

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.005

焦磷酸测序测定 SNP 的常见问题与解决方法 *

李思勤^{1,2} 邹秉杰² 王建平^{1,2} 刘云龙^{1,2} 宋沁馨³ 周国华^{1,2,Δ}

(1 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009; 2 南京军区南京总医院药理科 江苏 南京 210002;

3 中国药科大学药学院药物分析教研室 江苏 南京 210009)

摘要 目的:探讨焦磷酸测序技术对单核苷酸多态性分型因测序图谱中存在的一些典型问题而导致分型结果不准确的解决方法。**方法:**以 VKORC1 基因 1639 G>A 位点、CYP2C19 基因 636 G>A 位点及 UGT1A1 基因 TA 重复序列 (TA)₆>(TA)₇ 的多态性检测为例,分别采用优化 PCR 条件、改变测序时 dNTP 的加入顺序以及设立外标校正的方法来解决上述问题,从而提高焦测序对 SNP 分型的准确性。**结果:**通过升高 PCR 退火温度,可以显著提高 VKORC1 基因的扩增特异性,降低了测序图谱中非特异性信号峰强度;通过优化测序时 dNTP 的加入顺序,CYP2C19 基因 636 G>A 位点的准确分型结果可通过观察测序图谱中相关信号峰的有无而简单获得,避免了比较信号峰的相对强度;通过比较待测样本与已知基因型的外标样本的测序图谱来确定待测样本的基因型,提高了对 UGT1A1 基因 TA 重复序列 (TA)₆>(TA)₇ 多态性的分型准确性。**结论:**本文针对焦测序在测定 SNP 时的常见问题所提出的相应解决方法不仅简单、经济有效,而且在临床应用方面具有可靠性。

关键词:焦磷酸测序;PCR;单核苷酸多态性

中图分类号:Q78,R914 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2219-05

Solutions to the Problems Frequently Occurring in Pyrosequencing for Detecting Single Nucleotide Polymorphisms*

LI Si-qin^{1,2}, ZOU Bing-jie², WANG Jian-ping^{1,2}, LIU Yun-long^{1,2}, SONG Qin-xin³, ZHOU Guo-hua^{1,2,Δ}

(1 School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China;

2 Department of pharmacology, Jinling Hospital, Nanjing University School of Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210002, China;

3 Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China)

ABSTRACT Objective: To explore the solutions to the problems of inaccurate genotyping results which may be resulted in the typical problems appearing in pyrograms during using pyrosequencing for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs). **Methods:** Taking the 1639 G>A locus in the VKORC1 gene, the 636 G>A locus in the CYP2C19 gene and the TA repeats (TA)₆>(TA)₇ in the UGT1A1 gene as examples, the problems were well solved by optimizing PCR conditions, changing the dispensing order of dNTPs and setting up external standards, respectively; the accuracy of SNP genotyping by pyrosequencing was improved significantly. **Results:** The amplification specificity of the VKORC1 gene was greatly improved by increasing the annealing temperature in PCR, and the intensities of non-specific signal peaks in pyrograms were thus reduced. By optimizing the dispensing order of dNTPs, accurate genotypes of the 636 G>A locus in the CYP2C19 gene were simply achieved by observing the existence of signal peaks instead of comparing the relative intensities of peaks. The genotyping accuracy of the TA repeats (TA)₆>(TA)₇ polymorphism in the UGT1A1 gene was improved by comparing the pyrogram of a sample with that of each external standard, whose genotype was known in advance. **Conclusions:** In this article, the solutions proposed to solve the problems frequently occurring in pyrosequencing for detecting SNPs are not only easy and cost-effective, but also reliable in clinical applications.

Key words: Pyrosequencing; PCR; Single nucleotide polymorphism

Chinese Library Classification: Q78,R914 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)12-2219-05

前言

焦磷酸测序技术^[1-7]是在 DNA 聚合酶、三磷酸腺苷硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶 4 种酶的协同作用下,通过对 DNA 延伸过程中释放的焦磷酸的实时检测,进行 DNA 碱基序列测定的技术。该技术在 DNA 序列分析时无需电

泳或荧光标记,定量性能好,适用于短序列的测定^[1-4],因此被广泛应用于单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP)分型^[8-11]。但是,在应用焦测序技术检测 SNP 时,有时存在分型结果不准确的问题。例如,本课题组在检测华法林个体化用药相关标志物 VKORC1 基因 1639 G>A 位点(rs9923231)^[12-14]时,存在非特异性信号峰干扰分型结果判断的现象;在检测氯

