

# 参照多重 PCR 片段分析法进行实时荧光 PCR 法对 ABCB1 三等位基因测定结果读取方法的确定

张 燕<sup>1,2\*</sup>, 蒙卓成<sup>1,2</sup>, 邢 欢<sup>2</sup>, 崔小花<sup>1,2</sup>, 杨 柳<sup>1,2</sup>, 郑 璇<sup>1,2</sup>, 戴尊孝<sup>1,2</sup>

(1. 西安市精神卫生中心, 陕西 西安 710100;

2. 西安市药学(精神卫生)重点实验室, 陕西 西安 710100

\*通信作者: 张 燕, E-mail: zy22661685@163.com)

**【摘要】** 目的 为解决实时荧光 PCR 法对三等位基因测定结果无法正常读取的问题, 通过参照多重 PCR 片段分析法, 确定实时荧光 PCR 法读取方法, 实现临床对 ABCB1 三等位基因准确、简便且价格低廉的检测。方法 收集西安市精神卫生中心 2020 年 3 月-2021 年 3 月 DNA 样本 2 794 例, 抽取 5% 作为实验样本, 分别进行实时荧光 PCR 法和多重 PCR 片段分析法测定。根据 PCR 曲线 Ct 值的比较以及多重 PCR 片段分析法碱基峰位强度的比较, 对比分析两种方法的判读结果, 对其中报告结果不相同的样本进行数据核查并确定 PCR 读取方法。结果 共抽取 139 例样本, 其中存在 120 例等位基因及 19 例三等位基因, 实时荧光 PCR 法和多重 PCR 片段分析法对等位基因的检测结果完全一致。根据多重 PCR 片段分析结果, 对 19 例三等位基因制定了实时荧光 PCR 法的读取方法: 扩增曲线图中, 当  $\|Ct_c - Ct_T| - |Ct_c - Ct_A| < 3$ , 分别读取两组碱基 Ct 值小的碱基, 将其组合形成判读结果; 当  $\|Ct_c - Ct_T| - |Ct_c - Ct_A| \geq 3$ , 读取两组碱基 Ct 值最小的碱基, 其纯合型即为判读结果。根据读取方法, 修正实时荧光 PCR 法的测定结果为: 1 例 G/G, 1 例 A/A, 4 例 T/G, 5 例 T/A, 8 例 T/T, 与多重 PCR 片段分析法结果一致。结论 通过多重 PCR 片段分析法制定实时荧光 PCR 法对 ABCB1 三等位基因的读取方法, 两者判读结果一致性良好。

**【关键词】** 实时荧光 PCR 法; 多重 PCR 片段分析; 三等位基因; ABCB1

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



微信扫码二维码

听独家语音释文

与作者在线交流

中图分类号: R749

文献标识码: A

doi: 10.11886/scjsws20210908004

## Interpretation of results obtained using real-time fluorescence PCR based on multiplex PCR fragment analysis for ABCB1 tri-allele

Zhang Yan<sup>1,2\*</sup>, Meng Zhuocheng<sup>1,2</sup>, Xing Huan<sup>2</sup>, Cui Xiaohua<sup>1,2</sup>, Yang Liu<sup>1,2</sup>, Zheng Xuan<sup>1,2</sup>, Dai Zunxiao<sup>1,2</sup>

(1. Xi'an Mental Health Center, Xi'an 710100, China;

2. Xi'an Key Laboratory of Pharmacy (Mental Health), Xi'an 710100, China

\*Corresponding author: Zhang Yan, E-mail: zy22661685@163.com)

**【Abstract】 Objective** To resolve the problems related to the abnormal interpretations of real-time fluorescence polymerase chain reaction (PCR) results for tri-allele, to formulate the interpretation methods of real-time fluorescence PCR by referring to multiplex PCR fragment analysis, so as to obtain an accurate, simple and cheap detection method for ABCB1 tri-allele. **Methods** A total of 2 794 DNA samples were collected from Xi'an Mental Health Center from March 2020 to March 2021, and 5% of which were selected as experiments. Real-time fluorescence PCR method and multiplex PCR fragment analysis method were performed respectively. According to the comparison of Ct values of PCR curves and the comparison of base peak intensity in multiplex PCR fragment analysis, comparison and analysis were conducted on the interpretation results of the two methods, and samples with different interpretation results were verified, thereafter, PCR interpretation method was formulated. **Results** A total of 139 samples were collected, of which 120 alleles and 19 tri-allele were detected. The results of allele detection by two methods were absolutely consistent. In combination with the results of multiplex PCR fragment analysis, a method for the interpretation of real-time fluorescence PCR for 19 cases of tri-allele was developed as follows: when  $\|Ct_c - Ct_T| - |Ct_c - Ct_A|$  in amplification curve was less than 3, the interpretation results were the combination of the base pairs with small Ct values; when  $\|Ct_c - Ct_T| - |Ct_c - Ct_A|$  was greater than or equal to 3, the interpretation results were homozygotes from the base pairs with minimum Ct values. According to the interpretation method, the results of real-time fluorescence PCR were revised, and it showed 1 case of G/G, 1 case of A/A, 4 cases of

T/G, 5 cases of T/A and 8 cases of T/T, which were consistent with the results of multiplex PCR fragment analysis. **Conclusion** Referring to the multiplex PCR fragment analysis method, the interpretation of ABCB1 tri-allele by real-time fluorescence PCR is developed, and the two interpretation methods are in good agreement.

