

基于级联核酸侵入反应的 real-time PCR 法检测咽拭子样本中 *UGT1A1**6 基因多态性

张婕妤, 初亚男, 邹秉杰, 张晏洁, 封利颖

南京总医院药理科, 南京 210002

摘要: 伊立替康(irinotecan)不良反应与 *UGT1A1**6 单核苷酸多态性相关, 目前应用的单核苷酸多态性检测方法具有耗时长、开盖易污染、操作繁琐等缺点, 因此需建立一种操作简便且不易污染的适合临床应用的新方法。本研究利用 3 种已知基因型的 DNA 样本建立基于级联核酸侵入反应的 real-time PCR 法检测 *UGT1A1**6 多态性的最佳反应体系, 并对其检测口腔咽拭子样本的灵敏度和准确性进行了考察。结果显示, 本文成功建立了基于级联核酸侵入反应的 *UGT1A1**6 基因多态性检测方法, 可用于咽拭子样本的分型检测, 其灵敏度达到 6 ng DNA, 分型准确性达到 100%。因其取样方便对人体无创, 单管闭管检测不易产生交叉污染, 具有用于临床检测伊立替康的个体化用药相关 *UGT1A1**6 基因多态性的潜力。

关键词: 核酸侵入反应; *UGT1A1**6; 基因多态性; 伊立替康

Detection of *UGT1A1**6 single nucleotide polymorphism in oral swab samples using the cascade invader assay-based real-time PCR

Jieyu Zhang, Yanan Chu, Bingjie Zou, Yanjie Zhang, Liying Feng

Department of Pharmacology, Nanjing General Hospital, Nanjing 210002, China

Abstract: The adverse reaction to irinotecan is related to the single nucleotide polymorphism (SNP) of *UGT1A1**6 genotype. The current SNP detection methods have various disadvantages, including time-consuming procedures, high-risk cross-contamination, and cumbersome operation. Hence, it is necessary to establish a new method suitable for clinical application, which is easy and simple to detect SNP with minimal risk for cross-contamination. In this study, a cascade invader assay-based real-time PCR, for *UGT1A1**6 genotyping has been established by optimizing reaction conditions with DNA samples of three genotypes. The sensitivity and accuracy of the method were evaluated with DNAs derived from oral swab samples. The results showed that the method could detect the *UGT1A1**6 genotypes from the oral swab samples with

收稿日期: 2018-03-26; 修回日期: 2018-05-17

基金项目: 南京总医院院管课题(编号: 2015043, 2015042)和国家自然科学基金项目(编号: 81703474)资助[Supported by Nanjing General Hospital Fund

(Nos. 2015043, 2015042) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81703474)]

作者简介: 张婕妤, 硕士研究生, 药师, 研究方向: 药物基因组学。E-mail: zjy881021@126.com

通讯作者: 封利颖, 硕士研究生, 药师, 研究方向: 药物基因组学。E-mail: flying870831@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.18-074

网络出版时间: 2018/7/26 18:46:03

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180726.1845.002.html>

a detection limit of 6 ng genomic DNA with 100% accuracy. Due to its convenient and non-invasive sampling, single close-tube operation, and minimal risk for cross-contamination, the method has the potential in clinical application for individualized detection of drug-related *UGT1A1*6* polymorphism and reaction to irinotecan.

Keywords: invader assay; *UGT1A1*6*; polymorphism; irinotecan

伊立替康(irinotecan)是一种 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂, 作为抗肿瘤药在结直肠癌、肺癌、胃癌等实体瘤的化疗中发挥重要作用, 但其导致腹泻和中性粒细胞减少不良反应的发生率高达 20%~35%^[1]。大量研究表明, 在亚洲人群中其不良反应的发生与 *UGT1A1*6* 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)相关^[2, 3], 因此, 在用药前检测 *UGT1A1*6* 基因型是一种预防伊立替康不良反应发生的有效途径。

