

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.027

酶法测定糖化血红蛋白的方法评价及标本前处理对结果的影响*

陈同庆¹, 周 春², 陈文清³, 李振兴¹, 罗 兵¹, 唐 倩¹, 张文明⁴

(安徽省第二人民医院:1. 输血科;2. 心内科;3. 检验科;4. 内分泌科, 安徽合肥 230011)

[摘要] **目的** 探讨酶法测定糖化血红蛋白(HbA1c)方法学性能及其影响因素。**方法** 采用酶法测定 HbA1c, 评价该方法学的精密性、抗干扰性、回收率、准确性以及标本前处理(抗凝、保存、离心)对结果的影响, 分析与高效液相法(HPLC)相关性及其偏倚程度。**结果** 酶法批内高、中、低值变异系数(CV)为 1.04%、1.26%、1.37%, 批间为 1.83%、2.24%、2.64%, 与 HPLC 法呈线性相关($r=0.996, P<0.01$); HbA1c 靶值浓度为 5.20%、6.40%、7.60%、8.80%、10.00%、11.20%, 其回收率分别为 100.15%、98.91%、98.84%、98.20%、103.62%、99.82%; 当葡萄糖小于 15.50 mmol/L、尿酸小于 516.00 $\mu\text{mol/L}$ 、胆红素小于 217.00 $\mu\text{mol/L}$ 、三酰甘油小于 10.20 mmol/L、尿素小于 11.50 mmol/L、清蛋白小于 50 g/L、球蛋白小于 50 g/L 时, 对结果无明显干扰。肝素钠、乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)、枸橼酸钠抗凝标本 HbA1c 结果在 -20~20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 3 d 无明显改变($P>0.05$); 标本 500、1 000 r/min($R=15$ cm)离心不同时间(1、2、5、10 min)以及 2 000 r/min 离心 1 min, 其检测结果与 3 000 r/min 离心 5 min 比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 酶法测定 HbA1c 其精密性、抗干扰性、准确性、线性范围均符合临床要求, 与常规方法相比其相关性良好且偏差较小, 可完全满足临床对 HbA1c 检测需求。

[关键词] 酶法; 血红蛋白 A, 糖基化; 方法学; 性能评价

[中图分类号] R446.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)10-1374-04

Methodological evaluation on enzymatic method for detecting HbA1c and influence of sample pre-processing on detection result*

Chen Tongqing¹, Zhou Chun², Chen Wenqing³, Li Zhenxing¹, Luo Bing¹, Tang Qian¹, Zhang Wenming⁴

(1. Department of Blood Transfusion; 2. Department of Cardiology; 3. Department of Clinical Laboratory; 4. Department of Endocrinology, Anhui Provincial Second People's Hospital, Hefei, Anhui 230011, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the methodological performance of the new enzymatic method for detecting glycosylated hemoglobin(HbA1c) and its influencing factors. **Methods** HbA1c was detected by the enzymatic method. The precision, anti-interference, recovery rate, accuracy and the influence of pre-processing(anti-coagulation, preservation, centrifugation) on the detection results were evaluated, its correlation with HPLC and the bias degree were analyzed. **Results** The within-run coefficients of variation (CVs) for high, middle and low value QC samples in the enzymatic assay were 1.04%, 1.26% and 1.37% respectively and the between-run CVs were 1.83%, 2.24% and 2.64%, respectively; the enzymatic method showed the linear correlation with HPLC($r=0.996, P<0.01$); the HbA1c target value concentrations were 5.20%, 6.40%, 7.60%, 8.80%, 10.00% and 11.20% respectively, the recovery rates were 100.15%, 98.91%, 98.84%, 98.20%, 103.62% and 99.82% respectively; the interference test showed that this method had no significant interference on the detection results when glucose <15.50 mmol/L, UA <516.00 $\mu\text{mol/L}$, bilirubin <217.00 $\mu\text{mol/L}$, triglyceride <10.20 mmol/L, urea <11.50 mmol/L, albumin <50 g/L and globulin <50 g/L. The HbA1c detection results in the samples with anti-coagulation by heparin sodium, EDTA-2K and sodium citrate stored for 3 d under -20~-20 $^{\circ}\text{C}$ had no obvious change ($P>0.05$); the sample was centrifuged at 500, 1 000 r/min($R=15$ cm) for different time(1, 2, 5, 10 min) and at 2 000 r/min for 1 min, their detection results had statistical differences compared with the sample centrifuged=3 000 r/min for 5 min ($P<0.05$). **Conclusion** The precision, anti-interference, accuracy and linearity range of the enzymatic method all conform to the clinical requirement. Compared with the conventional method, its correlation is good with small deviation, which can entirely satisfy the demand of the HbA1c detection in clinic.

