顾鹏,陈傍柱,徐涛,等. *Hpd* 基因修饰制备高酪氨酸血症 III 型巴马小型猪模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 11-16.

Gu P, Chen BZ, Xu T, et al. Generation of a Bama minipig model of hereditary tyrosinemia type III by modifying the *Hpd* gene [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 11-16.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.002

Hpd 基因修饰制备高酪氨酸血症 III 型巴马小型猪模型

顾 鹏[1,2],陈傍柱[1,2],徐 涛[1,2],刘 闻[1],邓俊成[2],徐名衬[1],袁 进[1],陈恩生[3*],顾为望[1,2,4*]

(1. 南方医科大学比较医学研究所暨实验动物中心,广州 510515;2. 东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司,广东 东莞 523808;3. 南方医科大学中西医结合医院,广州 510315;4. 五邑大学,广东 江门 529020)

【摘要】 目的 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除巴马小型猪 4-羟基苯丙酮酸氧化酶(4-OH phenylpyruvate dioxygenase,4HPPD/HPD)制备高酪氨酸血症 III 型巴马小型猪模型。方法 分别从质粒 pGL3-U6-gRNA-PGK-puromycin 和 pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 中通过 PCR 扩增 sgRNA-Hpd 和 Cas9 体外转录用模板,接着体外转录出 Cas9 mRNA 和 sgRNA-Hpd,最后将 Cas9 mRNA 和 sgRNA-Hpd 共注射入巴马小型猪受精卵的胞质内,以制备 *Hpd* 基因敲除巴马小型猪。结果 胞质内共注射后,共移植 20 枚受精卵至 2 只代孕母猪。获得子代 *Hpd* 基因敲除巴马小型猪共 4 只。结论 本研究成功制备了高酪氨酸血症 III 型巴马小型猪模型,将为研究酪氨酸代谢通路提供更好的模型。

【关键词】 4-羟基苯丙酮酸氧化酶;CRISPR/Cas9;高酪氨酸血症 III 型;巴马小型猪

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2019) 05-0011-06

Generation of a Bama minipig model of hereditary tyrosinemia type III by modifying the *Hpd* gene

GU Peng[1,2], CHEN Bangzhu[1,2], XU Tao[1,2], LIU Wen[1], DENG Juncheng[2], XU Mingchen[1], YUAN Jin[1], CHEN Ensheng[3*], GU Weiwang[1,2,4*]

(1. Institute of Comparative Medicine & Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China. 2. Songshan Lake Pearl Laboratory Animal Science and Technology Ltd., Dongguan 523808. 3. Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510315. 4. Wuyi University, Jiangmen 529020)

[基金项目]广东省科技计划项目(2013B060300013,2010A011200003,2016A020208004);国家自然科学基金项目(31271042);国家科技部国际合作项目(2011DFA33290);江门市创新团队项目(2017TD023290);广州市科技计划项目(201704020012);南方医科大学科研启动计划项目(PY2017N032)。

[作者简介]顾鹏(1993—),男,硕士研究生,研究方向:基于小型猪研发人类疾病动物模型。E-mail: gerogegu@hotmail.com

[通信作者]陈恩生(1983—),男,主治医师,研究方向:风湿病实验动物模型研究、风湿病中西医结合临床与基础研究。E-mail: chenensheng1@163.com

顾为望(1956—),男,教授,博士生导师,研究方向:实验动物培育、人类疾病动物模型制备与比较医学。E-mail: Guww100@163.com * 共同通信作者

【Abstract】 **Objective** To prepare a Bama minipig model of hereditary tyrosinemia type III, the hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*Hpd*) gene was chosen to be edited by the CRISPR/Cas9 technology. **Methods** Templates (used as *in vitro* transcripts for Cas9 mRNA and sgRNA) were amplified from pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 and pGL3-U6-gRNA-PGK-puromycin by PCR, respectively, and subsequently transcribed *in vitro* into Cas9 mRNA and sgRNA-Hpd. Finally, cas9 mRNA and sgRNA-Hpd were co-injected into the cytoplasm of single cell embryos to generate an *Hpd*-modified Bama minipig. **Results** Twenty embryos of Bama minipigs co-injected with cas9 mRNA and sgRNA-Hpd were transplanted into two pseudopregnant mothers. We obtained four offsprings with a modified *Hpd* gene. **Conclusions** In this study, we have successfully generated *Hpd* knockout Bama minipigs with hereditary tyrosinemia type III using the CRISPR/Cas9 technique, which will be a valuable model for research of the tyrosine metabolic pathway.

