

人血清去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)H2亚基(sH2a)酶联免疫检测法的建立及临床应用*

尹翔芳¹, 樊一笋¹, 汪琪², 饶品彬³, 石立立³ (1. 上海交通大学医学院附属苏州九龙医院检验科, 江苏苏州 215000; 2. 江苏为真生物医药技术股份有限公司, 江苏苏州 215000; 3. 苏州吉玛基因股份有限公司, 江苏苏州 215123)

摘要:目的 探讨肝损伤患者血清中去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)的H2亚基(sH2a)水平和肝损伤进程的相关性。方法 纳入苏州九龙医院210例血清样本, 其中70例肝损伤组患者, 包括肝硬化、病毒性肝炎、脂肪肝, 同时纳入140例对照组样本, 包括高脂、溶血、黄疸、自身免疫性疾病、健康人。检测上述人群血清sH2a蛋白水平, 对ELISA结果和临床诊断结果进行统计学分析。结果 ①140例对照组和70例肝损伤组的血清样本sH2a蛋白水平分别为 105.92 ± 53.41 ng/ml和 69.25 ± 27.45 ng/ml, 差异有统计学显著性意义($F=14.375, t=5.397, P=0.000$)。②sH2a蛋白水平诊断肝损伤的敏感度为68.57%(95%CI: 56.37%~79.15%), 特异度为82.86%(95%CI: 75.58%~88.70%), 总符合率为78.10%(95%CI: 71.88%~83.49%), KAPPA系数: 0.510 6(95%CI: 0.387 7~0.633 6)。结论 血清sH2a ELISA检测试剂盒的符合率达到临床预期要求, 可以作为新的血清标志物达到辅助诊断肝损伤相关疾病的效果。

关键词:肝损伤; 去唾液酸糖蛋白受体; sH2a; 酶联免疫检测

中图分类号: R575; R446.61 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)05-008-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.003

Establishment and Clinical Evaluation of sH2a Subunit from ASGPR in Diagnosis of Hepatic Injury

YIN Xu-fang¹, FAN Yi-sun¹, WANG Qi², RAO Pin-bin³, SHI Li-li³

(1. Department of Clinical Laboratory, Suzhou Kowloon Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Jiangsu Suzhou 215000, China;

2. Suzhou MicroDiag Biomedicine Co. Ltd, Jiangsu Suzhou 215000, China;

3. Suzhou Gene Pharma Co. Ltd, Jiangsu Suzhou 215123, China)

Abstract: **Objective** To diagnose the process of hepatic injury, a method of quantitating the concentration of sH2a subunit from asialoglycoprotein receptor (ASGPR) in serum by enzyme-linked immunosorbent assay was established and clinical evaluated. **Methods** 210 serum samples were collected in Suzhou Kowloon Hospital. Among them, 70 subjects with cirrhosis, viral hepatitis and fatty liver disease were as hepatic injury group and 140 subjects of healthy and high fat, hemolysis, jaundice and with autoimmune disease were as control group. The serum sH2a of two group were measured by ELISA kit. The results of sH2a ELISA were analyzed by four table chi-square test and SPSS20.0 software. **Results** sH2a protein level in liver injury group and control group were 105.92 ± 53.41 ng/ml and 69.25 ± 27.45 ng/ml, respectively. The difference between the control group and the liver injury group was statistically significant ($F=14.375, t=5.397, P=0.000$). The sensitivity and specificity of the sH2a ELISA kit were 68.57% (95%CI: 56.37%~79.15%) and 82.86% (95%CI: 75.58%~88.70%), and the total compliance rate was 78.10% (95%CI: 71.88%~83.49%) with KAPPA coefficient: 0.510 6 (95%CI: 0.387 7~0.633 6). **Conclusion** sH2a serum ELISA kit with positive and negative coincidence rate between sH2a serum level and meet the clinical requirement, which could be used as new marker for diagnosis of hepatic injury related diseases.

