

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.026

## 基于连接酶-琼脂糖凝胶电泳的单核苷酸多态性快速检测方法\*

崔海忠<sup>1</sup>,肖娜<sup>2</sup>,张永平<sup>1</sup>,陈大贵<sup>1</sup>,唐一通<sup>2△</sup>,赵雪红<sup>2</sup>,邵金辉<sup>2</sup>

(湖北文理学院医学院:1. 枣阳临床学院肿瘤科,湖北枣阳 441200;2. 分子医学重点实验室,湖北襄阳 441053)

**[摘要]** **目的** 研究一种简便、快速、灵敏的单核苷酸多态性(SNP)分型方法,使其能够在简单实验条件下进行常规的临床检测。**方法** 基于连接酶-琼脂糖凝胶电泳技术,设计突变位点的检测探针,通过对检测探针的连接、纯化和通用扩增反应,根据琼脂糖凝胶电泳条带的出现情况判定检测位点的突变类型。以表皮生长因子受体(EGFR)基因的 3 个 SNP 突变位点 EGFR, c. 2573T>G(L858R), EGFR, c. 2582T>A(L861Q) 和 EGFR, c. 2155G>T(G719C) 为检测对象,分别对质粒模板和肺癌血浆循环 DNA 样本进行了检测。**结果** 建立方法操作简便,具有较高的特异性和灵敏度。经过 20~30 个循环的 PCR 扩增,能够根据扩增条带的有无清晰判断检测位点的基因型。在对不均一样本中混合等位基因检测时,能够最低检测出 2.5% 的突变型等位基因。本方法和直接测序法分别能够从 62 例肺癌样本检测出 6 例和 2 例 L858R 位点杂合子突变。**结论** SNP 突变检测方法适合于在简单实验条件下对不均一样本进行常规突变检测。

**[关键词]** 多态性;单核苷酸;突变;基因型;连接酶类;电泳;琼脂凝胶

**[中图分类号]** R394-33

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)10-1370-04

### A rapid detection method for single nucleotide polymorphisms based on ligase-agarose gel electrophoresis\*

Cui Haizhong<sup>1</sup>, Xiao Na<sup>2</sup>, Zhang Yongping<sup>1</sup>, Chen Dagui<sup>1</sup>, Tang Yitong<sup>2△</sup>, Zhao Xuehong<sup>2</sup>, Shao Jinhui<sup>2</sup>

(Medical College of Hubei University of Arts and Science: 1. Department of Oncology, Zaoyang Clinical College, Zaoyang, Hubei 441200, China; 2. Key Laboratory of Molecular Medicine, Xiangyang, Hubei 441053, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a simple, rapid and sensitive nucleotide polymorphisms genotyping method in order to conduct the routine clinical detections under the simple laboratory condition by this method. **Methods** Based on the ligase-agarose gel electrophoresis, the oligonucleotide detection probes of mutational sites was designed. The detection underwent the detection probe connecting, purification and universal amplification, finally the mutation genotypes of detection sites were judged by the appeared bands in the agarose gel electrophoresis (AGE). With the 3 SNP sites EGFR, c. 2573T>G(L858R), EGFR, c. 2582T>A(L861Q) and EGFR, c. 2155 G>T(G719C) in epidermal growth factor receptor(EGFR) gene as the detection objects, the plasmid template and plasma circulating DNA sample in lung cancer were performed the detection. **Results** The established method was easy to operate with higher specificity and sensitivity. After 20—30 cycles of PCR amplification, the genotype of detection sites was clearly estimated according to the amplification band. When detecting the mixed alleles in the heterogeneous sample, minimal 2.5% mutation alleles could be detected out. This method and the direct sequencing method could respectively detect 6 cases and 2 cases of heterozygotes mutation in the SNP site of L858R among 62 samples of lung cancer. **Conclusion** The established detection method for SNP genotyping is suitable to the routine mutation detection on the heterogeneous samples under the simple laboratory condition.

