·论　著·

抑制探针置换扩增联合Sanger测序在ARMS法检测临界病例中的补充应用价值

张　静[1, 2]，张　玲[1, 2]，田　田[1, 2]，孙　慧[1, 2]，柏乾明[1, 2]，许蜜蝶[1, 2]，周晓燕[1, 2]，任　敏[1, 2]

1. 复旦大学附属肿瘤医院病理科，复旦大学上海医学院肿瘤学系，上海 200032；
2. 复旦大学病理研究所，上海 200032

［摘要］ **背景与目的：**扩增阻滞突变系统（amplification refractory mutation system，ARMS）法是目前临床常用的肿瘤组织基因突变检测方法，但在实际应用中，有时会产生难以判读的临界结果，影响后续临床诊疗决策。本研究旨在探讨抑制探针置换扩增（blocker displacement amplification，BDA）联合Sanger测序（Blocker displacement amplification combined with Sanger sequencing，BDA-Sanger）对ARMS法检测临界病例的补充应用价值。**方法：**回顾性连续纳入2024年1月—9月于复旦大学附属肿瘤医院经ARMS法检测判定为临界结果，且符合本研究纳入和排除标准的结直肠癌和肺癌患者，根据初筛结果分为两组：ARMS临界阳性组与ARMS临界阴性组。所有样本均采用BDA-Sanger法补充复核，对比两组临床病理学及质控参数差异。本研究已在国家全民健康保障信息平台-医学研究登记备案信息系统上注册（注册号：MR-31-26-088667）。本研究经复旦大学附属肿瘤医院伦理委员会批准（批号：2609-Exp531）。**结果：**206例临界病例（占同期检测总量4 759例的4.3%）中，结直肠癌114例，肺癌92例，ARMS临界阳性组91例，ARMS临界阴性组115例。验证位点以*KRAS*第2外显子为主（64.08%），其次为*EGFR*基因第20、21外显子（各5.83%）。针对ARMS临界阳性样本，BDA-Sanger法验证一致率达100%（91/91）。在115例ARMS临界阴性样本中，BDA-Sanger额外检出71例真阳性病例，整体阳性检出率由初筛的44.2%（91/206）提升至78.6%（162/206），差异有统计学意义（P<0.001）。以BDA-Sanger法为参考标准，在206例临界样本中，ARMS法的灵敏度为56.17%（91/162，95% CI: 48.18%~63.95%），特异度为100%（44/44，95% CI: 91.96%~100%），阳性预测值为100%（91/91），阴性预测值为38.26%（44/115，95% CI: 29.35%~47.78%）。肠癌和肺癌样本中BDA-Sanger法的阳性检出率均显著高于ARMS法（P<0.001）。质控分析显示，临界阳性组低肿瘤细胞占比（≤20%）比例显著高于临界阴性组（P=0.004），而临界阴性组低核酸浓度（≤30 ng/μL）比例显著高于临界阳性组（P=0.005）。两组病例在年龄、性别及样本类型等基线临床病理参数上差异均无统计学意义（P>0.05）。**结论：**ARMS法临界阳性病例的可信度较高，而临界阴性样本存在较高漏检风险，原因主要包括核酸绝对量不足或野生型背景稀释。针对此类低质量样本，BDA-Sanger法凭借对野生型背景的强效抑制，可作为有效的补充检测策略。

［关键词］ ARMS；抑制探针置换扩增联合Sanger测序；临界病例；补充检测；结直肠癌；肺癌

中图分类号：R730.43　**文献标志码：**A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.10.006

基金项目：上海市协同创新集群（2019CXJQ03）。
利益冲突：所有作者均声明无利益冲突。
伦理批件：2609-Exp531。
知情同意：已获得。
IIT备案：MR-31-26-088667。
引用本文：张静, 张玲, 田田, 等. 抑制探针置换扩增联合Sanger测序在ARMS法检测临界病例中的补充应用价值[J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(10): 1038-1045.
CC协议：CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: The Innovation Group Project of Shanghai Municipal Health Commission (2019CXJQ03).
Conflicts of interest: All authors declare no conflicts of interest.
Ethical approval: 2609-Exp531.
Informed consent: Acquired.
IIT registration: MR-31-26-088667.
Cite this article: Zhang J, Zhang L, Tian T, et al. Supplemental application value of blocker displacement amplification combined with Sanger sequencing in ARMS-based detection of borderline cases [J]. Chin Oncol, 2026, 36(10): 1038-1045.
CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

Supplemental application value of blocker displacement amplification combined with Sanger sequencing in ARMS-based detection of borderline cases

ZHANG Jing[1,2], ZHANG Ling[1,2], TIAN Tian[1,2], SUN Hui[1,2], BAI Qianming[1,2], XU Midie[1,2], ZHOU Xiaoyan[1,2], REN Min[1,2] (1. Department of Pathology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Institute of Pathology, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: REN Min E-mail: mren21@m.fudan.edu.cn

