

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.012

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.012>

基于荧光定量 PCR 技术的人类 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性检测方法学评价

戎国栋*, 沈丹婷*, 陈丹, 赵鸿, 吴蕾, 张洁心, 王芳, 黄珮琚, 徐婷

(南京医科大学第一附属医院检验学部, 南京 210029)

[摘要] 目的: 对基于荧光定量PCR技术的人类CYP2C9和VKORC1基因多态性检测试剂盒进行性能评价。方法: 选取20例已通过Sanger测序确定基因分型的临床样本编盲, 按照试剂盒流程进行实时荧光PCR检测, 评价其准确度; 对4种基因型样本(CYP2C9*3纯合野生型、CYP2C9*3杂合突变型、VKORC1-1639G>A纯合突变型和VKORC1-1639G>A杂合突变型)重复检测10次, 评价其批内精密度; DNA样本梯度稀释, 评价最低检测限。结果: 实时荧光PCR法与测序结果对比分析, 结果全部一致, 准确度100%。不同基因型批内精密度均 $\leq 5\%$, 批内精密度可接受。DNA浓度在0.964 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 仍可检测标本的基因型。结论: 实时荧光PCR技术对人类CYP2C9和VKORC1基因分型检测在方法学上稳定可靠, 此评价模式可适用于基于荧光PCR技术的其他基因多态性试剂盒的评价。

[关键词] 实时荧光PCR; CYP2C9; VKORC1; 药物代谢酶; 基因多态性

Evaluation of human CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms detection based on fluorescent quantitative PCR

RONG Guodong*, SHEN Danting*, CHEN Dan, ZHAO Hong, WU Lei, ZHANG Jiexin, WANG Fang, HUANG Peijun, XU Ting

(Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract **Objective:** To evaluate the performance of human CYP2C9 and VKORC1 polymorphism detection kit based on fluorescent quantitative PCR. **Methods:** The genotypes of 20 samples were detected by both Sanger sequencing and real-time PCR blindly to evaluate the accuracy of this kit. The intra-batch precision was evaluated by measuring every genotype sample (including CYP2C9*3 homozygous wild type, CYP2C9*3 heterozygous mutant, VKORC1-1639G>A homozygous mutant and VKORC1-1639G>A heterozygous mutant) 10 times. The

* 为共同第一作者

收稿日期 (Date of reception): 2017-07-06

通信作者 (Corresponding author): 徐婷, Email: tingxu@njmu.edu.cn

基金项目 (Foundation item): 江苏省“十三五”科教强卫工程 (ZDXKB2016005); 南京医科大学“十三五”教育研究课题 (QN2017139)。

This work was supported by the Key Laboratory for Laboratory Medicine of Jiangsu Province (ZDXKB2016005) and the Educational Research Project in 13th Five-Year of Nanjing Medical University (QN2017139), China.

DNA samples were detected by gradient dilution to evaluate the minimum detection limit. **Results:** The results of real-time PCR were in complete agreement with that of Sanger sequencing, so the accuracy was 100%. The intra-batch of samples with four genotypes was less than 5%. The genotype was detectable when DNA concentration was 0.964 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. **Conclusion:** Real-time PCR is a reliable method for the detection of human CYP2C9 and VKORC1 genotypes. This evaluation model can be applied to the evaluation of other gene polymorphism kits based on fluorescence PCR.