**【Keywords】** Real-time fluorescence PCR; Multiplex PCR fragment analysis; Tri-allele; ABCB1

精神障碍是一种长期困扰患者的慢性疾病,治疗时需要药物在脑内发挥作用,但因为血脑屏障的存在,药物是难以进入脑内起到疗效的。ABCB1 是一种药物转运体<sup>[1-2]</sup>,它在人体大脑的毛细血管中广泛表达<sup>[3-4]</sup>,可以影响 p-糖蛋白活性<sup>[5]</sup>,而 p-糖蛋白存在于血脑屏障中,在控制血液和大脑之间的物质传递起着重要作用<sup>[6]</sup>,可以改变血脑屏障中挤压回血液中的药物数量<sup>[7-11]</sup>,影响药物浓度<sup>[12-14]</sup>,从而影响药物的疗效。本研究中的 ABCB1 转运体主要涉及抗精神病药物脑内转运等相关问题。ABCB1 转运体的基因突变会影响其转运功能<sup>[15-16]</sup>,使药物无法正常发挥疗效,其中 rs2032582 是研究最广泛的突变位点<sup>[17]</sup>,通常会存在三等位基因,本研究主要针对 rs2032582 位点的突变(C. 2677T>G),虽然三等位基因存在比例较低,但影响不容忽视。

实时荧光 PCR 法操作简单、人为误差小,是目前临床上的主流检测方法,对于等位基因的检测结果,实时荧光 PCR 法可准确判读。但由于 ABCB1 存在三等位基因,采用实时荧光 PCR 法会在结果读取方面存在一定困难。多重 PCR 片段分析可以得到整个序列的直接信息,具有较高的准确度,是直接有效检测基因突变的方法<sup>[18]</sup>,该方法具有测序精度高、测序长度长等特点;不足之处在于其成本高、通量低、耗时长<sup>[19]</sup>。故本研究采用多重 PCR 片段分析法作为对照方法,将实时荧光 PCR 法的结果读取方法进行明晰,以期实现临床对 ABCB1 三等位基因准确、简便且低廉的检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本

收集西安市精神卫生中心 2020 年 3 月-2021 年 3 月 ABCB1 样本 2 794 例,按照 *t* 检验中对样本数量的规定,在理想状态下,样本数多于 120,认为其具有正态分布特征,可以代表群体样本。根据 120 个样本在所收集的样本中占比接近 5%,且考虑到实验过程中误差或样本脱落,故按照 5% 的比例进行抽样,即抽取样本 139 例,认为此抽样方式能代表样本的分布情形。

### 1.2 试剂与仪器

Taq Man rs2032582 T 试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司);Taq Man rs2032582 A 试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司);SNPscanTM 分型试剂盒(苏州天昊生物科技有限公司);HI-DI(美国 ABI 公司);GeneScanTM-500(美国 ABI 公司)。

StepOne Plus 实时荧光 PCR 分析仪(赛默飞世尔科技有限公司);FR-110 紫外分析装置(上海复日科技有限公司);凝胶成像仪(上海复日科技有限公司);FR-250 电泳仪(上海复日科技有限公司);多用途水平电泳槽(北京百晶生物科技有限公司);BG-Power 300 电泳仪(北京百晶生物科技有限公司);BG-submix cell 电泳槽(北京百晶生物科技有限公司);2720 Thermal Cycler PCR 分析仪(美国 ABI 公司);Milli-Q Academic 超纯水仪(美国 Millipore 公司);ABI3730XL 测序仪(美国 ABI 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实时荧光 PCR 法

配制 10  $\mu$ L 反应体系,包括 Master Mix 5  $\mu$ L, DME assay Mix 0.25  $\mu$ L, 去离子水 3.75  $\mu$ L, DNA 样本 1  $\mu$ L<sup>[20]</sup>。上 PCR 仪,扩增程序为:60 $^{\circ}$ C、30 s、95 $^{\circ}$ C、10 min,进入扩增循环(95 $^{\circ}$ C、15 s、60 $^{\circ}$ C、1.5 min),循环 40 次,60 $^{\circ}$ C、30 s,反应结束,输出结果<sup>[21-23]</sup>。

#### 1.3.2 多重 PCR 片段分析法

样本扩增:配制 10  $\mu$ L 连接反应预混合液,包括 10 $\times$ Ligase Buffer 2  $\mu$ L, Ligase 0.5  $\mu$ L, Probe Mix 1  $\mu$ L, 去离子水 6.5  $\mu$ L。进行连接反应,在 1  $\mu$ L DNA 样本中加入 10  $\mu$ L 连接反应预混合液,轻微震荡混匀,3 000 r/min 离心 30 s,然后上 PCR 仪,94 $^{\circ}$ C、1 min,58 $^{\circ}$ C、4 min,循环 4 次,94 $^{\circ}$ C、2 min,最后降温至 72 $^{\circ}$ C 结束连接反应。

