

· 论 著 ·

Tetra-primer ARMS PCR 检测丙型肝炎患者 IL-28B rs12979860 基因多态性*

姜树朋¹, 戴 锴², 乔 斌¹, 童永清¹, 李 艳^{1△}

(武汉大学人民医院:1. 检验医学中心;2. 感染性疾病科, 武汉 430060)

摘要:目的 评价四引物扩增受阻突变体系聚合酶链反应(Tetra-primer ARMS PCR)检测 IL-28B rs12979860 基因多态性在丙型肝炎患者抗病毒治疗中的应用。**方法** 选取 2015 年 5 月至 2016 年 7 月就诊的慢性丙型肝炎患者 275 例,提取外周血 DNA,建立 Tetra-primer ARMS PCR 检测体系,与 Sanger 测序法对比验证,检测该地区丙型肝炎患者 IL-28B rs12979860 基因多态性分布情况。**结果** Tetra-primer ARMS PCR 检测体系成功建立,与 Sanger 测序法的符合率 100%,rs12979860 基因的 C/C 型、C/T 型和 T/T 型的分布频率分别为 86.5%、12.0%、1.5%。在 C/C 型组与 C/T 或 T/T 型组中,年龄分布、性别分布、HCV 基因 1b 型比例差异均无统计学意义($P>0.05$);患者肝硬化比例和持续病毒学应答比例比较差异有统计学意义($P<0.05$),在 C/T 或 T/T 组中肝硬化比例较高,在 C/C 组中持续病毒学应答比例较高。**结论** 该研究建立的 Tetra-primer ARMS PCR 技术是一种操作简单、成本低廉、快速有效的基因多态性检测方法,对于丙型肝炎患者 IL-28B rs12979860 基因多态性基因分型具有很好的临床应用价值。

关键词:丙型肝炎; 四引物扩增受阻突变体系聚合酶链反应; IL-28B; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.002 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)12-1686-04

Tetra-primer ARMS PCR for detecting polymorphisms of IL-28B gene rs12979860 in patients with hepatitis C*

JIANG Shupeng¹, DAI Kai², QIAO Bin¹, TONG Yongqing¹, LI Yan^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Infectious Disease, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the application of tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (Tetra-primer ARMS PCR) for detecting IL-28B rs12979860 gene polymorphism in the patients with hepatitis C. **Methods** Two hundreds and seventy-five patients with chronic hepatitis C in our hospital from May 2015 to July 2016 were selected and their peripheral blood DNA was extracted. The detection system of Tetra-primer ARMS PCR was established, which was compared with the Sanger sequencing. Then this technique was used to detect IL-28B rs12979860 gene polymorphism in the patients with hepatitis C in this area. **Results** The detection system of Tetra-primer ARMS PCR was successfully established with a consistent rate of 100% with the Sanger sequencing. The distribution frequencies of C/C, C/T and T/T of IL-28B rs12979860 gene were 86.5%, 12.0% and 1.5% respectively. The age distribution, gender distribution and HCV genotype 1b ratio had no statistically significant difference ($P>0.05$), however, the rate of patients with liver cirrhosis has a statistical difference between the genotype C/C group with the genotype T/T group or genotype C/T group ($P<0.05$); while the proportion of liver cirrhosis and sustained virological response had the statistical difference ($P<0.05$), the proportion of liver cirrhosis in the genotype C/T group or T/T group was higher, and the proportion of sustained virological response in the genotype C/C group was higher. **Conclusion** The Tetra-primer ARMS PCR technique established by this research is simple to operate, low-cost, fast and effective detection method of gene polymorphism, which has a better clinical application value in the genotyping of IL-28B rs12979860 gene polymorphism in the patients with hepatitis C.