Keywords real-time fluorescence PCR; CYP2C9; VKORC1; drug metabolism enzyme; gene polymorphism

华法林是一种双香豆素衍生物, 是临床上常见的口服抗凝药物, 主要用于血栓性疾病和静脉血栓的预防及抗凝治疗^[1]。然而, 华法林治疗窗窄、个体差异大, 且易受其他因素影响(药物、饮食等)^[2]。研究^[3]表明: 引起华法林用量个体差异的主要原因是遗传因素, 其中细胞色素P450 2C9 (CYP2C9)基因和维生素K环氧化物还原酶复合体亚单位1基因(VKORC1)是影响华法林用量个体差异最主要的两个遗传因素。2010年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)^[4]更换了华法林药物标签, 增加了“患者CYP2C9和VKORC1基因多态性有助于华法林初始剂量选择”的内容, 以优化治疗方案, 避免药物不良反应。可见华法林药物代谢相关基因检测具有重要的临床意义。

实时荧光定量PCR TaqMan技术具有操作简单、检测速度快、灵敏度高、特异性强和重复性好等优点, 在基因表达水平分析、单核苷酸多态性(SNP)测定、遗传疾病诊断等方面具有广泛的应用^[4]。因此, 本实验室对基于实时荧光定量PCR技术的人类CYP2C9和VKORC1基因型的试剂盒进行性能验证, 以期临床实验室利用实时荧光定量PCR开展基因多态性检测提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本收集和选择

收集EDTA-K2抗凝静脉血样本, 按照血液基因组DNA提取试剂盒流程提取样本DNA, Sanger测序确定CYP2C9*3和VKORC1 1639 G>A位点多态性。选取其中20例临床样本进行性能验证, 要求所选样本尽可能涵盖所有基因型, 包括CYP2C9*3纯合野生型、CYP2C9*3杂合突变型、VKORC1-1639G>A纯合突变型和VKORC1-1639G>A杂合突变型(其中CYP2C9*3纯合突变型和VKORC1-1639

G>A纯合野生型在中国人群中分布较少, 未挑选到样本)。挑选的20例样本编盲。

1.1.2 仪器与试剂

血液基因组DNA提取试剂盒购于天根生化科技有限公司, CYP2C9和VKORC1基因多态性检测试剂盒购于武汉友芝友医疗科技有限公司, ABI7500荧光定量PCR仪, 3730 型测序仪购于美国应用生物系统公司, Nano-100型微量分光光度计购于杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

按照血液基因组DNA提取试剂盒流程提取编盲样本DNA。

1.2.2 准确度

提取的DNA样本按照试剂盒标准操作规程进行实时荧光定量PCR扩增检测。扩增后结果判读, 各通道Ct值 ≤ 36 且扩增曲线有明显指数增长期, 判定为阳性; Ct值 >36 或无Ct值表示无明显指数增长期, 判定为阴性。FAM通道为阳性表示携带野生型等位基因; VIC通道为阳性表示携带突变型等位基因; ROX通道为内标基因, 扩增曲线有明显指数增长表明实验有效。检测结果与Sanger测序法进行比较, 符合率达95%为合格。

1.2.3 精密度

选取4种基因型样品, 涵盖CYP2C9*3纯合野生型和杂合突变型、VKORC1-1639G>A纯合突变型和杂合突变型, 进行批内精密度检测, 每种基因型批内扩增检测10次。分析10次检测的Ct值, Ct值的CV $<5\%$ 为合格。

1.2.4 最低检测限

将提取的DNA模板紫外分光光度法测定DNA浓度, 系列梯度稀释(1/2, 1/4, 1/8, 1/16和1/32), 实时荧光定量PCR扩增检测。以能检测到该标本基因型的DNA最小浓度为该检测方法的最低检测限。

2 结果

2.1 准确度

人类CYP2C9和VKORC1基因多态性检测, CYP2C9*3位点AA, CC, AC分别为纯合野生型、纯合突变型和杂合突变型; VKORC1-1639G>A位点GG, AA, GA分别为纯合野生、纯合突变型和杂合突变型。20例标本实时荧光定量PCR法检测结果如图所示(图1): 17例CYP2C9*3纯合野生型和VKORC1-1639 G>A纯合突变型; 1例CYP2C9*3杂合突变型和VKORC1-1639G>A纯合突变型; 2例CYP2C9*3纯合野生型和VKORC1-1639G>A杂合突变型。实时荧光定量PCR法和Sanger测序法检测结果比较, 符合率为100%, 准确度符合