[**Abstract**] **Background and purpose:** The amplification refractory mutation system (ARMS) is currently a commonly used method for detecting gene mutations in clinical tumor tissues. However, in practical applications, it may sometimes yield borderline results that are difficult to interpret, affecting subsequent clinical decision-making. This study aimed to explore the supplementary application value of blocker displacement amplification (BDA) combined with Sanger sequencing (BDA-Sanger) for borderline cases initially detected by ARMS. **Methods:** This study retrospectively and consecutively enrolled patients with colorectal cancer and lung cancer who were treated at Fudan University Shanghai Cancer Center from January to September 2024, whose initial ARMS-based testing yielded borderline results, and who met the inclusion and exclusion criteria. Based on the initial screening results, patients were divided into two groups: the ARMS borderline-positive group and the ARMS borderline-negative group. All samples were further re-tested using the BDA-Sanger method for supplementary verification, and differences in clinicopathological and quality control parameters between the two groups were compared. This study has been registered on the National Health Security Information Platform-Medical Research Registration and Filing Information System (registration number: MR-31-26-088667) and was approved by the Ethics Committee of Fudan University Shanghai Cancer Center (approval number: 2609-Exp531). **Results:** Among the 206 borderline cases (accounting for 4.3% of the 4 759 total tests during the same period), there were 114 colorectal cancer cases and 92 lung cancer cases, with 91 in the ARMS borderline-positive group and 115 in the ARMS borderline-negative group. The sites requiring verification in these 206 borderline cases were predominantly *KRAS* exon 2 (64.08%), followed by *EGFR* exons 20 and 21 (5.83% each). For the ARMS borderline-positive group, BDA-Sanger demonstrated 100% (91/91) concordance. In the 115 borderline-negative cases, BDA-Sanger identified 71 additional true positive cases, increasing the overall positive detection rate from 44.2% (91/206) to 78.6% (162/206, $P<0.001$). Using BDA-Sanger as the reference standard, the sensitivity of the ARMS method in the 206 borderline samples was 56.17% (91/162, 95% CI: 48.18%-63.95%), specificity was 100% (44/44, 95% CI: 91.96%-100%), positive predictive value was 100% (91/91), and negative predictive value was 38.26% (44/115, 95% CI: 29.35%-47.78%). The detection rate of BDA-Sanger was significantly higher than that of ARMS in both lung and colorectal cancer subgroups ($P<0.001$). Quality control analysis revealed that the borderline-positive group had a significantly higher proportion of low tumor cellularity (≤20%) than the borderline-negative group ($P=0.004$), whereas the borderline-negative group had a significantly higher proportion of low nucleic acid concentration (≤30 ng/μL, $P=0.005$). No significant differences were observed in baseline clinicopathological parameters, including age, gender, and specimen type, between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion:** ARMS borderline positive cases demonstrate high reliability, whereas borderline negative samples carry a high risk of missed detection, primarily driven by insufficient absolute nucleic acid quantity or wild-type background dilution. For such low-quality samples, BDA-Sanger, with its robust suppression of wild-type background, serves as an effective supplemental testing strategy.

[**Key words**] ARMS; Blocker displacement amplification combined with Sanger sequencing; Borderline cases; Supplemental testing; Colorectal cancer; Lung cancer

近年来，随着精准医学的飞速发展，非小细胞肺癌与结直肠癌的临床实践已全面进入基于分子分型的靶向治疗时代。准确的基因突变状态（包括*EGFR*、*KRAS G12C*、*BRAF*、*PIK3CA*等关键可靶向基因）是制订个性化诊疗方案的前提[1-3]，因此对临床分子检测技术的准确性与灵敏度提出了更高要求。目前，基于荧光定量PCR平台的扩增阻滞突变系统（amplification refractory mutation system，ARMS）法因其操作简便、检测周期短、普及率高，成为中国病理科应用最广泛的基因突变检测技术[4-5]。然而，在日常实践中，ARMS法常出现突变循环阈值（cycle threshold，Ct）接近阴阳性临界值的灰区结果，给病理医师的临床判读带来了巨大的困扰与挑战。对于此类临界病例，需要采用其他检测方法进行验证复核，但目前未见针对ARMS法临界病例的常规临床验证策略报道。

对于此类临界病例的复核，传统Sanger测序虽为基因突变检测的金标准，但其检测灵敏度仅约15%，易漏检低频突变；二代测序（next-generation sequencing，NGS）成本高昂、检测周期长（通常需1~2周）；微滴式数字PCR则需针对各突变位点设计探针，难以实现多位点广谱筛查，均不适用于临床病理室的常规快速补充复核。抑制探针置换扩增（Blocker displacement amplification，BDA）技术通过引入与野生型序

列互补的Blocker引物，在PCR中竞争性抑制野生型模板扩增，实现对低频突变的有效富集。将BDA与Sanger测序联合（Blocker displacement amplification combined with Sanger sequencing，BDA-Sanger），仅在常规Sanger测序中加入一条Blocker引物，据文献报道其可在石蜡包埋组织及血浆样本中稳定检出0.20%的低频突变[6-7]，兼具高灵敏度、低成本、短周期及广谱筛查优势，尤其适用于临床样本的常规补充复核检测。

本研究回顾性分析本实验室采用BDA-Sanger法复核ARMS法临界病例的应用数据，系统评估该方法在解决ARMS临界判读问题中的临床价值，发现针对ARMS法判读困难的临界样本，BDA-Sanger法能显著提升低质量标本中的突变检出率，以期为病理科提供可行的补充复核策略，保障分子病理诊断结果的准确性与可靠性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

本研究回顾性连续纳入复旦大学附属肿瘤医院病理科2024年1月—9月采用ARMS法检测的样本，收集处于判定阈值边缘的临界病例，均经BDA-Sanger法补充检测。排除标准包括：① 临床及病理基线数据严重缺失者；② 原始核酸样本已耗尽或降解，无法满足BDA-Sanger复核要求者；③ ARMS检测扩增曲线典型、结果明确的非临界样本。本研究为回顾性设计，未在研究开始前进行严格的样本量估算，而是采取连续纳入研究期间符合标准的全部206例临界样本以最大化统计效能。组织样本常规固定，石蜡包埋，胸腔积液样本制成细胞蜡块；取厚度4 μm切片5~20张进行后续检测。