Key words: hepatitis C; Tetra-primer ARMS PCR; IL-28B; single nucleotide polymorphism

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种肝脏疾病,呈全球性流行,全球有 1.3 亿~1.5 亿人感染 HCV,严重危害人类健康^[1]。众多研究证实,在接受联合利巴韦林治疗的丙型肝炎患者中,白细胞介素(IL)-28B rs12979860 基因多态性与抗病毒治疗效果有关,IL-28B C/C 基因型患者治疗获得的持续病毒学应答(SVR)比例高于 C/T 和 T/T 基因型患者^[2-5]。因此,检测 IL-28B rs12979860 基因多态性有利于丙型肝炎患者抗病毒治疗。四引物扩增受阻突变体系聚合酶链反应(Tetra-primer ARMS, PCR)是一种在聚合酶链反应(PCR)

基础上发展起来用于检测基因多态性的简易方法。本研究通过建立 Tetra-primer ARMS PCR 检测体系,进行 IL-28B rs12979860 基因分型,以便为临床丙型肝炎抗病毒个性化治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 5 月至 2016 年 7 月于本院就诊的慢性丙型肝炎患者 275 例,其中男 140 例,女 135 例,入选患者均符合我国 2015 年版《丙型肝炎防治指南》的诊断标准。

1.2 试剂与仪器 本研究所用主要试剂为血液基因组提取试

* 基金项目:国家重点临床专科建设项目(财社[2010]305号)。

作者简介:姜树朋,男,技师,主要从事个体化医疗与分子诊断研究。△ 通信作者,E-mail:yanlif1120@163.com。

剂盒(中国天根公司), 2×Taq PCR Master Mix (中国莱枫公司), DL1000 DNA Marker(日本 Takara 公司), DNA 凝胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司), BigDye v3.1 测序反应试剂盒(美国 ABI 公司); 主要仪器为 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司), Bio-Rad T100 型梯度 PCR 仪(美国伯乐公司), G:BOX F3 凝胶成像系统(英国 Syngene 公司), ABI 3500DX 基因测序仪(美国 ABI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 采集患者乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂) 抗凝血 2 mL, 按照试剂盒说明书进行基因组 DNA 提取, 并使用 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计测定患者标本 DNA 浓度和光密度(A)260/280 值, 确保 DNA 提取质量。

1.3.2 扩增原理 Tetra-primer ARMS PCR 是一种在 PCR 基础上发展起来用于检测基因多态性的方法, 如图 1, 其基本原理是在已知单核苷酸多态性(SNP)位点设计 2 条延伸方向相反的内引物(细虚线所示)和 2 条外引物(细实线所示), 这 4 条引物在同一 PCR 管中进行扩增反应^[6]。在 PCR 完成后, 通过凝胶电泳就可以检测出患者的基因型, 即两个特异性片段分别代表 C/C 和 T/T 纯合基因型, 同时出现两个特异性片段带代表 C/T 杂合基因型, 非特异性片段(即两条外引物扩增片

段)可作为阳性对照, 提高检测的准确性。

在 ARMS PCR 中, 为了增加扩增特异性, 通常在引物 3' 末端的第 3 位碱基引入一个错配碱基, 引物在与其互补当 3' 末端是强错配(A/G 或 C/T)时, 可以在引物中引入一个弱错配(C/A 或 G/T); 当 3' 端是中等错配(A/A、C/C、G/G 或 T/T)时, 可以在引物中再引入一个中等错配; 当 3' 端是弱错配时, 则需要在引物中引入一个强错配^[7]。

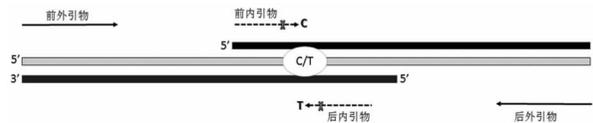


图 1 Tetra-primer ARMS PCR 原理模式图

1.3.3 引物设计 在 NCBI Genbank 中查找 IL-28B 基因序列, 采用 Oligo7.0 软件针对该基因 rs12979860 位点设计引物, Sanger 测序引物和 Tetra-primer ARMS PCR 引物见表 1, 其中 Sanger 测序目的片段长度为 309 bp; Tetra-primer ARMS PCR 中 C 等位基因扩增片段为 157 bp, T 等位基因扩增片段为 196 bp, 前后外引物扩增片段长度为 310 bp。