* 基金项目:国家自然科学基金项目(21005088);江苏省科技支撑计划社会发展项目(BE2010604, BE2012744);

中国博士后科学基金资助项目(2012M512179, 2013T60962)

作者简介:李思勤(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:药物基因组学、分子诊断,电话:15952050822, E-mail: siqincat@163.com

Δ 通讯作者:周国华, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

(收稿日期:2013-12-25 接受日期:2014-01-28)

吡咯雷个体化用药相关标志物 CYP2C19 基因 636 G>A 位点 (rs4986893)^[15,16]时,因同质区信号峰强度与碱基数不成比例而难以判断分型结果;在测定伊立替康个体化用药相关标志物 UGT1A1 基因 TA 重复序列(TA)₆>(TA)₇(rs8175347)^[17-19]时,因背景信号较高而导致分型判断困难。为了得到准确的 SNP 检测结果,针对上述问题,分别采取了优化 PCR 条件、改变焦测序 dNTP 加入顺序、设立外标校正等不同的解决方法,均获得了准确的分型结果,有效解决了焦测序在 SNP 检测中存在的问题,显著提高了分型结果的准确性,为指导临床合理用药提供了可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

EDC-810 型基因扩增仪(东胜创新生物科技有限公司);小型焦磷酸测序仪(日本 Hitachi 公司)。Taq DNA 聚合酶、10× PCR Buffer (Mg²⁺ free)、MgCl₂ (25 mmol/L)、500 bp DNA Ladder

marker 购自大连 TaKaRa 公司;dNTPs (10 mmol/L)购自南京百斯凯科技有限公司;琼脂糖微球(Sepharose Beads)购自美国 GE Healthcare 公司;聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone, PVP)、D- 荧光素 (D-Luciferin)、QuantiLum 重组荧光素酶 (Luciferase)购自美国 Promega 公司;三磷酸腺苷双磷酸酶-VII (Apyrase-VII)、5'-磷酸化硫酸腺苷(Adenosine 5'-phosphosulfate, APS)、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)购自美国 Sigma 公司;α-硫代脱氧腺苷三磷酸(Deoxyadenosine alpha-thio 5'-triphosphate, dATP_αS)、dCTP、dGTP、dTTP 购自美国 MyChem 公司;ATP 硫酸化酶(ATP-sulfurylase)、单链结合蛋白(Single-stranded binding protein, SSBP)和 Klenow 聚合酶为实验室自表达;其它试剂均为分析纯;实验室用水均为灭菌双蒸水。实验用 EDTA 抗凝血样本由南京军区南京总医院提供。

所有引物由上海 Invitrogen 公司合成,具体引物名称及序列见表 1。

表 1 扩增及测序引物

Table 1 Primers for amplification and sequencing

Polymorphism	Primer name	Primer sequence, 5'→3'
VKORC1, 1639 G>A	VK-BiotinForward	Bio-AGGGAAATATCACAGACGCCA
	VK-Reverse	AGTGATCCACCCACCTCGG
	VK-Sequencing	GGCGTGAGCCACCGCACC
CYP2C19, 636 G>A	CYP2C19-Forward	TGCAATGTGATCTGCTCCATTAT
	CYP2C19-BiotinReverse	Bio-AGCAAAAACTTGGCCTTACCTG
	CYP2C19-Sequencing	TGTAAGCACCCCTG
UGT1A1, TA repeats (TA) ₆ >(TA) ₇	UGT-BiotinForward	Bio-AGTGAAGTCCCTGCTACCTTTGTG
	UGT-Reverse	TCCACTGGGATCAACAGTATCTTC
	UGT-Sequencing	GTTCGCCCTCTCCTACTTATAT

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取 650 L 外周 EDTA 抗凝血,采用酚-氯仿法^[20]提取基因组 DNA,最终溶于 40 μL 1× TE 缓冲液,紫外测定其浓度。

1.2.2 PCR PCR 体系包括:1× PCR buffer (50 mmol/L KCl; 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3)、MgCl₂ 1.5 mmol/L、dNTPs 200 μmol/L、上下游引物各 0.4 μmol/L、Taq DNA 聚合酶 1.25 U,模板 1 μL,加水补充至 50 μL。PCR 程序:94 ℃,预变性 5 min;94 ℃,30 s,55 ℃,30 s,72 ℃,30 s,35 个扩增循环;72 ℃,延伸 7 min。