**[Key words]** polymorphism, single nucleotide; mutation; genotype; ligases; electrophoresis, agar gel

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是指 DNA 序列上发生的单个核苷酸碱基的变异,在人群中的分布率占 1% 以上。SNP 是人类基因组中最常见的变异形式,现有公共数据库中已经报道了超过 900 万个 SNP 位点。SNP 被认为是疾病易感性和药物反应的决定因素,开展 SNP 研究对医学、法医学、遗传学、临床诊断、药物开发与合理用药等的发展都具有非常重要的意义<sup>[1]</sup>。SNP 的基因分型检测工作,已成为当前国际上研究的热点。近年来,随着生物学实验技术的快速发展,SNP 检测方法和相关仪器的研发进展很快。目前,

有 20 余种 SNP 突变检测方法,如限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)<sup>[2]</sup>, PCR-SSCP<sup>[3]</sup>, DNA 测序,实时荧光定量 PCR(Real-Time PCR)<sup>[4]</sup>, TaqMan PCR<sup>[5]</sup>, 焦磷酸测序(Pyrosequencing)<sup>[6]</sup>, 质谱(Mass Spectrometry)<sup>[7]</sup>, 连接酶链反应(Ligase Detection Reaction)<sup>[8]</sup>, 基因芯片<sup>[9]</sup>, SNPstream 技术<sup>[10]</sup>, 分子灯塔技术<sup>[11]</sup> 等。其中 DNA 直接测序是传统的序列测定的方法,但是其检测灵敏度低,在对肿瘤组织、穿刺活检组织或体液等不均一样本进行 SNP 突变检测时具有较大局限性。虽然 Pyrosequencing、荧光定量 PCR、质谱等方法具有较

\* 基金项目:湖北省卫生计生科研基金(WJ2015MB266);湖北省教育厅资助项目(Q20132604);襄阳市科技局资助项目[襄科业(2012)43号];湖北省教育厅高校青年教师深入企业计划项目(2014)。 作者简介:崔海忠(1977—),主治医师,硕士研究生,主要从事肿瘤学研究。

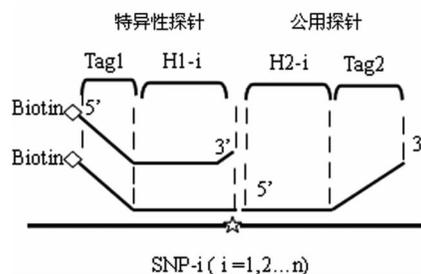
△ 通讯作者, Tel: 15897979532; E-mail: yitongtang@126.com。

高的灵敏度,但这些方法对实验条件、实验仪器设备具有很高的要求,在简单实验条件下的常规临床检测中很少能够应用。本研究建立了一种基于连接酶-凝胶电泳的简便、快速、灵敏的 SNP 突变检测方法,适合于在简单实验条件下对不均一样本进行常规突变检测。并对在非小细胞肺癌酪氨酸激酶抑制剂药物个体化治疗中的生物标记基因表皮生长因子受体(EGFR)为检测对象,对有较高突变频率的 EGFR, c. 2573T>G(L858R), EGFR, c. 2582T>A(L861Q) 和 EGFR, c. 2155 G>T(G719C) 3 个 SNP 位点进行了分型检测。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从枣阳临床学院肿瘤科 62 例非小细胞肺癌血浆样本中抽提循环 DNA, -20 °C 保存。(1)检测样本:携带有野生型和突变型等位基因的 EGFR, c. 2582T>A(L861Q), EGFR, c. 2573T>G(L858R) 和 EGFR, c. 2155 G>T(G719C) 3 个 SNP 突变位点的质粒 DNA 以黄杰等<sup>[12]</sup>定点突变技术进行构建。寡核苷酸探针:针对每个 SNP 位点,用 3 条寡核苷酸探针进行检测。分别为上游的两条特异性检测探针和下游的一条公用探针(图 1)。在两条特异性探针的 5' 端,为一段通用扩增引物序列 Tag1, 3' 端为与模板上突变位点一侧的序列互补的序列,并且 3' 末端碱基与突变位点碱基对应互补,野生型检测探针(WT-Probe)与野生型等位基因互补,突变型检测探针(MT-Probe)与突变型等位基因互补,在特异性探针的 5' 端分别进行生物素修饰。公用检测探针 5' 端为与 SNP 位点另一侧序列互补的序列, 3' 端为一段通用扩增引物序列 Tag2。对

