

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.12.008

## 三种常见 CD36 基因突变体标准质粒的构建\*

陈尚良,刘正婷,黄佳丽,何海洪,黎绍昌,李立浩<sup>△</sup>

南方医科大学深圳医院,广东深圳 518000

**摘要:**目的 构建 3 种常见的 CD36 基因突变质粒,为建立高分辨率熔解曲线方法提供突变标准品。方法 选取广州人群常见的 CD36 基因突变位点 A1237C、C268T 及 329-330delAC 作为研究位点,采用重叠延伸 PCR 方法及 TA 克隆技术构建含有上述突变位点的野生型和突变型质粒,并且对其进行测序验证。结果 DNA 测序结果证实构建的 3 种重组质粒分别含有 CD36 基因 A1237C、C268T、329-330delAC 突变。结论 成功构建 CD36 基因 A1237C、C268T、329-330delAC 突变体标准质粒,为后续建立高分辨率熔解曲线方法筛查 CD36 基因多态性奠定物质基础。

**关键词:**CD36 基因; 基因突变; 重叠延伸 PCR; TA 克隆**中图分类号:**Q343.1+3**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2020)12-1659-04

## Construction of three common CD36 gene mutant standard plasmids\*

CHEN Shangliang, LIU Zhengting, HUANG Jiali, HE Haihong, LI Shaoshang, LI Lihao<sup>△</sup>

Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518000, China

**Abstract: Objective** Three common CD36 gene mutation plasmids were constructed to provide mutation standards for establishing a high-resolution melting curve method. **Methods** The CD36 gene mutation sites A1237C, C268T and 329-330delAC, which were common in Guangzhou population, were selected as research sites. The overlapping extension PCR method and TA cloning technology were used to construct the wild-type and mutant-type plasmids containing the above-mentioned mutation sites, and they were verified by sequencing. **Results** DNA sequencing results confirmed that the three recombinant plasmids contained CD36 gene A1237C, C268T, and 329-330delAC mutations, respectively. **Conclusion** The CD36 gene A1237C, C268T, 329-330delAC mutant standard plasmids were successfully constructed, which laid a material foundation for the subsequent development of a high-resolution melting curve method for screening CD36 gene polymorphisms.

**Key words:**CD36 gene; gene mutation; overlap extension PCR; TA cloning

高分辨率熔解曲线分析方法因具有操作简便、速度快、通量大、成本低、不受检测位点局限,既可以检测已知突变又可发现未知突变等优点,已经在多个领域中得到了广泛的应用。本研究拟建立高分辨率熔解曲线分析方法,对常见的 CD36 基因突变进行筛查。然而,无论使用何种方法,通常需要已确认的 DNA 样品对建立的方法进行评价和质量控制,但由于 DNA 样品本身的限制性,其作为大规模筛查的标准品有其自身不足之处,因此需要克隆相应的质粒作为标准品。本研究首先利用重叠延伸 PCR 定点突变的方法获取 CD36 基因突变片段,然后通过 TA 克隆技术分别构建含有 CD36 基因 A1237C、C268T、329-330delAC 突变片段的野生型和纯合突变型质粒,为后续建立高分辨率熔解曲线分析(HRM)方法筛查 CD36 基因多态性奠定物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DNA 提取酚试剂(北京索莱宝公司,货

号:T0250)、核酸抽提试剂(24:1 北京索莱宝公司,货号:P1014)、3M 乙酸钠(北京索莱宝公司,货号:A1070)、X-gal(北京索莱宝公司,货号:X1010)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(北京索莱宝公司,货号:I8070)、DNA Marker(北京索莱宝公司,货号:M1100)均购自广州昂飞生物公司、克隆菌 E. coli DH5α 感受态细胞(Taraka,货号:9057)、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara,货号:R010A)、Takara Ex Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase(Takara,货号:RR001Q)、pMD19-T Vector Cloning Kit(Takara,货号:6013)均购自广州瑞真公司,质粒小提试剂盒(Magen,货号:D2110-02)均购自广州美基生物公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人血基因组 DNA 提取