1.2 临床资料

收集所有复核样本的临床病理学资料，包括肿瘤类型、性别、年龄、样本类型以及样本的肿瘤细胞含量、核酸浓度、核酸纯度及ARMS法检测的各反应管的Ct值。本研究经复旦大学附属肿瘤医院伦理委员会批准（批号：2609-Exp531）。

1.3 检测流程

1.3.1 病理学检查

病理科医师镜下评估HE切片，标记肿瘤区域及肿瘤细胞百分比，根据HE标记刮取肿瘤细胞进行富集。

1.3.2 DNA提取

使用德国凯杰生物技术有限公司的QIAamp DNA Mini Kit试剂盒提取样本DNA，Nanodrop 2000型分光光度仪检测样本核酸的浓度和纯度。

1.3.3 ARMS法检测

采用厦门艾德生物医药科技股份有限公司的人类*KRAS/NRAS/BRAF*基因突变联合检测试剂盒（荧光PCR法，简称肠癌试剂盒）和5种突变基因检测试剂盒（荧光PCR法，简称肺癌试剂盒），按照说明书进行操作及判读。试剂盒室温解冻后，将反应液、混合酶、ddH_2O混合后对应分装，依次加入样本、阴性及阳性质控品。肠癌试剂盒循环参数：第一阶段：95 ℃ 5 min，1个循环；第二阶段：95 ℃ 25 s，64 ℃ 20 s，72 ℃ 20 s，15个循环；第三阶段：93 ℃ 25 s，60 ℃ 35 s，72 ℃ 20 s，31个循环。肺癌试剂盒循环参数：第一阶段：42 ℃ 5 min，95 ℃ 5 min，1个循环；第二阶段：95 ℃ 25 s，64 ℃ 20 s，72 ℃ 20 s，10个循环；第三阶段：93 ℃ 25 s，60 ℃ 35 s，72 ℃ 20 s，36个循环。采用ABI 7500型荧光定量PCR仪（Life）进行检测。

1.3.4 BDA-Sanger法检测

Blocker引物设计参考文献[8]，针对ARMS法检测的各基因突变位点区域，分别设计特异性Blocker引物与扩增引物，由上海生工生物公司合成；PCR总反应体系为12.5 μL：终浓度10 μmol/L的正反向引物各0.5 μL、Blocker引物1.5 μL、2×PCR混合缓冲液6.25 μL、DNA模板1 μL、ddH_2O 2.75 μL。循环参数：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性30 s，56 ℃退火30 s，72 ℃延伸45 s，共40个循环；72 ℃延伸10 min。使用Big Dye Terminator Version 3.1循环测序试剂盒（Applied Biosystems）和ABI 3500DXL型基因分析仪进行测序。本自研体系在前期已使用标准质控品完成性能确认，证实其能有效富集并稳定检出常规Sanger测序难以检测的低频突变序列，且未见非特异性扩增，批内及批间重复性良好。

1.3.5 结果判读

ARMS检测结果按照试剂盒说明书进行判读。BDA-Sanger法检测的阳性判读标准为：在特异性扩增位点出现明显区别于背景基线噪声的突变峰（信噪比>3）；阴性判读标准为：测序峰图基线平稳，目标位点仅见清晰的野生型信号峰，无异常突变峰，或局部微弱杂峰（信噪比<3）。对于首次测序出现峰图模糊或多重套峰等不确定结果，将重新进行PCR扩增及纯化测序；若二次测序仍无法明确判读，则作为缺失数据排除（本研究队列中经二次复测均获得了明确结果，无此类排除病例）。所有BDA-Sanger法测序结果由两名病理科医师独立判读，结果不一致时进行BDA-Sanger二次重复检测确认。由于Sanger测序的阳性突变峰具有直观的形态学特征，两名独

立判读医师对206例BDA-Sanger法结果的判读一致性达100%，本研究未见显著的操作者间诊断变异性。

1.3.6 盲法说明

本研究为回顾性设计，所有样本均先完成ARMS法检测及初步判读，随后对筛选出的临界病例进行BDA-Sanger法复核。ARMS判读人员不知晓后续BDA-Sanger结果；BDA-Sanger复核人员已知晓样本为ARMS临界病例。为控制主观偏倚，结果的判定统一依据客观峰图特征，并由两名高年资病理医师在双盲条件下进行独立判读。

1.3.7 时间间隔说明

本研究中，从ARMS初筛报告临界结果至启动BDA-Sanger法复核期间，样本DNA于-20 ℃冰箱中冻存。两次检测的时间间隔均严格控制在5个工作日以内，通过标准化的低温储存条件与限制检测时间间隔，以降低核酸自然降解对复核结果可能产生的影响。

1.4 统计学处理

本研究所纳入的样本在核心指标（ARMS Ct值、BDA-Sanger测序结果、肿瘤细胞百分比及核酸浓度）上均无缺失数据。采用IBM SPSS Statistics 26.0（IBM Corp.，Armonk，NY，USA）软件对数据进行统计学分析。计数资料采用频数（n）和百分率（%）进行描述，组间比较采用χ^2检验。以BDA-Sanger检测结果作为本研究的参考标准，计算ARMS法在临界样本中的灵敏度、特异度、阳性预测值（positive predictive value，PPV）和阴性预测值（negative predictive value，NPV），并采用Wilson法计算95% CI。采用Kappa值进行一致性分析，Kappa值<0.4为一致性较弱，0.4~0.6为一致性中等，>0.6为一致性较强。采用双侧检验，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 ARMS法临界病例的验证场景与基因类型分布

