

突變分析報告書的解讀

張寧瑀^{1,2}

¹國泰綜合醫院分子醫學科，台北，台灣

²社團法人台灣分子醫學會，台北，台灣

摘要

突變檢驗是目前臨床醫學新興的檢驗項目。遺傳疾病的診斷、癌症的標靶治療、藥物基因學的使用都需要依賴突變的檢驗，因此報告書的結果將左右診斷治療。突變結果依國際公認的命名系統描述，因此瞭解此命名法有助於解讀陽性結果。目前檢測突變的方法有許多種。每一種突變分析法的靈敏度皆不相同，從最低靈敏度（15-25%）的桑格定序（sanger sequencing）到靈敏度最高（0.1%）的smart amplification process version 2（SMAP-2）皆有人使用。瞭解這些分析方法的步驟及其靈敏度，有助於我們解讀突變分析報告書的陰性結果。

關鍵字：桑格定序（sanger sequencing）、smart amplification process version 2（SMAP-2）、標靶治療（targeted therapy）、肽核酸鎖核酸PCR（peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR; PNA-LNA PCR）、單一分子定序法（single molecule sequencing）

前言

分子醫學的進步，讓往日只能在實驗室研究的突變，成為今日在臨床上可檢測的突變。因此，如何看懂一份突變分析報告書已是新世紀醫療的必備技能了。由於突變分析不僅用於遺傳疾病的診斷，也用於各種癌症的標靶治療（targeted therapy），甚至還用於藥物劑量的選擇（藥物基因學），因此，各專科醫師都需要看得懂突變分

析報告書。基於這個重要性，本文為讀者介紹如何解讀突變分析報告書。

首先我們先定義什麼是突變（mutation）。突變就是指DNA發生改變。突變可以是有害的，謂之「病理性的突變（pathological mutation）」或簡稱為「突變」；DNA的改變也可以是無害的，謂之「核苷酸多型性（nucleotide polymorphism）」或簡稱為「變異（variant）」。

通訊作者：張寧瑀

電話：886-02-2690-7965 ext 2518

傳真：886-02-2691-9800

地址：221 台北縣汐止市建成路16巷32號 分子醫學科

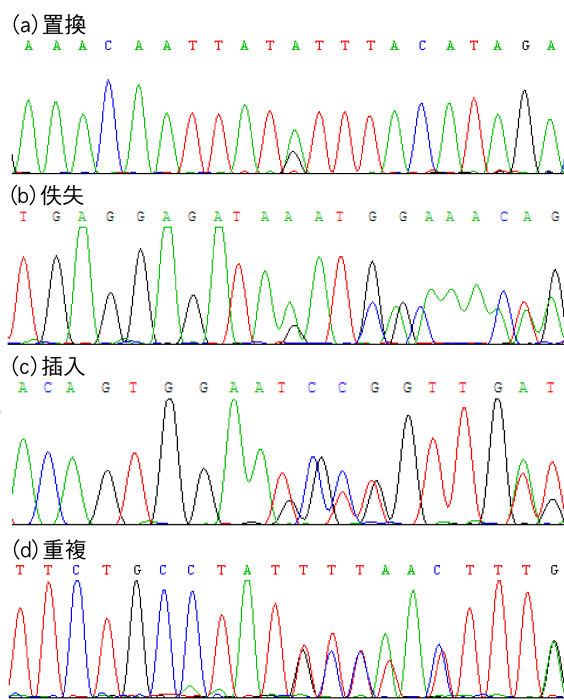
電子郵件：vivianchang515@gmail.com

2010年6月17日來稿；2010年6月29日修改；2010年7月10日同意刊登

雖然「突變」這個名詞常用於指「有害的DNA改變」，但並非一定如此。由於有時候專家學者也不太能確定「發生改變的DNA」是否真的有害，因此我們必須看報告書的前後文，才能確定所指為何。為了避免混淆，以下所指皆是廣義的「突變」，亦即只管DNA的改變，而不論是否為致病性的。

