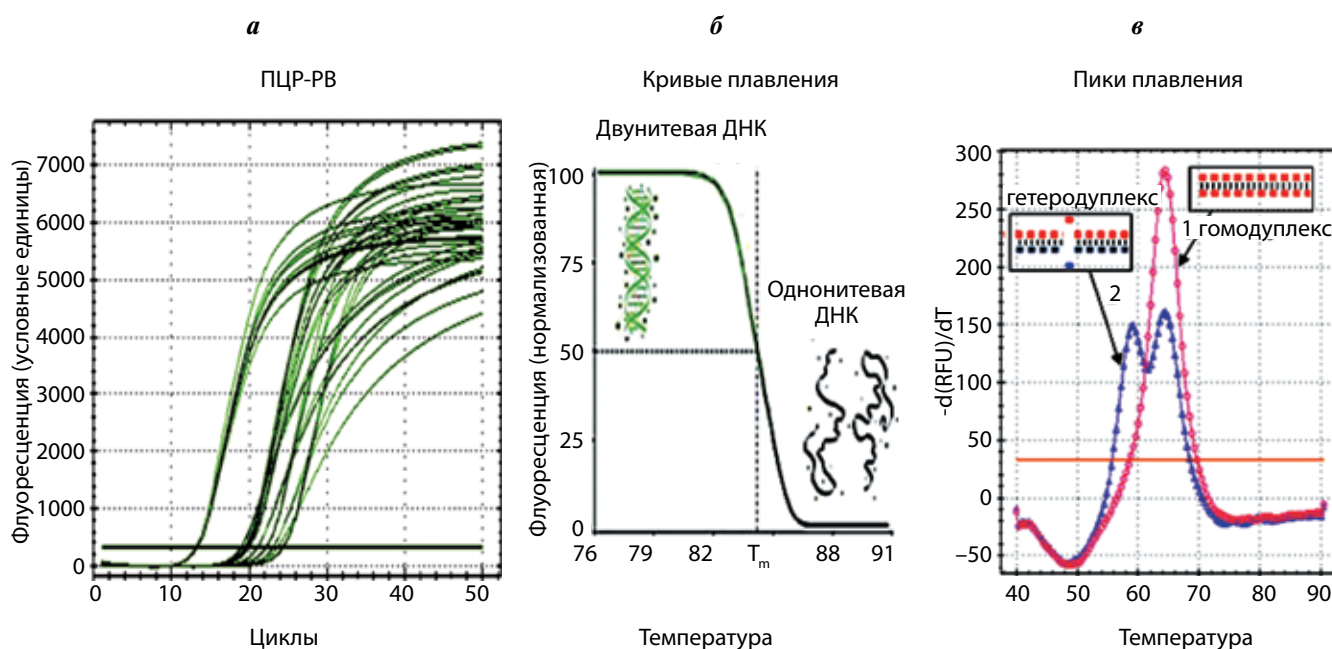


Рис. 1. Последовательные этапы DMA: а — асимметричная ПЦР-РВ с зондами TaqMan (гидролиз зонда во время реакции сопровождается «разгоранием» флуоресценции, что позволяет в реальном времени судить о ходе реакции); б — повышение температуры приводит к фазовому переходу ДНК из двунитевой в одностебчатую форму, что сопровождается падением флуоресценции; в — симметричный пик (гомодулекс — кривая 1) свидетельствует о присутствии аллеля «дикого» типа, дополнительный пик слева (гетеродуплекс — кривая 2) — о присутствии мутантного аллеля

Размер ампликона гена *BRAF*, последовательности праймеров и зондов TaqMan

Ампликон (экзон, кодоны, длина)	Праймер, зонд*	Последовательность (длина, число пар оснований)
B15 (15, 597–601, 197 пар оснований)	Прямой	5'– gagatctactgttttcttactt (24 b)
	Обратный	5'– ggccaaaaatttaacagtc (19 b)
	Зонд B15-ROX(30)s	5'– ROX–aggtgatttggctagctacagtgaaatc–BHQ2 (30 b)
	Зонд B15-Cy5(26)as	5'– Cy5–accactccatcgagatttcactgta–BHQ2 (26 b)

*В названии зонда TaqMan указаны соответствующий ампликон, флуорофор, длина олигонуклеотида и направление (*sense* или *antisense*).