多重荧光 PCR 反应<sup>[24]</sup>:配制 20  $\mu$ L 反应体系,包括 2 $\times$ PCR Master Mix 10  $\mu$ L, Primer Mix I or II 1  $\mu$ L, 样本扩增溶液 1  $\mu$ L, 去离子水 8  $\mu$ L, 轻微震荡混匀,3 000 r/min 离心 30 s,然后上 PCR 仪,95 $^{\circ}$ C、2 min。第一次 PCR 反应:94 $^{\circ}$ C、20 s,62 $^{\circ}$ C、40 s,72 $^{\circ}$ C、1.5 min,循环 9 次。第二次 PCR 反应:94 $^{\circ}$ C、20 s,57 $^{\circ}$ C、40 s,

72°C、1.5 min, 循环 25 次, 68°C、60 min, 最后降温至 4°C 结束多重荧光 PCR 反应<sup>[25]</sup>。

片段测序: 将多重荧光 PCR 产物稀释 10 倍后, 取 1 μL 与 0.5 μL Liz 500 Size Standard、8.5 μL Hi-Di 混匀, 95°C、5 min, 上测序仪测定。

### 1.4 统计方法

实时荧光 PCR 的结果采用 StepOne Software v2.2.3 进行处理, 分别以循环数和荧光强度值的对数作为横纵坐标并绘制扩增曲线, 数据分析采用扩增曲线指数增长期对应的 Ct 值进行对比分析; 多重 PCR 片段分析的结果采用 GeneMapper 6 进行处理, 数据分析采用碱基峰位图中对应的研究峰位进行对比分析。

## 2 结 果

### 2.1 实时荧光 PCR 法与多重 PCR 片段分析法读取结果

139 例样本中, 包括 120 例等位基因及 19 例三等位基因。实时荧光 PCR 法与多重 PCR 片段分析法对 120 例等位基因样本的读取结果完全一致。两种方法对 19 例三等位基因样本的读取结果见表 1。

### 2.2 三等位基因读取结果的确定

采用实时荧光 PCR 法测定 19 例 ABCB1 三等位基因的结果, 以多重 PCR 片段分析结果作为对照

进行解读, 将 Ct 值 (PCR 扩增进入指数增长期所对应的循环数) 作为实时荧光 PCR 读取依据, 重新确定 ABCB1 三等位基因的分型结果。

表 1 实时荧光 PCR 法与多重 PCR 片段分析法对三等位基因分析结果

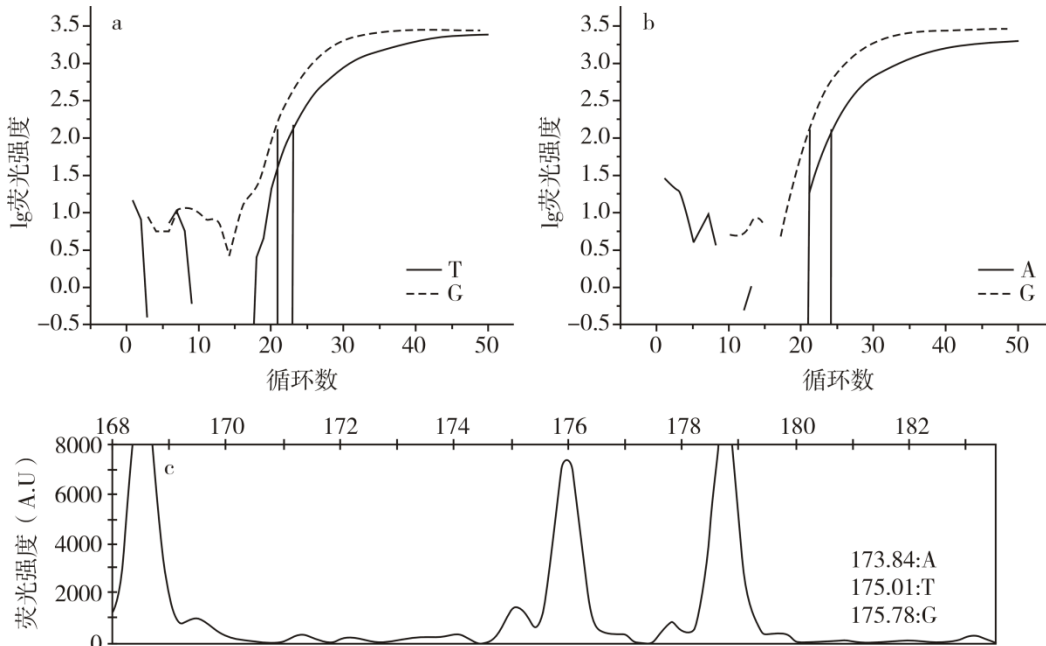
方 法	分 型	例数(%)
实时荧光 PCR 法	G/A/T	8(42.1)
	T/A/G	7(36.8)
	G/T/A	4(21.1)
多重 PCR 片段分析法	T/T	8(42.1)
	G/G	1(5.3)
	A/A	1(5.3)
	T/G	4(21.0)
	A/T	5(26.3)