解讀突變的命名系統

當報告書上標示為陽性結果時，也一定會用專業術語描述此突變，這常常讓臨床醫師看得一頭霧水。到底我們該如何解讀「突變的密碼」呢？DNA序列的改變（如圖一）可以是置換（substitution）、佚失（deletion）、插入（insertion）以及重複（duplication）。置換的符號以“>”表示，若是第999個核苷酸由胸腺嘧啶（thymine; T）變成鳥糞嘌呤（guanine; G），則會寫成999T>G；佚失的代號為“del”，所以若是ATG GCT GGA C變成ATAC，而開始的A其核苷酸序列為1的話，則可將此突變型態寫成3_8del，或是將發生佚失的核苷酸片段其序列標示出來而寫成3_8delIGGCTGG。插入的代號則是“ins”，因此若是用以上的例子ATG GCT GGA C變成ATG GAA TTC GGC TGG AC的話，我們可將此突變類型寫成4_5insAATTCGG，標示出發生插入的兩個核苷酸位置以及插入的核苷酸片段。序列重複的突變其實可視為一種特殊的插入突變，如ATG GCT GGA C變成ATG GCT GCT GGA C可寫成3_4insGCT，或是以重複表示為4_6dup，將重複片段的核苷酸序列標示清楚即可。但有些時候可發現較為複雜的情況就是同時發生佚失和插入，



圖一、DNA突變之定序示意圖。

(a) 當核苷酸發生置換時，定序圖會在同一個位點出現一個或兩個峰值（peak）。一個峰值代表兩條對偶基因（allele）均發生核苷酸置換，因此只能看到突變後的核苷酸訊號；倘若出現兩個峰值，代表僅有一條對偶基因發生置換，因此可同時發現兩種核苷酸的訊號。(b) DNA發生佚失（deletion）最明顯的特徵是定序圖會呈現混亂的峰值，因為每一個位點均會出現兩種訊號—原本序列以及發生佚失之後的序列，因此可以依序讀出突變的對偶基因序列，再比照野生型的序列，即可得知佚失的片斷序列。(c) 插入（insertion）產生的定序圖看起來與佚失類似，會出現混亂的峰值，因為同一個位點亦會出現原本序列以及發生佚失之後的序列，再將突變序列與野生序列比對之後，即可讀出插入的核苷酸序列。(d) 重複（duplication）可視為是插入標的基因的某一片段序列，因此定序圖亦可同時讀出野生型和突變型的核苷酸序列，兩條序列相比較即可得知重複的片斷。倘若兩條對偶基因皆發生佚失、插入或是重複，此時定序圖會呈現整齊的峰值，因此須小心注意，避免誤讀。（彩圖詳見本刊網頁）

如ATG GCT GGA C變成ATG AAT CCA C，此時可

先將佚失的部份標示清楚後再敘述插入的核苷酸片段，如3_7delinsAATCC。

蛋白質層面的突變命名法與核苷酸層面類似，知道突變後的蛋白質氨基酸序列後，再依上述的敘述規則清楚地將改變的氨基酸序列描述出來即可。如原本的氨基酸序列為MKLDFATYY，最後突變為MKYY，倘若M指的是此蛋白質的第一個氨基酸，我們則可將此突變敘述為L3_T7del（或L3_T7deILD FAT）。其它類型的突變可參考核苷酸的突變命名法。但是在蛋白質層面的突變會遇到一個特殊的情形即是框架移動突變（frameshifting mutation），此時我們用“fs”表示。如K35fsX76指的是離氨酸（Lysine; Lys; K）35是第一個發生框架移動的氨基酸，而新產生的閱讀框架（reading frame）有40個氨基酸，X代表的是終止密碼子（stop codon）。

突變的檢測法及其偽陰性

當報告顯示「未偵測到突變」就代表沒有突變了嗎？正確地說，我們應該將它解讀為「利用某檢測方法未偵測到突變」。因為不同的分析方法有不同的靈敏度，亦即「偽陰性」有不同的發生率，因此了解各種分析方法之流程及其靈敏度將有助於我們解讀突變分析報告書的陰性結果。以下介紹目前幾種常見之突變分析法。

偵測突變最簡單而完整的方法就是DNA定序。目前最常用的DNA定序方法是1975年由Sanger所發明的，稱之為桑格定序（sanger sequencing）。檢驗操作流程即是在PCR反應