туре). Основной пик (гомодуплекс) отражает присутствие аллеля «дикого» типа, пик, расположенный левее, в области меньших температур (гетеродуплекс), – присутствие мутантных аллелей.

DMA в стандартных условиях (DMA_{st}) [10, 11]. Размер ампликона гена *BRAF* (Genbank Accession number NC_000007.14), последовательности праймеров и зондов TaqMan представлены в табл. 1. Последовательности праймеров и зондов находили с помощью программы Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corp., США). Схема ампликона гена *BRAF* с взаимным расположение праймеров, зондов и «горячего участка» с кодоном V600, в котором мутации наиболее часты, представлена на рис. 2. Зонды «сдвинуты» относительно друг друга (перекрывание – 12 пар оснований) для того, чтобы исключить возможность их гибридизации друг с другом, конкурентной по отношению к гибридизации каждого из них с ДНК (во время ПЦР-РВ и плавления).

Асимметричную ПЦР-РВ вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl, pH 8,8; 50 мМ KCl; 0,01 % Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов; прямой и обратный праймеры в соотношении 1:10 или 10:1 (т. е. 0,04 мкМ/0,4 мкМ или 0,4 мкМ/0,04 мкМ) в зависимости от необходимости синтезировать анти-смысловую или смысловую нить ампликона соответственно, что позволило сканировать мутации в обеих его нитях; 0,2 мкМ соответствующего зонда TaqMan; 1,25 ед. not-rescue Taq-полимеразы (Синтол, Россия);

5 мкл раствора ДНК в воде. Условия ПЦР-РВ: начальная денатурация – 5 мин при температуре +95 °С, затем 55 циклов – 13 с при температуре +95 °С, 15 с при +57 °С и 20 с при +72 °С (флуоресценцию регистрировали при температуре +72 °С). По завершении ПЦР продукты реакции прогревали 1 мин при температуре +95 °С, 2 мин при +55 °С, после чего повышали температуру от +55 °С до +85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 6 с).

DMA в модифицированных условиях (DMA_{mod}). Асимметричную ПЦР-РВ вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl, pH 8,8; 50 мМ KCl; 0,01 % Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов; 0,2 x EvaGreen (Biotium, США); 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 1 мМ дитиотреитола; праймеры в соотношении 15:1 или 1:15 (0,4 мкМ одного и 0,027 мкМ другого) в зависимости от необходимости синтезировать преимущественно смысловую или анти-смысловую нить ампликона; по 0,25 мкМ зондов B15-ROX(30)s и B15-Cy5(26)as; 0,63 ед. hot-rescue Taq-полимеразы (Синтол, Россия); 5 мкл раствора ДНК в воде. Условия ПЦР: начальная денатурация – 5 мин при температуре +95 °С, затем 80–100 циклов – 13 с при температуре +95 °С, 2 с при +57 °С с регистрацией флуоресценции. По завершении ПЦР продукты реакции прогревали 1 мин при температуре +95 °С, затем 2 мин при +55 °С, после чего повышали температуру от +55 °С до +85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 6 с). Данные анализировали с помощью программы Bio-