#### 2.2.1 T/A/G 基因分型读取结果的确定

##### 2.2.1.1 T/A/G 基因分型判读为 G/G 型

图 1 中, 图 1a 中 G 碱基与 T 碱基 Ct 值分别为 21 和 23, 图 1b 中 G 碱基与 A 碱基 Ct 值分别为 21 和 24, Ct 值小的碱基含量高。图 1a  $\Delta Ct_a (|Ct_c - Ct_t|) = 2$ , 图 1b  $\Delta Ct_b (|Ct_c - Ct_a|) = 3$ , 两图  $\Delta Ct$  值的差值  $< 3$  ( $|\Delta Ct_a - \Delta Ct_b| = 1$ ), 故将图 1a 和图 1b 中含量高的碱基组合作为判读结果, 判读基因型为 G/G 型。

图 1c 中, 175.78 位置的 G 碱基峰远高于 175.01 位置的 T 碱基峰, 173.84 位置几乎没有 A 碱基峰, 故判读基因型为 G/G 型。



注: a、b 为荧光扩增曲线; c 为多重 PCR 片段分析峰图

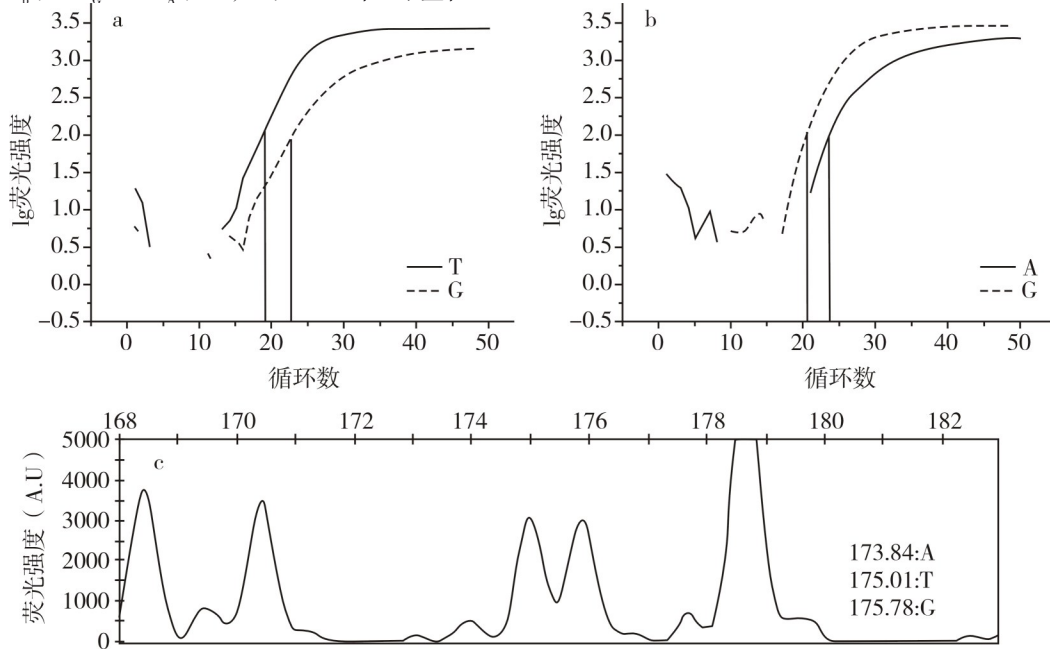
图 1 T/A/G 基因分型判读为 G/G 型两种方法对比图

### 2.2.1.2 T/A/G 基因分型判读为 T/G 型

图2中,图2a中G碱基与T碱基Ct值分别为23和19,图2b中G碱基与A碱基Ct值分别为21和24,Ct值小的碱基含量高。图2a $\Delta Ct_a(|Ct_c - Ct_t|) = 4$ ,图2b $\Delta Ct_b(|Ct_c - Ct_a|) = 3$ ,两图 $\Delta Ct$ 值的差值 $< 3$