2024年1月—9月ARMS共检测样本4 759例，验证样本主要为ARMS法检测的Ct值在阳性阈值±1，且△Ct值在相应△Ct Cut-off值±1的临界病例，共计206例（4.3%），其中结直肠癌114例，肺癌92例。根据ARMS检测试剂盒的判读标准，将上述临界病例分为两类验证场景：①为ARMS法判读结果为阳性的临界病例（91例），包含Ct值小于强阳性阈值但△Ct值大于相应Cut-off值（80例），以及Ct值在弱阳性范围内但△Ct值小于相应Cut-off值（11例）；②为ARMS法判读结果为阴性的临界病例（115例），即Ct值在弱阳性范围内但△Ct值大于相应Cut-off值。本研究的流程见图1。进一步统计分析ARMS法临界病例与同期判读明确病例之间的临床病理学特征，结果显示包括性别、年龄、样本类型（手术/活检）、肿瘤细胞百分比、核酸浓度及核酸纯度差异均无统计学意义（P＞0.05）。

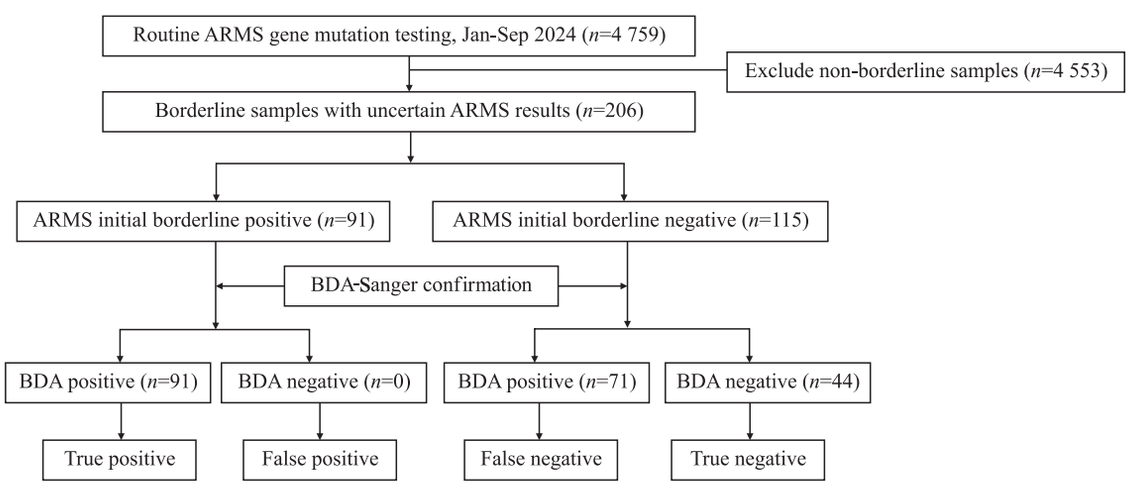


图1 本研究的流程图

Fig. 1 The flowchart of the present study

在基因类型分布方面，206例样本中涉及*KRAS*基因第2外显子共132例（64.08%），以BDA-Sanger法验证结果为标准，其中野生型27例（13.11%），G12D突变44例（21.36%）、G12C突变14例（6.80%）、G12V突变13例（6.31%）、G13D突变11例（5.34%）、G12S突变10例（4.85%），其他突变类型（G12A、G13C、G12R）13例（6.31%）；*EGFR*基因第20外显子

12例（5.83%）；*EGFR*基因第21外显子12例（5.83%）；*BRAF*基因第15外显子9例（4.37%）；*NRAS*基因第3外显子9例（4.37%）；其他基因类型32例（*KRAS*基因第4外显子8例、*PIK3CA*基因第9/20外显子7例、*EGFR*基因第19外显子5例、*KRAS*基因第3外显子6例、*NRAS*基因第2外显子3例、*EGFR*基因第18外显子3例），占15.53%（图2）。对各管Ct值进行统计分析，选取样本量最多的*KRAS*基因第2外显子各管Ct值进行统计（ARMS肠癌试剂盒1，2，3号管，以及肺癌试剂盒8，9号管），发现ARMS与BDA-Sanger法检测结果一致组样本的Ct值均明显低于结果不一致组样本（图3）。

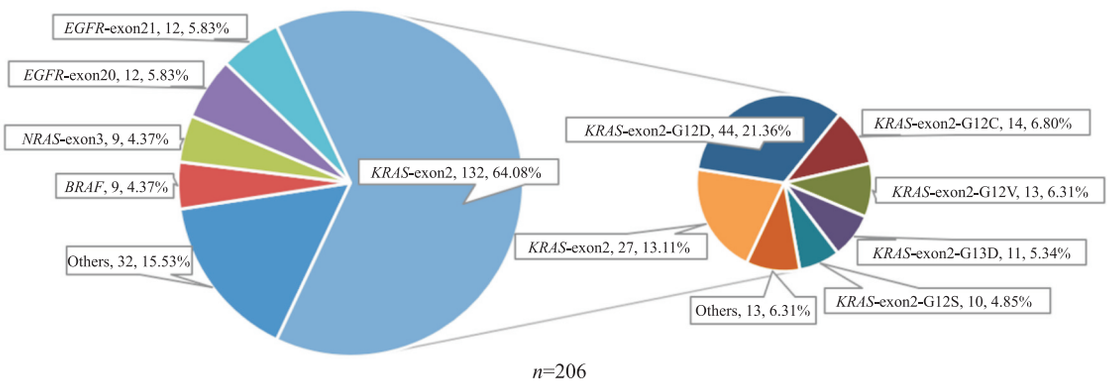


图2　206例ARMS临界病例的验证基因及突变位点分布

Fig. 2　Distribution of validated genes and mutation sites in 206 ARMS borderline cases