1.2.3 单链 DNA 模板制备 取 5 μL Sepharose Beads 加入至 40~50 μL PCR 产物中,使 Beads 与 Biotin 标记的 PCR 产物充分结合后,用 0.1 mol/L NaOH 使 PCR 产物双链变性解链。在制备好的固相单链中,加入测序引物退火(退火程序:94 ℃,30 s;55 ℃,3 min),制备测序模板。

1.2.4 焦测序 将制备好的单链模板加入测序反应混合液,再依次加入 dATP_αS、dCTP、dGTP 和 dTTP 进行测序反应。焦测序反应混合液组成:0.1 mol/L Tris-HAc (pH 7.7),2 mmol/L EDTA,10 mmol/L Mg (Ac)₂,0.1% BSA,1 mmol/L DTT,2 μmol/L APS,0.4 g/L PVP,0.4 mmol/L D-Luciferin,2 μmol/L ATP-sul-

furyase,1.6 U/mL Apyrase-VII,18 U/mL Klenow 聚合酶,43.2 mg/mL Luciferase。

2 结果与分析

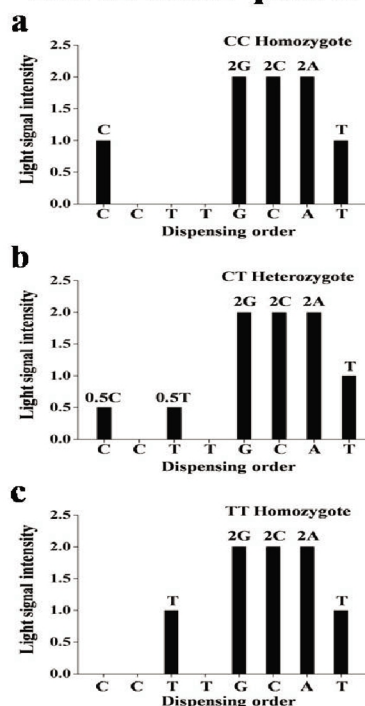
2.1 非特异性信号峰的消除

利用焦测序法对华法林个体化用药相关标志物 VKORC1 基因 1639 G>A 位点进行分型时,由于测序图谱中非特异性信号峰的存在(图 1d 中箭头所示信号峰;d 为对 1 例样本采用 55℃ 退火温度扩增后测序所得的焦测序图,为了证明箭头所指峰非 dCTP 背景产生,测序时 dCTP 连续加入了两次,第 2 次加入的 dCTP 用来估计背景信号值),导致 SNP 分型难于判断。为了寻找非特异性峰的来源,将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,发现扩增产物中含有非特异性扩增条带(图 2,泳道 1;图 2 中右面箭头所示为目的产物的条带位置,目的产物片段大小为 173bp),因此推测非特异性信号峰是由非特异性扩增产物造成的。通常,非特异性扩增可能是由 PCR 退火温度低所导致。因此,为了消除非特异性扩增,从提高退火温度方面对扩增条件进行了优化,对该例样本分别选取 55℃、60℃ 及 65℃ 作为退火温度进行 PCR 扩增,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳结果如图 2 所示。从结果可知,非特异性扩增条带随退火温度的提高而显著减少。为了得到单一的扩增产物,对该样本采用