( $|\Delta Ct_a - \Delta Ct_b| = 1$ ),故将图2a和图2b中含量高的碱基组合作为判读结果,判读基因型为T/G型。

图2c中,175.78位置的G碱基峰等高于175.01位置的T碱基峰,173.84位置几乎没有A碱基峰,故判读基因型为T/G型。



注:a,b为荧光扩增曲线;c为多重PCR片段分析峰图

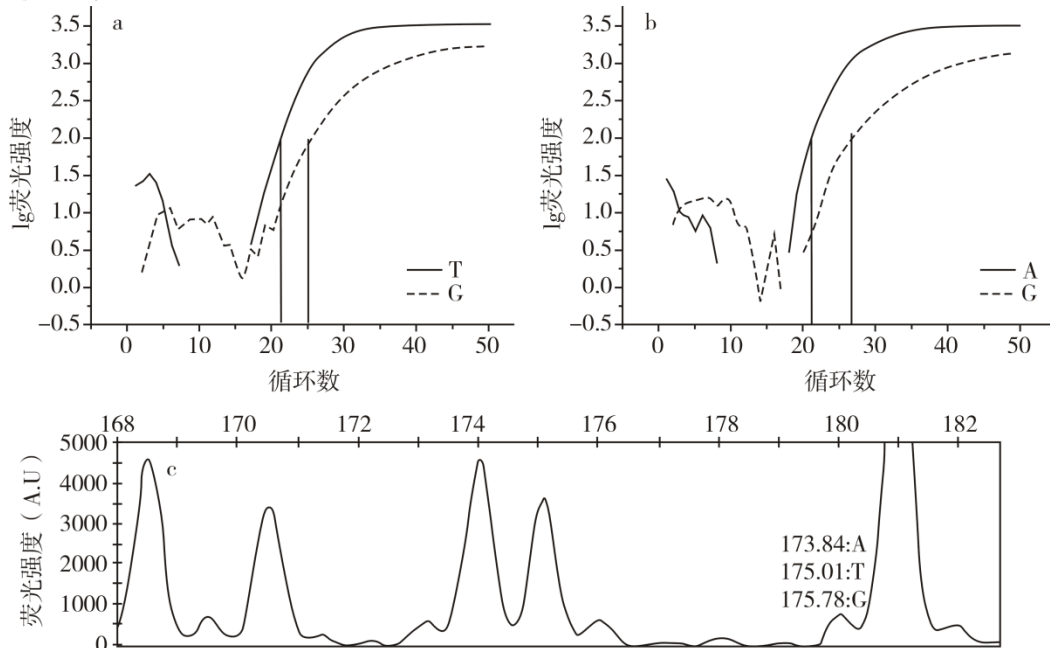
图2 T/A/G 基因分型判读为 T/G 型两种方法对比图

### 2.2.1.3 T/A/G 基因分型判读为 T/A 型

图3中,图3a中G碱基与T碱基Ct值分别为25和21,图3b中G碱基与A碱基Ct值分别为27和21,Ct值小的碱基含量高。图3a $\Delta Ct_a(|Ct_c - Ct_t|) = 4$ ,图3b $\Delta Ct_b(|Ct_c - Ct_a|) = 6$ ,两图 $\Delta Ct$ 值的差值 $< 3$

( $|\Delta Ct_a - \Delta Ct_b| = 2$ ),故将图3a和图3b中含量高的碱基组合作为判读结果,判读基因型为T/A型。

图3c中,明显存在175.01位置的T碱基峰和173.84位置的A碱基峰,几乎没有175.78位置的G碱基峰,故判读基因型为T/A型。



注:a,b为荧光扩增曲线;c为多重PCR片段分析峰图

图3 T/A/G 基因分型判读为 T/A 型两种方法对比图

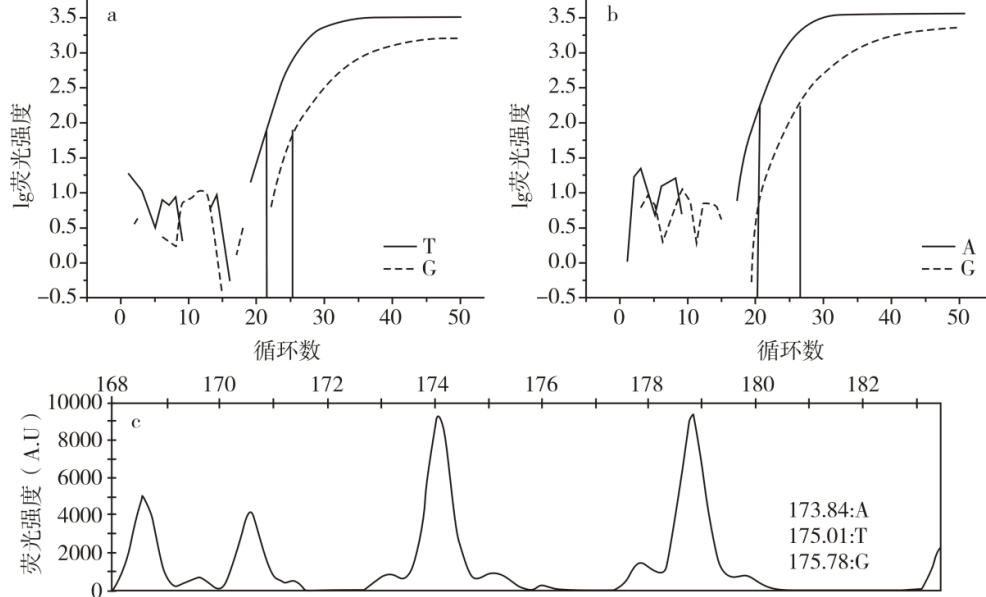
2.2.2 G/T/A 基因分型读取结果的确定

2.2.2.1 G/T/A 基因分型判读为 A/A 型

图 4 中,图 4a 中 G 碱基与 T 碱基 Ct 值分别为 25 和 22,图 4b 中 G 碱基与 A 碱基 Ct 值分别为 26 和 20, Ct 值小的碱基含量高,但图 4a  $\Delta Ct_a (|Ct_c - Ct_t|) = 3$ , 图 4b  $\Delta Ct_b (|Ct_c - Ct_a|) = 6$ , 两图  $\Delta Ct$  值的差值=3