Keywords: hepatic injury; asialoglycoprotein receptor (ASGPR); sH2a; ELISA

包含肝硬化、肝炎、脂肪肝等多种肝脏损伤和炎症反应是肝纤维化、肝硬化的病理学基础, 肝损伤的并发症也是导致发展为肝癌的必经过程, 所以对肝损伤的早期发现、早期诊断对降低癌症死亡率和提高患者总体生存率具有重要意义^[1,2]。目前, 肝损伤的诊断方法有组织病理学诊断、血清指标诊

断、影像学诊断等。其中血清指标诊断包括肝功能全套和肝纤维化四项检查, 临床常用的肝损伤的指标是传统的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)及胆红素(BIL)等, 但这些传统指标不仅特异度不高, 除肝病外其他疾病时也可在血

* 作者简介: 尹翔芳(1974—), 女, 本科, 副主任技师, 主要从事临床生物化学、免疫学检验研究, E-mail: yxf1225@sina.com。

清中检测出^[3,4]。

sH2a 源于人去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)的 H2 亚基,是在肝脏特异度表达的可溶性分泌型蛋白,负责将脱唾液酸糖蛋白从血浆中清除,且与病毒性肝炎、肝硬化、肝癌等肝脏疾病的发生发展有着密切联系^[5,6]。ASGPR 由两个相关的氨基酸序列亚基 H1(46KD)和 H2(50KD)组成,H2a 在紧邻五肽处快速裂解为 35KD 的片段组成受体的可溶形式(sH2a)^[7]。本文采用双抗体夹心酶联免疫吸附法定量测定血清中 sH2a 水平,建立肝损伤患者血清中 sH2a 含量和肝脏功能状况的相关性,旨在探讨一种新的临床上脂肪肝、肝炎、肝硬化等肝损伤的辅助诊断^[8]。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2016 年 11 月~2017 年 3 月期间,由上海交通大学医学院附属苏州九龙医院收集的 70 例患者血清样本作为肝损伤组,其中肝硬化 2 例,肝炎 4 例,脂肪肝 64 例,同时收集非肝损伤和健康人血清共 140 例作为对照组,其中高血脂 3 例,溶血 7 例,黄疸 3 例,系统性红斑狼疮 3 例,肾功能检测无异常、血小板计数正常的健康人 124 例。

全部样品均有明确的临床诊断结果,诊断标准为:①在超声波引导下经皮肝穿刺活组织检查,或经颈静脉、腹腔镜、外科手术活检的病理诊断;②临床医生通过影像学检查和(或)生物化学指标检查以及临床症状综合诊断。

1.2 试剂和仪器 上述血液标本使用非抗凝采血管收集,人 sH2a 定量检测试剂盒(酶联免疫吸附法)(江苏为真生物医药技术股份有限公司);RT-3900 型全自动酶标洗板机(深圳雷杜生命科学股份有限公司);Bio-Tek ELX800 多功能酶标仪(美国宝特);DK-600 电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清样品制备及保存:利用非抗凝采血管收集全血 3 ml,采血后常温放置,待血液凝固、血块收缩后,于 3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清至 1.5 ml 离心管中。血清样本在 2~8℃ 保存 2 天内使用。

1.3.2 标准品和质控品的稀释:将初始浓度为 20 μg/ml 的 sH2a 标准品和初始浓度为 2 μg/ml 的 sH2a 质控品取出至室温平衡,用稀释液将 sH2a 标准品稀释 6 个标准浓度梯度,分别为 200,100,50,25,12.5,6.25 ng/ml,加上 0 ng/ml 的稀释液一共 7 个浓度;质控品用稀释液按 1:100 稀释至工作浓度,所有稀释好的工作当天有效。

1.3.3 检测步骤:将 7 个标准品、质控品和待测的血清样品按人 sH2a 定量检测试剂盒(酶联免疫吸附法)说明书检测,读取各样品 A 值。

1.4 统计学分析

1.4.1 线性评价:以标准品浓度 200,100,50,25,12.5,6.25,0 ng/ml 为自变量(X),以其对应的 450 nm 吸光度值(A)作因变量(Y),用最小二乘法进行线性拟合,求出线性回归方程并计算相关系数(r)。

1.4.2 重复性评价:在 210 例入组的临床样品血清中选取高、中、低值的 3 例样本,分别用人 sH2a ELISA 定量检测试剂盒重复检测 10 次,计算变异系数(CV%)用于评估重复性,公式如下:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \times 100\%$$