[Key words] enzymatic method; hemoglobin A, glycosylated; methodology; performance evaluation

糖化血红蛋白(HbA1c)是血红蛋白两条 B 链的 N 端缬氨酸与葡萄糖非酶化结合而成, 其水平不受血糖水平暂时波动的影响, 可反映 8~12 周血糖的平均水平, 是判定糖尿病长期控制的良好指标。2002 年美国糖尿病协会明确将 HbA1c 作为糖尿病血糖控制的金标准^[1-2]。临床上测定 HbA1c 方法有几十种, 目前常用的基本上可分为两大类: 一类是基于 HbA1c 与

血红蛋白(Hb)的电荷不同如离子交换层析法、电泳法; 另一类是基于 Hb 上糖化基团的结构特点, 如亲和层析法、免疫法、离子捕捉法^[3-4]。其中高效液相色谱法(HPLC)被列为 HbA1c 测定的参考方法, 被认为是金标准, 但需要昂贵的仪器设备。酶法是近年来新推出的一种新方法, 该方法不需要特殊的仪器, 可在生化仪上完成检测, 具有简便、快速、重复性好、成本

* 基金项目: 安徽省高校省级自然科学基金资助项目(KJ2013z157); 安徽省立新安医院自然科学基金资助项目(KJ2010Y02)。 作者简介: 陈同庆(1973—), 在读博士研究生, 主要从事临床医学检验工作。

低、收费低廉等优点,有着更好的应用前景^[5-6]。但关于该方法的方法学性能及其影响因素目前还少有报道。本文就该方法学的精密度、线性范围、干扰因素、准确性、相关性、标本抗凝保存及离心等影响因素进行探讨,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取在本院门诊或住院就诊的糖尿病患者 52 例,和非糖尿病患者 57 例,留取静脉血液标本,根据试验需要,进行不同的前处理,备用。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 美国伯乐 Bio-Rad Variant II 型全自动 HbA1c 分析仪及原装配套试剂(批号 AA31331)及质控物(AA63665)。日立 7600 型全自动生化分析仪(日本,日立公司产品);酶法试剂盒:日本积水 Norudia HbA1c 试剂。试剂主要成分:(1)试剂 1(批号 801RDK),N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-二甲氨基二苯胺化钠。(2)试剂 2(批号 801RDK),过氧化物酶,果糖基氨基酸氧化酶。(3)标准品(批号 918RDK)的浓度①,610mg/dl(Hb)、14.1mg/dl(HbA1c);浓度②,901mg/dl(Hb)、75mg/dl(HbA1c)。(4)HbA1c 定值质控靶值(批号为 918RDK),高值(8.80±0.43)%、中值(6.30±0.37)%、低值(4.50±0.29)%。

1.2.2 仪器状态确认 按照要求对仪器进行日常维护,严格按照试剂盒说明书及厂家的规定进行 Norudia HbA1c 的参数设置,使用配套的标准液进行定标,并检测配套的质控品,确认准确性和精密度均符合要求后,对不同前处理的标本或质控物进行检测。

1.2.3 精密度实验 取高、中、低值质控物分别测定 20 次,然后每天测定 1 次,连续测定 20 d,分别得出批内及批间变异系数(CV),按照全国临床检验操作规程临床化学质量控制允许偏差范围,HbA1c 的允许误差限值为 T±15%,批内 CV 均小于 1/4 允许误差限值(3.75%),批间 CV 均小于 1/3 允许误差限值(5.00%)^[7]。