( $|\Delta Ct_a - \Delta Ct_b| = 3$ ), 故此种情况认为 Ct 值最小的 A 碱基具有绝对优势。当  $|\Delta Ct_a - \Delta Ct_b| = 3$ , 将图 4a 和图 4b 中含量最高的碱基纯合型作为判读结果, 判读基因型为 A/A 型。

图 4c 中, 明显存在 173.84 位置的 A 碱基峰, 几乎没有 175.01 位置的 T 碱基峰和 175.78 位置的 G 碱基峰, 故判读基因型为 A/A 型。



注:a,b为荧光扩增曲线;c为多重PCR片段分析峰图

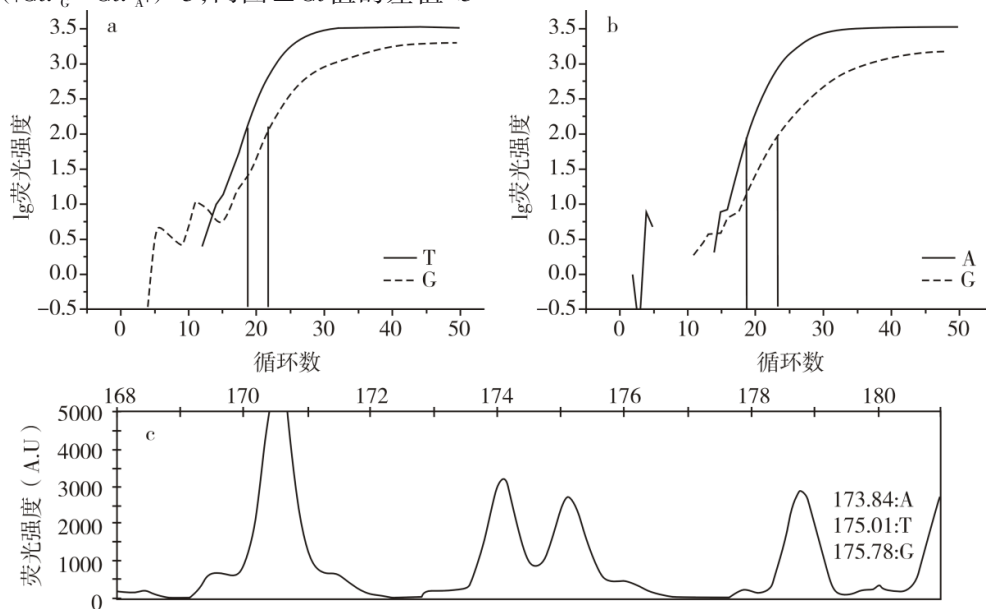
图4 G/T/A 基因分型判读为 A/A 型两种方法对比图

2.2.2.2 G/T/A 基因分型判读为 T/A 型

图 5 中,图 5a 中 G 碱基与 T 碱基 Ct 值分别为 22 和 19,图 5b 中 G 碱基与 A 碱基 Ct 值分别为 24 和 19, Ct 值小的碱基含量高。图 5a  $\Delta Ct_a (|Ct_c - Ct_t|) = 3$ , 图 5b  $\Delta Ct_b (|Ct_c - Ct_a|) = 5$ , 两图  $\Delta Ct$  值的差值<3

( $|\Delta Ct_a - \Delta Ct_b| = 2$ ), 故将图 5a 和图 5b 中含量高的碱基组合作为判读结果, 判读基因型为 T/A 型。

图 5c 中, 明显存在 175.01 位置的 T 碱基峰和 173.84 位置的 A 碱基峰, 几乎没有 175.78 位置的 G 碱基峰, 故判读基因型为 T/A 型。