目前, 临床用于 SNP 检测的方法主要有等位基因特异性 PCR^[4]、焦磷酸测序^[5]、基于 TaqMan 探针的 real-time PCR 法^[6]等。其中, 等位基因特异性 PCR 和基于 TaqMan 探针的 real-time PCR 法可实现闭管检测, 不易产生交叉污染, 但为达到高特异性检测, 引物或探针需要精心设计, 反应条件较难优化^[7, 8]。焦磷酸测序法是 SNP 检测的金标准, 但其操作繁琐、开盖检测易污染、仪器设备较昂贵^[9]。级联核酸侵入反应(invader assay)因其特异性高、反应条件易优化而非常适用于 SNP 检测。该反应通过结构特异性内切酶 flap 核酸内切酶 1 (flap endonucleases 1, FEN1)识别由侵入探针、检测探针和靶序列互补形成的三碱基重叠结构, 并切除检测探针的 5' flap 片段, 该片段可作为侵入探针与荧光共振转移(fluorescence resonance energy transfer probe, FRET)发卡探针参与新一轮的核酸侵入反应, 生成放大的荧光信号^[10]。该反应对探针与靶标形成的三碱基重叠的侵入结构具有很强的识别特异性。因此, 在对 SNP 进行分型检测时, 可将待测 SNP 位点置于三碱基重叠结构中, 每种基因型对应不同的 flap 片段与不同荧光标记的 FRET 探针, 通过双通道荧光信号检测可在单管中判断 SNP 的类型。虽然该方法由于灵敏度和特异性高, 已被开发成为商品试剂盒广泛用于 SNP 检测, 但现有基于级联核酸侵入反应的 SNP 检测大都会在 PCR 扩增结束后利用级联核酸侵入反应检测扩增产物中

的单碱基序列差异, 造成反应时间长, 并且易产生非特异信号干扰结果判断^[11]。

本研究以 *UGT1A1*6* 为检测对象, 将级联核酸侵入反应与 PCR 扩增循环相偶联, 在每个 PCR 循环中进行一段时间的级联核酸侵入反应放大扩增产物中的位点特异性信号, 产生类似于荧光定量 PCR 的扩增曲线, 通过两种荧光通道产生的扩增曲线判断 *UGT1A1*6* 的基因型, 缩短了检测时间, 避免了终点法产生的非特异性背景信号对结果的干扰。此外, 为避免抽取患者血液进行基因检测, 本研究将建立的 *UGT1A1*6* 基因分型方法与口腔咽拭子 DNA 提取试剂盒结合, 成功建立了通过咽拭子采样的 *UGT1A1*6* 基因分型检测方法, 从一定程度上简化了检测流程, 提高了患者顺应性。

1 材料和方法

1.1 样本采集

采用咽拭子擦拭患者口腔内壁的 10 次, 用于基因组 DNA 提取。

1.2 基因组 DNA 提取

采用北京天根生物科技有限公司的口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒提取样本中的 DNA。使用 One Drop 分光光度计(南京伍义科技有限公司)进行 DNA 的质量评估和浓度测定, 合格的标本存放在-20 待测。

1.3 基于级联核酸侵入反应的 real-time PCR 反应条件

反应体系包括反应缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl (南京 Biosky 公司)、0.05% (V/V) NP-40 (南京 Sunshine 公司)、0.05% (V/V) Tween-20 (美国 Bios

公司)、12 $\mu\text{g/mL}$ BSA(美国 Amresco 公司)、50 mmol/L KCl(北京国药集团)、7.5 mmol/L MgCl_2 (北京国药集团), pH 8.5], dNTPs(上海百思凯公司) 250 $\mu\text{mol/L}$, PCR 正反向引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 侵入探针 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 野生型检测探针 0.125 $\mu\text{mol/L}$, 突变型检测探针 1 $\mu\text{mol/L}$, 野生型(携带 VIC 荧光基团)、突变型(携带 FAM 荧光基团)荧光共振转移发卡探针各 0.25 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶 1 U(美国 Promega 公司), FEN 酶 1.5 U(本实验室自表达), 基因组 DNA 1.5 μL , 用 H_2O 补充到 20 μL 。反应程序: 95 3 min; 95 20 s, 67 60 s, 70 30 s, 预扩增 10 个循环; 95 20 s, 63 60 s, 采集荧光信号, 70 30 s, 扩增 35 个循环。使用 Universal Invader™ 软件设计核酸侵入反应的引物和探针(表 1), 所有引物和探针由上海 Invitrogen 公司合成。反应在德国 QIAGEN 公司的 Rotor-Gene Q 实时荧光定量 PCR 仪上进行。结果判读时, 将空白对照最后一个循环信号值的平均值+3SD 作为阈值线, 超过阈值线即为检出。

1.4 焦磷酸测序

PCR 扩增反应采用大连 TaKaRa 公司的 Taq™ (含 Mg^{2+} 溶液), 反应条件: 94 5 min; 94 30 s, 55 30 s, 72 30 s, 扩增 35 个循环; 72 7 min, 使用杭州朗基生产的基因扩增仪进行扩增。扩增产物用 Qiagen 公司的 PyroMark Q24 进行单链制备和焦测序。PCR 扩增与焦磷酸测序引物序列见表 2。