健康人乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝外周全血来源于南方医科大学深圳医院输血科。取 1 mL 全血样本,采用酚氯仿法提取外周血基因组 DNA,具体方法详见产品说明

\* 基金项目:广东省深圳市科技计划(JCYJ20170307143728891);广东省深圳市宝安区科技计划(2016CX306)。

作者简介:陈尚良,男,副主任技师,主要从事输血医学方向研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:zhshboai@163.com。

书。最后用 30  $\mu$ L TE 缓冲液溶解血基因组 DNA, 置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

**1.2.2 PCR 引物设计** 基于重叠延伸 PCR 定点突变的原理, 使用 Primer3 Plus 引物设计网站设计针对 CD36 基因 A1237C、C268T、329-330delAC 突变的引物, 每个突变位点共 4 条引物, 见表 1。F 和 R 分别代表侧翼上游和下游引物, 用于扩增含突变位点的全长片段。Fm 和 Rm 为引入突变位点的突变上游和下游引物, 并且部分序列重叠互补, 与侧翼引物配对扩增含有突变位点的上、下游序列。

表 1 引物序列

突变位点	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
A1237C	F: ATCAATGTGATTAGAAGACATATAAGAGC	233
	Rm: CCAAAGAAGAGGCACAAATATAGTTCTCTCT	
	Fm: TTGTGCCCTCTTCTTTGGCTTAATGAGG	156
C268T	R: ATGTATACTCATCCATATGGGTAATGG	
	F: AAGTTGTCTCGAAGAAGGTACA	115
	Rm: CGTATAAG <u>A</u> ACTCTTTGCTTAACTTGAA	
329-330delAC	Fm: GAGGTTCTTATAACGTACAGGTGAG	112
	R: ACATTTCAATACAATGACATTTGCCA	
	F: AGACCCCTTCTCGTTAGTTTGCTAGA	235
	Rm: ACTGT <u>T</u> GTCTCAGCGTCTCGG	
	Fm: GCTGAGGACA <u>AC</u> AGTCTCTTTCTCGCA	267
	R: CTTTCCAAATGACCATGCCTCCATTC	

注: 下划线表示碱基替换或缺失位点。

**1.2.3 重叠延伸 PCR 定点突变方法原理** 重叠延伸 PCR 定点突变是通过 2 轮 PCR 扩增来完成的。第 1 轮 PCR 以经过双向测序验证为 CD36 基因野生型的健康人血基因组 DNA 为模板, 以侧翼上游和突变为引物, 在高保真酶的作用下进行 PCR 扩增获得含有突变位点的上游序列。同时, 以经过双向测序验证为 CD36 基因野生型的健康人血基因组 DNA 为模板, 以侧翼下游和突变上游为引物, 在高保真酶作用下进行 PCR 扩增, 获得含有突变位点的下游序列。这两个反应同时进行, 最后获得含有重叠片段的 PCR 产物, 将其经过切胶回收纯化后, 等浓度、等量混合。第 2 轮 PCR 扩增以上述混合 PCR 产物为模板, 以侧翼上游引物和侧翼下游引物为模板, 在 Taq 酶作用下进行 PCR 扩增, 获得含有突变位点的全长片段。同样以健康人血基因组 DNA 为模板, 侧翼上游引物和侧翼下游引物为引物, 在 Taq 酶作用下进行 PCR 扩增, 获取野生型片段。

**1.2.4 PCR 扩增**

**1.2.4.1 第 1 轮 PCR 扩增** 以经过双向测序验证为 CD36 基因野生型的健康人血基因组 DNA 为模板, 引物 F 与 Rm、Fm 与 R 搭配, 在高保真酶的作用下进行 PCR 扩增。反应体系为 50  $\mu$ L: 0.5  $\mu$ L PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ L), 4  $\mu$ L dNTP mixture (2.5 mmol/L each), 10  $\mu$ L 5  $\times$  PrimeSTAR buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus), 1  $\mu$ L 引物 (5 pmol),