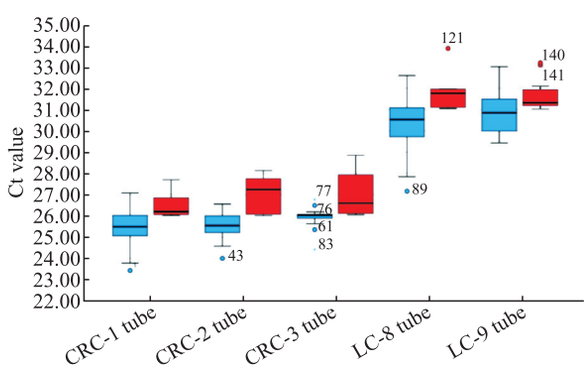


图3　肺癌与肠癌试剂盒中*KRAS*基因第2外显子各反应管Ct值的分布差异

Fig. 3　Differences in Ct value distribution of each reaction tube for *KRAS* gene exon 2 in lung cancer and colorectal cancer kits

Blue: Consistent group between ARMS and BDA-Sanger detection. Red: Inconsistent group between ARMS and BDA-Sanger detection. CRC: Colorectal cancer. LC: Lung cancer.

2.2　ARMS法与BDA–Sanger法检测结果比较

206例样本中，ARMS法突变阳性率为44.2%（91/206），BDA-Sanger法为78.6%（162/206），BDA-Sanger法的突变阳性检出率更高（P<0.001）。以BDA-Sanger法为参考标准，在206例样本中，ARMS法的灵敏度为56.17%（91/162，95% CI：48.18%~63.95%），特异度为100%（44/44，95% CI：91.96%~100%），阳性预测值为100%（91/91），阴性预测值为38.26%（44/115，95% CI：29.35%~47.78%）。两种检测方法的总符合率为65.5%（135/206），Kappa值为0.354，提示一致性较弱。ARMS法判读为阳性（验证场景①）的91例样本均被BDA-Sanger法验证为阳性；而在115例ARMS判读为阴性的病例（验证场景②）中，两种检测方法的结果差异较大，BDA-Sanger法可额外检测出71例突变阳性病例。针对不同肿瘤类型的亚组分析显示，在114例肠癌及92例肺癌病例中，BDA-Sanger法的阳性检出率都显著高于ARMS法（P<0.001，表1）。

2.3　验证场景与临床病理参数的关系

进一步对不同验证场景和相关临床病理及样本质控特征进行对比分析（表2），发现验证场景①（ARMS临界阳性组）中，肿瘤细胞比例≤20%者占54.9%（50/91），显著高于验证场景②（ARMS临界阴性组）中的34.8%（40/115；P=0.004，图4）。验证场景②中核酸浓度≤30 ng/μL的样本比例为54.8%（63/115），显著高于验证场景①中的35.2%（32/91；P=0.005，图5）。

3　讨　　论

本研究系统评估了BDA-Sanger法对ARMS法临界病例的补充应用价值，以BDA-Sanger为参考标准，ARMS法在临界样本中的整体诊断准确度为65.53%，灵敏度为56.17%，特异度为100%，阳性预测值为100%，但值得注意的是，其阴性预测值仅为38.26%，提示ARMS法临界阴性样本的漏诊风险极高。本研究中两组临界病例在年龄、性别、样本类型及核酸纯度等基线参数上均无显著差异，提示临界结果并非源于患者

表1 ARMS法与BDA-Sanger法检测结果的一致性

Tab. 1 Consistency of detection results between ARMS and BDA-Sanger methods

Item	BDA-Sanger positive *n*(%)	BDA-Sanger negative *n*(%)	χ^2 value	*P* value	Agreement rate/% (95% CI)	Kappa value (95% CI)
Total cohort (*n*=206)						
ARMS positive	91 (44.2)	0 (0)	44.274	<0.001	65.5 (58.8-71.7)	0.354 (0.261-0.447)
ARMS negative	71 (34.5)	44 (21.3)				
Colorectal cancer (*n*=114)						
ARMS positive	45 (39.5)	0 (0)	21.966	<0.001	62.3 (53.1-70.6)	0.323 (0.206-0.441)
ARMS negative	43 (37.7)	26 (22.8)				
Lung cancer (*n*=92)						
ARMS positive	46 (50.0)	0 (0)	22.378	<0.001	69.60 (59.5-78.0)	0.391 (0.242-0.541)
ARMS negative	28 (30.4)	18 (19.6)				

表2 验证场景与临床病理参数的关系

Tab. 2 Relationship between validation scenarios and clinicopathological parameters