EGFR, c. 2582T>A(L861Q), EGFR, c. 2573T>G(L858R) 和 EGFR, c. 2155 G>T(G719C) 3 个 SNP 位点进行检测的探针序列,见表 1。对检测探针进行通用扩增的 Tag1 序列和 Tag2 的互补序列(CTag2)分别为:Tag1:5'-TTT TTT TGG GTT CGT GGT AGA GCG TCG GAG T-3'; CTag2:5'-CCA GAC GAC ACC GAG ATA GCA GCC-3'。(2)实验试剂:Low MW DNA Marker-A 购自生工生物工程(上海)有限公司, 2×PCR Mastermix 购自天根生化科技北京有限公司,链亲和素(Streptavidin)磁珠购自西安金磁纳米生物技术有限公司, Taq DNA ligase 购自 New England BioLabs。TA 克隆试剂盒、TaKaRa Ex Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司产品。QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)购自上海叶舟生物科技有限公司。核酸序列均由上海生工生物有限公司合成。其余试剂均为分析纯。



H1、H2、Tag1、Tag2: 探针的不同组成部分。◇: 生物素标记。

图 1 检测探针设计示意图

表 1 寡核苷酸检测探针序列

SNP	特异性探针(5'-3')	公用探针(5'-3')
L858R	Biotin-TTTTTTTGGGTTTCGTGGTAGAGCGTCG-GAGTCAACCAGCAGTTTGGGCA Biotin-TTTTTTTGGGTTTCGTGGTAGAGCGTCG-GAGTCAACCAGCAGTTTGGGCC	p-GCCAAAATCTGTGATCTTGGGCTGC-TATCTCGGTGTCGTCTGG
L86Q	Biotin-TTTTTTTGGGTTTCGTGGTAGAGCGTCG-GAGTTCTCTCCGCACCCACCA Biotin-TTTTTTTGGGTTTCGTGGTAGAGCGTCG-GAGTTCTCTCCGCACCCACT	p-GTTTGGCCAGCCCAAAGGCTGCTATCTCG-GTGTCTCTGG
G719C	Biotin-TTTTTTTGGGTTTCGTGGTAGAGCGTCG-GAGTCGAACGCACCGACCC Biotin-TTTTTTTGGGTTTCGTGGTAGAGCGTCG-GAGTCGAACGCACCGACCA	p-CGACTTTGATCTTTTTGAATTGGCTGC-TATCTCGGTGTCGTCTGG

1.2 方法

1.2.1 EGFR 基因扩增 对基因外显子 18 和 21 进行 PCR 扩增,扩增引物为: exon 21-forward: 5'-GAG CTT CTT CCC ATG ATG ATC T-3'; exon 21-reverse: 5'-GAA AAT GCT GGC TGA CCT AAA G-3'; exon 18-forward: 5'-GAG GTG ACC CTT GTC TCT GTG T-3'; exon 18-reverse: 5'-CCC AAA CAC TCA GTG AAA CAA A-3'。扩增体系为: 3 μL 循环 DNA 样本, 0.5 μmol/L 扩增引物, 15 μL 2×Taq PCR Mastermix, 去离子水补足 30 μL。扩增条件为: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 35 个循

环; 72 °C 再延伸 4 min。各样本扩增产物用直接测序法测定突变类型。

1.2.2 连接反应 针对每个 SNP 位点,用两个检测管进行检测,并分别标记为 WT 管和 MT 管。两管分别加入 3 μL 10×连接反应缓冲液, 5 μL 模板序列和 1 U 的 Taq ligase,在 MT 管中加入 50 fmol 突变型特异性检测探针和公用检测探针, WT 管中加入 50 fmol 野生型特异性检测探针和公用检测探针,去离子水补足 30 μL。对于每个检测位点,设定一对对照管 CT,对照管中不加入模板序列,其它成分与检测管相同。反应条件为: 94 °C 变性 40 s, 60 °C 退火 5 min; 5 个循环; 95 °C 变性