要求。

2.2 精密度

对20例样品中出现的4种基因型样本(CYP2C9*3纯合野生型和杂合突变型、VKORC1-1639G>A纯合突变型和杂合突变型), 批内重复扩增10次, 扩增结果如表1所示。4个样本Ct值的CV值均<5%, 批内精密度符合要求。

2.3 最低检测限

将提取的模板DNA进行1/2, 1/4, 1/8, 1/16和1/32梯度稀释, 每份样品检测3次。结果如表2所示, DNA浓度在0.964 μg/μL仍能检测到标本的基因型。

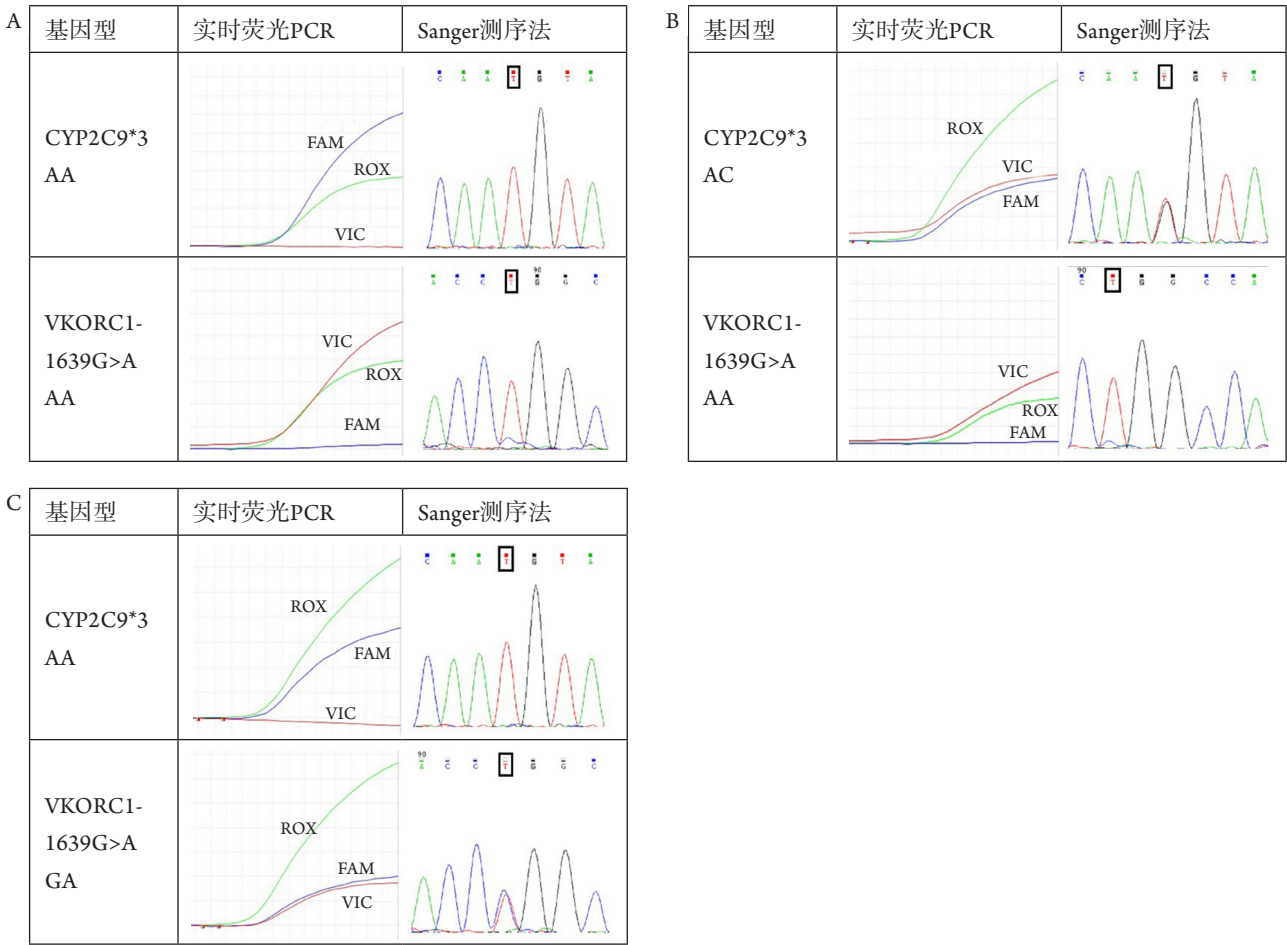


图1 不同基因型荧光定量PCR和测序法结果

Figure 1 Results of fluorescent quantitative PCR and sequencing of different genotypes

(A) CYP2C9纯合野生型和VKORC1纯合突变型; (B) CYP2C9杂合突变型和VKORC1纯合突变型; (C) CYP2C9纯合野生型和VKORC1杂合突变型。
(A) CYP2C9 homozygous wild type and VKORC1 homozygous mutant; (B) CYP2C9 heterozygous mutant and VKORC1 homozygous mutant; (C) CYP2C9 homozygous wild type and VKORC1 heterozygous mutant.

表1 CYP2C9和VKORC1精密度检测结果(Ct值)

Table 1 Precision results of CYP2C9 and VKORC1 (Ct value)

参数	CYP2C9*3						VKORC1					
	纯合野生型			杂合突变型			杂合突变型			纯合突变型		
	FAM	VIC	ROX	FAM	VIC	ROX	FAM	VIC	ROX	FAM	VIC	ROX
均值	23.49	—	24.61	22.27	23.56	22.44	24.22	25.38	24.70	—	22.01	22.78
SD	0.24	—	0.28	0.27	0.22	0.20	0.41	0.41	0.19	—	0.54	0.49
CV%	1.02	—	1.13	1.23	0.94	0.88	1.69	1.61	0.78	—	2.46	2.15

表2 CYP2C9和VKORC1最低检测限检测结果

Table 2 Results of minimum detection limit for CYP2C9 and VKORC1