Characteristic	Validation scenario *n*(%)		χ^2 value	*P* value
	① (*n*=91)	② (*n*=115)		
Cancer type			2.288	0.130
Colorectal cancer	45 (49.5)	69 (60.0)		
Lung cancer	46 (50.5)	46 (40.0)		
Gender			0.038	0.846
Male	51 (56.0)	66 (57.4)		
Female	40 (44.0)	49 (42.6)		
Age/year			1.336	0.248
≤65	53 (58.2)	76 (66.1)		
>65	38 (41.8)	39 (33.9)		
Sample type			0.005	0.946
Biopsy	21 (23.1)	27 (23.5)		
Surgical specimen	70 (76.9)	88 (76.5)		
Tumor cell percentage			8.394	0.004
≤20%	50 (54.9)	40 (34.8)		
>20%	41 (45.1)	75 (65.2)		
Nucleic acid concentration/ ($ng \cdot \mu L^{-1}$)			7.868	0.005
≤30	32 (35.2)	63 (54.8)		
>30	59 (64.8)	52 (45.2)		
Nucleic acid purity ($D_{260\ nm}/D_{280\ nm}$)			0.408	0.815
<1.8	6 (6.6)	7 (6.0)		
1.8-2.0	64 (70.3)	77 (67.0)		
>2.0	21 (23.1)	31 (27.0)		

Validation scenario ①: Cases judged positive by ARMS, including those with Ct below the strong positive threshold but ΔCt exceeding the corresponding cut-off, and those with Ct within the weak positive range but ΔCt below the corresponding cut-off. Validation scenario ②: Cases judged negative by ARMS, i. e., Ct within the weak positive range but ΔCt exceeding the corresponding cut-off.

或取材方式的差异，而是样本在核酸质量和肿瘤纯度上极端劣势的体现，针对此类样本引入高灵敏度的补充检测策略具有迫切的临床现实意义。

BDA技术的核心原理在于利用与野生型序列互补的Blocker引物，在PCR反应初期竞争性抑制野生型模板的扩增，从而实现低频突变的有效富集。本研究结果显示，206例ARMS临界样本中，BDA-Sanger法的阳性检出率由ARMS法的44.2%显著提升至78.6%，且肠癌与肺癌亚组均显示显著提升（*P*<0.001）。Wang等[9]在BDA法检测JAK2V617F低频变异时同样发现，BDA法可稳定检出等位基因频率低至0.05%的突变，其检测灵敏度显著优于常规ARMS法。Liu等[10]的研究指出，Super-ARMS检测在晚期NSCLC血浆ctDNA中的应用存在一定的假阴性率，尤其在突变丰度较低的样本中更为突出。该研究的发现与本研究观察到的ARMS法在临界阴性样本中高达61.74%的漏检率高度吻合。Lu等[11]在结直肠癌基因突变分析中应用长Blocker置换扩增技术，同样证实BDA策略能有效提高低频突变的检测通量和准确性。上述研究共同表明，BDA技术通过其独特的野生型模板抑制机制，可有效突破ARMS法在低突变丰度场景下的灵敏度瓶颈。

本研究发现，在115例ARMS临界阴性样本中，BDA-Sanger法额外检出71例真阳性突变，使大量ARMS法初始判读为阴性的患者重新获得了突变阳性的分子诊断结果。Kohei等[12]采用微滴式数字PCR分析非小细胞肺癌患者支气管灌洗液时也发现，对于低质量、微量临床标本，高灵敏度的检测方法可显著提高驱动基因突变检出率。王祥等[13]在2191例结直肠癌样本中对比ARMS法与NGS检测一致性时发现，两种方法在*KRAS*、*NRAS*、*BRAF*和*PIK3CA*基因检测中的总体一致率虽高达99.41%~100%，但27例不一致样本中23例为ARMS阴性而NGS阳性，其变异

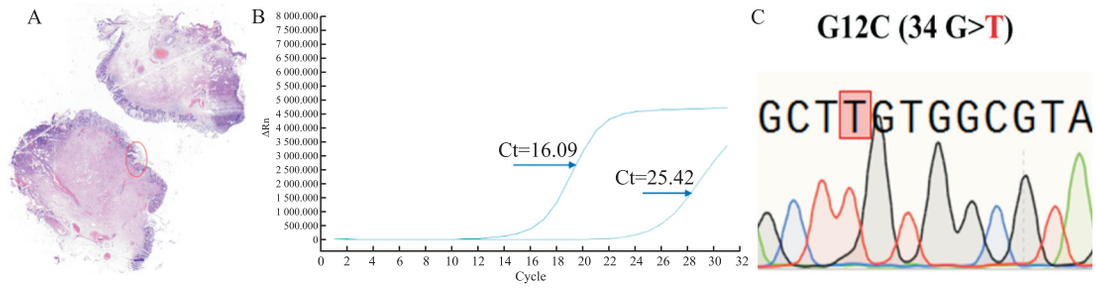


图4　验证场景①病例代表图

Fig. 4　Representative case of validation scenario ①

Scenario ①: Colorectal cancer surgical sample, HE-stained tumor enrichment area with tumor percentage about 5%-10%, nucleic acid concentration 20 ng/μL. A: HE staining (×1), red circle indicates tumor cell area. B: ARMS amplification curves: Tube 1 in colorectal cancer kit Ct=25.42 (strong positive range Ct<26), external control tube 12 Ct=16.09, ΔCt=9.33, exceeding the ΔCt cut-off value of 9 for tube 1, ARMS classified as strong positive mutation. C: BDA-Sanger sequencing result: *KRAS* gene exon 2 mutation, c.34 G>T, p.G12C.