5 min。

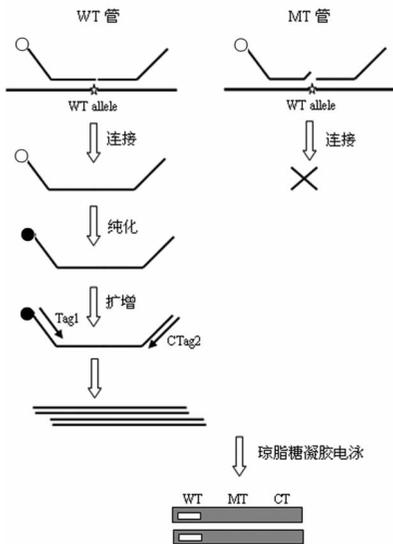
**1.2.3 纯化反应** 按照 Streptavidin 磁珠操作说明,对 各 SNP 位点对应各管扩增产物进行纯化。加入 20  $\mu\text{L}$  Tris-HCl (10 mmol/L, pH7.5) 重新悬浮磁粒。

**1.2.4 通用扩增反应** 取 15  $\mu\text{L}$  2 $\times$ PCR Mastermix, 5  $\mu\text{L}$  各管对应纯化磁性微粒, 2  $\mu\text{mol/L}$  的通用扩增引物 Tag1 和 CTag2, 去离子水补足 30  $\mu\text{L}$ 。95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 25 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s; 20 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 进行扩增反应。

**1.2.5 扩增产物检测** 分别取各 SNP 突变位点对应 MT 管、WT 管和 CT 管扩增产物 5 L 进行 3.5% 琼脂糖凝胶电泳, 根据 3 个反应管对应泳道在目标位置电泳条带出现的情况判定检测突变位点基因型。如果 WT 管和 MT 管对应泳道均出现条带, 则该 SNP 位点为野生/突变型; 如果只有 WT 管对应泳道出现条带, 则该 SNP 位点为纯合野生型; 如果只有 MT 管对应泳道出现条带, 则检测 SNP 为纯合突变型。

## 2 结 果

**2.1 检测方法流程** 通过连接反应, WT 管中野生型检测探针和公用探针能够完成连接, 而 MT 管中突变型检测探针和公用探针不能连接。经链亲和素磁性微粒的纯化反应, WT 管中完成连接反应的探针被纯化固定在链亲和素磁性微粒上。以 Tag1 和 CTag2 作为通用引物, 对 WT 管和 MT 管中磁性微粒纯化产物进行通用扩增反应, 最后在琼脂糖凝胶电泳水平对突变位点进行分型检测。通过观察 WT 管和 MT 管对应电泳泳道条带的出现情况进行结果判定。WT 管对应泳道出现条带, 而 MT 管对应泳道无条带, 说明检测 SNP 位点为野生纯合子基因型。野生纯合子 SNP 位点的检测示意图, 见图 2。



○: 表示生物素标记; ●: 表示链亲和素磁性微粒。

图 2 分型方法检测流程图

**2.2 连接温度的优化** 进行连接反应时, 退火温度是影响反应灵敏度及特异性的一个重要因素, 特异性会随着退火温度的升高而有所提高, 但是较高的退火温度也会使得退火效率降低从而影响检测的灵敏度。以 L858R 野生型质粒模板为检测对象, 分别在 55、60、65  $^{\circ}\text{C}$  的退火温度条件下, 经检测探针的连接, 纯化和 PCR 扩增, 扩增产物的凝胶电泳结果如图 3 所示,

在 55、60  $^{\circ}\text{C}$  两个温度梯度条件下, 均明显在 WT 管对应泳道出现扩增条带, 而其余泳道均无扩增条带出现; 但是当退火温度上升为 65  $^{\circ}\text{C}$  时, 3 个泳道均无扩增条带出现。说明检测探针在检测模板上的退火能力随着反应温度的升高而降低, 在 55~60  $^{\circ}\text{C}$  时能够有效的保证检测探针在检测模板上的退火从而完成连接反应。但是在 65  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 检测探针无法有效的退火到模板上, 使得连接反应不易完成, 从而无目的扩增条带的出现。因为在对检测探针设计时, 将所有检测探针上 H1、H2 序列的  $T_m$  值均设计为 58~60  $^{\circ}\text{C}$ , 所以为了即能够保证探针在模板上的有效退火, 又能够保证连接反应的特异性, 选定 60  $^{\circ}\text{C}$  作为连接反应的温度。