2 结果与分析

2.1 基于级联核酸侵入反应的 real-time PCR 法检测 SNP 的原理

检测原理如图 1 所示。针对待测 *UGT1A1**6 位点设计侵入探针与检测探针, 使它们与待测靶标杂交后, 侵入探针的 3'端有 1 个碱基侵入到检测探针和待测靶标形成的双链中, 形成三碱基重叠结构, flap 核酸内切酶 1 (FEN1)可特异地识别该结构, 并将检测探针 5'flap 片段切下来; 由于反应温度与检测探针的 T_m 值接近, 被切割的检测探针会与靶标分离, 完整的检测探针会再次与靶标退火形成切割循环, 产生扩增的 flap 片段, 该片段可在体系中与 FRET 探针再次杂交形成三碱基重叠结构, 形成切割循环, 产生放大的荧光信号。将待测位点设计在三碱基重叠结构中, 当检测探针与 SNP 位点不匹配时, 将无法形成三碱基重叠结构, 不发生切割反应; 而当 SNP 位点的碱基与检测探针匹配时, 将形成侵入结构, 引发切割反应, 产生对应的荧光信号(突变型为 FAM 信号, 野生型为 VIC 信号)。待测靶标在 PCR 扩增的同时会在每个循环发生级联核酸侵入反应产生荧光信号, 最终形成类似于实时荧光 PCR 的扩增曲线, 通过两种荧光信号曲线即可判断基因型。

2.2 检测探针用量的优化

在级联核酸侵入反应中, 影响检测特异性的最

表 1 基于级联核酸侵入反应的 real-time PCR 检测 *UGT1A1**6 基因型的扩增引物和探针序列

Table 1 Sequences of amplification primers and probes detecting *UGT1A1**6 genotype using cascade invader assay-based real-time PCR

引物名称	序列(5'→3')
突变型荧光发卡探针 FRET-1	FAM-TCTT(BHQ1)AGCCGGTTTCCGGCTAAGACTCCGCGTCCGT-C6-NH ₂
野生型荧光发卡探针 FRET-2	VIC-TCTT(BHQ1)AGCCGGTTTCCGGCTAAGACCTCGGCGCG-C6-NH ₂
PCR 正向引物	TGTCCTGCACCTGACGCCT
PCR 反向引物	ACATCCTCCCTTTGGAATGGCACA
侵入探针	GTACGTCTTCAAGGTGTAATGCTCA
野生型检测探针	CGCGCCGAGGCGTCTCTGATGTACAACG-PO ₃
突变型检测探针	ACGGACGCGGAGTGTCTCTGATGTACAACG-PO ₃

下划线标记部分检测探针序列与模板不互补; 斜体标记部分为修饰的荧光基团(FAM 和 VIC)和淬灭基团(BHQ1)。

表 2 焦测序检测 *UGT1A1**6 基因型的扩增引物和测序引物序列

Table 2 Sequences of amplification and sequencing primers for detection *UGT1A1**6 genotype using pyrosequencing

引物名称	序列(5'→3')
正向生物素修饰扩增引物	Biotin-CAGCAGAGGGGACATGAAATAG
反向扩增引物	CCTCCCTTTGGAATGGCAC
测序引物	GTCTCAAGGTGTAAATGCTC

大因素为检测探针的浓度，浓度过高会造成非特异性信号，浓度过低会造成信号过低而影响曲线抬起时间，因此需要优化反应体系中野生型和突变型的

检测探针。选取 *UGT1A1**6 位点野生型(*1*1 型)、杂合型(*1*6 型)和突变型(*6*6 型)的基因组 DNA 作为待测模板，浓度在 10~50 ng/μL $A_{260/280}$ 在 1.8~2.0，分型结果由焦磷酸测序确证，分别采用不同浓度的野生型和突变型检测探针进行检测。前期预实验结果发现，野生型探针会在突变型模板检测时产生较高的背景信号，而突变型探针在野生型模板检测时基本无背景信号，因此，选取低浓度野生型探针与高突变浓度型探针组合来优化探针浓度，结果如图 2 所示。理论上，杂合样本中野生型模板与突变型模板应该等量，两种信号应该一起出现抬起。当野生型探针浓度为 0.05 μmol/L 而突变型探针为