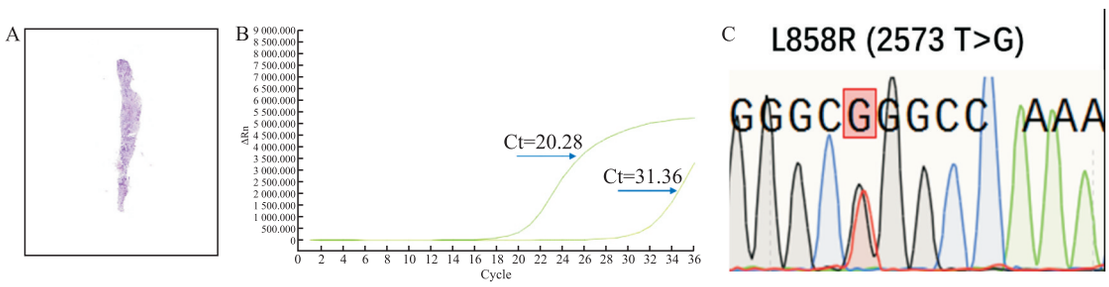


图5　验证场景②病例代表图

Fig. 5　Representative case of validation scenario

Scenario ②: Lung cancer biopsy sample, tumor percentage 10%, nucleic acid concentration 1.5 ng/μL. A: HE (H-E staining, ×1). B: ARMS amplification curves: FAM signal in tube 6 of lung cancer kit Ct=31.36 (weak positive range, 31≤Ct<34), external control tube 12 Ct=20.28, ΔCt=11.08, exceeding the ΔCt cut-off value of 11 for tube 6, ARMS classified as negative. C: BDA-Sanger sequencing result: *EGFR* gene exon 21 mutation, c.2573 T>G, p.L858R.

等位基因频率范围为0.55%~3.47%。本研究以BDA-Sanger法为参考标准计算的ARMS法阴性预测值（38.26%）进一步揭示了这一漏检风险在临界样本中的严重程度。本研究与上述文献的研究结论相互印证，ARMS法在常规临床检测中对典型阳性样本的检测性能优良，但当低质量样本处于临界区域时，其检测效能显著下降，需引入高灵敏度的补充检测手段。

本研究的质控分析表明，一方面ARMS法临界阳性组主要表现为肿瘤细胞占比过低（≤20%：54.9% *vs* 34.8%，*P*=0.004），可见野生型DNA背景稀释是造成ΔCt值偏移甚至超出Cut-off值的重要原因。Didelot等[14]检测FFPE样本时也观察到类似现象。尽管如此，此类样本的突变模板绝对拷贝数通常仍高于检测下限，样本的Ct值仍处于强阳性范围（图3中两种检测方法结果一致组Ct值显著更低），可见其突变丰度并不低，仅因背景干扰而造成ΔCt值偏移。因此对于“Ct值小于强阳性阈值但ΔCt值超出Cut-off值”的临界阳性样本，其判读结果相对稳健。另一方面，ARMS法临界阴性组主要表现为核酸浓度过低（≤30 ng/μL：54.8% *vs* 35.2%，*P*=0.005），可见模板绝对量不足才是导致ARMS法假阴性的关键因素，PCR扩增晚期靶标模板不足易诱发非特异性扩增与背景噪声，使微弱突变信号被掩盖，导致Ct值落入弱阳性区间。在真实临床实践中，晚期癌症患者多依赖穿刺获取微量组织，初次检测往往已耗尽标本；且对于低肿瘤纯度标本，盲目增加总DNA上样量反而会使野生型背景同比例剧增。因此，当面临此类ARMS法临界阴性结果时，引入具备野生型背景抑制能力的BDA技术作为补充检测策略，可为因样本质量不佳而濒临失去靶向治疗机会的患者重新争取分子诊断的可能性。

针对结直肠癌等病种，临床常探讨超敏感检测（等位基因频率<1%）的实际意义[15]。本研究需强调的是，BDA-Sanger法在临界病例中的应用价值，并非去挖掘缺乏临床干预意义的微小亚克隆，而是为了应对主克隆变异因样本劣质而产生的物理稀释效应。本研究证实，ARMS临界组与明确组在患者年龄、肿瘤类型及样本质控等基线特征上的差异并无统计学上的显著性意义，两者高度同质。这一宏观特征证实，被BDA技术从临界区域复核出的低频真阳性突变，本质上

是与典型阳性突变具有同等生物学驱动地位的主克隆变异，具有极其重要的靶向用药指导意义。通过本研究挽救的假阴性病例具有显著的临床转化价值，可望使处于临界区间的*EGFR*、*KRAS* G12C及其他少见突变患者重新获得奥希替尼或sotorasib等靶向治疗的机会[16]。

作为一项单中心回顾性研究，本研究存在一定局限性。首先，本研究仅连续纳入了ARMS检测的临界灰区样本，排除了扩增曲线典型的明确阳性与阴性病例。这一设计虽高度契合临床痛点，但导致本研究所报告的灵敏度及预测值仅适用于临界样本这一特定亚组，存在一定程度的偏倚。其次，限于回顾性分析本质，存在一定的选择与信息偏倚；且由于标本量极少，未能采用微滴式数字PCR进行严格的三方平行定量校验。经检索ClinicalTrials.gov等临床试验注册平台，目前专门针对分子病理临界样本复核策略的前瞻性注册研究极少。未来需要开展多中心、大样本的前瞻性真实世界研究，以进一步明确高灵敏度辅助诊断技术在疑难样本中的循证医学证据级别。