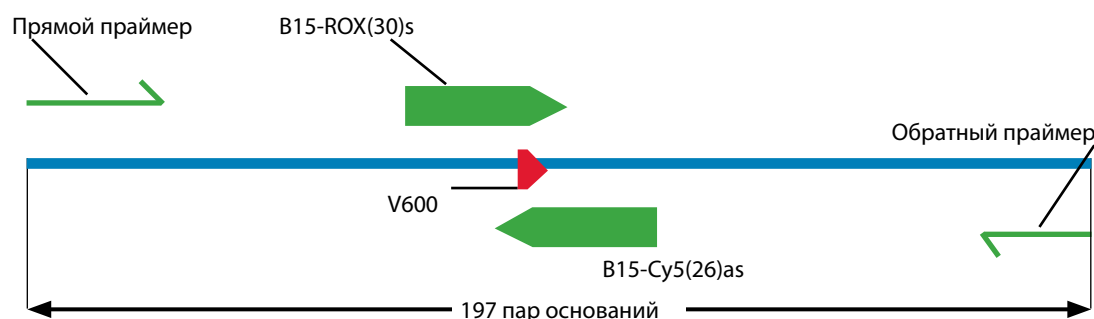


Рис. 2. Схема ампликона B15 (название ампликона происходит от названия гена и номера экзона). Расположение праймеров и зондов TaqMan B15-ROX(30)s и B15-Cy5(26)as показано стрелками (в названии зонда указаны соответствующий ампликон, флуорофор, длина олигонуклеотида и направление – *sense* или *antisense*); V600 – «горячий участок» гена (сайт наиболее часто встречающихся мутаций)

Rad CFX Manager (version 1.6), в ряде случаев экспортировали в Microsoft Excel, пики плавления нормализовывали по отношению к максимальному их значению, принятому за 100 %.

При проведении асимметричной ПЦР-РВ в модифицированных условиях оба зонда функционируют в качестве индикаторов хода реакции и блокирующих агентов, в то время как в DMA участвует только один из них, комплементарный односторонней (избыточной) ДНК.

Результаты

Предложенный недавно вариант DMA [9] позволяет использовать зонды TaqMan не только на этапе ПЦР-РВ, для чего они изначально были предназначены [12], но и на этапе плавления ДНК, что существенно упростило и удешевило метод, повысило его эффективность и расширило возможности применения. DMA с зондами TaqMan реализуется в «закрытом формате», т. е. в одной пробирке без дополнительных процедур (см. рис. 1), что сводит к минимуму затраты времени, труда и риск перекрестного загрязнения образцов.

В нашей предыдущей работе были определены параметры DMA, влияющие на эффективность метода: оптимальное число циклов асимметричной ПЦР-РВ, сочетание флуорофора, гасителя и длины олигонуклеотида TaqMan, нить (смысловая или антисмысловая) для максимального разрешения нормальных и мутантных аллелей, величина температурного сдвига гетеродуплекса относительно гомодуплекса (ΔT_m), указывающая на тип мутации. Усовершенствованный метод был успешно применен в клиническом мутационном сканировании генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и *PIK3CA* [10, 11].

При исследовании кинетики ПЦР-РВ возникло предположение, что гидролизующие зонды TaqMan (олигонуклеотиды длиной 25–30 пар оснований с флуорофором на 5'-конце и гасителем на 3'-конце) могут быть использованы также в качестве агентов, блокирующих ПЦР-РВ. В опытах с применением интеркалирующего красителя EvaGreen было обнаружено, что присутствие в инкубационной среде, помимо праймеров, олигонуклеотидов, способных гибридизоваться с матрицей ДНК (таковы зонды TaqMan), приводит к увеличению числа циклов амплификации (C_t) на 0,5–1,5 (здесь не показано). Это могло означать, что устранение Taq-полимеразой возникающего на ее пути препятствия посредством 5'–3'-экзонуклеазной активности сопряжено со снижением скорости полимеризации. Это предположение согласуется с данными о том, что удлинение праймера существенно замедляется, когда фермент «наталкивается» на сгибризованный с матрицей олигонуклеотид [14]. Таким образом, возникает потенциальная возможность преимущественной амплификации мутантных аллелей, поскольку комплекс зонда с мутантной матрицей менее стабилен

(из-за неспаренного основания), чем с матрицей «дикого» типа (имеется в виду, что зонд TaqMan должен подавлять амплификацию нормального аллеля сильнее, чем мутантного). В пользу этого свидетельствуют термодинамические расчеты [13], показывающие, что в избранных нами условиях (длина, последовательность и концентрация зондов TaqMan, равная 0,2–0,3 мкМ) присутствие мутации в «горячем участке» гена *BRAF* снижает величину T_m дуплекса зонд/ДНК на 3–7 °С.