65℃ 作为退火温度进行扩增,扩增产物进行焦磷酸测序,测序结果如图 1e 所示,非特异性信号峰明显降低(图 1e 中箭头所

示峰),测得序列与 TT 纯合型理论图谱(图 1 中的 a,b,c 中的 c)一致,故该样本可判断为 TT 纯合型。

Theoretical patterns



Observed pyrograms

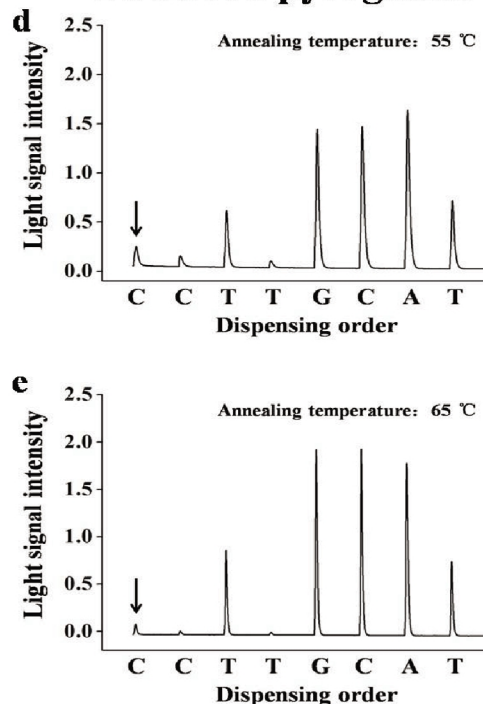


图 1 VKORC1 基因 1639 G>A 位点的理论焦测序图谱(a, b, c)和实际焦测序结果(d, e)

Fig.1 The theoretical patterns (a, b, c) and observed pyrograms (d, e) for genotyping the 1639 G>A locus in the VKORC1 gene

The sequence to be analyzed is underlined in *GGCGTGAGCCACCGACCC**[C/T]**GGCCAAT*, and the sequence of the sequencing primer is in italic.

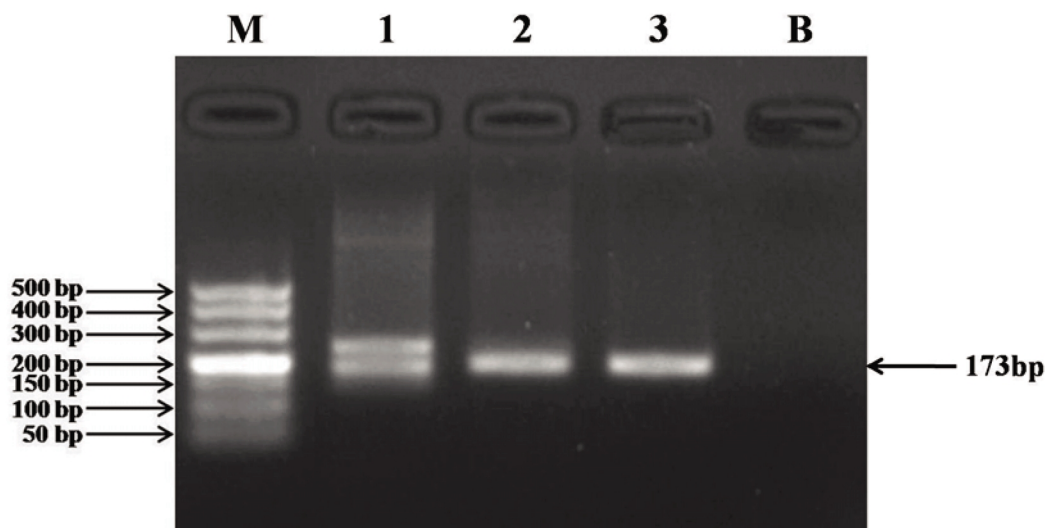


图 2 VKORC1 基因 1639 G>A 位点扩增条件考察琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis for investigating amplification conditions of the 1639 G>A locus in the VKORC1 gene

Lane M: DNA markers; lane 1: annealing temperature 55℃; lane 2: annealing temperature 60℃; lane 3: annealing temperature 65℃; lane B: blank control. The size of the target amplicon is 173 bp.

2.2 同质区焦测序的策略

利用焦测序对氯吡格雷个体化用药相关标志物 CYP2C19 基因 636 G>A 位点分型检测时,发现 SNP 位点处存在同质区,当按常规测序时先加入 dGTP 再加入 dATP α S 的顺序(GAT)进行测序时,对于 GG 纯合型、GA 杂合型、AA 纯合型模板所

得到的理论测序图谱分别如图 3 中的 a,b,c 所示,除 AA 纯合型模板可通过 G 信号的有无来判断外,GG 纯合型与 GA 杂合型模板均需通过判断碱基的峰高比来确定基因型。当测序体系不稳定造成信号峰比例异常时,就难以准确测定该位点的基因型,如图 3g 中箭头所示信号峰峰高比 G:A 为 1:1.74,比例介