稀释倍数	DNA浓度/($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)		检测次数1		检测次数2		检测次数3	
	理论值	实测值	CYP2C9	VKORC1	CYP2C9	VKORC1	CYP2C9	VKORC1
原倍	60.024	60.024	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型
1/2	30.012	27.207	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型
1/4	15.006	16.273	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型
1/8	7.503	8.048	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型
1/16	3.752	3.715	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型
1/32	1.876	0.964	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型	纯合野生型	纯合突变型

3 讨论

如今，药物基因组学数据可以提供“个体化”或“精准”的医疗信息，利用这些信息，医生可以为特定患者提供合适剂量的特异性药物，达到精确调整治疗方案的目的^[5]。根据个体基因变异与药效差异的关系，依据自身基因型安全，有效地选用药物，设计临床个体化用药方案，充分发挥药物对机体的作用效应，减少或避免不良反应的发生(尤其是治疗安全范围窄的药物)，为指导临床合理用药提供科学依据^[6]。

华法林是双香豆素衍生物，主要通过CYP2C9，2C19，2C8，2C18，1A2及3A4在肝代谢，它在肝微粒体内通过抑制维生素K环氧化物还原酶(Vitamin K epoxide reductase, VKOR)的活性而阻断维生素KH₂的生成，进而抑制维生素K依赖性凝血因子的 γ -羧基化作用，从而抑制维生素K依赖性凝血因子II，VII，IX和X的合成起到抗凝血作用。相关基因的遗传多态性在华法林起始用量方面起决定性的作用。Wadelius等^[7]对201例患者的29个华法林代谢相关基因中发现VKORC1和CYP2C9与华法林的用量密切相关；Takeuchi等^[8]通过对1053