【Keywords】 HPD; CRISPR/Cas9; hereditary tyrosinemia type III; Bama minipig

4-羟基苯丙酮酸氧化酶(4-OH phenylpyruvate dioxygenase,4HPPD/HPD)作为一种参与大多数生物体内酪氨酸分解代谢第二步所需的酶,存在于哺乳动物的肝和肾中,能够将 4-羟基苯丙酮酸转化为尿黑酸(图 1)[1-2]。在 III 型酪氨酸血症(Mckusick 27671)中,该酶活性低甚至不存在,临床上主要表现为血清酪氨酸水平和尿液 4-羟基苯丙酮酸、4-羟基苯乳酸、4-羟基苯乙酸水平显著升高。患者通常会出现神经异常、智力迟钝和轻度共济失调,但尚未确定一致的表型[3]。越来越多的人开始关注这种疾病以及 HPD 阻滞的后果。本研究拟通过敲除 *Hpd* 基因建立高酪氨酸血症 III 型巴马小型猪模型,为更好地研究该疾病的本质和治疗方法提供可靠的大动物模型。

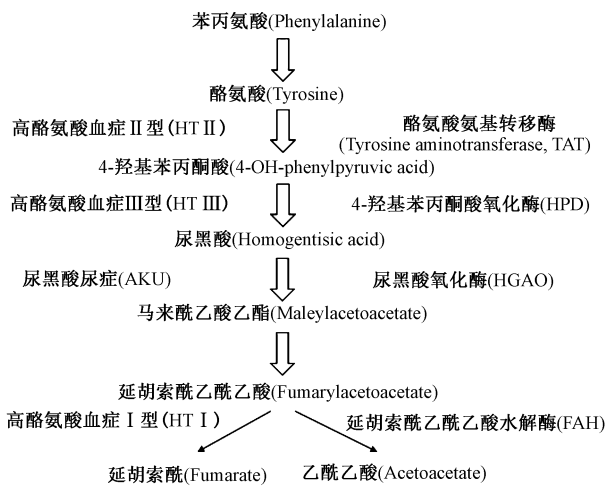

图 1 酪氨酸代谢通路及其相关疾病

Figure 1 Tyrosine catabolic pathway and related diseases

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

6 头巴马小型猪,普通级饲养,其中 2 头作为代孕母猪(24 月龄),体重 40 kg;4 头作为供卵母猪(12 月龄),体重 30~35 kg,均由南方医科大学实验动物中心提供并饲养[SCXK(粤)2016-0041],采卵和胚胎移植手术在南方医科大学实验动物中心大动物手术室进行[SYXK(粤)2016-0167]。实验动物饲养和实验过程均按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀,所有手术操作均在麻醉状态下进行,本研究经南方医科大学伦理审查委员会审核通过(L2016088)。

1.1.2 载体

sgRNA 载体 pGL3-U6-gRNA-PGK-puromycin 和 Cas9 载体 pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 均购自 Addgene。载体经转化后提取质粒,通过酶切鉴定并进行测序分析,均正确后用作体外转录模板。

1.2 主要试剂与仪器

sgRNA 体外转录试剂 MEGAshortscript™ Kit (AM1354) 和 Cas9 体外转录试剂 mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit (AM1345) 均购自 Ambion;酚∶氯仿∶异戊醇 = 25∶24∶1 (PH > 7.8) (P1012)抽提试剂购自北京索莱宝科技有限公司;X5 高保真 DNA 聚合酶 (MF003)购自聚合美生物科技有限公司;2× Taq PCR Master Mix (DBI-2028)购自 DBI Bioscience;基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Genomic DNA kit (DP304-03) 购自 TIANGEN BIOTECH(BEIJING);TA 克隆试剂 pMD19-T Vector Cloning Kit (T6013)购自大连 Takara 公司;四烯雌酮购自北京科益丰生物技术发展有限公司。显微操作系统 TransferMan NK2 购自 Eppendorf 公司;倒置显微镜及成像系统购自 Olympus 公司;体视显微镜购自 Nikon 公司,拉针仪、磨针仪、锻针仪毛细玻璃管均购自日本 Narishige 公司;细胞培养皿购自 Corning 公司;胚胎培养箱购自 Thermo 公司;胚胎移植管购自北京比威克生物公司。