中添加「雙去氧核苷酸（dideoxynucleotide; ddNTP）」。ddNTP的3'端缺乏氫氧基（hydroxyl group），無法與下一個核苷酸形成磷脂鍵（phosphoester bond），所以一但ddNTP與DNA模板形成配對後，就會終止PCR的反應，因此又稱為鏈終止法（chain termination method）（請參考《生物醫學》第三卷第一期第285頁之圖二）。所以，反應後會產生各種大小片段的DNA產物，此時利用電泳將這些片段進行分離，即可判讀出DNA的序列。桑格定序法的優點是能偵測到DNA模板中所有的突變。亦即置換、佚失、插入、及重複等變化，不管是在DNA模板中的任何部位皆可偵測到。因此DNA定序是偵測突變最簡單而完整的方法。然而，桑格定序法靈敏度只有15-25%，亦即當突變細胞與正常細胞混在一起時，假使檢體中突變的細胞數量不多，就很容易造成偽陰性。

目前還有靈敏度較高的定序法—焦磷酸測序法（pyrosequencing）以及單一分子定序法（single molecule sequencing）。焦磷酸測序法是新世代的DNA序列分析技術，主要針對短或中等長度的DNA序列，是個精確度高且再現性佳的分析技術。其DNA序列分析反應之原理是利用幾種生化反應之組合，DNA在合成時會產生焦磷酸基團（pyrophosphate, PPi），進而將PPi轉換成腺苷三磷酸（adenosine-5'-triphosphate, ATP），ATP再促使發光酶（luciferase）放出冷光（bioluminescence）。此放出的冷光強度經冷光儀（luminometer）偵測後，轉讀出DNA序列（請參考《生物醫學》第三卷第一期第286頁之圖三）。此法無須進行電泳，可在96孔盤上進行反應，因

此可同時進行多檢體序列分析。但也因反應特性的限制，精準讀序目前只在二十至三十個核苷酸（nucleotide）序列左右。有研究者改良此方法，使該技術的讀序長度增加一倍以上。因此有些專家偏好將焦磷酸測序法用於小片段的DNA序列，此法的花費較為經濟，並且敏感性高（5%），因此較一般傳統桑格定序法還要好。

單一分子定序法（圖二）主要是先將DNA切成小片段，再利用酵素在小片段DNA末端加上「多A（poly A）」以及螢光，並藉此標的物黏附到定序平台上的互補序列，藉螢光定位出每個序列在晶片上的位置；然後加入一種含有螢光標記的鹼基（base），沖洗後，藉由CCD偵測這些序列點上的不同步螢光發光；之後切掉螢光，再加入下一個螢光標記的鹼基。反覆這種步驟即可得知每一小片段DNA的序列；最後把這些小片段DNA序列疊合就可併成完整的DNA序列。此法靈敏度為0.2%。根據Helicos BioSciences生技公司公佈的資料顯示，單一分子定序法只能定序小片段（三十個鹼基以下）的序列，但是另外一家生技公司Pacific Biosciences則宣稱已經可利用此技術完成一千個鹼基長度的定序。

除了上述的DNA定序法之外，還有以下四大類的分析方法可以偵測定點的突變：

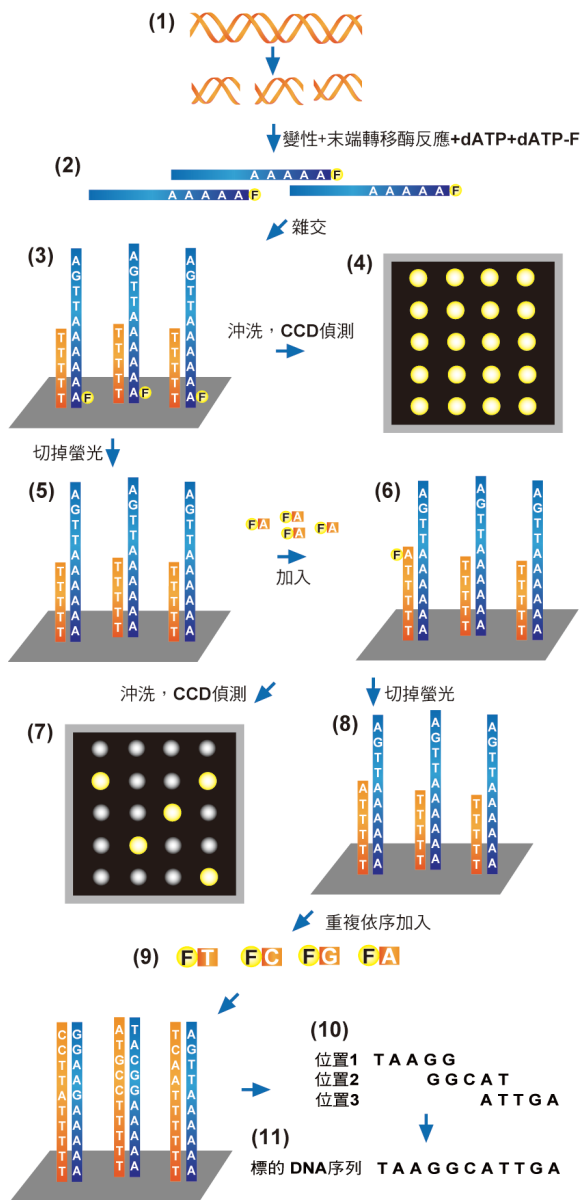
一、與DNA結構相關的突變分析法：此方法的代表為「單鏈構象多態性（single strand conformation polymorphism PCR; SSCP-PCR）」。