200 ng 模板, 加灭菌双蒸水至 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 5 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 共 40 个循环。最后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存 30 min。

**1.2.4.2 第 2 轮 PCR 扩增** 将第 1 轮 PCR 产物进行切胶, 回收纯化, 具体按照试剂盒说明书操作。将纯化后的 PCR 产物按照相同浓度混合作为第 2 轮 PCR 扩增的模板, F 与 R 为引物, 在 Taq 酶作用下进行第 2 轮 PCR 扩增。反应体系为 50  $\mu$ L: 0.25  $\mu$ L Takara Ex Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L), 4  $\mu$ L dNTP mixture (2.5 mmol/L each), 1  $\mu$ L 引物 (0.2  $\mu$ mol/L), 200 ng 模板, 加灭菌双蒸水至 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 40 个循环。最后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存 30 min。

**1.2.5 TA 克隆** 将第 2 轮 PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒切胶回收纯化, 纯化后的 PCR 产物作为 TA 克隆的模板, 将目的基因片段与 pMD19-T Vector 连接, 连接反应体系为 5  $\mu$ L, 包括 1  $\mu$ L pMD19-T Vector, 0.1~0.3 pmol 的 PCR 产物, 加灭菌双蒸水补足至 5  $\mu$ L。具体操作详见说明书。最后将反应产物导入 E. coli DH5 $\alpha$  感受态细胞, 然后涂布于含有 X-gal、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、氨苄青霉素 (Amp) 的平板中 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。

**1.2.6 质粒提取** 挑取单个白色菌落于 5 mL 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 12 h, 取 2 mL 菌液用于质粒提取采用质粒抽提试剂盒进行质粒提取, 具体操作详见说明书。剩下的菌液用 15% 甘油保种。

**1.2.7 DNA 测序** 将菌液和重组质粒送上海生工生物有限公司广州分公司进行序列测定, 以验证是否成功克隆。结果用 SeqMan 软件及 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 分析。

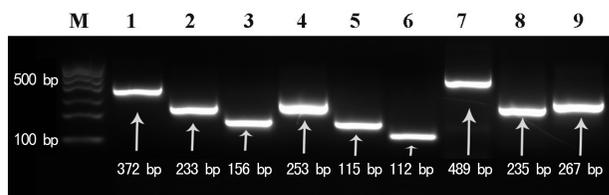
**2 结 果**

**2.1 第 1 轮 PCR 扩增产物电泳结果** 1.5% 琼脂糖电泳结果显示: 泳道 1、4、7 分别是 3 种突变的 CD36 基因野生型片段, PCR 产物条带大小分别为 372、253、489 bp; 泳道 2 和 3 分别是含有 A1237C 突变的上游序列和下游序列, PCR 产物条带大小分别为 233、156 bp; 泳道 5 和 6 分别是含有 C268T 突变的上游序列和下游序列, PCR 产物条带大小分别为 115、112 bp; 泳道 8 和 9 分别是含有 329-330delAC 突变的上游序列和下游序列, PCR 产物条带大小分别为 235、267 bp。见图 1。

**2.2 第 2 轮 PCR 产物电泳结果** 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果显示: 含有 CD36 基因 A1237C 突变的全长片段大小是 372 bp, 含有 CD36 基因 C268T 突变的全长片段大小是 253 bp; 含有 CD36 基因 329-330delAC 突变的全长片段大小是 487 bp。见图 2。

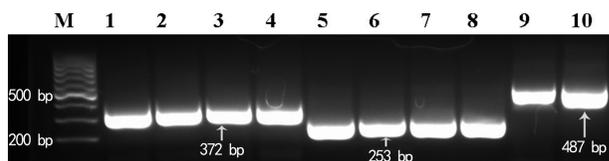
**2.3 重组质粒的 DNA 测序结果** 将菌液和重组质粒进行 DNA 测序鉴定, 并且在 NCBI 网站上使用 BLAST 进行序列比对。测序结果显示, 重组质粒

pMD19-1237CD36 基因 1237 处的碱基由 A 突变为 C, 其余序列和野生型序列相同; 重组质粒 pMD19-268268 处碱基由 C 突变为 T, 其余序列同野生型; 重组质粒 pMD19-329-330 的 329-330 处缺失两个碱基 A 和 C。由此可见, 成功构建了上述 3 个常见 CD36 基因突变的质粒。