表 1 IL-28B 基因 rs12979860 位点 Sanger 测序和 Tetra-primer ARMS PCR 的引物信息

项目	引物名称	引物序列(5'-3')	引物长度(bp)
Sanger 测序	前引物 Fs	GCTTATCGCATACGGCTAGG	20
	后引物 Rs	TCTCTATGTCAGCGCCCA	19
Tetra-primer ARMS PCR	前内引物 F1	CAGGGAGCTCCCCGAAGG A GT	21
	后内引物 R2	AGTGCAATTCAACCCTGGT G CG	22
	前外引物 F3	GCTTATCGCATACGGCTAGGCC	22
	后外引物 R4	CTCTCTATGTCAGCGCCCA	21

注: F 为正向引物; R 为反向引物, 加粗部分为人为错配碱基。

1.3.4 Sanger 测序 使用 Fs 和 Rs 引物按下列条件进行 IL-28B 基因扩增: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。在 PCR 扩增产物凝胶电泳后, 将 PCR 扩增 DNA 条带进行胶回收、纯化, 用 Fs 引物对其进行测序反应, 然后在 ABI3500DX 测序仪上进行测序分析, 将测序结果与 Tetra-primer ARMS PCR 电泳结果进行比对。

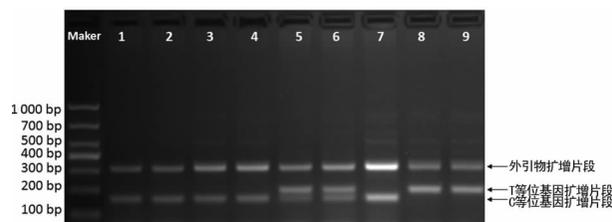
1.3.5 HCV 检测 患者血浆 HCV-RNA 检测采用高灵敏度荧光定量 PCR 检测, HCV 基因分型采用测序法检测。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析, 样本 Hardy-Weinberg 平衡分析采用 χ^2 检验, 计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用四格表 χ^2 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Tetra-primer ARMS PCR 检测体系建立 经过一系列优化, 确定反应体系(体积 20 μ L): 2×Taq PCR Master Mix 10.0 μ L, 引物 1.0 μ L(内外引物比例为 1 : 2, 浓度 10 μ mol/L), 模板 DNA 2.0 μ L(约 50 ng), dd H₂O 7.0 μ L。反应温控循环参数: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 35 次; 72 °C 末延伸 5 min, 4 °C 保存。反应结束, 取 10 μ L PCR 产物, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 Syngene G: BOX F3 凝胶成像系统拍照, 根据条带大小和有无进行基因分

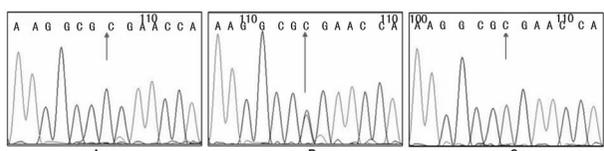
型, 结果如图 2 所示。



注: PCR 扩增片段从大到小依次为外引物扩增片段(310 bp)、T 等位基因扩增片段(196 bp)和 C 等位基因扩增片段(157 bp)。泳道 1、2、3、4、7 为 IL-28B C/C 型, 泳道 5 和 6 为 IL-28B C/T 型, 泳道 8 和 9 为 IL-28B T/T 型。

图 2 IL-28B rs12979860 基因多态性 Tetra-primer ARMS PCR 分型结果

2.2 Tetra-primer ARMS PCR 基因分型验证 IL-28B rs12979860 基因多态性 Sanger 测序法检测结果如图 3 所示。以 Sanger 测序法作为基因多态性检测金标准, 将 Tetra-primer ARMS PCR 法和测序法平行检测 60 例慢性丙型肝炎患者 rs12979860 基因分型结果进行比较, 在随机抽取的 60 例患者中, Tetra-primer ARMS PCR 法检测出 C/C 型 45 例, C/T 型 13 例, T/T 型 2 例, 与 Sanger 测序法的符合率 100%, 如表 2 所示。