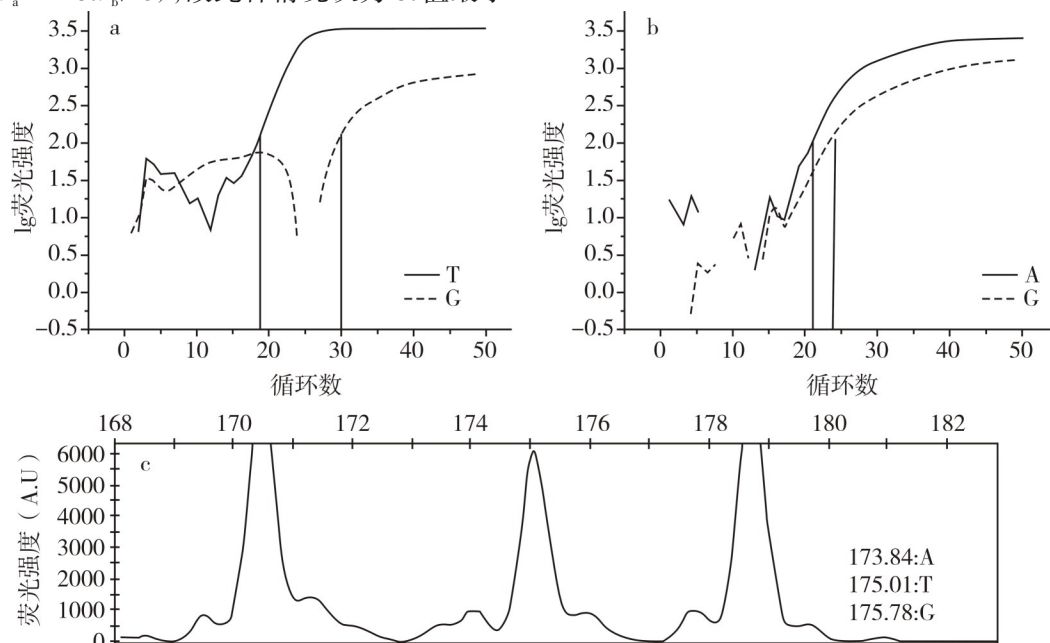


注:a,b为荧光扩增曲线;c为多重PCR片段分析峰图

图5 G/T/A 基因分型判读为 T/A 型两种方法对比图

### 2.2.3 G/A/T基因分型读取结果的确定

图6中,图6a中G碱基与T碱基Ct值分别为30和19,图6b中G碱基与A碱基Ct值分别为24和21,Ct值小的碱基含量高,但图6a  $\Delta Ct_a (|Ct_c - Ct_T|) = 11$ ,图6b  $\Delta Ct_b (|Ct_c - Ct_A|) = 3$ ,两图 $\Delta Ct$ 值的差值  $> 3 (|\Delta Ct_a - \Delta Ct_b| = 8)$ ,故此情况认为Ct值最小



注:a,b为荧光扩增曲线;c为多重PCR片段分析峰图

图6 G/A/T基因分型判读为T/T型两种方法对比图

的T碱基具有绝对优势。当 $|\Delta Ct_a - \Delta Ct_b| \geq 3$ ,将图6a和图6b中含量最高的碱基纯合型作为判读结果,判读基因型为T/T型。

图6c中,明显存在175.01位置的T碱基峰,几乎没有173.84位置的A碱基峰和175.78位置的G碱基峰,故判读基因型为T/T型。

## 3 讨论

通过对19例 ABCB1 三等位基因样本进行两种方法判读结果的对比,总结出实时荧光PCR法检测 ABCB1 基因的读取原则:当 $||Ct_c - Ct_T| - |Ct_c - Ct_A|| < 3$ 时,分别读取两组碱基实时荧光PCR扩增曲线图中Ct值最小的碱基,将其组合形成判读结果。当 $||Ct_c - Ct_T| - |Ct_c - Ct_A|| \geq 3$ ,读取两组碱基实时荧光PCR扩增曲线图中Ct值最小的碱基,其纯合型即为判读结果。

根据读取原则,将19例三等位基因的实时荧光PCR法结果重新判读,结果修正为:1例G/G,1例A/A,4例T/G,5例T/A,8例T/T,与多重PCR片段分析法判读结果一致。

在人体中,三等位基因的存在比例相对较低,本研究中的样本比例组成也可体现这一点。但当人体内存在三等位基因且存在的碱基突变比例较高时,突变的碱基在进行基因表达时或许会占优势,人体的相关功能就会受到影响。存在这种高比例的碱基突变时,实时荧光PCR检测方法不能明确判断哪个碱基占优势,所以不便出具基因报告。

在判断何种碱基占优势时,可观察实时荧光PCR扩增曲线的Ct值,Ct值越小,相应碱基的含量所占比例较高。但当存在三等位基因时,一个位点会存在三个碱基,就会有两种不同的扩增曲线图,在判断何种碱基占优势时,就要结合两个扩增曲线图进行对比分析,分析比较两图之间的 $\Delta Ct$ 值的差值。在扩增曲线图中,当碱基进入指数增长期,每进行一个循环,碱基的量便会翻番,当扩增循环进行3次以后,碱基的量会相差 $2^3$ 倍,这时就可以判断何种碱基在表达时占绝对优势。所以,在本研究中,当两者扩增曲线的 $\Delta Ct$ 值相差3及3以上,均判读为Ct值最小的碱基为纯合子;当两者扩增曲线的 $\Delta Ct$ 值相差3以下,分别读取两组实时荧光PCR扩增曲线图中Ct值小的碱基,将其组合形成杂合子。

随着技术不断进步,实时荧光PCR技术与其他分子生物学技术相结合使定量极微量的基因表达成为可能,荧光标记核酸化学技术和寡核苷酸探针杂交技术的发展以及实时荧光PCR技术的应用,使得实时荧光PCR技术有一个足够的基础为广大临床诊断实验室所接受<sup>[26-27]</sup>,未来实时荧光PCR法有望成为进行基因检测研究的主要工具。