1.2.4 线性试验 将 HbA1c 水平(酶法测定结果)为 5.20%(低值)和 11.20%(高值)的标本按线性递增的比例关系稀释。高值:低值从 0:5、1:4、2:3、3:2、4:1、5:0 的比例充分混合后,每个混合标本检测 3 次,计算其平均值,与理论靶值相比较得出回收率。

1.2.5 干扰试验 在 HbA1c 水平为 5.96%(酶法检测结果)的标本中分别添加不同终浓度葡萄糖(3.71、6.11、15.50 mmol/L)、尿酸(89、416、516 μmol/L)、胆红素(5.10、19、217 μmol/L)、三酰甘油(1.01、1.70、10.20 mmol/L)、尿素(1.81、7.12、11.50 mmol/L)、清蛋白(20、40、50 g/L)和球蛋白(25、35、50 g/L)。充分混匀后,重复检测 3 次,将 3 次检测均值与靶值(5.96%)进行比较,计算偏差。

1.2.6 相关性实验 分别用酶法、HPLC 测定 109 份全血标本的 HbA1c% 水平,分析两种方法的差别及其相关性。

1.2.7 标本储存温度和时间 将同一份标本分成几等份,分别在 0、-20、20℃ 储存 0、1、2、12、24、36、72 h 后上机检测,共试验 20 份标本,以 20℃ 储存 0 时(即时)为对照组,其他为观察组,比较每组与对照组间的差异。

1.2.8 离心力及离心时间 将标本分别以 500、1 000、2 000、3 000 r/min 离心(R=15 cm)1、2、5、10 min,共试验 20 份标本,以 3 000 r/min 离心 5 min 组为对照组(试剂盒说明书要求的离心速度和时间),其他为观察组,比较各观察组与对照组间

的差异。

1.2.9 抗凝剂 同一份标本,分别用肝素钠、EDTA-2K、枸橼酸钠商品化抗凝试管抗凝,共 20 份标本,统计 3 种抗凝管之间的差异。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS10.0 统计分析软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对的 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组批内和批间精密度比较 批内和批间精密度均小于 3%,见表 1。

表 1 酶化学法测定质控 HbA1c 批内及批间变异结果(n=20,%)

组别	\bar{x}	<i>s</i>	<i>cv</i>	95%CI
批内低值组	4.56	0.06	1.37	4.44~4.68
批内中值组	6.32	0.08	1.26	6.16~6.48
批内高值组	8.69	0.09	1.04	8.51~8.87
批间低值组	4.92	0.13	2.64	4.66~5.18
批间中值组	6.38	0.14	2.24	6.11~6.66
批间高值组	8.73	0.16	1.83	8.41~9.05

2.2 线性试验 6 个浓度 HbA1c 平均回收率为 99.92%。回归方程 $Y=1.0255X-0.2039(r=0.997,P<0.01)$ 。不同浓度 HbA1c 回收率及偏差检测结果,见表 2。

表 2 不同浓度(混合比)HbA1c 回收率及偏差检测结果比较

项目	0:5	1:4	2:3	3:2	4:1	5:0
靶值(%)	5.20	6.40	7.60	8.80	10.00	11.20
测定均值(%)	5.21	6.33	7.51	8.64	10.36	11.18
回收率(%)	100.15	98.91	98.84	98.20	103.62	99.82
绝对偏差	0.01	-0.07	-0.09	-0.16	0.36	-0.02

2.3 干扰试验 加入不同浓度干扰物后 HbA1c 检测值无明显变化,偏差为 -1.23%~1.45%,平均 0.18%。

2.4 相关性实验 HPLC 及酶法结果分别为 (6.93±1.72)%、(6.89±1.85)%,作两种方法配对 *t* 检验,差异无统计学意义($P>0.05,n=109$);回归方程 $Y=1.064X-0.4856(r=0.996,P<0.01)$,二者相关性良好,偏差为 -7.23~7.45%。

表 3 不同温度储存不同时间 HbA1c 检测结果比较($\bar{x} \pm s,n=20,%$)