注: M 为 DNA marker; 泳道 1、4、7 为 CD36 基因野生型 PCR 产物; 泳道 2、5、8 为含有 A1237C、C268T、329-330delAC 上游序列 PCR 产物; 泳道 3、6、9 为含有 A1237C、C268T、329-330delAC 下游序列 PCR 产物。

图 1 第 1 轮 PCR 产物以及野生型 PCR 产物电泳图



注: M 为 DNA marker; 泳道 1~4 为 A1237C 突变基因片段 PCR 产物; 泳道 5~8 为 C268T 突变基因片段 PCR 产物; 泳道 9~10 为 329-330delAC 突变片段 PCR 产物。

图 2 第 2 轮 PCR 产物电泳图

### 3 讨论

CD36 亦称血小板膜糖蛋白 IV (GPIV) 或 NaKa 抗原, 是一种相对分子质量约为 88 000 的糖基化蛋白, 属于 B 类清道夫受体家族, 其广泛分布于血小板、单核细胞、巨噬细胞、红细胞前体细胞及毛细血管内皮细胞等多种细胞表面<sup>[1]</sup>。CD36 缺失分为两种类型: I 型缺失是血小板和单核细胞均缺乏 CD36 抗原, 而 II 型缺失仅是血小板缺乏 CD36 抗原。通常仅 I 型缺失即可导致同种免疫性血小板减少症的发生。有研究报道, I 型 CD36 缺失的发生是由 CD36 基因杂合突变或者纯合突变所致, 最常见的突变是 C268T、949insA 及 329-330delAC<sup>[2]</sup>。CD36 基因多态性在不同国家和地区, 不同人群之间存在明显差异, 亚洲人群 CD36 基因突变主要是 C268T, 占有突变的 50% 以上<sup>[3]</sup>, 国内学者报道中国 CD36 基因突变主要是 329-330delAC<sup>[4]</sup>。

随着分子诊断技术的不断发展, 现阶段筛查 CD36 基因多态性的方法主要有实时 PCR、直接测序法、聚合酶链反应-限制性酶长度多态性分析 (PCR-RFLP)、序列特异引物引导的聚合酶链式反应 (PCR-SSP)<sup>[5-7]</sup> 等, 但是上述方法均存在操作烦琐、耗时长、容易产生 PCR 产物污染等缺点, 不适于临床大规模应用。HRM 方法是最近兴起的用于基因突变扫描和基因分型的分子诊断技术, 由于该方法具有成本低、灵敏度高、PCR 污染小等优点, 被广泛应用于珠蛋白生成障碍性贫血基因突变的筛查<sup>[8]</sup>、结核分枝杆菌耐

药基因筛查<sup>[9]</sup>、肿瘤基因突变及甲基化筛查<sup>[10]</sup> 等。

基于 HRM 方法的特性, 本研究拟建立一种 HRM 技术检测 CD36 基因多态性的方法。在建立该方法的过程中, 需要提供已确认的 DNA 样品对方法进行评价, 以及质量控制等, 然而, 由于 DNA 样品本身的特性, 其作为大规模筛查的标准品存在一定的局限性, 因此需要克隆相应的质粒作为标准品。本研究采用重叠延伸 PCR 突变方法人为地进行碱基的改变, 获取目的突变基因片段, 再通过 TA 克隆技术构建含有目的片段的野生型和纯合突变型质粒, 为 HRM 方法筛查 CD36 基因多态性提供基因型标准品。