于 GG 纯合型理论比值 1:1(图 3a)和 GA 杂合型理论比值 1:3(即 0.5:1.5,图 3b)之间,SNP 分型难于判断。为了准确测定该位点的基因型,我们改变测序时 dNTP 的加入顺序,即以 AT-GAT 的顺序测序,对于 3 种基因型的模板,所得到的理论测序信号峰如图 3 中的 d,e,f 所示,GG 纯合型模板无 A 和 T 碱基的信号峰,AA 纯合型模板无 G 及其后碱基的信号峰,而 GA

杂合型模板每个碱基都会有信号峰。这样,通过判断信号峰有无即可对该位点的基因型进行准确测定,而无需通过定量测定信号峰比例来判定,使基因分型结果更加准确直观。改变 dNTP 加入顺序后,对 2 例实际样本的测序结果如图 3 中的 h 和 i 所示,分别与理论图谱 d 和 e 一致,因此可判断 h 中的样本为 GG 纯合型,i 中的样本为 GA 杂合型。

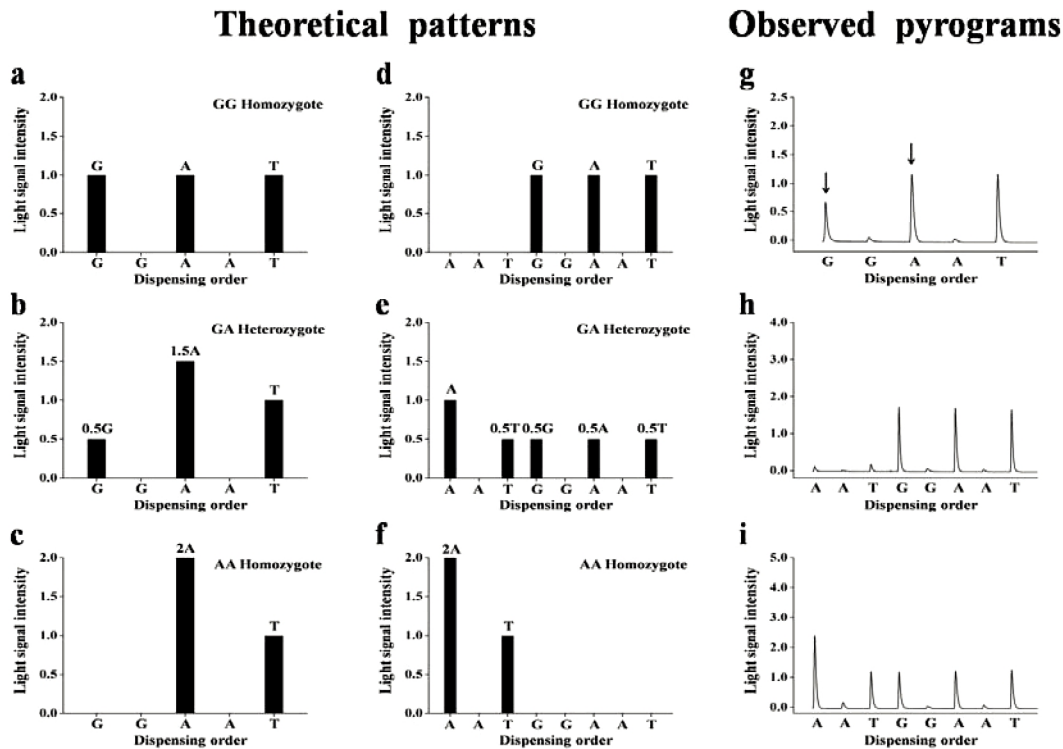


图 3 采用不同碱基加入顺序测定 CYP2C19 基因 636 G>A 位点的理论焦测序图谱(a, b, c; d, e, f)和实际焦测序结果(g; h, i)

Fig.3 The theoretical patterns (a, b, c; d, e, f) and observed pyrograms (g; h, i) for genotyping the 636 G>A locus in the CYP2C19 gene through different dispensing orders of dNTPs

The sequence to be analyzed is underlined in *TGTAAGCACCCCTG*[G/A]*ATCCA*, and the sequence of the sequencing primer is in italic