Исходя из предположения, что наибольший блокирующий эффект может быть достигнут в присутствии обоих (смыслового и антисмыслового) зондов TaqMan (поскольку они должны подавлять синтез обеих нитей ампликона), мы исследовали их совместное влияние на амплификацию «дикого» и мутантного аллелей. Объектом исследования служил образец ДНК с содержанием 5 % наиболее часто встречающейся мутации V600E (замена T1799A), который получали смешиванием ДНК нормальных клеток и клеток RKO. В различных условиях проведения асимметричной ПЦР-РВ и плавления ДНК оценивали соотношение пиков плавления гетеродуплекса и гомодуплекса, которые отражают доли мутантного и «дикого» аллелей соответственно. В предварительных экспериментах было установлено, что лучшей их дискриминации способствуют укорочение этапа отжига праймеров и элонгации, а также снижение концентрации Taq-полимеразы. На рис. 3 представлены результаты определения в условиях градиентной асимметричной ПЦР-РВ температуры отжига праймеров и зондов, в максимальной степени «проявляющей» мутантный аллель. Для удобства сравнения на каждом рисунке показано сканирование образца ДНК в стандартных условиях (кривая 1), не позволяющих надежно идентифицировать минорный мутантный аллель, а также в модифицированных условиях (кривая 2). Из результатов следует, что при снижении температуры отжига, т. е. по мере стабилизации дуплексов ДНК и усиления блокирующего эффекта зондов, преимущественный синтез мутантного аллеля становится более выраженным (как следствие, пик гетеродуплекса растет и из минорного, на уровне фона, превращается в доминирующий). Максимальное обогащение (примерно 10-кратное) мутантного аллеля достигается при температуре отжига около +50 °С (более высокая температура препятствует связыванию праймеров, тогда как более низкая полностью блокирует амплификацию). Следует отметить, что в последующих опытах температуру отжига оказалось необходимым существенно корректировать, поскольку условия градиентной ПЦР-РВ позволяют выявить сам эффект «обогащения» мутантного аллеля, но не гарантируют точности определения исследуемого параметра.

На рис. 4 представлены результаты определения чувствительности (предела обнаружения мутантных аллелей гена *BRAF*) 2 способами: DMA_{st} и DMA_{mod}. «Обогащение» мутантного аллеля вследствие его пре-