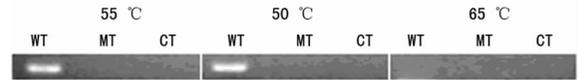


图 3 连接温度的优化

**2.3 特异性检测** 通过扩增反应中的循环次数对本方法的特异性进行检测, 分别对 L858R 野生/突变混合模板和 L861Q、G719C 两个野生型等位基因模板进行检测。分别作 20 和 30 个循环的扩增, 将各管 5  $\mu\text{L}$  扩增产物做 3.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 4 所示。两种循环条件下, 在 L858R 位点的 MT 管和 WT 管对应泳道中均出现明显扩增条带, 而 G719C 和 L861Q 两个位点对应的 WT 管泳道出现扩增条带, MT 泳道均未有带出现。同时, 3 个位点对应 CT 管泳道均未出现条带。说明此方法具有较高的检测特异性和扩增容量。

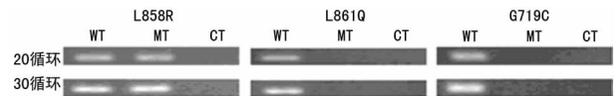


图 4 分型方法特异性检测

**2.4 敏感性检测** 以 L858R 位点为检测对象, 分别设定突变等位基因在总检测模板中的比例为 50.00%、25.00%、5.00%、2.50%, 对不同比例的混合等位基因进行检测。结果如图 5 所示, 各条件下, 在 MT 和 WT 管对应的泳道中均有扩增条带出现, 且随着突变型等位基因所占比例的减少, MT 管对应泳道中扩增条带亮度逐渐减弱, 但当突变等位基因在混合等位基因中比例低至 2.50% 时, 仍能够在 MT 管对应泳道中检测出扩增条带, 说明本方法有着较高的检测灵敏度, 适合于从不均一的样本中对突变等位基因进行检测。

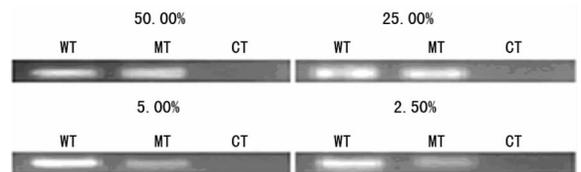


图 5 L858R 位点琼脂糖凝胶电泳水平敏感度检测

**2.5 样本检测** 利用本方法对 62 例样本中 EGFR, c. 2573 T>G (L858R), EGFR, c. 2582 T>A (L861Q) 和 EGFR, c. 2155 G>T (G719C) 3 个 SNP 位点进行了检测, 并与直接测序结果进行了比较。两种方法未检测到 L861Q 和 G719C 位点的突变, 但均检测到 L858R 位点有杂合子突变。如图 6 所示, 通过直接测序方法仅可以明确检测出 8# 和 15# 两例样本是

L858R 位点杂合子突变, 23# 样本出现类似杂峰的突变碱基对应峰, 故无法给出明确的基因型判断。而通过连接酶-琼脂糖凝胶电泳方法共检测出 8#, 15#, 23#, 6#, 11#, 14# 共 6