## 参考文献

- [1] 杨文娟. ABCB1、RPA1 基因多态性与奥沙利铂治疗胃癌的疗效和不良反应的相关性研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
- [2] 李宇, 樊晖晖, 冯晓俊, 等. ABCB1 C3435T 基因多态性与甲氨蝶呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病安全性的 Meta 分析[J/OL]. 中国药物警戒, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5219.R.20210512.0927.002.html>, 2021-05-12.
- [3] Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, et al. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues[J]. *J Histochem Cytochem*, 1990, 38(9): 1277-1287.
- [4] Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development[J]. *Pharm Res*, 2007, 24(9): 1745-1758.
- [5] 李冰玉, 梁亚林, 史佳佳, 等. CYP3A5 和 ABCB1 基因多态性与肾移植术后服用他克莫司患者医院感染的关系[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(17): 2692-2696.
- [6] Chang HH, Chou CH, Yang YK, et al. Association between ABCB1 polymorphisms and antidepressant treatment response in Taiwanese major depressive patients[J]. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 2015, 13(3): 250-255.
- [7] Zheng X, Fu Z, Chen X, et al. Effects of ABCB1 gene polymorphism on the efficacy of antidepressant drugs: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(28): e26411.
- [8] Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, et al. Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression[J]. *Neuron*, 2008, 57(2): 203-209.
- [9] 李保环. ABCB1、APOB、CAV1 和 NAMPT 基因多态性与中国人 PDAC 遗传易感性的相关性研究[D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [10] Zhang Y, Xie H, Zhao D, et al. Association of ABCB1 C3435T polymorphism with the susceptibility to osteonecrosis of the femoral head: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(20): e6049.
- [11] Gunes A, Spina E, Dahl ML, et al. ABCB1 polymorphisms influence steady-state plasma levels of 9-hydroxyrisperidone and risperidone active moiety[J]. *Ther Drug Monit*, 2008, 30(5): 628-633.
- [12] Schatzberg AF, DeBattista C, Lazzaroni LC, et al. ABCB1 genetic effects on antidepressant outcomes: a report from the iSPOT-D trial[J]. *Am J Psychiatry*, 2015, 172(8): 751-759.
- [13] Huang H, Peng C, Liu Y, et al. Genetic association of NOS1 exon18, NOS1 exon29, ABCB1 1236C/T, and ABCB1 3435C/T polymorphisms with the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(40): e4982.
- [14] Thomas M. ABCB1: is there a role in the drug treatment of Parkinson's disease?[J]. *Expert Opin Drug Met*, 2017, 14(2): 127-129.
- [15] Tan EK, Chan DK, Ng PW, et al. Effect of MDR1 haplotype on risk of Parkinson disease[J]. *Arch Neurol*, 2005, 62(3): 460-464.
- [16] Bartels AL, Willemsen AT, Kortekaas R, et al. Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2008, 115(7): 1001-1009.
- [17] Han LL, Zuo BL, Cai WL, et al. Association between ABCB1 (3435C>T) polymorphism and susceptibility of colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(8): e19189.
- [18] 邱田, 黄文亭, 郭蕾, 等. 比较实时荧光 PCR 法与 Sanger 测序法检测甲状腺乳头状癌 BRAF 基因突变[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31(7): 756-758.
- [19] 张国林, 景荣先, 刘昆梅, 等. 新一代测序技术进展及其在药品质量控制中应用和发展趋势[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(1): 1-12.
- [20] 陈雪, 刘小晖, 王兴, 等. MTHFR 和 MTRR 基因多态性及增补叶酸与早产的相关性分析[J]. *中国生育健康杂志*, 2021, 32(5): 412-417.
- [21] 关小妮, 张克让, 崔勇, 等. 5-羟色胺转运体基因 LPR 及 5-羟色胺 1A 受体 C(-1019)G 基因多态性的联合作用与重症抑郁症的关联研究[J]. *四川精神卫生*, 2017, 30(3): 248-252.
- [22] 王亮, 陈凡一, 石伟, 等. 三磷酸腺苷黏合转运体 B1 基因多态性对老年心房颤动患者华法林稳态剂量的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2021, 23(4): 383-386.
- [23] 王磊, 代玉超, 陈佳琦, 等. 1 例异基因造血干细胞移植患者环孢素血药浓度异常波动原因分析[J]. *中国药师*, 2021, 24(5): 912-915.
- [24] 黄礼彬, 柯志勇, 张晓莉, 等. 自动片段分析的多重 PCR 检测儿童急性淋巴细胞白血病微小残留病探索[J]. *中国实用儿科杂志*, 2013, 28(4): 281-285.
- [25] 莫宗平. 多重定量 PCR 结合荧光片段分析检测缺失型  $\alpha$ -地中海贫血的方法建立及其应用[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.
- [26] 张贺, 李波, 周虚, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及应用[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(增刊): 5-12.
- [27] 梁艳, 杨再兴, 王皓, 等. 实时荧光定量 PCR 测定人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体基因表达[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(7): 797-800.

(收稿日期: 2021-09-08)

(本文编辑: 陈霞)