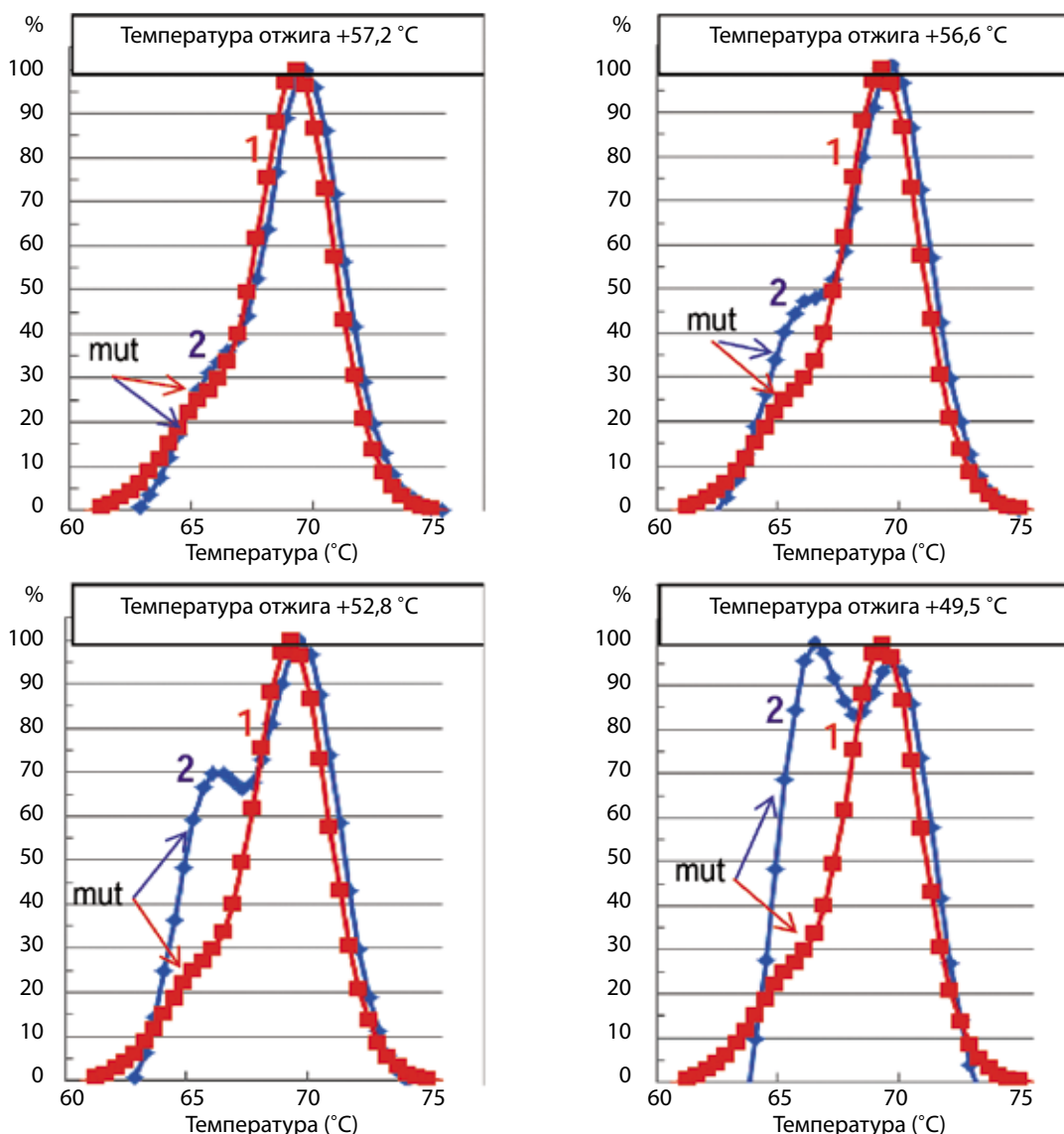


Рис. 3. Градиентная асимметричная ПЦР-РВ с последующим DMA. Образец ДНК с содержанием 5 % мутантного аллеля *BRAF* (V600E) анализировали в стандартных (кривые 1) и в модифицированных (кривые 2) условиях, т. е. с применением во время амплификации блокирующих зондов TaqMan. DMA проводили при отсутствии зондов и добавляли их на этапе плавления ДНК. Данные, полученные с помощью программы Bio-Rad CFX Manager, экспортировали в Microsoft Excel и пики плавления нормализовали по отношению к максимальному их значению, принятому за 100 %. Стрелками указаны позиции гетеродуплексов, отражающих присутствие и содержание мутантного аллеля

имущественной амплификации приводит к значительному (~15-кратному) повышению чувствительности анализа.

Цель следующего этапа — верификация полученных результатов. Обладающая 5'–3'-экзонуклеазной активностью (необходимой для гидролиза зонда TaqMan), но не имеющая «редакторской» (3'–5' экзонуклеазной) активности Taq-полимераза относится к ферментам, допускающим большое число ошибок ($1-5 \times 10^{-5}$ в расчете на пару оснований и 1 цикл удвоения) [15, 16]. Поэтому в ампликонах могут возникать «рассеянные» нуклеотидные замены, число которых в процессе ПЦР растет, формирует мутационный фон и может приводить к неверной интерпретации результатов. По этой причине результаты «обогащения» мутантных аллелей мы проверили секвенированием.

На рис. 5 представлено исследование образца ДНК с содержанием 5 % мутантного аллеля V600E (замена Т на А) гена *BRAF* методами DMA_{st} и DMA_{mod} с последующим секвенированием ампликонов. Видно, что только в последнем случае пики плавления ДНК и секвенирование свидетельствуют о наличии мутации, тогда как стандартный подход не позволяет выявить мутантный аллель, присутствующий в столь низкой (5 %) концентрации. Аналогичный результат был получен при исследовании клинического образца ДНК меланомы, присутствие в котором мутантного аллеля обнаружено только посредством DMA_{mod} (рис. 6).