注:箭头所指处为该 SNP 位点,其中图 A 为 CC 型,图 B 为 CT 型,图 C 为 TT 型。

图 3 IL-28B rs12979860 基因多态性 Sanger 测序结果

表 2 Tetra-primer ARMS PCR 和测序法平行检测 rs12979860 基因分型结果对比

基因型	检测标本数(n)		符合率 (%)
	Tetra-primer ARMS PCR	Sanger 测序	
IL-28B C/C 型	45	45	100
IL-28B C/T 型	13	13	100
IL-28B T/T 型	2	2	100
合计	60	60	100

2.3 丙型肝炎患者 IL-28B rs12979860 基因多态性 在 275 例丙型肝炎患者中,采用 Tetra-primer ARMS PCR 检出 238 例 C/C 型 238 例,占 86.5%;C/T 型 33 例,占 12.0%;T/T 型 4 例,占 1.5%。经 Hardy-Weinberg 平衡分析, $\chi^2 = 4.67, P = 0.10$,说明标本分布达到了 H-W 遗传平衡,具有群体代表性。患者 IL-28B rs12979860 基因分型特征分析如表 3 所示,在 C/C 型组与 C/T 或 T/T 型组中,年龄分布、性别分布、HCV 基因 1b 型比例差异均无统计学意义($P > 0.05$);患者肝硬化比例和持续病毒学应答比例比较差异有统计学意义($P < 0.05$),在 C/T 或 T/T 组中肝硬化比例较高,在 C/C 组中持续病毒学应答比例较高。

表 3 丙型肝炎患者 IL-28B rs12979860 基因分型特征分析

特征	IL-28B rs12979860		P
	C/C 型	C/T 或 T/T 型	
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	41.5 \pm 10.30	45 \pm 13.20	0.07
性别(男/女, n/n)	121/117	19/18	0.95
肝硬化[n(%)]	10(0.4)	6(1.6)	<0.01
基因 1b 型[n(%)]	200(84.0)	29(78.4)	0.39
SVR12[n(%)]	93(39.1)	7(18.9)	0.02

注:SVR12 为持续病毒学应答,指治疗结束后第 12 周患者 HCV RNA 不可测。

3 讨论

宿主遗传差异是 HCV 感染临床转归的一个重要因素,宿主 IL-28B 基因编码 IFN- $\lambda 3$,为 III 型干扰素。目前我国丙型肝炎治疗主流方案为聚乙二醇干扰素(PegIFN)- α 联合利巴韦林(RBV),即 PR 二联疗法。直接抗病毒药物尚未普及应用。多项研究表明,IL-28B rs12979860 与 HCV 自发清除能力及对干扰素的应答有关,rs12979860 C/C 型对干扰素抗病毒治疗应答较好,而 T/T 型或 C/T 型应答较差^[8-9]。2015 年中国《丙型肝炎防治指南》指出我国 HCV 感染者 IL-28B 基因型以 rs12979860 CC 为主(84.1%)^[10]。在本研究中,rs12979860 基因的 C/C 型、C/T 型和 T/T 型的分布频率分别为 86.5%、

12.0%、1.5%,表明本地区 rs12979860 C/C 型频率与全国平均水平相当;IL-28B C/C 型丙型肝炎患者第 12 周持续病毒学应答比例大于 IL-28B C/T 型或 T/T 型患者,与以往研究相符^[9,11];同时,发现 IL-28B C/T 型或 T/T 型患者发生肝硬化比例较高,这可能是 IL-28 T 等位基因携带者病毒自发清除能力和对干扰素的应答能力较差,加速了肝纤维化进程,导致发生肝硬化。因此,在丙型肝炎患者抗病毒治疗前,鉴定 IL-28B rs12979860 基因型有助于临床治疗方案的选择,如选择抗病毒药物种类和决定抗病毒治疗周期。