例样本是 L858R 杂合子突变(图 7)。结果证明, 连接酶-琼脂糖凝胶电泳方法比直接测序方法具有更高的灵敏度, 适合于对不均一样本或杂合子突变位点的检测。

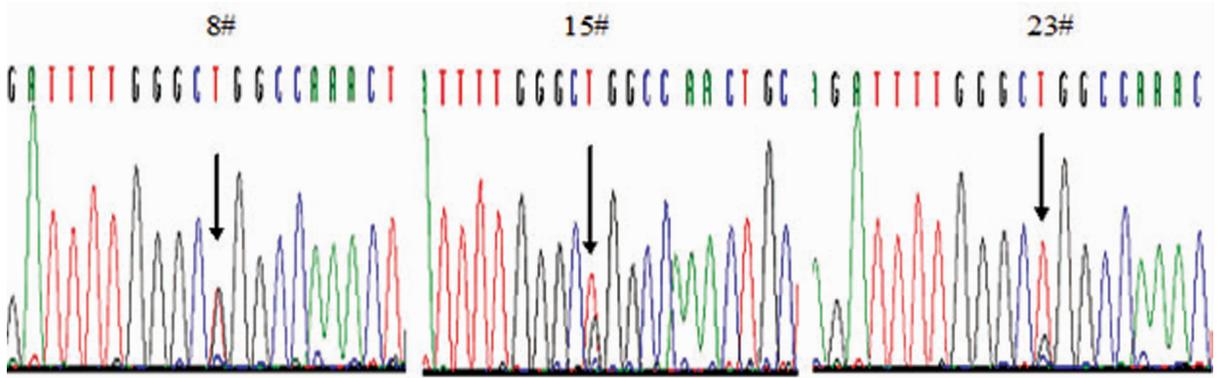


图 6 循环 DNA 样本 EGFR, c. 2573T>G(L858R) 位点突变测序图

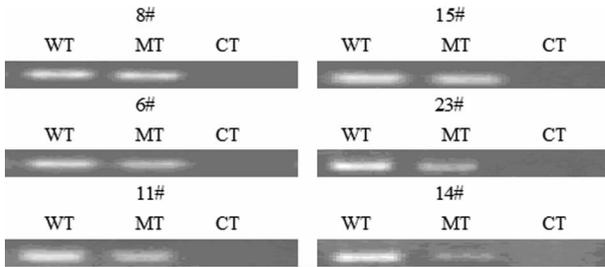


图 7 样本 EGFR, c. 2573T>G(L858R) 位点突变检测图

### 3 讨论

随着人类生物信息学资源的爆炸性积累, 极大地推动了 SNP 突变检测技术的发展。但是, SNP 突变检测技术在检测成本、灵敏性和常规性等方面仍需要进行改进。如传统的 DNA 直接测序方法的灵敏度只有 20%<sup>[13-14]</sup>, 检测位点突变等位基因对应测定峰线很低, 无法明确从背景峰中分离(图 6), 因此, 不能够从不均一样本中对突变等位基因进行检测。虽然实时定量 PCR、焦磷酸测序, 以及质谱等检测方法的灵敏度较高, 文献报道称可达到 1%<sup>[14-15]</sup>, 但是这些检测方法都要求具备昂贵的检测设备和实验试剂, 因而不能够在常规实验条件下进行突变检测, 限制了其在基层医疗或研究机构的应用。

本研究建立的 SNP 突变检测方法基于连接酶反应原理, 通过检测探针的连接反应, 链亲和素磁性微粒对连接探针的纯化反应以及通用扩增引物的扩增反应, 利用琼脂糖凝胶电泳方法进行 SNP 突变位点的分型检测。本方法具有较高的检测灵敏度, 能够从野生/突变位点所在混合质粒模板中检测出低至 2.50% 的突变型等位基因, 因此, 适合于从不均一样本中对突变等位基因进行检测。而且, 与其他检测方法如荧光定量 PCR, 质谱, DNA 直接测序等方法相比, 本方法操作简单, 不需要借助昂贵的实验仪器设备, 只需普通 PCR 仪、凝胶电泳等简单实验条件即能完成, 同时, 所需探针长度均小于 50 bp, 合成成本低, 没有对荧光探针等昂贵试剂及高质量检测样本的要求, 具有较低的成本和易操作性, 因此, 更适用于在常规、简单实验条件下的突变检测。