Заключение

В предлагаемом нами методе условия реакции подбирали таким образом, чтобы обеспечить преиму-

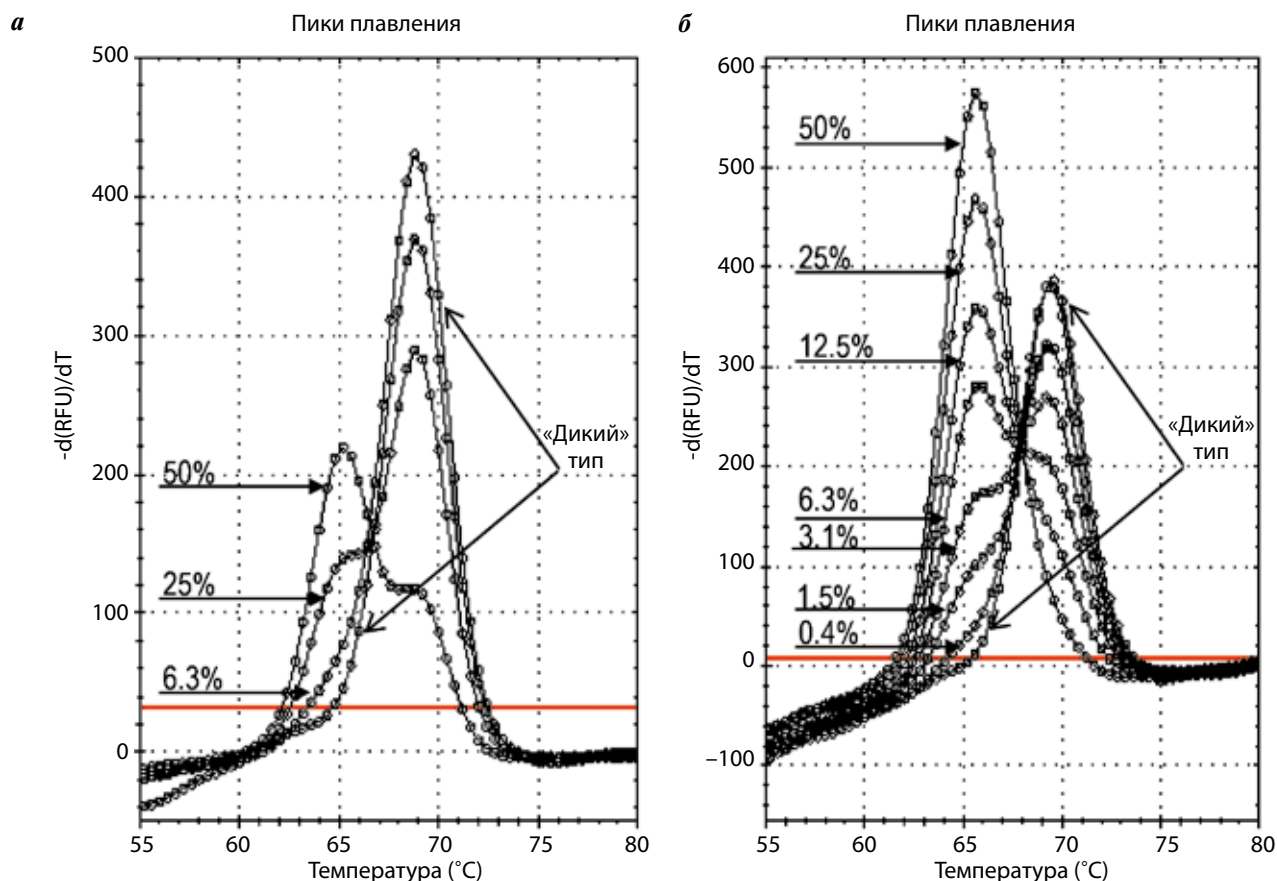


Рис. 4. Сравнение чувствительности определения мутантных аллелей *BRAF* посредством серийного разведения ДНК клеток RKO (мутация V600E) в ДНК «дикого» типа (пики плавления аллелей «дикого» типа (wt) и мутантных обозначены стрелками (в последнем случае указано также процентное содержание мутантной ДНК); пределы обнаружения мутантного аллеля V600E посредством DMA_{st} и DMA_{mod} составляют 6,3 и 0,4 % соответственно): а – DMA_{st} ; б – DMA_{mod}