例瑞典人群的全基因组关联分析，发现VKORC1基因和CYP2C9基因与华法林的剂量关联性最强。CYP2C9基因和VKORC1基因具有SNP^[9]。SNP研究是现阶段人类基因组研究的热点，在相关遗传性疾病、新药研发、个体化治疗、法医学、临床检验及分子诊断等方面有重要的应用价值^[10]。国外CYP2C9基因研究主要集中在CYP2C9*2和CYP2C9*3，其中CYP2C9*2多态性在我国甚至亚洲均罕见。VKORC1-1639G>A基因型西方人群以GG，GA型为主，AA型少见；而我国汉族以AA型为主，GG，GA型少见^[2]。

编码CYP2C9的基因位于染色体10q24.12，全长约55 kb，含有9个外显子和8个内含子。CYP2C9基因具有高度遗传多态性，Shintani等^[11]报道5'区域至少存在7个SNP，分别是1912T>C，1886C>G，1566C>T，1538G>A，C1189>T，G982>A和162A>G。Takahashi等^[12]对5'上游至2.1 kb区域分析发现除上述单核苷酸多态性外，还有7个新的点突变(2080C>T，2079T>A，A2078>G，1097A>G，620G>T，485T>A和484C>A)，1个插入突变Ins T-839和2个缺失突变Del T-828和Del A-820。研究^[6]发现：这些5'上游区域的突变携带

者对S-华法林清除有不同程度的影响。较常见的基因突变体是CYP2C9 3 & 2和CYP2C9 3&3, 因其编码的酶活性分别比野生型CYP2C9 3&1降低了30%和80%, 导致CYP2C9基因突变个体对华法林的需求剂量较低^[13]。CYP2C9代谢的药物很多, 有甲苯磺丁脲、苯妥英、华法林、氟西汀、洛沙坦等。其中很多药物(特别是苯妥英、S-华法令和甲苯磺丁脲)治疗指数很窄, 所以酶活性成为确定上述药物个体化差异的重要决定因素^[14]。

VKOR是华法林作用的靶蛋白。华法林通过抑制VKOR, 使无活性的氧化型(还原物型)VK无法还原为有活性的还原型(氢醌型)VK而起到抗凝作用。多个VKORC1的SNP位点被发现与华法林用量个体差异相关^[15]。

除了CYP2C9和VKORC1基因, 其他基因如CYP4F2, GGCX, EPHX1和ApoE, 也可能对华法林剂量产生影响, 其影响作用有待进一步证实^[16]。这些基因未来可能纳入遗传药理学公式或剂量推荐表中以进一步提高华法林剂量预测的准确性, 但在这之前需要大量临床研究来证实^[17]。

目前检测CYP2C9和VKORC1基因型的突变主要采用等位基因特异性PCR扩增法、PCR扩增后限制性片段长度多态性分析法、单链构象多态性和变性高效液相色谱法。但这类方法普遍存在步骤繁琐、自动化不高和无法多位点同时检测的缺点^[18]。近年来, 一些新发展起来的方法也广泛用于这两个基因的分型, 如基因芯片、变性高效液相色谱、焦磷酸测序、电离飞行时间质谱、高分辨溶解曲线(high resolution melting, HRM)等^[3,19]。

本实验采取的方法为实时荧光PCR技术中的TaqMan探针技术, Taqman探针技术是杂交技术与荧光检测技术的结合, 每检测一个SNP位点需要一条探针, 通过检测PCR过程中及PCR后产生的荧光信号来区分SNP的类型。该技术没有单独扩增的步骤, 也没有中间处理过程。TaqMan探针技术比较灵活, 可以根据要检测的SNP位点及检测的样本数设计实验。其局限性在于只可以检测已知的SNP位点而不能发现未知的SNP位点; 其次由于PCR扩增与TaqMan探针酶切是同步进行的, 随着多重水平的增加, 会导致非特异性信号增多, 影响结果的准确性^[10]。