1.4.3 统计学分析:210 例入组的临床样品由人 sH2a 定量检测试剂盒测定的血清 ELISA 的检测结果,根据前期大量对正常人样品 sH2a ELISA 检测的临床数据,以 sH2a 蛋白定量值 ≤87 ng/ml 及 >87 ng/ml 为标准,将入组检测的 210 例血清判读为 sH2a 阴性和 sH2a 阳性;采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析:采用独立样本 t 检验的方法对两组样本的 sH2a 值进行显著性检验,0.01 < P ≤ 0.05 为差异具有统计学意义, P ≤ 0.01 为差异具有统计学显著性意义,采用四格表卡方检验和绘制受试者特征工作曲线(ROC curve)的方法评价 sH2a 蛋白表达含量和临床诊断标准的相关性。

2 结果

2.1 线性评价 7 个 sH2a 标准品浓度和测定的吸光值对应关系见表 1,以标准品浓度为自变量(X),对应的吸光度值(A)作因变量(Y),用最小二乘法进行线性拟合,得到线性回归方程: Y = 0.0073X + 0.0999; 计算相关系数(r) = 0.997,说明人 sH2a ELISA 定量检测试剂盒呈良好的线性相关性。

表 1 sH2a 标准品浓度和吸光值对应关系

标准品含量(ng/ml)	吸光度 A _{280nm} (Abs)	
	值 1	值 2
0	0.086	0.074
6.25	0.11	0.116
12.5	0.185	0.193
25	0.286	0.265
50	0.521	0.493
100	0.905	0.892
200	1.532	1.526

2.2 重复性评价 选取分布高、中、低值的3个样品人 sH2a ELISA 定量检测试剂盒重复10次检测,三个梯度测定的吸光度值和 CV 值结果见表2,

三个梯度 CV 值均 $<10\%$,说明在临床检测范围内本检测方法具备较高的可重复性。

表2 样本三个梯度测定的吸光度值和 CV 值(ng/ml)

样本类别	重复检测次数(n)										精密度(CV%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
低值(2163号样本)	26.09	20.15	21.5	23.39	22.99	22.72	22.31	20.15	23.26	21.64	7.80
中值(2069号样本)	90.69	84.74	80.15	86.36	95.01	79.88	98.53	92.72	84.74	78.93	7.80
高值(2179号样本)	140.69	131.5	138.8	122.85	127.45	124.88	142.18	125.15	136.36	152.85	7.20

2.3 统计学分析 肝损伤组和对照组的 sH2a 分别为 105.92 ± 53.41 ng/ml 和 69.25 ± 27.45 ng/ml,结果进行独立样本 t 检验,差异具有统计学显

著性意义($F=14.375, t=5.397, P=0.000$),见表3。

表3 两组样品 sH2a 定量值独立样本 t 检验

项 目	方差方程的 Levene 检验		均值方程的 t 检验						
	F	Sig.	t	df	Sig. (双侧)	均值差值	标准误差值	差分的 95%置信区间	
								下限	上限
假设方差相等	14.375	0.000	6.564	207	0.000	36.672 04	5.586 98	25.657 35	47.686 72
假设方差不相等			5.397	87.800	0.000	36.672 04	6.795 05	23.167 88	50.176 20

根据参考值 87 ng/ml 判读阳性和阴性结果,采用四格表卡方检验的方法评价人 sH2a ELISA 定量检测结果和临床诊断结果相关性见表4,阳性符合率为 68.57%(48/70),阴性符合率为 82.6%(116/140),阳性预期值为 66.67%(48/72),阴性预期值为 84.06%(116/138),故 sH2a 检测试剂盒诊断肝损伤(肝硬化、肝炎、脂肪肝)的敏感度为 68.57%(95%CI: 56.37%~79.15%),特异度为 82.86%(95%CI: 75.58%~88.70%),总符合率为 78.10%(95%CI: 71.88%~83.49%),KAPPA 系数: 0.510 6(95%CI: 0.387 7~0.633 6)。