本方法较高的检测特异性通过以下条件保证: (1) 在设计检测探针时, 除了依靠特异性检测探针 3' 端碱基与突变碱基

的配对识别能力外, 还在其 3' 端上游第 3 个碱基处引入 1 个错配碱基以增强探针的识别能力; (2) 特异性检测探针和公用探针的 H1 和 H2 序列的 T<sub>m</sub> 值与通用扩增引物 Tag1 和 Tag2 序列的 T<sub>m</sub> 值相差 7~8 度, 以减少连接反应和后续的扩增反应之间的影响; (3) 高保真性 Taq DNA 连接酶对错配碱基的识别作用。本方法同时具有较高检测灵敏度, 其是通过在探针序列上设计通用扩增引物序列 Tag1 和 Tag2, 完成连接反应后, 进行了连接产物的二次扩增以极大增加连接产物的数量, 从而能够在琼脂糖凝胶电泳水平进行快速检测。但琼脂糖凝胶电泳的检测灵敏度具有局限性, 因此, 当突变等位基因在不均一样本总的比例低至 2.50% 时, 就不能够得以检测。同时, 在检测通量上也有限制, 不适合于进行高通量的突变检测。

综上所述, 本研究建立了一种基于连接酶-凝胶电泳的 SNP 分型新方法, 并对与酪氨酸激酶抑制剂个体化用药密切相关的 EGFR 基因的 3 个常见 SNP 位点 EGFR, c. 2582T>A (L861Q), EGFR, c. 2573T>G (L858R) 和 EGFR, c. 2155 G>T (G719C) 进行了检测。该方法操作简便, 有较高的检测特异性和灵敏度, 适合于在一般实验条件下对不均一样本进行常规突变检测。

### 参考文献

- [1] Kathryn MM. Factors influencing warfarin dose requirements in African-Americans[J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(11):1535-1545.
- [2] 张博, 陈洁平. microRNA 相关基因 rs895819、rs6505162 和 rs2292832 的 SNP 变异与 B 细胞淋巴瘤患者生存关系的研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(16):1801-1803.
- [3] 王春侠, 林加娟, 刘宣宣, 等. 海门山羊 MDFI 基因 SNP 及其与体尺性状的关联分析[J]. *生物技术通报*, 2013 (9):99-104.
- [4] 王倩, 罗凯. 一种 EGFR 基因突变检测方法的建立及初步应用[J]. *重庆医学*, 2014, 43(11):1351-1356.
- [5] 黄小英, 王超, 黄炳臣, 等. XRCC4 与 XPC 编码区突变与肝细胞癌的关联性研究[J]. *上海交通大(下转第 1377 页)*

明确要求具体抗凝剂,作者查阅资料也未见相关的研究与报道,与厂家沟通,其也未曾做过相关的研究。为此,本研究对这 3 种不同抗凝剂进行了比较试验。选取结果中具有临床应用价值的常用指标(HbA1c%)进行比较,结果显示,3 种抗凝管所测得 HbA1c %结果差异无统计学意义( $P>0.05$ ),表明酶法测定 HbA1c 时,3 种抗凝剂均可以作为标本常规抗凝剂。

综上所述,酶法测定 HbA1c 其精密度、抗干扰性、准确性、线性范围均符合临床要求,与常规方法比较相关性良好且偏差较小,可完全满足临床对 HbA1c 检测需求,但在标本前处理过程中要注意标本离心速度不能过低。

#### 参考文献

- [1] 包玉倩,贾伟平.糖化血红蛋白在诊断糖尿病中的意义[J].中华内分泌代谢杂志,2011,27(5):367-370.
- [2] 俞春芳,葛军,李静怡,等.糖化血红蛋白和空腹血糖用于早期筛查糖尿病的意义[J].中华内分泌代谢杂志,2011,27(5):390-392.
- [3] 李娅,宋宇,段勇.糖化血红蛋白检测的局限性[J].中华检验医学杂志,2012,35(6):501-504.
- [4] 田慧,李春霖,方福生,等.糖化血红蛋白诊断糖尿病切点的横断面研究[J].中华内分泌代谢杂志,2011,27(5):375-380.
- [5] 郑华,马芳玲,邹效漫.高效液相色谱法检测不同真空采血管糖化血红蛋白的结果比较[J].军医进修学院学报,2011,32(2):151-152.
- [6] 宁光.HbA1c:临床应用中的几个问题[J].中华内分泌代谢杂志,2011,27(5):365-366.
- [7] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:58-61.
- [8] 陈同庆,马连星,孙倩,等.酶法测定 HbA1c 浓度的临床应用[J].中国糖尿病杂志,2010,18(8):611-613.