时间	-20℃	0℃	20℃
0 h	6.79±2.25	6.84±2.23	6.81±2.32
1 h	6.75±2.26	6.86±2.28	6.82±2.32
2 h	6.81±2.23	6.89±2.24	6.85±2.29
12 h	6.82±2.27	6.82±2.32	6.77±2.30
24 h	6.90±2.33	6.78±2.22	6.84±2.35
36 h	6.82±2.36	6.84±2.24	6.88±2.36
72 h	6.84±2.27	6.79±2.35	6.84±2.33

2.5 不同储存温度和时间比较 不同温度储存不同时间,各组结果差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.6 不同离心力离心时间比较 离心速度过低,其 HbA1c 检测结果偏低。标本 500、1 000 r/min 离心不同时间(1、2、5、10 min)以及 2 000 r/min 离心 1 min,其检测结果与 3 000 r/min 离心 5 min 比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 标本离心不同速度、时间 HbA1c 检测结果比较($\bar{x}\pm s, n=20, \%$)

离心速度(r/min)	1 min	2 min	5 min	10 min
500	6.27±1.78 ^a	6.38±1.87 ^a	6.28±1.79 ^a	6.25±1.8 ^a
1 000	6.24±1.82 ^a	6.40±1.88 ^a	6.54±1.85 ^b	6.50±1.78 ^b
2 000	6.58±2.02 ^b	6.90±1.97	6.93±1.99	7.02±1.94
3 000	7.04±1.99	7.05±2.09	7.02±2.05	7.05±2.08

^a: $P<0.01$,^b: $P<0.05$,与 3 000 r/min 离心 5 min 比较。

2.7 不同抗凝剂比较 3 种抗凝剂保存 72 h 在各组 HbA1c%检测结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 5。

表 5 不同抗凝剂保存不同时间标本 HbA1c 结果比较($\bar{x}\pm s, n=20, \%$)

抗凝剂	即时	24 h	48 h	72 h
EDTA-2K	6.19±1.14	6.16±1.15	6.21±1.12	6.17±1.10
枸橼酸钠	6.26±1.19	6.18±1.11	6.25±1.22	6.17±1.17
肝素钠	6.22±1.24	6.22±1.12	6.21±1.11	6.23±1.17

3 讨 论

HbA1c 检测的方法有很多种,不同检验设备和检测方法其测定结果的准确度、精密性往往存在一定差异或偏倚,按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)文件要求的批内、批间 CV<5%,本次酶法批内及批间均 CV<3%,精密性较高且符合 NCCLS 的要求,也完全符合临床要求。根据美国临床化学协会(AACC)的 HbA1c 标准化分会和国际生物化学与分子生物学联盟的 HbA1c 标准化工作组建议,以 HPLC 方法作为检测 HbA1c 的金标准,希望以此使大多数的实验方法能够参照“指定的方法”实现标准化。本研究选取 109 份临床标本,结果显示与 HPLC 法相关良好($r=0.996, P<0.01$),相关性结果表明酶法与目前临床上测定 HbA1c 金标准方法(HPLC)高度相关;进一步比较和分析,通过对两种方法作配对 t 检验,结果显示差异无统计学意义($P>0.05$),因此,本研究认为酶法检测结果与 HPLC 基本相当。但本结果显示,与 HPLC 还是存在偏差(-7.25%~7.45%),109 例标本酶法平均低于 HPLC 1%,这种偏差可能是随机误差造成的,也可能是方法差异造成,具体原因还有待于进一步研究。

酶法的反应原理是,首先利用反应液中蛋白分解酶的催化分解 HbA1c 的 β 链生成糖化甘氨酸谷氨酰胺,根据分解前后吸光度的差异计算出 Hb 水平;然后向反应液中加入果糖基氨基酸氧化酶(FPOX),糖化甘氨酸谷氨酰胺生产红色的 N-(羧甲基氨基)-4,4'-二甲氨基二苯胺化钠(显色剂),通过反应前后吸光度的差异计算出 HbA1c 水平^[8]。在本次干扰试验中,结果显示在加入浓度小于 15.5 mmol/L 葡萄糖、516 μ mol/L