2.3 模板重复序列测定不准确的解决方法

利用焦测序测定伊立替康个体化用药相关标志物 UGT1A1 基因中 TA 重复序列(TA)₆-(TA)₇时,需要通过循环重复加入 dATPα S 与 dTTP,测定 AT 重复个数来判断该位点的基因型。其理论测序图谱如图 4 中的 a,b,c 所示,在第 6 次加入 AT 时(为监测 dNTP 背景信号值而连续加入的相同碱基不计),(TA)₆/(TA)₆ 纯合型样本应产生本底信号(图 4a 中箭头所示信号峰峰高比 A:T 为 0:1),(TA)₆/(TA)₇ 杂合型样本应产生比之前 AT 信号峰高度减半的信号(图 4b 中箭头所示信号峰峰高比 A:T 为 0.5:1),而(TA)₇/(TA)₇ 纯合型样本应产生与之前 AT 信号峰高度一致的信号(图 4c 中箭头所示信号峰峰高比 A:T 为 1:1)。然而,在实际测定时,常会因反应体系延伸不完全造成 A 和 T 背景信号累加,导致第 6 次加入 AT 时产生较理论信号值偏高的信号,干扰对分型结果的判断。为了解决该问题,我们采取了平行测定已知不同基因型的外标样本的方法,通过比较待测样本焦测序图谱与不同基因型的外标样本焦测序图谱中相关信号峰的比例,来确定待测样本的基因型。图 4 中的 d,e,f 分别为对(TA)₆/(TA)₆ 纯合型外标样本、(TA)₆/(TA)₇ 杂合型外标样本及 1 例待测样本平行扩增并测序后所得到的

焦测序图,虚线所示处分别为各自图中箭头所示 T 信号峰高度的一半所在位置。图 4 的 d,e 中,由于延伸测序过程中 AT 背景信号的积累,当加入第 6 个 A 时,(TA)₆/(TA)₆ 纯合型外标样本产生了高于背景信号值的信号,该信号与前 1 个 T 信号(图 4d 中箭头所示 A 和 T)的峰高比为 0.20:1,而非理论上的 0:1;而(TA)₆/(TA)₇ 杂合型外标样本第 6 个 A 与前 1 个 T(图 4e 中箭头所示 A 和 T)的信号峰高比为 0.52:1,略高于理论比值 0.5:1。图 4f 中,第 6 个 A 与前 1 个 T(图 4f 中箭头所示 A 和 T)的信号峰高比为 0.51:1,与 2 例外标样本的测序图谱中相关信号峰的比例对比后,可判断图 4f 中待测样本的基因型为 (TA)₆/(TA)₇ 杂合型。

3 讨论

焦磷酸测序技术是检测 SNP 最为准确的方法之一,然而,目的片段扩增的特异性、待测位点附近序列的复杂性以及测序体系延伸效率的差异性等因素均会对 SNP 测定结果的准确性造成影响。本课题组在利用焦测序对 VKORC1 基因 1639 G>A 位点、CYP2C19 基因 636 G>A 位点及 UGT1A1 基因 TA 重复序列 (TA)₆-(TA)₇ 进行多态性分型时,发现由于目的片段