根据《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)》^[20], 临床检验实验室应用的体外诊断试剂都需进行性能评价。实验室所购买的商业化的仪器应根据说明书进行验证, 在报告

结果之前实验室应该证明其性能能够满足厂家规定的准确度、精密度、线性与可报告范围和参考区间。因此, 本实验室设计了评估华法林代谢相关CYP2C9和VKORC1基因检测试剂盒的性能验证方案, 验证试剂盒的准确度、精密度与最低检测限。在实验设计中根据《指南》要求“药物代谢酶基因变异检测体系进行准确度性能验证时所使用的参考物质基因型应包括各种突变型和野生型”, 我们希望尽量覆盖CYP2C9*3和VKORC1-1639G>A的全部基因型, 但由于CYP2C9*3纯合突变型和VKORC1-1639G>A位点纯合野生型在中国汉族人群中分布较少, 故而实验中没有挑选到这两种类型的样本。通过分析实验结果, 我们认为基于荧光定量PCR方法的人类CYP2C9和VKORC1基因多态性检测试剂盒准确度100%、精密度<5%, 对原浓度稀释32倍仍能对DNA样本进行准确分型, 性能符合检测要求。同时, 该实验方案可应用于其他多态性检测试剂盒的评估, 对促成临床试剂盒应用性能评估标准化具有一定意义。

参考文献

1. 王亮, 钟武. CYP2C9*3和VKORC1基因多态性对华法林预防骨科术后下肢深静脉血栓效果的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 33(10): 1360-1363.
WANG Liang, ZHONG Wu. Effects of CYP2C9*3 and VKORC1 gene polymorphisms on warfarin in prevention of deep venous thrombosis of lower limbs after orthopedic surgery[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University. Medical Science, 2013, 33(10): 1360-1363.
2. 闻武. CYP2C9, VKORC1-1639G>A和CYP4F2 rs2108622基因多态性对华法林剂量的影响[D]. 福州: 福建医科大学, 2013.
WEN Wu. Influence of CYP2C9*3, VKORC1-1639 G>A and CYP4F2 rs2108622 genetic polymorphisms on warfarin dose[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2013.
3. 吴海丽, 向道康, 黄凌, 等. SYBR Green I实时荧光PCR检测VKORC1和CYP2C9基因型[J]. 江苏医药, 2011, 37(15): 1815-1818.
WU Haili, XIANG Daokang, HUANG Ling, et al. Detection of VKORC1 and CYP2C9 genotypes by SYBR Green I -based real-time PCR[J]. Jiangsu Medical Journal, 2011, 37(15): 1815-1818.
4. 顾梦月, 张希根, 张楚麟, 等. 实时荧光定量PCR检测CYP2C9*3及VKORC1_C1173T基因多态性方法的建立[J]. 药物生物技术, 2016, 23(3): 195-200.
GU Mengyue, ZHANG Xigen, ZHANG Chulin, et al. Establishment of quantitative real-time PCR for detecting CYP2C9*3 and VKORC1_C1173T genes polymorphism[J]. Pharmaceutical Biotechnology,