SNP 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性,变异频率不小于 1%,是基因组中最常见的变异形式。常见的 SNP 检测方法有限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)技术、等位基因特异扩增(ASA)、Tetra-primer ARMS PCR、Taqman 荧光探针法、高分辨率熔解曲线(HRM)分析和 Sanger 测序法等^[12-13]。PCR-RELP 在 PCR 完成后需要特异性内切酶消化切割 PCR 产物才能进行下一步的电泳,步骤较为繁琐,同时又增加了检测成本;ASA 虽然可以对 SNP 特异分型,但是,对于某基因单个位点至少需要双管反应才能进行 SNP 分型;Taqman 荧光探针法可以特异、快速、高效、自动化地实现 SNP 分型,但是由于探针的高费用,导致检测成本较高;HRM 只需设计 PCR 引物,采用饱和染料(如 EvaGreen)进行闭管 PCR 反应,无需序列特异性探针,亦不受突变碱基位点与类型的限制,完全是基于 DNA 的物理性质进行分析,但是对检测仪器平台的升降温速率及温度均一性要求较高,难以检测高 GC 含量 DNA 片段中的变异或多个位点同时变异。Sanger 测序是 SNP 分型的金标准,但是价格较贵,操作繁琐,检测周期长。在本研究采用 Tetra-primer ARMS PCR 检测技术,通过设计 4 条特异性引物进行 PCR、电泳,在 2.5 h 内可以实现单管 IL-28B rs12979860 基因分型,与 Sanger 测序金标准完全符合,表明 Tetra-primer ARMS PCR 可用于检测 rs12979860 基因型。与 PCR-RFLP 相比,本技术省去了限制性内切酶所需的消化时间及较高的费用,操作简单、价格低廉,在具备常规 PCR 条件的任何实验室都可以开展,易于推广。然而,技术也有其局限性,在本研究中,引物设计是决定 Tetra-primer ARMS PCR 检测基因多态性的灵敏性和准确性的基础和关键步骤,但是两条内引物设计受到 SNP 位点两侧碱基的限制,4 条引物须有相近的解链温度增加了引物设计的难度。同时该技术需要基于琼脂糖凝胶电泳分型,所以不适用于大规模一次性基因多态性检测。

总之,本研究建立的 Tetra-primer ARMS PCR 技术是一种操作简单、成本低廉、快速有效的基因多态性检测方法,对于丙型肝炎患者 IL-28B rs12979860 基因多态性基因分型具有很好的临床应用价值。

参考文献

[1] Omata M, Kanda T, Wei L, et al. APASL consensus statements and recommendation on treatment of hepatitis C [J]. Hepatol Int, 2016, 10(5):1-25.
 [2] Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus(下转第 1691 页)

人口为 330 962 人,占 48.29%;农场人口为 72 476 人,占 10.57%。在本次调查 25 032 例产妇中,来自市区、乡镇及农场者分别占 53.89%、42.30%及 3.81%,其 DS 儿发生率依次为 7.41/10 000、12.28/10 000 及 10.48/10 000,差异无统计学意义($P>0.05$)。而从不同职业分娩新生儿 DS 发生率调查结果看,工人、农民、无业者、职员及其他职业对应的发生率依次为 9.93/10 000、17.05/10 000、15.18/10 000、3.50/10 000 及 3.31/10 000,各发生率相比较差异有统计学意义($\chi^2=9.987$, $P<0.05$)。农民、无业者及工人分娩新生儿的 DS 发生率高于职员及其他职业,造成这一差异的原因是否与农民、无业者及工人较其他岗位的产妇更易忽视 DS 筛查和产前诊断有关,值得进一步深入调查研究。