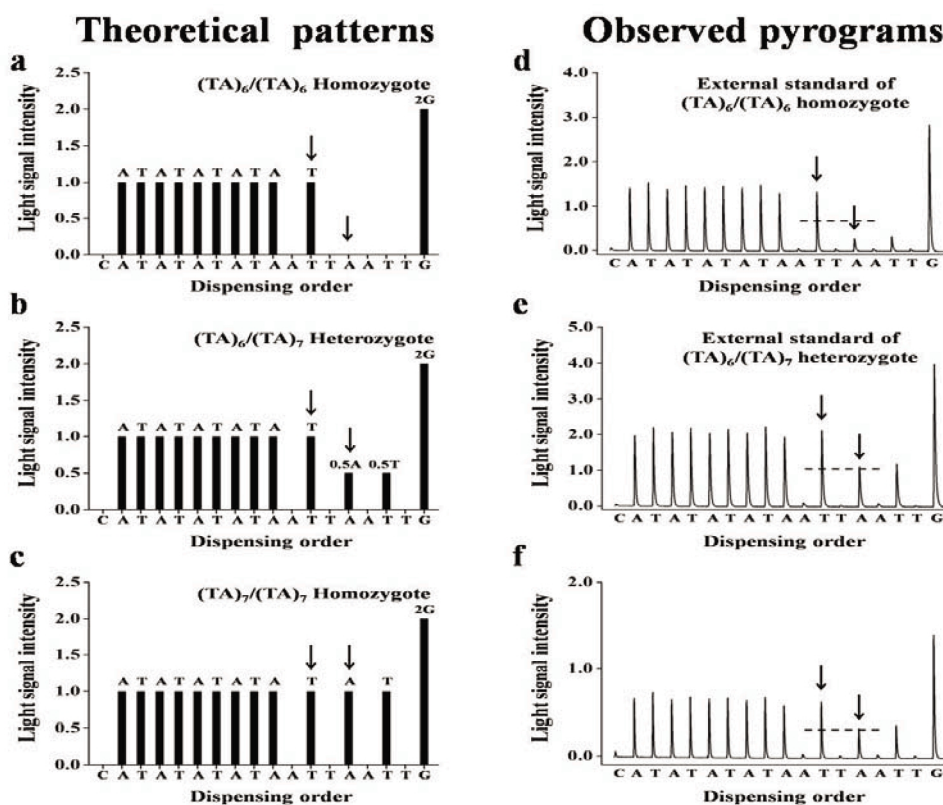


图4 UGT1A1 基因 TA 重复序列 $(TA)_6/(TA)_7$ 的理论焦测序图谱 (a, b, c) 和实际焦测序结果 (d, e, f)

Fig.4 The theoretical patterns (a, b, c) and observed pyrograms (d, e, f) for genotyping the TA repeats $(TA)_6/(TA)_7$ in the UGT1A1 gene

The sequence to be analyzed is underlined in *GTTCGCCCTCTCTACTTATATATATATATA[TA]TGG*, and the sequence of the sequencing primer is in italic

扩增特异性差、待测位点处存在同质区以及重复序列后多态性位点处背景信号升高等问题使上述 3 个位点的分型结果难以判断。利用焦测序对 VKORC1 基因 1639 G>A 位点分型时,通过提高 PCR 退火温度至 65℃,可提高 PCR 扩增特异性,使扩增产物条带单一,减少非特异性扩增产物,从而消除了焦测序图谱中非特异性信号峰的干扰,提高了焦测序对该位点测定的准确性;利用焦测序对 CYP2C19 基因 636 G>A 位点分型时,通过改变测序时 dNTP 的加入顺序,该位点的准确分型结果可通过判断测序图谱中相关信号峰的高低而简单获得,避免了定量判定信号峰比例,使基因分型结果更加准确直观;利用焦测序对 UGT1A1 基因中 TA 重复序列 $(TA)_6/(TA)_7$ 进行分型时,通过平行测定已知基因型的外标样本,依据外标样本测序图谱中相关信号峰的高度比例来辅助判断待测样本的基因型,可使重复序列的测定结果更加准确可靠。因此,在利用焦测序进行 SNP 测定时,首先,要确保扩增片段的特异性,以保证测序结果中不出现非特异性信号峰;其次,需要仔细分析待测位点附近序列,合理设计 dNTP 加入顺序,避免通过不易区分的信号峰高度比例来进行 SNP 分型判断;此外,在对重复序列多态性进行分型时,要充分考虑 dNTP 的延伸效率,可通过平行测定已知基因型的外标样本作为参照来辅助判断未知样本的基因型。本文就利用焦测序技术对 SNP 测定时遇到的 3 类常见问题提出了相应的解决方法,有效提高了上述 3 个与个体化用药相关 SNP 位点的分型准确性,为临床更好地应用焦测序技术进行 SNP 检测提供了参考。

参考文献 (References)

- [1] Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing [J]. Genome Res, 2001, 11(1): 3-11
- [2] Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing [J]. Genome Res, 2005, 15(12): 1767-1776
- [3] Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future [J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1-2): 83-94
- [4] 陈之遥, 周国华. 焦测序技术的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(8): 1573-1576
- [5] Chen Zhi-yao, Zhou Guo-hua. Advances in pyrosequencing [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(8): 1573-1576
- [6] Song QX, Wu HP, Feng F, et al. Pyrosequencing on Nicked dsDNA Generated by Nicking Endonucleases [J]. Anal Chem, 2010, 82(5): 2074-2081
- [7] Wu HP, Wu WJ, Chen ZY, et al. Highly Sensitive Pyrosequencing Based on the Capture of Free Adenosine 5' Phosphosulfate with Adenosine Triphosphate Sulfurylase [J]. Anal Chem, 2011, 83(9): 3600-3605
- [8] Chen ZY, Fu XY, Zhang XD, et al. Pyrosequencing-based barcodes for a dye-free multiplex bioassay [J]. Chem Commun, 2012, 48(18): 2445-2447
- [9] Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing [J]. Anal Biochem, 2000, 280(1): 103-110