許多DNA的突變常常都是單一位置的點突變，如鎌狀細胞貧血（sickle cell anemia），這些位

置的點突變會影響單股（single strand）DNA折疊（folding），不同結構的DNA在電泳時會有不同的移動速率。其作法是先取DNA進行聚合酶連鎖反應，接著將增幅的DNA片段經過變性（denature）成為單鏈，再將單鏈之變性DNA進行復性（renature）。倘若DNA發生突變，發生復性時會形成不同的二級結構，此時再將復性後的DNA進行中性聚丙烯醯胺凝膠電泳（neutral polyacrylamide gel electrophoresis; neutral PAGE）。由於不同結構的DNA具有不同的電泳速度，因此將檢體的電泳結果與野生型或是已知突變型的電泳圖相比對後，即可知道有無突變。此法的靈敏度為10%。

二、利用螢光的原理而設計的突變分析法：此方法是利用螢光共振能量轉移（fluorescence resonance energy transfer; FRET）的原理，利用能量轉移的方式，當兩蛋白質的距離低於10奈米（nanometer; nm）時，捐贈者（donor）受到激發後，散發出的能量會被接納體（acceptor）所吸收。因此，先將fluorophore（即螢光捐贈者）及quencher（即螢光接納體）分別接在合成之核苷酸探針（probe）的5'端和3'端，此時的螢光捐贈者因為和螢光接納體的距離相當接近，即便受到激發也無法發出螢光。當外力使得螢光捐贈者和螢光接納體的距離拉大時，螢光捐贈者就可因為激發而發出螢光。使用此原理的突變分析如下：

（1）TaqMan探針：此方法是在PCR反應中加入一個特殊探針，探針的序列必須包含欲觀察之標的序列。當PCR開始進行時，探針結合上DNA模板，反應中之DNA聚合酶（DNA polymerase）的5'端外切酶（5'-exonuclease）特性，會將結合到



圖二、單一分子定序法 (single molecule sequencing)。

單一分子定序法也是藉由核苷酸標記螢光，再經由CCD偵測螢光訊號，最後根據依序出現的螢光訊號，讀出標的DNA的訊號。其流程簡述如下：

(1) 先將DNA變性成單股的結構，並利用酵素將其切成100至200個核苷酸的小片段。(2) 添加末端轉移酶 (terminaltransferase)、去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)，末端轉移酶可催化將去氧腺苷三磷酸結合上DNA片段的3'端，形成多A (poly A) 的結構。最後再加上一個螢光標記的去氧腺苷三磷酸，使每一個DNA片段的3'端都帶有螢光標示。(3) 將螢光標示的片段DNA與固定於固定相的多T序列進行雜交 (hybridization) 反應。(4) 沖洗掉未結合上固定相的多A片段，並進行第一次的螢光偵測。根據第一次的螢光偵測可定位出每一個片段DNA的位置。(5) 切掉去氧腺苷三磷酸的螢光標記。(6) 加入一種具有螢光標示的去氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)，待去氧核糖核苷三磷酸與片段DNA反應後，再沖洗掉未反應之去氧核糖核苷三磷酸。(7) 進行第二次的螢光偵測。並將發光的片段DNA位置記錄下來。(8) 將結合上片段DNA之具有螢光標示的去氧核糖核苷三磷酸的螢光切除。(9) 依序加入其他三種具有螢光標示的去氧核糖核苷三磷酸，並且重複5至7的步驟。(10) 依據每個片段DNA位置的發光訊號，便可讀出每一個片段DNA之序列。(11) 最後合併這些序列，並拼湊成為完整的DNA序列。(彩圖詳見本刊網頁)