综上所述，在临床实体瘤常规检测中，ARMS法临界阳性判读高度可靠；而单纯依赖阈值判读临界阴性样本存在极高的漏诊风险。此类漏诊主要源于活检小标本或低核酸浓度的物理稀释效应。BDA-Sanger法利用其对野生型背景的强效抑制，实现了对低质量临界样本的精准检出。建议病理科医师在日常工作中，针对呈现ARMS法临界阴性的疑难病例，可常规引入BDA-Sanger法等具备高灵敏度的补充检测策略进行验证，最大程度地降低假阴性风险，从而为患者争取精准靶向治疗的宝贵机会。

第一作者：

张静（ORCID: 0000-0002-4796-5315），硕士，主管技师。

通信作者：

任敏（ORCID: 0000-0002-0019-5536），博士，主治医师，E-mail: mren21@m.fudan.edu.cn。

作者贡献声明：

张静：病例收集、实验操作、数据分析及文章撰写；张玲：实验操作；田田、孙慧：实验结果判读；柏乾明、许蜜蝶、周晓燕：研究设计、文章修改及经费支持；任敏：研究设计、文章修改。

［参 考 文 献］

［1］ Yaeger R, Uboha N V, Pelster M S, et al. Efficacy and safety of adagrasib plus cetuximab in patients with *KRAS*G^{12}C–mutated metastatic colorectal cancer［J］. Cancer Discov, 2024, 14(6): 982–993.

［2］ Zhou Q, Meng X J, Sun L H, et al. Efficacy and safety of *KRAS*G^{12}C inhibitor $IBI_3$51 monotherapy in patients with advanced NSCLC: results from a phase 2 pivotal study［J］. J Thorac Oncol, 2024, 19(12): 1630–1639.

［3］ Pietrantonio F, Salvatore L, Esaki T, et al. Overall survival analysis of the phase Ⅲ CodeBreaK 300 study of sotorasib plus panitumumab versus investigator's choice in chemorefractory *KRAS* G^{12}C colorectal cancer［J］. J Clin Oncol, 2025, 43(19): 2147–2154.

［4］ 杨野梵, 武莎斐, 李媛, 等. 2019—2020年中国病理科人员、设备、工作量的调研报告［J］. 中华病理学杂志, 2023, 52(9): 985–988.
Yang Y F, Wu S F, Li Y, et al. Investigation report on personnel, equipment and workload of pathology department in China from 2019 to 2020［J］. Chin J Pathol, 2023, 52(9): 985–988.

［5］ 柏乾明, 武莎斐, 吴焕文, 等. 中国分子病理发展现状基线调研(2022)［J］. 中华病理学杂志, 2024, 53(10): 1070–1077.
Bai Q M, Wu S F, Wu H W, et al. Baseline survey of molecular pathology development in China (2022)［J］. Chin J Pathol, 2024, 53(10): 1070–1077.

［6］ Jiang H Q, Chen X N, Huang F, et al. Validation of a highly sensitive Sanger sequencing in detecting *EGFR* mutations from circulating tumor DNA in patients with lung cancers［J］. Clin Chim Acta, 2022, 536: 98–103.

［7］ Akkhasutthikun P, Kaewsapsak P, Nimsamer P, et al. Tissue and plasma–based highly sensitive blocker displacement amplicon nanopore sequencing for *EGFR* mutations in lung cancer［J］. Cancer Res Treat, 2024, 56(2): 455–463.

［8］ Wu L R, Chen S X, Wu Y L, et al. Multiplexed enrichment of rare DNA variants via sequence–selective and temperature–robust amplification［J］. Nat Biomed Eng, 2017, 1: 714–723.

［9］ Wang Z, Weller C, Pinto A, et al. Highly sensitive blocker displacement amplification for detection of low–level JAK_2V617F variant［J］. J Appl Lab Med, 2023, 8(3): 479–490.

［10］ Liu H C, Li H, Xiao L S, et al. Biomarker and prognostic value of super–ARMS detection for *EGFR* mutation in advanced NSCLC［J］. Onco Targets Ther, 2025, 18: 789–801.

［11］ Lu P, Su X L, Leong S, et al. Analysis of colorectal cancer gene mutations and application of long blocker displacement amplification technology for high–throughput mutation detection［J］. Biosensors, 2025, 15(5): 308.

［12］ Somekawa K, Kobayashi N, Nagaoka S, et al. Rapid detection of non–small cell lung cancer driver mutations using droplet digital polymerase chain reaction analysis of bronchial washings: a prospective multicenter study［J］. Transl Lung Cancer Res, 2025, 14(2): 353–362.

［13］ 王祥, 陈其成, 宋琦, 等. ARMS法与NGS检测结直肠癌关键基因突变的一致性分析及临床应用探讨［J］. 诊断病理学杂志, 2026, 33(6): 839–844.
Wang X, Chen Q C, Song Q, et al. Concordance of ARMS and NGS for detecting key gene mutations in colorectal cancer and their clinical application［J］. Chin J Diagn Pathol, 2026, 33(6): 839–844.

［14］ Didelot A, Le Corre D, Luscan A, et al. Competitive allele specific TaqMan PCR for *KRAS*, *BRAF* and *EGFR* mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples［J］. Exp Mol Pathol, 2012, 92(3): 275–280.

［15］ Diaz L A Jr, Williams R T, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers［J］. Nature, 2012, 486(7404): 537–540.

［16］ Ramalingam S S, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, *EGFR*–mutated advanced NSCLC［J］. N Engl J Med, 2020, 382(1): 41–50.

（收稿日期：2026–05–25 修回日期：2026–08–04）

（责任编辑：王琳辉）