表4 试剂盒检测结果与临床诊断结果比较

试剂盒检测结果	临床诊断结果		合 计
	阳性	阴性	
阳性	48	24	72
阴性	22	116	138
合计	70	140	210

对检测的血清样品绘制受试者特征工作曲线(ROC 曲线,图1),评价血清 sH2a 用于诊断肝损伤病程进展的应用价值。实验受试者工作特征曲线下面积为 0.765(0.690~0.841,95%置信区间),约登指数最大为 0.515,对应检测敏感度为 68.6%,特异度为 82.9%,和四格表卡方检验方法的结果基本一致。

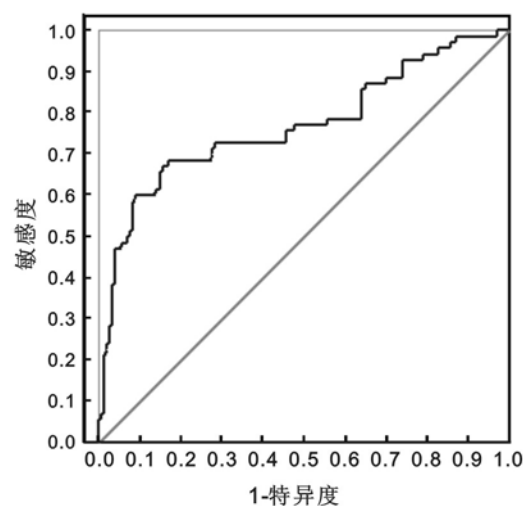


图1 血清 sH2a 的受试者特征工作曲线(ROC 曲线)

2.4 对不同类型的肝损伤组检测结果 对肝损伤组根据不同病种类型将 sH2a 检测试剂盒的结果进行分类统计,肝硬化入组2例全部检测为阳性,肝炎入组4例全部检测为阳性,脂肪肝入组64例检出42例阳性,sH2a 检测试剂盒诊断肝损伤中脂肪肝的敏感度为 65.63%。

3 讨论 目前,肝损伤的诊断方法有组织病理学诊断、血清指标诊断、影像学诊断等。其中组织病理学诊断又称肝活检,由于肝活检是一种创伤性检查,穿刺后疼痛并会导致其他并发症、取材误差、方

法复杂,其难以在临床广泛开展;血清指标诊断包括肝功能全套和肝纤维化四项检查,但是特异度不高,不仅在肝病,在其他疾病时也可在血清中检测出;影像学技术受肥胖、肋间隙狭窄等因素限制,可能会漏诊。因此,在临床应用中,需要综合各种方法以及病人的临床表现对疾病进行综合诊断^[9,10]。此时就需要一种稳定性好、灵敏度高、特异度强、准确度高的非创伤性方法检测肝损伤。通过检测血清标志物观察慢性肝病患者肝组织损害严重程度,判断病程发展和预后有很重要的临床意义。临床常用的肝损伤生化指标有:丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转肽酶、总胆红素、血清清蛋白、胆碱酯酶及凝血酶原时间等,但各有其局限性,因此很少独立使用作为肝损伤严重程度的判别标准。

人去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)仅在肝细胞中表达,能够迅速评出血循环中末端为 β -1,4链半乳糖的寡糖糖蛋白和脂蛋白等物质,且与病毒性肝炎、肝硬化、肝癌等肝脏疾病的发生发展密切相关。ASGPR由两个相关的氨基酸序列亚基,H1(46KD)和H2(50KD)组成,H2a和H2b为ASGPR H2亚基的两个可变剪接受体。H2a在紧邻五肽处快速裂解为35KD的片段,包括完整的胞外域,其是分泌性的,组成受体的可溶形式(sH2a)。研究发现,sH2a水平与肝损伤程度密切相关。肝纤维化阶段血清样本中sH2a水平明显降低,患者血清sH2a水平与肝脏纤维化程度呈负相关,且无纤维化(S0期)、早期纤维化(S1~S2期)和中晚期纤维化(S3~S4期)3组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)^[11],因此在肝纤维化阶段早期预警肝硬化、肝癌,通过治疗逆转或终止肝损伤进一步发展,将有效降低肝硬化、肝癌的发病率。