DNA的探針水解掉，於是螢光捐贈者和螢光接納體的距離就會拉大，因此，螢光捐贈者就可發出特定波長的螢光了。因此，針對欲探測的基因位點，設計兩種分別可與特定基因型DNA序列結合的探針，觀察在PCR反應中何種探針的反應會產生螢光，即可得知標的DNA之序列。此方法的靈敏度為0.1-10%，表示異型合子 (heterozygous) 突變細胞和正常細胞的數目比只要大於1:4，就可用此方法偵測出突變了。(2) 肽核酸鎖核酸PCR

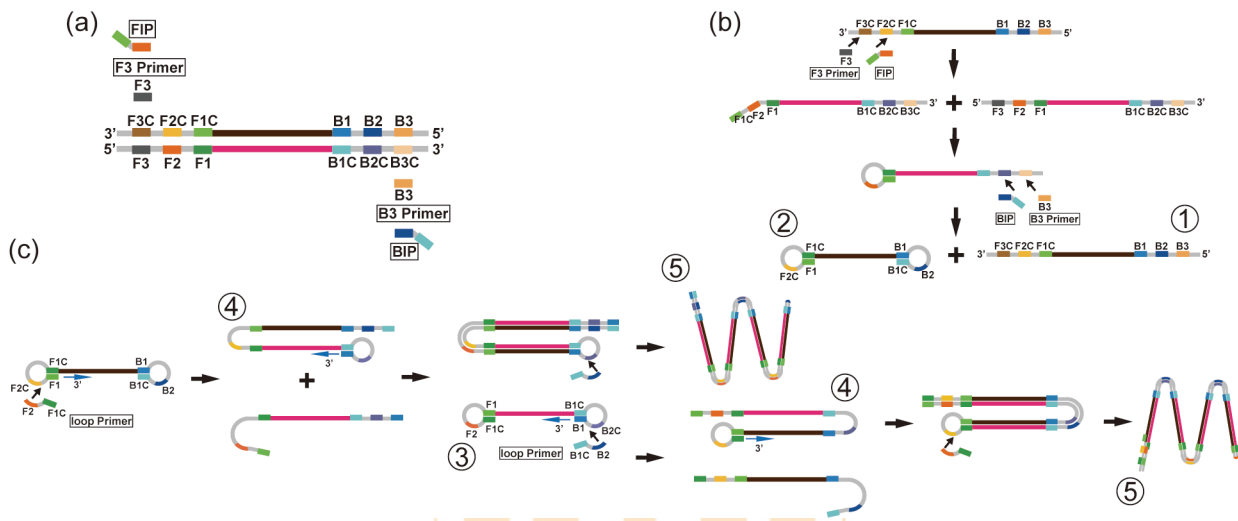
(peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR; PNA-LNA PCR)：肽核酸 (peptide nucleic acid; PNA) 為一特殊設計的類DNA片段，其醯胺鍵 (amide bond) 取代了DNA原有的去氧核糖磷酸 (deoxyribose phosphate) 的骨架 (backbone)。它可準確結合到野生型DNA序列上，但結合比DNA-DNA的結合比還要強，因此DNA聚合酶無法解開此鍵結。其檢測流程為設計一個與突變型DNA序列互補的鎖核酸 (locked nucleic acid;

LNA) 探針和一個與野生型DNA互補的PNA片段，此兩段互補的序列皆須包含欲檢測之突變位置。結合螢光共振能量轉移的原理，在LNA探針的5'端和3'端分別接上螢光捐贈者及螢光接納體，當PCR進行時，PNA會結合到野生型DNA，當DNA聚合酶進行到PNA的位置時，會因為無法解開PNA和DNA的雙股結構而使得PCR反應停止，於是野生型DNA無法被擴增；另一方面LNA探針會結合上突變型DNA，但是遇到DNA聚合酶時，會被其5'端外切酶的活性分解掉，基因擴增因此可繼續進行，螢光捐贈者也因為遠離螢光接納體可受激發而發出螢光。隨著野生型基因被抑制擴增，突變型基因持續的放大，可提高檢測的靈敏度至0.2-1%。(3) 蠍型擴增受阻突變系統 (scorpion amplification refractory mutation system; scorpion ARMS)：其方法是設計一個特殊序列的探針，探針序列的3'端和5'端為互補的序列，使得探針呈現髮夾環形狀 (hairpin loop)。環 (loop) 的序列需包含欲偵測DNA的突變點。當溫度升高，DNA模板和蠍型引子 (primer) 都會產生變性，探針的髮夾結構會解開。當引子與探針都結合上模板並開始進行DNA延長 (extension) 的反應，DNA聚合酶作用到探針的位置時，會將探針水解，使得螢光捐贈者發出螢光。此方法之靈敏度為1%。