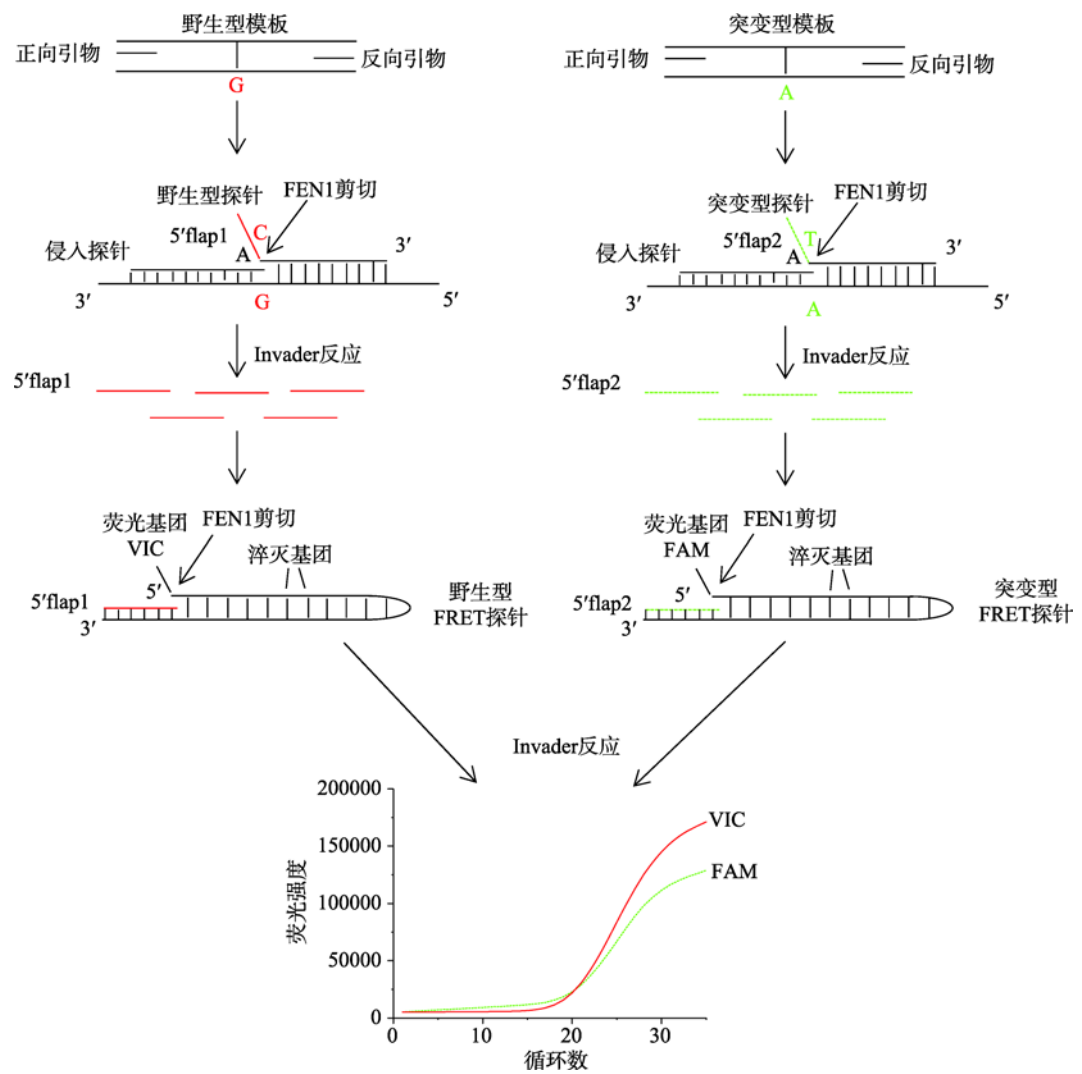


图 1 基于级联核酸侵入反应的实时荧光 PCR 检测 SNP 的原理

Fig. 1 Schematic illustration of SNP detection using real-time PCR-based cascade invader assay