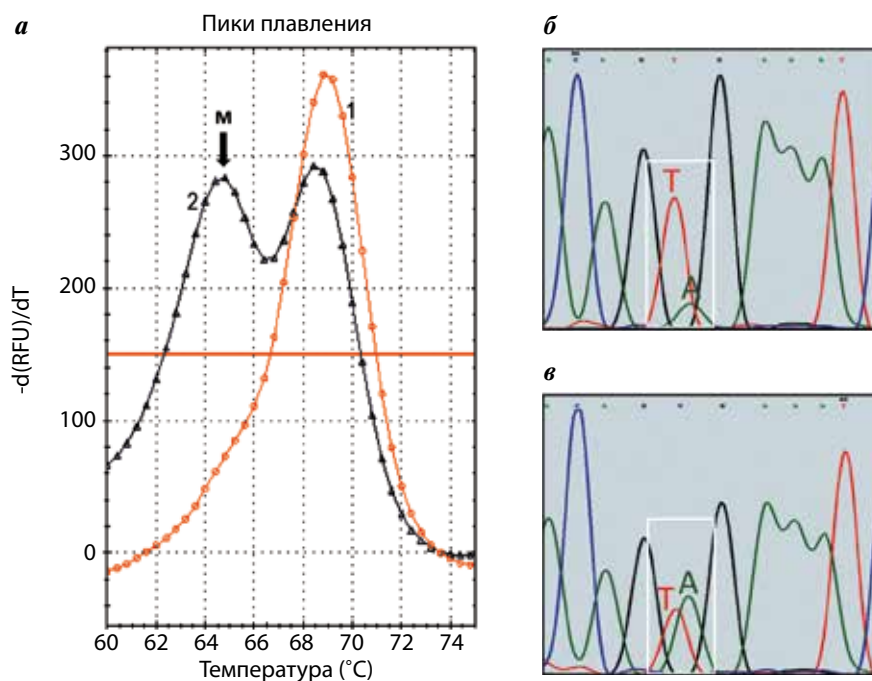


Рис. 5. Верификация секвенированием по Сэнгеру результатов мутационного сканирования: а – образец ДНК с содержанием 5 % мутантного аллеля T1799A анализировали DMA_{st} и DMA_{mod} (кривые 1 и 2 соответственно). Гетеродуплекс, свидетельствующий о присутствии мутантного аллеля (м) указан стрелкой; б, в – секвенирование ампликонов DMA_{st} и DMA_{mod} соответственно (мутантный аллель, присутствующий в 1-м случае на уровне фона, во 2-м случае становится доминирующим)