L 尿酸、217 mol/L 胆红素、10.20 mmol/L 三酰甘油、11.50 mol/L 尿素、50 g/L 清蛋白、50 g/L 球蛋白的干扰物质后, HbA1c 检测结果的偏差均小于 1.50%,偏差效应小于本试验的变异系数(2.64%),偏差小于系统变异系数,这说明上述物质可能对检测结果无干扰。在回收试验中,本次样本 HbA1c 水平为 5.20%~11.20%,其回收率最低 98.20%,最高 103.62%,平均回收率 99.92%。回收率试验及干扰试验结果表明该方法具有较高的准确性和特异性,且完全能够满足临床的检测需要。

有较多的前处理因素对 HbA1c 检测有影响,全血标本的质量直接影响到检验结果的准确性及可靠性。全血标本质量包括标本抗凝与保存以及离心力与离心时间等,前处理日常工作中也往往是被忽视的问题,如何规范前处理操作规程,也是成为该领域当前的关注热点。有文献报道,应用 HPLC 法,发现在 -20 °C 低温冰箱冷冻保存的全血标本 HbA1c%从第 1 天就开始发生变化,分析认为这是由于 Hb 结果降低所致,第 10 天变化更为显著,在 4~8 °C 冰箱冷藏保存的全血标本 HbA1c 在 10 d 内均保持稳定^[9];有报道显示,采用 HPLC 检测 HbA1c%,标本贮存时间、温度影响 HbA1c 检测结果,随着标本贮存时间延长,测定结果会逐渐升高^[10-11]。然后,不同检测方法得出的结论也不同,与其他方法相比,离子交换色谱法和硼酸盐亲和色谱法在任何温度下稳定性都较好,可在 -70 °C 低温冻干条件下保存 1 年,检测结果不受标本储存时间的影响^[12-13];在 4 °C 时,全血样本可保存 7 d,在室温条件下,全血样本稳定性较差,只能保存数天;在 37 °C 条件下,未经任何处理的全血样本稳定性最差,无论何种检测方法,样本有效保存时间均小于 1 d^[14-16]。目前关于酶法其标本保存温度与时间的相关要求尚少见报道,本次酶法研究结果显示 -20、0、20 °C 保存 3 d, HbA1c 结果无显著性改变,因此,本研究认为酶法检测时其全血标本在 -20~20 °C 可以保存 3 d。关于离心速度和时间方面,试剂盒说明书要求 3 000 r/min 离心 5 min,在日常工作中发现,往往存在离心不规范现象,比如离心速度过低或者时间过短,离心是否会对结果产生影响,目前尚少见文献报道,本研究主要是人为设计不同的离心速度离心不同的时间,观察结果的变化(以 3 000 r/min 离心 5 min 为对照)。本研究结果显示,当离心速度低于 1 000 r/min($R=15$ cm)、 ≤ 2 000 r/min 离心 1 min,其检测结果偏低($P<0.05$),当离心速度大于或等于 2 000 r/min 离心 2 min($R=15$ cm),与试剂说明书要求 3 000 r/min($R=15$ cm)离心 5 min 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),据此可以认为酶法检测其标本离心速度应该大于或等于 2 000 r/min 且不低于 1 min;离心速度过低会导致其检测结果偏低,这可能是由于血细胞层含有血浆成分干扰酶法检测结果。当然不同的方法,其对标本的离心力要求也可能是有差别的。有文献报道采用免疫比浊法,结果显示 3 000 r/min 离心 1 min 会使结果偏低,而离心 2、3、4 min 检测的结果之间无显著性差异^[13-17],这与本研究结果基本一致。在标本抗凝方面,应用 HPLC 法,临床上常以 EDTA-K2 抗凝管作为测定 HbA1c 的标准用管^[15];有文献报道采用 EDTA-K2 抗凝管、枸橼酸钠抗凝管、肝素锂抗凝管对 HbA1c 检测结果无影响,但肝素锂抗凝的全血检测结果略有偏高,大约比 EDTA-K2 和枸橼酸钠抗凝标本高 0.50 左右^[15-18]。而酶法厂家并未

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 glycosylated 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)