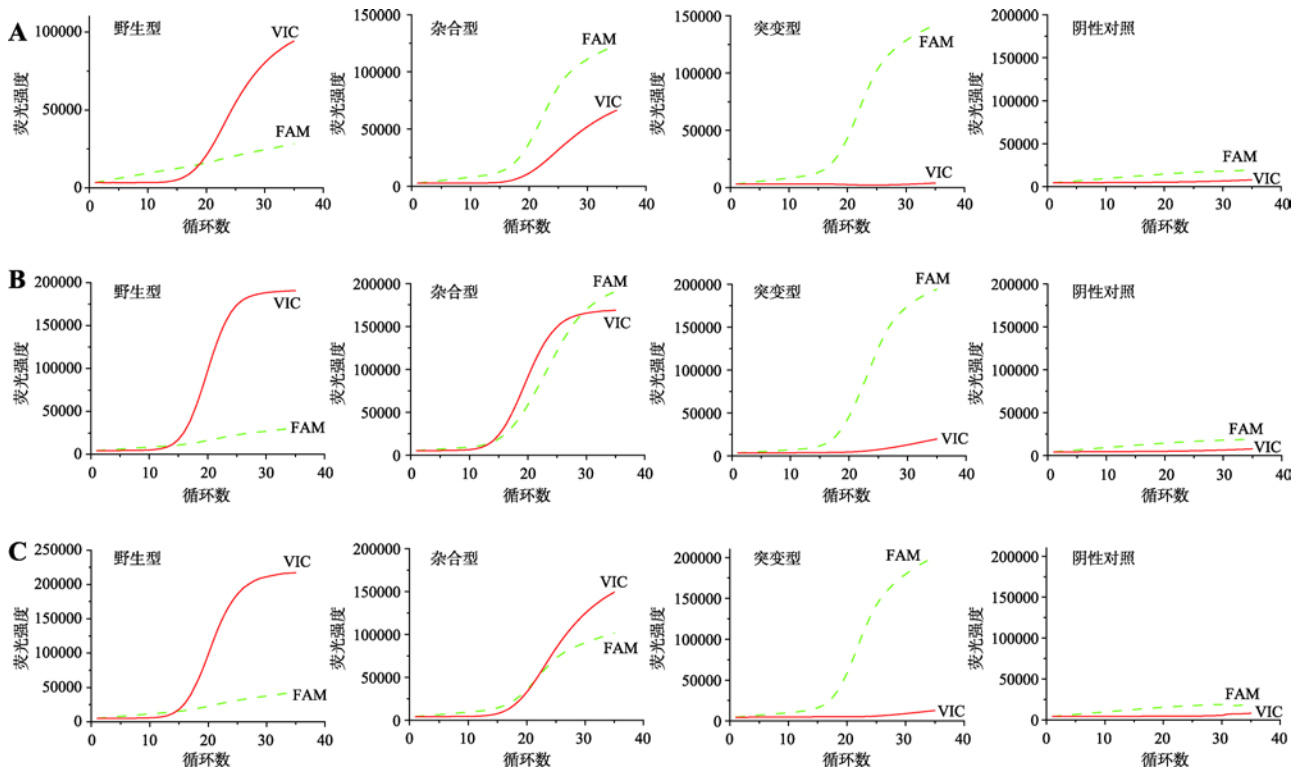


图 2 不同检测探针浓度对 3 种 *UGT1A1**6 基因型样本的检测结果

Fig. 2 Detection results of three genotypes of *UGT1A1**6 in different amounts of detection probes

A: 野生型探针浓度为 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 突变型探针浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$; B: 野生型探针浓度为 0.125 $\mu\text{mol/L}$, 突变型探针浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$;

C: 野生型探针浓度为 0.125 $\mu\text{mol/L}$, 突变型探针浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 。

1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 杂合型模板中突变型信号(FAM)早于野生型信号(VIC)抬起(图 2A), 表明野生型探针浓度偏低; 增加野生型探针浓度到 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 后, 野生型与突变型信号抬起时间基本相同, 符合预期(图 2B); 当增加突变型探针浓度到 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 突变型信号抬起早于野生型信号(图 2C), 各浓度探针在检测纯野生或纯突变型模板时均能得到预期分型结果, 因此, 选择 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 野生型探针浓度与 1 $\mu\text{mol/L}$ 突变型探针浓度作为最佳反应条件。

2.3 检测口腔咽拭子 DNA 样本与血液 DNA 样本的灵敏度比较

从口腔内壁细胞中提取基因组 DNA 可减少对受检者的损伤, 比取静脉血的应性更好。但从咽拭子中提取的 DNA 可能因浓度低、存在影响扩增检测的成分等原因而干扰检测结果, 因此, 需比较所建立方法对咽拭子样本中提取的 DNA 与从血液中提取的 DNA 的检测灵敏度是否存在差异。选取*1*6

型咽拭子样本及血液提取的 DNA 各 1 例, 用蒸馏水梯度稀释成 10 ng/ μL 、2 ng/ μL 、0.4 ng/ μL 、0.08 ng/ μL 和 0 ng/ μL , 每个反应加入 1.5 μL DNA 样本进行检测, 每个浓度进行 3 次重复, 结果如图 3 和图 4 所示。结果表明, 不论对血液 DNA 样本还是咽拭子 DNA 样本, 该方法均可检测低至 0.6 ng 的基因组 DNA, 咽拭子 DNA 可以替代血液 DNA 作为本研究建立方法的待测样本。

2.4 方法对口腔咽拭子样本检测的准确性评价

为验证所建立的方法检测口腔咽拭子样本 *UGT1A1**6 基因型的准确性, 收集 28 例门诊患者口腔咽拭子样本并提取了 DNA, 提取的 DNA 浓度范围在 15~160 ng/ μL , $A_{260/280}$ 均在 1.8~2.0。利用本研究建立的方法和焦磷酸测序法对收集的样本进行了检测, 比较两种方法的分型检测结果。采用本研究建立的方法检测出 *UGT1A1**1*1 型样本 16 例, *1*6 型样本 11 例, *6*6 型样本 1 例, 该结果与焦磷酸测