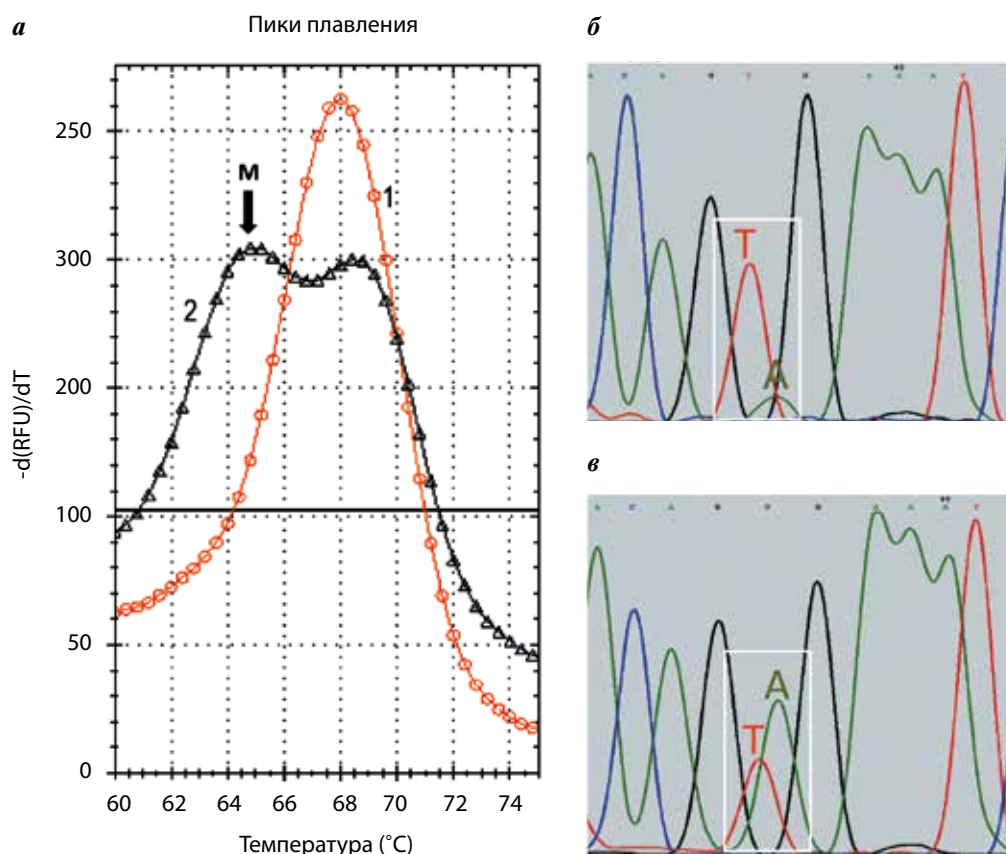


Рис. 6. Верификация секвенированием по Сэнгеру результатов мутационного сканирования (обозначения как на рис. 5): а — клинический образец ДНК (меланома) анализировали DMA_{st} и DMA_{mod} (кривые 1 и 2 соответственно); б, в — секвенирование ампликонов DMA_{st} и DMA_{mod} соответственно

шественную амплификацию мутантного аллеля, максимально подавив синтез аллеля «дикого» типа. Для этого были подобраны последовательности праймеров и зондов TaqMan, сокращена продолжительность цикла амплификации, снижена, по сравнению со стандартной, концентрация Taq-полимеразы и подобрана температура отжига праймеров и зондов, максимально дискриминирующая амплификацию «дикого» и мутантного аллелей. Таким способом удалось повысить чувствительность выявления мутантных аллелей более чем в 10 раз (в предварительных опытах анализа мутантного гена *KRAS* было достигнуто 100-кратное повышение чувствительности).

По сравнению с обычно используемыми для обогащения мутантных аллелей блокирующими агентами

(пептидными нуклеиновыми кислотами) [17] предлагаемый нами подход имеет ряд преимуществ: один и тот же зонд используется для количественной и качественной оценки участков генома и для «обогащения» мутантных аллелей, кроме того, нет необходимости в дорогостоящем химическом синтезе.

Таким образом, DMA_{mod} обладает высокой чувствительностью (что позволяет сократить число ложноположительных результатов клинической генодиагностики), прост в исполнении, экономичен и производителен.

Подана заявка на изобретение № 2016114041
«Способ сканирования генных мутаций в опухолях человека» (приоритет от 12.04.2016).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E. et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013;339: 1546–58.
2. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415–21.
3. Borrás E., Jurado I., Hernán I. et al. Clinical pharmacogenomic testing of *KRAS*, *BRAF* and *EGFR* mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC Cancer* 2011;11:406.
4. Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C.A. Comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012;72: 2457–67.

5. Diaz L.A. Jr, Williams R.T., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted *EGFR* blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486(7404):537–40.
6. Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al. Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486(7404):532–6.
7. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883–92.
8. Narayan A., Carriero N.J., Gettinger S.N. et al. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Res* 2012;72(14):3492–8.
9. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One* 2011;6(4):e19206.
10. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Optimization of melting analysis with Taqman probes for detection of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations. *Anal Biochem* 2015;491:75–83.
11. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Asymmetric real-time PCR and multiplex melting curve analysis with TaqMan probes for detecting PIK3CA mutations. *Data Brief* 2015;5:913–7.
12. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995;4:357–62.
13. Schutz E., von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 1999;27:1218–24.
14. Montgomery J.L., Rejali N., Wittwer C.T. The influence of nucleotide sequence and temperature on the activity of thermostable DNA polymerases. *J Mol Diagn* 2014;16(3):305–13.
15. Smith J., Modrich P. Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(13):6847–50.
16. McInerney P., Adams P., Hadi M.Z. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. *Mol Biol Int* 2014;2014:287430.
17. Guha M., Castellanos-Rizaldos E., Makrigiorgos G.M. DISSECT Method using PNA-LNA clamp improves detection of T790m mutation. *PLoS One* 2013;8(6):e67782.