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附法定量测定血清中sH2a水平,通过检测患者血清中sH2a含量可获得肝脏功能状况的信息,用于临床脂肪肝、肝炎、肝硬化等肝损伤的辅助诊断。70例肝损伤组和140例对照组的sH2a定量值进行均值比较,结果对照组和肝损伤组的均值分别为 105.92 ± 53.41 ng/ml和 69.25 ± 27.445 ng/ml,独立样本 t 检验结果 $F=14.375$, $t=5.397$, $P=0.000$,差异具有统计学显著性意义。和临床诊断结果对比,采用四格表卡方检验和实验受试者工作特征曲线一致评价sH2a ELISA试剂盒诊断肝损伤的敏感度为68.57%(95%CI:56.37%~79.15%),特异度为82.86%(95%CI:75.58%~88.70%),总符合度均达到临床预期要求,能够达到辅助诊断肝损伤疾病的效果,sH2a作为新的血

清标志物为判定肝损伤进程提供临床价值。

本研究样品数量有限,肝损伤组以脂肪肝为主,肝硬化和肝炎的数量较少,且缺少肝纤维化患者病例,在今后的研究中应尽可能的扩大样本量,并进一步将每一组的病例按照严重程度进行细分,以建立sH2a在血清中的量值和肝损伤严重程度相关性的数据。另外,无论是哪种类型的慢性肝病,都存在一定的个体差异,如年龄、肥胖、饮酒、协同用药、其他炎症疾病等相关因素,sH2a在血清中的量值是否和这些因素相关尚不清楚,需要在今后的持续研究中系统考虑。

参考文献:

- [1] El-Serag HB, Kanwal F, Richardson P, et al. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in veterans with hepatitis C virus infection [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 130-137.
- [2] 傅海媛, 侯利平, 周晓明, 等. 新型肝损伤血清标志物Pep5定量检测方法的建立及临床应用[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(20): 2641-2643.
Fu HY, Hou LP, Zhou XM, et al. Development and application of quantitate assay for serum biomarker polypeptide 5 of liver injury [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2013, 10(20): 2641-2643.
- [3] 纪冬, 陈国风. 肝纤维化无创诊断研究进展及其临床应用[J]. *传染病信息*, 2013, 26(3): 190-194.
Ji D, Chen GF. Development and clinical application of noninvasive methods to assess liver fibrosis [J]. *Infectious Disease Information*, 2013, 26(3): 190-194.
- [4] 田丽艳, 陆伦根. 肝纤维化影像学诊断研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2013, 33(5): 292-294.
Tian LY, Lu LG. Progress in imaging diagnosis of hepatic fibrosis [J]. *International Journal of Digestive Diseases*, 2013, 33(5): 292-294.
- [5] Benyair R, Kondratyev M, Veselkin E, et al. Constant serum levels of secreted asialoglycoprotein receptor sH2a and decrease with cirrhosis [J]. *WJG: World Journal of Gastroenterology*, 2011, 17(48): 5305-5309.
- [6] 石红, 刘健, 余进洪. 肝脏去唾液酸糖蛋白受体的研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2014, 8(23): 4282-4286.
Shi H, Liu J, Yu JH. Research progress of the asialoglycoprotein receptor in liver [J]. *Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition)*, 2014, 8(23): 4282-4286.
- [7] Veselkin E, Kondratyev M, Lurie Y, et al. A secreted form of the asialoglycoprotein receptor, sH2a, as a novel potential noninvasive marker for liver fibrosis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27210.
- [8] 刘婷, 徐铭益. 肝纤维化的血清学诊断研究进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2016, 19(1): 125-128.