三、使用限制酶 (restriction enzyme; RE) 作為突變分析工具的分析法：限制酶又稱為限制內切酶 (restriction endonuclease)，是在細菌內發現的一種能切斷DNA而不會破壞鹼基和核苷酸的酵素。限制酶能辨識DNA上特定的鹼基序列，因此每個限制酶各有其特定的切點。其代表方法有：(1) 限制片段長度多型性PCR (restriction

fragment length polymorphism PCR; RFLP-PCR)：其流程是將擴增後的標的基因分解成小片段，再利用洋菜凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 分離片段，最後對照已知野生型和突變型DNA的電泳圖，即可得知受檢檢體是否含有突變。倘若野生型基因之核苷酸序列可被限制酶辨識，那麼基因就可被切成小片段；而突變型基因改變了限制酶的切點序列，使得限制酶無法作用，那麼基因就無法被切成小片段。這方法只適用於已知的突變位置，並且此位點必須剛好位於限制酶切點上。其靈敏度為5%。(2) 突變體富集PCR (mutant-enriched PCR)：利用已知的RE切點，在巢式PCR (nested PCR) 第一次基因放大結束後，加入特定的RE切斷擴增的DNA。野生型DNA會被RE切斷而不能進入後續的PCR擴增，而突變型DNA因為RE切點發生突變，所以能躲過RE作用，進入後續的PCR擴增。其靈敏度為0.2%。

四、恆溫擴增 (isothermal amplification) 突變分析法：此方法的優點在於不需要像PCR一樣經由溫度的升降達到DNA的擴增，僅需要恆溫的水浴槽或是加熱板即可，其反應溫度大約介於60-70°C。恆溫環狀增幅法 (loop-mediated isothermal amplification; LAMP) (圖三) 的反應中需要三組引子對 (primers)，分別為外引子對 (outer primers)、內引子對 (inner primers) 以及環狀引子對 (loop primers)，DNA聚合酶則選用適合在60-70°C作用之Bst DNA聚合酶。反應過程中外引子對和內引子對首先辨識並結合到DNA，進行增幅後，由於內引子對序列設計的特性，因此反應進行中會產生含有環狀的產物。此時環狀引子對會辨識並結合上此環狀結構，藉由不斷的重複反



圖三、恆溫環狀增幅法 (loop-mediated isothermal amplification; LAMP)。

(a) LAMP的反應需要三組引子對 (primers)，分別為外引子對 (outer primers)、內引子對 (inner primers) 以及環狀引子對 (loop primers)，其中外引子對 (outer primers) 與內引子對 (inner primers) 一共可辨識DNA上的六個位置，F1、F2、F3、B1c、B2c和B3c。(b) 反應進行時，F3引子與B3引子會結合上F3c與B3c，放大原本的DNA模板①；FIP引子與BIP引子分別結合上F2c與B2c的序列，產生兩端皆具環狀之DNA產物②。(c) 環狀引子對會結合上環狀之DNA產物，除了能繼續放大此環狀DNA③之外，亦能產生self-primed DNA④，顧名思義，self-primed DNA就是能以自己作為primer，自行放大。此時環狀引子亦能結合上環狀DNA，因而產生具有多重環狀的DNA片段⑤。(彩圖詳見本刊網頁)

應，DNA可被放大為帶有多重環狀結構的DNA片段。由於不需要階段性的升降溫度，加上self-priming的特性，反應過程中不斷產生原始和中間產物的DNA片段，迅速地增加標的DNA之數量，因此花費的時間較短（30分鐘至1小時）。加上外引子對與內引子對一共可辨識DNA上六段不同的序列，因此特异性極高。2007年Hayashizaki團隊所研發的smart amplification process version 2 (SMAP-2) 即是採用*Thermus aquaticus* MutS (Taq MutS) 搭配恆溫擴增法的方式，另外搭配兩個不對稱 (asymmetric) 的引子—folding primer (FP) 和turn-back primer (TP)，利用其self-priming的特性，專一性地放大所要觀察之DNA特定片段。隔年Tatsumi發表修改 (modified) 後的SMAP-2方法，他於反應中加入含有野生序