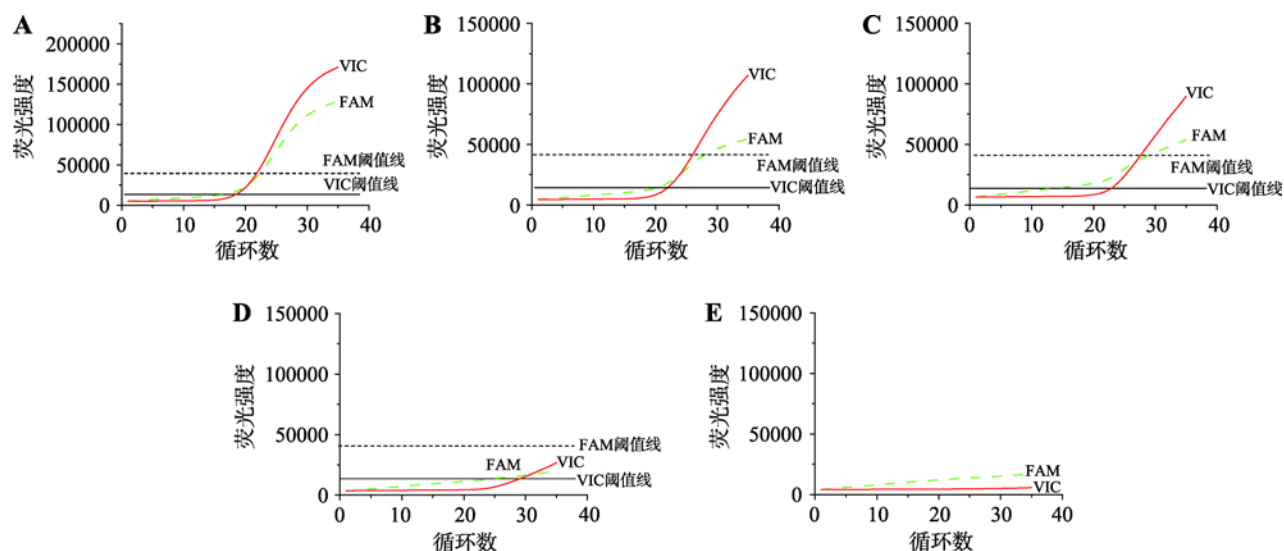


图 3 不同浓度*1*6型咽拭子基因组 DNA 的检测结果

Fig. 3 Detection results of different concentrations of *1*6 type genomic DNA extracted from oral swab

A: 15 ng 基因组 DNA; B: 3 ng 基因组 DNA; C: 0.6 ng 基因组 DNA; D: 0.12 ng 基因组 DNA; E: 空白对照。