- [9] 李琦,尚晓泓,胡晓菊,等.全血标本存放时间及温度对糖化血红蛋白的影响[J].国际检验医学杂志,2008,29(10):927-928.
- [10] Little RR,Rohlfing CL,Tennill AL,et al.Effects of sample storage conditions on glycated hemoglobin measurement:evaluation of five different high performance liquid chromatography methods[J].Diabetes Technol Ther,2011,9(1):36-42.
- [11] Jones W,Scott J,Leary S,et al.Stability of whole blood at 70 degrees C for measurement of hemoglobin A (1c) in healthy individuals[J].Clin Chem,2004,50(12):2460-2461.
- [12] 潘玥,何泳,史亚明.全血标本的贮存条件对糖化血红蛋白测定结果的影响[J].中国全科医学,2010,13(9):2988-2990.
- [13] 武永霞,宋倩,王小玉.离心时间对糖化血红蛋白检测的影响[J].西部医学,2010,22(7):1274-1275.
- [14] 宋秀国,袁福江.标本的处理方法对糖化血红蛋白测定结果的影响[J].临床和实验医学杂志,2012,11(15):1219-1220.
- [15] 史晓丹,蔡淑敏.不同的采血时间不同的抗凝剂对糖化血红蛋白测定的影响[J].中国社区医师,2011(1):129.
- [16] 李济凯,赵莹,徐根云.不同抗凝剂对糖化血红蛋白测定结果的影响[J].实验与检验医学,2011,28(3):288,295.
- [17] 邱蕴文,张曙晴,邱谷.糖化血红蛋白测定分析前影响因素探讨[J].国际检验医学杂志,2012,33(9):1110-1111.
- [18] 杨燕,邢文晓,李贵连,等.浅议糖化血红蛋白测定的影响因素[J].国际检验医学杂志,2012,33(5):629-630.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-12-10)

(上接第 1373 页)

- 学学报:医学版,2013,33(8):1085-1088.
- [6] 王丹慧,蔡彦宁,张燕莉,等.异柠檬酸脱氢酶 D 基因突变焦磷酸测序检测方法的建立[J].首都医科大学学报,2014,35(2):219-224.
- [7] Mauger F,Gelfand DH,Gupta A,et al.High-specificity single-tube multiplex genotyping using Ribo-PAP PCR, tag primers,alkali cleavage of RNA/DNA chimeras and MALDI-TOF MS[J].Hum Mutat,2013,34(1):266-273.
- [8] Pingle M,Rundell M,Das S,et al.PCR/LDR/universal array platforms for the diagnosis of infectious disease[J].Methods Mol Biol,2010,632(1):141-157.
- [9] 马芬,吴凤霞,李宁,等.应用 Affymetrix 全基因组芯片检测染色体 7q36 区域的 DNA 拷贝数突变[J].中华医学遗传学杂志,2009,26(3):336-339.
- [10] 费丽娟,季林丹,张莉娜,等.SNPstream 基因分型技术在医学遗传学研究中的应用[J].中华医学遗传学杂志,2012,29(1):9-12.
- [11] 刘小琦.采用 SNaPshot 方法对中国老年黄斑变性与 C2

和 C3 基因单核苷酸多态性进行相关性研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(3):285-287.

- [12] 黄杰,曲守方,徐任,等.人类 EGFR 基因突变体质控品的建立[J].药物分析杂志,2011,31(9):1758-1763.
- [13] Garcia CA,Ahmadian A,Gharizadeh B,et al.Mutation detection by pyrosequencing:sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene[J].Gene,2000,253(2):249-257.
- [14] Dufort S,Richard MJ,de Fraipont F.Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues[J].Anal Biochem,2009,391(2):166-168.
- [15] Jarry A,Masson D,Cassagnau E,et al.Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E[J].Mol Cell Probes,2004,18(5):349-352.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-10)