- Liu T, Xu MY. Serologic diagnosis of liver fibrosis [J]. Journal of Practical Hepatology, 2016, 19(1): 125-128.
- [9] Flass T, Narkewicz MR. Cirrhosis and other liver disease in cystic fibrosis [J]. Journal of Cystic Fibrosis, 2013, 12(2): 116-124.
- [10] Than NN, Ghazanfar A, Hodson J, et al. Comparing clinical presentations, treatments and outcomes of hepatocellular carcinoma due to hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease [J]. QJM: An International Journal of Medicine, 2017, 110(2): 73-81.
- [11] 王磊, 金沛桦, 瞿欢佳, 等. 外周血可溶性 sH2a 在早期诊断肝纤维化程度中的价值 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2017, 31(1): 57-61.
- Wang L, Jin PH, Qu HJ, et al. The clinical diagnosis value and significance of serum sH2a level on early hepatic fibrosis degree [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2017, 31(1): 57-61.
- 收稿日期: 2017-07-06
修回日期: 2017-08-14
-
- (上接 7 页)
- [3] 邱进, 刘辉, 热孜宛古丽·伊敏, 等. MEF2C 基因启动子区碱基突变对转录活性的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(5): 606-611, 616.
- Qiu J, Liu H, Reziwanguli YM, et al. Effect of base mutation in MEF2C promoter region on transcription activity [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2017, 40(5): 606-611, 616.
- [4] 李璐, 梁辉, 陈群蓉. 鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 39-41, 45.
- Li L, Liang H, Chen QR. Methylation of SYK gene promoter region in nasopharyngeal carcinoma [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 39-41, 45.
- [5] 裴静娴, 王月刚, 张艺军, 等. p53RFP 基因启动子荧光素酶报告基因载体的构建及鉴定 [J]. 广东医学, 2017, 38(2): 170-172.
- Pei JX, Wang YG, Zhang YJ, et al. Construction and identification of luciferase reporter plasmid containing p53RFP gene promoter [J]. Guangdong Medical Journal, 2017, 38(2): 170-172.
- [6] 李星光, 卢圣奎, 王帅. microRNA-17 过表达对胶质瘤患者预后的影响 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2016, 24(3): 168-171.
- Li XG, Lu SK, Wang S. Influence of expression level of miR-17 on prognosis of glioma patients [J]. Journal of Brain and Nervous Diseases, 2016, 24(3): 168-171.
- [7] 周君纯, 郑丽, 刘家华, 等. 以 microRNA-17 为靶点的反义核酸对白血病细胞 K562 的作用 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2013, 22(7): 428-430, 435.
- Zhou JC, Zheng L, Liu JH, et al. Effects of antisense oligonucleotides targeting microRNA-17 on human leukemic K562 cells [J]. Journal of Leukemia & Lymphoma, 2013, 22(7): 428-430, 435.
- [8] Dellago H, Bobbili MR, Grillari J. MicroRNA-17-5p: At the crossroads of cancer and aging-a mini-review [J]. Gerontology, 2017, 63(1): 20-28.
- [9] Liao XH, Xiang Y, Yu CX, et al. STAT3 is required for MiR-17-5p-mediated sensitization to chemotherapy-induced apoptosis in breast cancer cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15763-15774.
- [10] Gong J, He L, Ma J, et al. The relationship between miR-17-5p, miR-92a, and let-7b expression with non-small cell lung cancer targeted drug resistance [J]. Journal of the Balkan Union of Oncology, 2017, 22(2): 454-461.
- [11] 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): 1351-1353, 1356.
- Wang Q, Luo K. Establishment of a method for detecting EGFR gene mutations and its preliminary application [J]. Chongqing Medicine, 2014, 43(11): 1351-1353, 1356.
- [12] Pratyush DD, Tiwari S, Kumar A, et al. A new approach to touch down method using betaine as cosolvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification [J]. Gene, 2012, 497(2): 269-272.
- [13] Obradovic J, Jurisic V, Tosic M, et al. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-rich EGFR promoter sequence [J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2013, 27(6): 487-493.
- [14] Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences [J]. Mol Biotechnol, 2013, 54(3): 1048-1054.
- [15] Vandenbussche F, Lefebvre DJ, De Leeuw I, et al. Laboratory validation of two real-time RT-PCR methods with 5'-tailed primers for an enhanced detection of foot-and-mouth disease virus [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 246: 90-94.
- [16] 罗凯, 黎谢梦丹, 石兴源, 等. 人 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 26-29.
- Luo K, Lixie MD, Shi XY, et al. Establishment and preliminary application of the method for detecting expression of human CDK14 with real-time quantitative PCR [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(2): 26-29.
- 收稿日期: 2017-06-09
修回日期: 2017-07-27