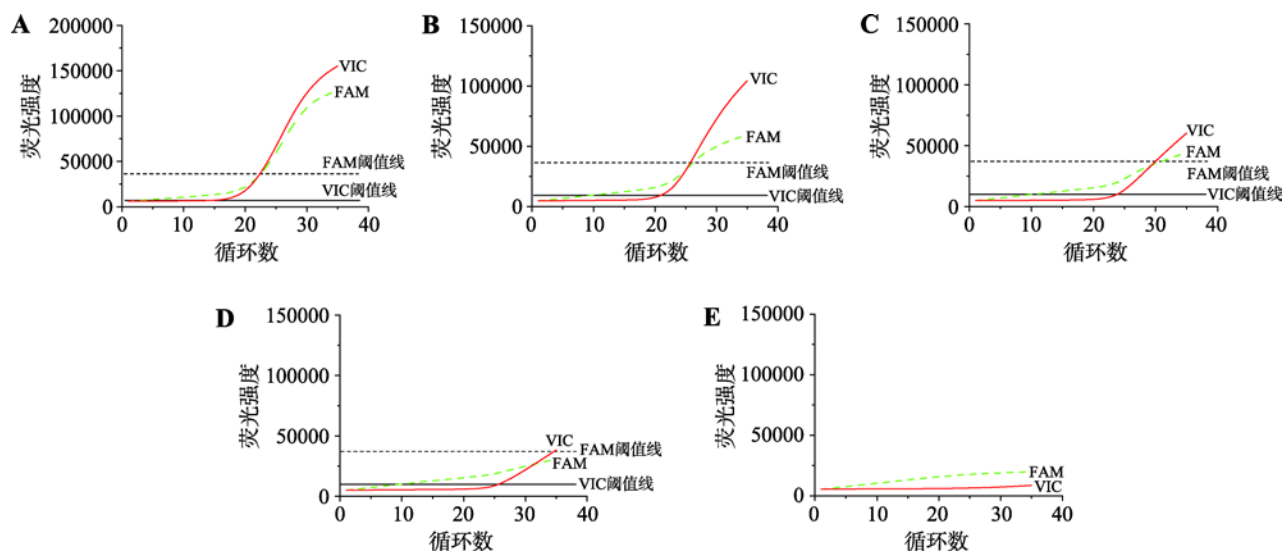


图 4 不同浓度*1*6型血液基因组 DNA 的检测结果

Fig. 4 Detection results of different concentrations of *1*6 type genomic DNA extracted from blood

A: 15 ng 基因组 DNA; B: 3 ng 基因组 DNA; C: 0.6 ng 基因组 DNA; D: 0.12 ng 基因组 DNA; E: 空白对照。

序法所得到的结果完全一致, 因此, 方法的准确性为 100%, 具有用于临床检测 *UGT1A1**6 基因多态性的潜力。

3 讨论

伊立替康为半合成水溶性喜树碱, 通过引起肿瘤细胞的死亡发挥抗肿瘤作用, 广泛应用于多种实

体瘤治疗。然而它能引起严重的不良反应包括迟发性腹泻和中性粒细胞减少, 单独使用伊立替康时致死率能达到 5.3%^[12]。伊立替康转化成活性更强的 SN-38 而产生对肿瘤细胞的毒性, SN-38 经肝脏中尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶(uridine diphosphate glucuronosyl transferase, UGT)灭活, 生成葡萄糖醛酸产物 SN-38G, SN-38G 在肠道菌群的作用下又转变成对肠道黏膜有损伤和引起迟发性腹泻的 SN-38,

SN-38 可再经肠道中的 UGT 灭活, 因此 UGT 的活性与伊立替康的不良反应息息相关^[13]。药物代谢酶的基因多态性是造成个体疗效和毒性反应差异的主要因素之一, UGT 的基因多态性影响 SN-38 和 SN-38G 之间的相互转化, *UGT1A1**6 在亚洲人群具有较高的分布频率, 其基因多态性与伊立替康的不良反应相关^[2,3,13]。因此, 准确检测 *UGT1A1**6 基因型可有效指导伊立替康的合理使用。

基因分型检测方法很多, 如焦磷酸测序法^[5]、等位基因特异性 PCR 法^[4]、基于 *TaqMan* 探针的实时荧光 PCR 法^[6]等。然而这些方法存在开管操作易污染、特异性不够高、探针设计复杂等问题^[14, 15]。虽然 *TaqMan* 探针法也是一种闭管可避免污染的操作方法, 但本研究建立的基于级联核酸侵入反应的实时荧光 PCR 检测方法, 依赖 flap 核酸内切酶识别侵入结构的高特异性, 采用通用的 FRET 探针作为荧光报告探针, 可以用于其他 SNP 位点分型检测, 避免反复设计, 重复合成, 降低成本。该方法成功实现了对咽拭子样本中 *UGT1A1**6 的分型检测, 并且利用咽拭子样本避免了有创的静脉采血, 有效提高了患者的依从性; 对 28 例临床样本的检测方法与焦磷酸测序结果完全一致, 表明方法具有很高的准确性。因此, 该方法为临床进行 *UGT1A1**6 检测来指导伊立替康的合理用药提供了一种有力工具。

参考文献(References):