DS 筛查及产前诊断技术早已被证明是降低 DS 出生率最有效的措施^[9],然而受经济条件、医疗水平及文化习俗等因素的影响,当前我国 DS 筛查在推广、实施过程中仍然面临诸多难题。据报道,我国 DS 筛查覆盖率在 2009—2011 年尚不足 25%^[10-11]。造成我国 DS 筛查覆盖率不高的原因很多,我们认为卫生主管部门对育龄期妇女优生优育知识宣传力度不足,造成孕妇对 DS 筛查及产前诊断缺乏了解,是重要因素之一。为此,我们建议当地卫生行政管理部门宜加大对本地区育龄期人群,尤其对农民、工人及无业人群的优生优育知识宣传力度,同时应力争将 DS 筛查列为政府统筹的免费检测项目,尽最大可能提高本地区 DS 筛查覆盖率。

参考文献

[1] Shin M, Besser LM, Kucik JE, et al. Prevalence of down syndrome among children and adolescents in 10 regions of the United States [J]. *Pediatrics*, 2009, 124 (6): 1565-1571.

[2] Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, et al. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2010, 52(6): 1888-1896.

[3] Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, et al. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy [J]. *Gut*, 2011, 60 (2): 261-267.

[4] Bochud PY, Bibert S, Negro F, et al. IL28B polymorphisms predict reduction of HCV RNA from the first day of therapy in chronic hepatitis C [J]. *J Hepatol*, 2011, 55 (5): 980-988.

[5] Vieira Medrano RF, De Oliveira CA. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR technique development [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(7): 599-608.

[6] 管峰,艾君涛,杨利国.一种 SNP 检测新方法:四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术 [J]. *生命的化学*, 2004, 24(6): 514-516.

[7] Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus

[2] Deng C, Yi L, Mu Y, et al. Recent trends in the birth prevalence of Down syndrome in China: impact of prenatal diagnosis and subsequent terminations [J]. *Prenat Diagn*, 2015, 35(4): 311-318.

[3] Ritvanen A, Lancaster P, Hausler M, et al. *World Atlas of Birth Defects* [M]. 2nd ed. Geneva: WHO, 2003: 151-153.

[4] Méndez-Rosado LA, Hechavarría-Estenez D, De La Torre ME, et al. Current status of prenatal diagnosis in Cuba: causes of low prevalence of Down syndrome [J]. *Prenat Diagn*, 2014, 34(11): 1049-1054.

[5] 李荔荔,刘冰,杨柳,等.沈阳市人群唐氏综合征儿发生状况流行病学调查 [J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(3): 417-418.

[6] 毕丽华,丁伟,柳洁.大连地区唐氏综合征发病率的调查研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(9): 33-35.

[7] 王莹,江陵,吴剑波,等.中山地区重大出生缺陷监控和干预措施的实施对降低唐氏综合征出生率的效果分析 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(12): 103-105.

[8] 王玉丰,羊轶驹,林玲,等.三亚地区新生儿唐氏综合征流行病学调查及相关发病因素研究 [J]. *重庆医学*, 2015, 44 (2): 235-236.

[9] 段嫦丽,潘丽,闵香.珠海市 21 三体综合征诊断情况分析 [J]. *广东医学*, 2012, 33(16): 2449-2451.

[10] 王和.唐氏综合征产前筛查的问题与对策 [J/CD]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2010, 6(6): 398-399.

[11] 中华人民共和国卫生部.中国出生缺陷防治报告(2012) [R].北京:中华人民共和国卫生部,2012.

(收稿日期:2017-01-18 修回日期:2017-04-01)

(上接第 1688 页)

[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(1): 120-129.

[2] Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(3): 692-701.

[3] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会.丙型肝炎防治指南(2015 更新版) [J]. *肝脏*, 2015, 20(12): 933-949, 1006.

[4] Antonio Montes-Cano M, Raul Garcia-Lozano J, Abad-Molina C, et al. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes [J]. *Hepatology*, 2010, 52(1): 33-37.

[5] Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007, 9 (1): 289-320.

[6] Miranzadeh-Mahabadi H, Miranzadeh-Mahabadi H, Nikpour P, et al. Comparison of TaqMan Real-Time and Tetra-Primer ARMS PCR techniques for genotyping of Rs 8066560 variant in children and adolescents with metabolic syndrome [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2015, 24(6): 951-955.

(收稿日期:2017-01-22 修回日期:2017-04-05)