- Rb2/p130[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2889-2894
- [7] Shi L, Cheng Z, Zhang J, et al. The mechanism of apoptosis in human U87 glioma cells induced by miR -21 antisense oligonucleotide [J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2008, 25(5): 497-501
- [8] Garzon R, Croce C M. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis[J]. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15(4): 352-358
- [9] Cohen E E, Zhu H, Lingen M W, et al. A feed-forward loop involving protein kinase Calpha and microRNAs regulates tumor cell cycle[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 65-74
- [10] Nie J, Liu L, Zheng W, et al. microRNA-365, down-regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting Cyclin D1 and Bcl-2[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 220-225
- [11] Lu J, Getz EA, Miska E, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838
- [12] Hammond S M. MicroRNAs as oncogenes[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16(1): 4-9
- [13] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065-7070
- [14] 姜飞洲, 万小平, 陈晓悦, 等. MiR-125b 在肿瘤发生发展中作用的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(8): 1570-1572
- Jiang Fei-zhou, Wan Xiao-ping, Chen Xiao-yue, et al. Research Progress in Functions of MiR-125b in Tumors[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2010, 10(8): 1570-1572
- [15] Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(7): 862-876
- [16] Xia HF, He Tz, Liu CM, et al. MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human gloma cells by targeting Bmf Cell [J]. *Physiol Biochem*, 2009, 23(4-6): 347-358
- [17] BrianjH, Smasiddhi B, Dawn D, et al. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral Cancer Cells Contributes to Malignacy [J]. *Genes Chrom Cancer*, 2009, 48(7): 569-582
- [18] Shi XB, Xue L, Ma AH, et al. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes [J]. *Prostate*, 2011, 71(5): 538-549
- [19] Ghose J, Sinha M, Das E, et al. Regulation of miR-146a by RelA/NFkB and p53 in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells, a cell model of Huntington's disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23837
- [20] Lin KY, Zhang XJ, Feng DD, et al. miR-125b, a Target of CDX2, Regulates Cell Differentiation through Repression of the Core Binding Factor in Hematopoietic Malignancies[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(44): 38253-38263

(上接第 2223 页)

- [9] Nordfors L, Jansson M, Sandberg G, et al. Large-scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by Pyrosequencing™ and validation against the 5' nuclease (Taqman) assay [J]. *Hum Mutat*, 2002, 19(4): 395-401
- [10] 刘云龙, 陈之遥, 周国华, 等. 全血直接扩增结合焦磷酸测序法测定亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性 [J]. *分析化学*, 2012, 40(7): 1037-1042
- Liu Yun-long, Chen Zhi-yao, Zhou Guo-hua, et al. Genotyping of methylenetetrahydrofolate reductase gene by pyrosequencing coupled with polymerase chain reaction using human whole blood as starting material[J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(7): 1037-1042
- [11] Ye H, Wu HP, Huang H, et al. Prenatal diagnosis of trisomy 21 by quantitatively pyrosequencing heterozygotes using amniotic fluid as starting material of PCR[J]. *Analyst*, 2013, 138(8): 2443-2448
- [12] Klein TE, Altman RB, Eriksson N, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(8): 753-764
- [13] Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, et al. A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing (CoumaGen-II) [J]. *Circulation*, 2012, 125(16): 1997-2005
- [14] Yang J, Chen Y, Li X, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 genotypes on the risk of hemorrhagic complications in warfarin-treated patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 4234-4243
- [15] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(4): 363-375
- [16] Jeong YH, Tantry US, Kim IS, et al. Effect of CYP2C19*2 and *3 loss-of-function alleles on platelet reactivity and adverse clinical events in East Asian acute myocardial infarction survivors treated with clopidogrel and aspirin [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011, 4(6): 585-594
- [17] Ando Y, Saka H, Ando M, et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(24): 6921-6926
- [18] Iyer L, Das S, Janisch L, et al. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity [J]. *Pharmacogenomics J*, 2002, 2(1): 43-47
- [19] Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, et al. Relevance of Different UGT1A1 Polymorphisms in Irinotecan-Induced Toxicity A Molecular and Clinical Study of 75 Patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5151-5159
- [20] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 463-471