- [1] Federico I, Samir DU, Lalitha I, Chen PX, Soma D, Masha K, Theodore K, Linda J, Jacqueline R, Charles MR, Everett EV, Mark JR. Genetic variants in the UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol*, 2004, 22(8): 1382–1388. [DOI]
- [2] Cheng L, Li M, Hu J, Ren W, Xie L, Sun ZP, Liu BR, Xu GX, Dong XL, Qian XP. *UGT1A1**6 polymorphisms are correlated with irinotecan-induced toxicity: A system review and meta-analysis in Asians. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 73(3): 551–560. [DOI]
- [3] Naminatsu T, Yousuke N, Hiroyuki I, Takashi S, Yumiko S, Daiya T, Tsuyoshi H, Rie U, Suguru M, Koji M, Dai M, Kazumichi K, Hirofumi K, Natsuyo Y, Naoki S, Kenji H, Hideaki I, Minoru T, Yutaka Y, Kazuhiko K. Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1 family polypeptide A1 gene (*UGT1A1*) polymorphisms are associated with toxicity and efficacy in irinotecan monotherapy for refractory pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(1): 85–92. [DOI]
- [4] Nie YC, Zhang C, Liu YN, Huang JP, Jiao HT, Wu D, Zhou HG. AS-PCR assay for 20 mtDNA SNP typing and haplotype frequency. *Journal of Forensic Medicine*, 2014, 30(2): 96–100, 109. 聂燕钗, 张晨, 刘亚楠, 黄江平, 焦海涛, 吴丹, 周怀谷. AS-PCR 技术检测 20 个 mtDNA SNP 位点及单倍型频率. 法医学杂志, 2014, 30(2): 96–100, 109. [DOI]
- [5] Olsson LM, Johansson ÅC, Gullstrand B, Jönsen A, Saevarsdottir S, Rönnblom L, Leonard D, Wetterö J, Sjöwall C, Svenungsson E, Gunnarsson I, Bengtsson AA, Holmdahl R1.. A single nucleotide polymorphism in the *NCF1* gene leading to reduced oxidative burst is associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(9): 1607–1613. [DOI]
- [6] Tayel SI, Fouda EAM, Elshayeb EI, Eldakamawy ARA, El-Kousy SM.. Biochemical and molecular study on interleukin-1 β gene expression and relation of single nucleotide polymorphism in promoter region with type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem*, 2018, doi: 10.1002/jcb.26667. [Epub ahead of print] [DOI]
- [7] Hwang MT, Landon PB, Lee J, Choi D, Mo AH, Glinsky G, Lal R.. Highly specific SNP detection using 2D graphene electronics and DNA strand displacement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(26): 7088–7093. [DOI]
- [8] Dhas DB, Ashmi AH, Bhat BV, Parija SC, Banupriya N.. Modified low cost SNP genotyping technique using cycle threshold (Ct) & melting temperature (Tm) values in allele specific real-time PCR. *Indian J Med Res*, 2015, 142(5): 555–562. [DOI]
- [9] Zheng ML, Qi XM, Tong H, Liu YL, Zou BJ, Song QX, Zhou GH. Detection of single nucleotide polymorphism by real-time polymerase chain reaction coupled with high specific invader assay in single tube. *Chin J Anal Chem*, 2015, 43(7): 1001–1008. 郑梦琳, 齐谢敏, 童欢, 刘云龙, 邹秉杰, 宋沁馨, 周国华. 实时荧光聚合酶链式反应偶联高特异性核酸侵入反应检测单核苷酸多态性. 分析化学, 2015, 43(7): 1001–1008. [DOI]
- [10] Nakahara H, Sekiguchi K, Hosono N, Kubo M, Takahashi

- A, Nakamura Y, Kasai K.. Criterion values for multiplex SNP genotyping by the invader assay. *Forensic Sci Int Genet*, 2010, 4(2): 130–136. [DOI]
- [11] Liu YL, Zou BJ, Wu HP, Chu YN, Zhou GH. Specificity improvement of invader assay by introducing an artificially mismatched base into the probe. *Anal Methods*, 2015, 7(23): 9779–9784. [DOI]
- [12] Fuchs CS, Moore MR, Harker G, Villa L, Rinaldi D, Hecht JR.. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21(5): 807–814. [DOI]
- [13] Li M, Wang Z, Guo J, Liu J, Li C, Liu L, Shi H, Liu L, Li H, Xie C, Zhang X, Sun W, Fang S, Bi X. Clinical significance of *UGT1A1* gene polymorphisms on irinotecan-based regimens as the treatment in metastatic colorectal cancer. *Onco Targets Ther*, 2014, 7: 1653–1661. [DOI]
- [14] Liu XQ, Zhu SH, Zou BJ, Ma YJ, Zhou GH. Development of 3-enzyme pyrosequencing system and its application in rapid diagnosis of Down's syndrome. *Hereditas (Beijing)*, 2010, 32(5): 517–523.
刘夕群, 朱术会, 邹秉杰, 马寅姣, 周国华. 三酶焦测序体系的建立及其在唐氏综合征快速诊断中的应用. *遗传*, 2010, 32(5): 517–523. [DOI]
- [15] Cao CG, Sun HY, Zhou FF, Wang SM, Chen HY, Lu DR. Duplex genotyping of *CYP2C19**2 and *CYP2C19**3 by high-resolution melting curve analysis. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(7): 923–930.
曹春鸽, 孙海燕, 周芳芳, 王诗铭, 陈红岩, 卢大儒. 应用 HRM 技术对 *CYP2C19**2 和 *CYP2C19**3 进行双重 SNP 分型. *遗传*, 2013, 35(7): 923–930. [DOI]

(责任编辑: 卢大儒)