目前用于 PCR 定点突变的技术有很多, 甚至有些公司研发了相关的商品化试剂盒, 例如 Takara 公司的多点突变试剂盒、天根公司的快速定点突变试剂盒等, 然而这些试剂盒成本较高, 不宜作为实验室首选的定点突变方法。重叠延伸 PCR 技术是一种高效、经济的突变方法, 该方法可对 DNA 片段中间区域的碱基进行人为的突变, 包括碱基的插入、缺失、替换等。基于重叠延伸 PCR 方法的原理, 本研究设计了针对 CD36 基因 A1237C、C268T、329-330delAC 突变的引物, 包括用于扩增全长的侧翼引物, 并且对引物引入了突变位点, 用于扩增包含突变位点及其上、下游序列, 通过 2 轮 PCR 和 3 个反应来获得突变片段。为了防止 PCR 扩增过程中发生碱基错配, 在第 1 轮 PCR 扩增采用了高保真酶, 该酶扩增效率高, 还具有 3'-5' 核酸外切酶的活性, 可以在 PCR 扩增过程中切除错配的碱基, 从而提高 PCR 扩增的保真性。而第 2 轮 PCR 则使用 Taq 酶进行扩增, 在扩增结束后可在 PCR 产物末端加 A, 反应产物可以直接和 T 载体连接, 进行 TA 克隆。为了验证质粒是否构建成功, 本研究还对重组质粒进行 DNA 测序分析验证, 测序结果表明, 成功将 CD36 基因 1237 位点处碱基由 A 突变成 C, 268 位点处碱基由 C 突变成 T, 329 位点处缺失 A、C 两个碱基。

综上所述, 本研究成功构建了 3 种常见 CD36 基因突变体标准质粒, 为后续建立 HRM 技术检测 CD36 基因多态性提供了基因分型对照。

### 参考文献

[1] LIN M, XU X, LEE H L, et al. Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-CD36 antibodies: antibody evaluations by CD36-transfected cell lines[J]. Transfusion, 2018, 58(1):189-195.

[2] RA M E, SAFRANOW K, PONCYLJUSZ W. Molecular basis of human CD36 gene mutations[J]. Mol Med, 2006, 13(5/6):288-296.

[3] MASUDA Y, TAMURA S, MATSUNO K, et al. Diverse CD36 expression among Japanese population; defective CD36 mutations cause platelet and monocyte CD36 reductions in not only deficient but also normal phenotype subjects[J]. Thromb Res, 2015, 135(5):951-957.

(下转第 1665 页)

产生碳青霉烯水解酶是肠杆菌科细菌碳青霉烯耐药的主要机制<sup>[9]</sup>。本研究发现,本院 23 株 CRKP 均产 ESBLs,耐药基因检出情况为 19 株同时携带 blaK-PC-2、blashv-1, 2 株同时携带 blaKPC-2、blashv-1、blactx-m-15,与宫雪等<sup>[2]</sup>报道相似。提示本院 CRKP 的主要耐药机制可能是 KPC-2 型碳青霉烯酶同时联产 SHV-1 型酶。另 2 株未检出 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌,其耐药机制后续将继续研究。

本研究中 CRKP 分布广泛,在临床能引起多个部位感染,主要分离自痰标本,占各类标本的 69.57%,这些细菌来自不同科室,而临床主要来源于神经外科和 ICU 这些重症患者,占总分离率的 65.21%,与国内报道一致<sup>[10]</sup>。经国内一些专家研究证实,CRKP 可以在重症病房与普通病房间传播,是导致肺炎克雷伯菌耐药性不断上升及 CRKP 检出率逐年提高的主要原因。

综上所述,为预防 CRKP 检出率上升,有效控制医院内感染的发生,应积极配合医院感染部门,并与临床进行沟通,做好 CRKP 的监测与防控工作,以降低产生 CRKP 风险,为临床治疗肺炎克雷伯菌导致的感染提供帮助。

### 参考文献

[1] 姚志宏,刘真真.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的流行病学、耐药与传播机制研究进展[J].中国抗生素杂志,2017,42(12):1107-1112.

(上接第 1661 页)

[4] 刘静,徐秀章,丁浩强,等.广州地区无偿献血者的 CD36 缺失频率及其分子基础研究[J].中国输血杂志,2018,31(10):1132-1135.