列PNA，當基因型態為野生型時，PNA與DNA的鍵結力強，因此會阻斷PCR進行延長反應 (elongation) 而沒有PCR產物生成。一旦DNA發生點突變，PNA與DNA就無法完全互補 (perfect match)，反應的高溫即可打斷PNA與DNA的之間的鍵結，PCR得以繼續進行。此法的優點在於能快速的檢測基因是否發生突變，因為一般PCR反應都應具有高純度的DNA，以確保DNA聚合酶的作用。但是利用修改後的SMAP-2不僅能應用在粗產物 (crude lysate) 和冷凍組織 (frozen tissue) 上，也適用於蠟塊檢體。其敏感度可達0.1%。

以上所介紹的方法各有其優缺點，敏感度也不相同，表一為上述突變檢測分析方法之靈敏度整理。對於遺傳疾病而言，突變檢驗方法的敏感性較不重要，因為遺傳疾病是種系突變 (germline

表一、突變檢驗方法之敏感度一覽表

突變檢驗方法	敏感度
桑格定序法	10-25%
單鏈構象多態性PCR	10%
TaqMan PCR	0.1-10%
焦磷酸測序法	5%
限制片段長度多型性PCR	5%
肽核酸鎖核酸PCR	0.2-1%
蠟型擴增受阻突變系統	1%
單一分子定序法	0.2%
突變體富集PCR	0.2%
SMAP-2	0.1%

mutation)，因此一但遺傳到此突變基因，全身的細胞皆含有此突變基因。但是腫瘤檢體（如血液、胸水等）的內容並不單純，其內可含許多正常細胞，倘若檢體中只含10%的腫瘤細胞，那麼以桑格定序法（靈敏度為15-25%）做為突變檢測的話，就會造成實驗的偽陰性了。

結語

突變檢測目前應用最多也最廣為人知的就是「癌症標靶治療」。由於病患必須含有或排除特定的突變基因才可使用標靶藥物，因此可見突變檢測之重要性。可想而知，突變分析報告書一定會愈來愈常見。對於陽性與陰性的結果，讀者須具備不同的學識才能完全了解報告的內容。只有當大家都不會誤解檢測的結果時，高科技才能為病患帶來最多的益處。

建議閱讀

- Harris TD, Buzby PR, Babcock H, Beer E, Bowers J, Braslavsky I, Causey M, Colonell J, Dimeo J, Efcavitch JW, Giladi E, Gill J, Healy J, Jarosz M, Lapen D, Moulton K, Quake SR, Steinmann K, Thayer E, Tyurina A, Ward R, Weiss H, Xie Z. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science* 2008;320:106-109.
- Tatsumi K, Mitani Y, Watanabe J, Takakura H, Hoshi

- K, Kawai Y, Kikuchi T, Kogo Y, Oguchi-Katayama A, Tomaru Y, Kanamori H, Baba M, Ishidao T, Usui K, Itoh M, Cizdziel PE, Lezhava A, Ueda M, Ichikawa Y, Endo I, Togo S, Shimada H, Hayashizaki Y. Rapid screening assay for KRAS mutations by the modified smart amplification process. *J Mol Diagn* 2008;10:520-526.
- Mitani Y, Lezhava A, Kawai Y, Kikuchi T, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, Itoh M, Miyagi T, Takakura H, Hoshi K, Kato C, Arakawa T, Shibata K, Fukui K, Masui R, Kuramitsu S, Kiyotani K, Chalk A, Tsunekawa K, Murakami M, Kamataki T, Oka T, Shimada H, Cizdziel PE, Hayashizaki Y. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat Methods* 2007;4:257-262.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000;15:7-12.
- Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 2002;79:464-470.
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 2008;3:877-882.
- Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Sutani A, Huqun, Udagawa K, Murayama Y, Nagata M, Shimizu Y, Ikebuchi K, Kanazawa M, Kobayashi K, Hagiwara K. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2007;98:246-252.