- 2016, 23(3): 195-200.
5. Spizz G, Chen Z, Li P, et al. Determination of genotypes using a fully automated molecular detection system[J]. Arch Pathol Lab Med, 2015, 139(6): 805-811.
 6. 李惠芬, 孟英韬. 细胞色素氧化酶CYP2C9基因多态性与个体化治疗[J]. 医学综述, 2011, 17(3): 351-353.
LI Huifen, MENG Yingtao. Individualized drug therapy and gene polymorphism of CYP2C9[J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(3): 351-353.
 7. Wadelius M, Chen L Y, Eriksson N, et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism[J]. Hum Genet, 2007, 121(1): 23-34.
 8. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose[J]. PLoS Genet, 2009, 5(3): e1000433.
 9. 耿启彬, 蔡佳琳, 黄思玲, 等. 华法林药物遗传学基因CYP2C9和VKORC1单核苷酸多态性在广东汉族人群的分布研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(6): 371-374.
GENG Qibin, CAI Jialin, HUANG Siling, et al. The study of single nucleotide polymorphisms distribution of CYP2C9 and VKORC1 associated with pharmacogenetics of warfarin in Guangdong Han Chinese[J]. Journal of Molecular Diagnostics and Therapy, 2012, 4(6): 371-374.
 10. 李穗雯, 胡大春. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(12): 1559-1561.
LI Suiwen, HU Dachun. Progress in detection methods of single nucleotide polymorphisms[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2013, 34(12): 1559-1561.
 11. Shintani M, Ieiri I, Inoue K, et al. Genetic polymorphisms and functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies[J]. Clin Pharmacol Ther, 2001, 70(2): 175-182.
 12. Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, et al. 5'-Flanking region polymorphisms of CYP2C9 and their relationship to S-warfarin metabolism in white and Japanese patients[J]. Blood, 2004, 103(8): 3055-3057.
 13. 曹红, 王建华. 华法林基因检测及临床应用进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2010, 3(3): 204-208.
CAO Hong, WANG Jianhua. Clinical application and detection of warfarin[J]. Chinese Journal of Lung Diseases. Electronic Edition, 2010, 3(3): 204-208.
 14. 赵钢涛, 丁媛媛, 杨凡, 等. Pyrosequencing检测CYP2C9*3基因多态性方法的建立及其可靠性研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(7): 799-803.
ZHAO Gangtao, DING Yuanyuan, YANG Fan, et al. Development of pyrosequencing method for the simultaneous and rapid detection of CYP2C9*3 gene polymorphism and its reliability study[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2009, 14(7): 799-803.
 15. 黄盛文. VKORC1和CYP2C9基因型对中国人华法林个体化用药剂量影响的前瞻性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2008.
HUANG Shengwen. Effect of VKORC1 and CYP2C9 genotype on inter-individual warfarin dose: A prospective study in Chinese patients[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2008.
 16. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose[J]. Blood, 2008, 111(8): 4106-4112.
 17. Agustinus Wijaya, 蒋廷波, 何军, 等. 应用VKORC1和CYP2C9基因多态性准确评估患者使用华法林的剂量[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2012, 26(3): 229-231.
Agustinus Wijaya, JIANG Tingbo, HE Jun, et al. The accuracy of warfarin dosage based on VKORC1 and CYP2C9[J]. Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology, 2012, 26(3): 229-231.
 18. 张亚同, 梁欣, 胡欣, 等. 基于连接酶反应快速检测华法林相关基因VKORC1、CYP2C9多态性[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(12): 1395-1401.
ZHANG Yatong, LIANG Xin, HU Xin, et al. Ligase-based method to detect the polymorphism of warfarin related genes: VKORC1, CYP2C9[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2010, 15(12): 1395-1401.
 19. Chen C, Li S, Lu X, et al. High resolution melting method to detect single nucleotide polymorphism of VKORC1 and CYP2C9[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5): 2558-2564.
 20. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)[EB/OL]. 2015-07-29. www.moh.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2015/07/20150731150013239.doc.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Technical guidelines for medical affairs authority testing drug metabolizing enzymes and drug target genes (trial) [EB/OL]. 2015-07-29. www.moh.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2015/07/20150731150013239.doc.

本文引用: 戎国栋, 沈丹婷, 陈丹, 赵鸿, 吴蕾, 张洁心, 王芳, 黄珮珺, 徐婷. 基于荧光定量PCR技术的人类CYP2C9和VKORC1基因多态性检测方法学评价[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(11): 2357-2362. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.012

Cite this article as: RONG Guodong, SHEN Danting, CHEN Dan, ZHAO Hong, WU Lei, ZHANG Jiexin, WANG Fang, HUANG Peijun, XU Ting. Evaluation of human CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms detection based on fluorescent quantitative PCR[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(11): 2357-2362. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.012