[5] JAYEWARDENE A F, MAVROS Y, HANCOCK D P, et al. Associations between CD36 gene polymorphisms, fat tolerance and oral fat preference in a young-adult population[J]. Eur J Clin Nutr, 2016, 70(11):1325-1331.

[6] MOMENI-MOGHADDAM M A, ASADIKARAM G, AK-BARI H, et al. CD36 gene polymorphism rs1761667 (G>A) is associated with hypertension and coronary artery disease in an Iranian population[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2019, 19(1):140-144.

[7] WANG D D, LI W G, ZHANG Y Y. Association of CD36 expression and polymorphism with serum biochemical indices in cherry valley duck[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(2):15027994.

[8] JOMOUI W, TEPAKHAN W, KARNPEAN R. Strong linkage of the single nucleotide polymorphism rs77308790 with an  $\alpha^0$ -thalassemia ( $--^{SEA}$  Deletion) allele and applica-

[2] 宫雪,王勇,张吉生,等.耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药机制及同源性分析[J].临床检验杂志,2018,36(4):270-273.

[3] 马红玲,肖圣达,杜帅先,等.碳青霉烯酶 3 种检测方法间的比较[J].临床血液学杂志,2018,31(2):105-107.

[4] 姚慧琳,范德胜,陆士海,等.重症监护病房耐亚胺培南肺炎克雷伯菌耐药基因检测[J].蚌埠医学院学报,2013,38(1):99-102.

[5] 高倩倩,殷杏,祝俊英,等.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的分子特征[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(1):53-57.

[6] 张艳双,刘静,万楠,等.耐碳青霉烯肠杆菌科(CRE)耐药分子机制及控制流行的应对策略[J].现代检验医学杂志,2019,34(2):1-4.

[7] 姚欣,冯莉,朱良苗.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学及耐药机制[J].中国抗生素杂志,2018,43(1):85-90.

[8] 李耕,吕媛,郑波,等.中国细菌耐药监测研究 2015-2016 革兰氏阴性菌监测报告[J].中国临床药理学杂志,2017,33(23):2521-2542.

[9] 刘周,李昕,储雯雯,等.碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌临床分布及耐药特征分析[J].临床医学,2018,39(3):274-277.

[10] 董爱英,陈东科,李春娟,等.30 株 CRE 临床感染特点及 blaNDM-1 基因检出情况分析[J].中国抗生素杂志,2018,43(5):513-518.

(收稿日期:2019-07-29 修回日期:2020-03-09)

tion for double-check diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis syndrome in Thailand [J]. Hemoglobin, 2019, 43(4/5):236-240.

[9] 杨彩虹,杨敏,于璐,等.高分辨率熔解曲线技术用于结核分枝杆菌临床分离株异烟肼耐药性的快速检测[J].中国人兽共患病学报,2017,33(5):403-412.

[10] KHATAMI F, LARIJANI B, HESHMAT R, et al. Hypermethylated RASSF1 and SLC5A8 promoters alongside BRAF<sup>V600E</sup> mutation as biomarkers for papillary thyroid carcinoma[J/OL]. J Cell Physiol, 2020 [2020-02-13]. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32017063/?from\\_single\\_result=Hypermethylated+RASSF1+and+SLC5A8+promoters+alongside+BRAF%28V600E%29+mutation+as+biomarkers+for+papillary+thyroid+carcinoma&expanded\\_search\\_query=Hypermethylated+RASSF1+and+SLC5A8+promoters+alongside+BRAF%28V600E%29+mutation+as+biomarkers+for+papillary+thyroid+carcinoma](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32017063/?from_single_result=Hypermethylated+RASSF1+and+SLC5A8+promoters+alongside+BRAF%28V600E%29+mutation+as+biomarkers+for+papillary+thyroid+carcinoma&expanded_search_query=Hypermethylated+RASSF1+and+SLC5A8+promoters+alongside+BRAF%28V600E%29+mutation+as+biomarkers+for+papillary+thyroid+carcinoma).

(收稿日期:2020-02-15 修回日期:2020-03-10)