1.3 实验方法

1.3.1 SgRNA-Hpd 和 Cas9 mRNA 获取

通过 GeneBank 网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)查找猪 *Hpd* 基因组序列。利用 CRISPR 设计网页(http://crispor.tefor.net)于猪 *Hpd* 基因第 6 号外显子上(E6)设计 20 bp 的靶向序列,并合成两条互补的单链 oligos。退火形成双链后连接到 pGL3-U6-gRNA-PGK-puromycin 载体的 Bsa I 位点。以上述产物为模板通过 X5 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,完成 sgRNA 体外转录所需的模板制备。sgRNA-Hpd 正向引物:5'-TTAATACGACTCACTATAGAGTGAAGGACATTGCGTTCG-3';sgRNA-Hpd 反向引物:5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCC-3'。sgRNA 模板获取 PCR 反应条件:98℃,5 min,98℃,30 s 60℃,30 s 72℃,30 s,37 个循环,72℃,10 min,4℃保存。应用 MEGAshortscript™ Kit 试剂盒对上述体外转录模板进行体外转录获得 sgRNA-Hpd。用限制性内切酶 *Age* I 对 Cas9 载体 pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 酶切线性化,用于 Cas9 mRNA 体外转录模板,应用 Cas9 体外转录试剂盒 mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit 进行体外转录获取 Cas9 mRNA[4-5]。所有产物经酚氯仿抽提纯化乙醇沉淀后回收并溶于无核酸酶的水中,-80℃保存备用。

1.3.2 巴马小型猪同步发情与受精卵获取

供卵母猪和代孕母猪均拌料饲喂给药四烯雌酮 20 mg/d,连续饲喂 18 d 诱导同步发情。停药后,每天上午和下午,均在猪采食 30 min 后,通过压背法和外阴观察法检测母猪的发情状态,当母猪出现"静立反射发情"时即可进行自然交配。12~14 h 后通过手术冲卵方法收集巴马小型猪猪受精卵。

1.3.3 Cas9 mRNA 和 sgRNA 的受精卵胞质内共注射

用 RNase-free water(胚胎水)将 Cas9 mRNA 和 sgRNA-Hpd 分别稀释至 100 ng/μL 和 50 ng/μL。随后将混合物注射入巴马小型猪单细胞期受精卵的胞质中,注射完成后放入培养箱培养 30~60 min,挑选状态良好的受精卵行胚胎移植。

1.3.4 胚胎移植及妊娠检测

将选好的发情代孕母猪通过戊巴比妥钠静脉注射麻醉,手术切开下腹部一小口,找出一侧子宫角和输卵管伞部,将受精卵用胚胎移植管移植至一侧的输卵管中,每头代孕母猪移植 10 枚受精卵。移植后 19~21 d,用猪早孕检测试纸检测是否妊娠。

1.3.5 基因型鉴定

每头 F0 代巴马小型猪分别进行耳号标记并剪取少量耳组织,用基因组提取试剂盒 TIANamp Genomic DNA kit 提取基因组 DNA。设计相应 PCR 引物扩增巴马小型猪 HPD 基因 6 号外显子(表 1),用 TAQ 酶进行 PCR 扩增目的片段。并将 PCR 产物用 pMD19-T Vector Cloning Kit 进行 TA 克隆。最后挑取 10 个单克隆,测序分析。

1.3.6 蛋白表达水平检测

按照标准操作提取#3 和#4 巴马小型猪肝组织全蛋白并进行浓度测定,取 20 μg 进行蛋白电泳。SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶分别按照浓度为 10%和 5%配置,电压为恒压 80 V,30 min;120 V,60 min。电泳结束后切下目的蛋白与内参条带,转膜:恒定电流 200 mA, 120 min。5% BSA 溶液封闭 1 h。一抗 4℃孵育过夜(Anti-HPD antibody, ab232906),TBST 洗膜 10 min×3 次,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 10 min×3 次。化学发光仪显影。

1.3.7 血液氨基酸检测

(1)样品采集:仔猪出生 15 d 后,将新鲜外周血采集后滴于专用采血滤纸上,自然晾干 3 h,待完全干燥后放于封口塑料袋内,置于-20℃冰箱中保存待检。

(2)样品处理方法:本研究用血液氨基酸检测仪器为美国生物应用系统公司(Applied Biosystems)3200QTRAP 型串联质谱仪。将干燥血液滤纸片用打孔器制成直径为 3 mm 的圆形滤纸血片后置于 96 孔聚丙烯板中(高低各 1 各质控)。同时,向每孔加入甲醇溶液 100 μL(含有同位素内标),用 Teflon 膜覆盖,置于 45℃环境密封震荡 45 min,设置振荡频率为 650 r/min。震荡完毕后室温放置 20 min,转移其中 75 μL 至新的 96 孔聚丙烯板并用铝膜覆盖,随后即可上样检测[6]。

表 **1** 巴马小型猪 HPD 基因 6 号外显子扩增引物

Table 1 Primer pairs used for PCR detection of the *HPD* gene

外显子 Exon	名称 Name	序列 Sequence	产物长度(bp) PCR product size
6	HPD-pig-e6-F	5′-TGTCTTCTCCTCTGCCCTCA-3′	349
	HPD-pig-e6-R	5′-CAAAGCAATAAGGCTCGGCC-3′	

(3)数据分析:定量分析采用美国生物应用系统公司软件 ChemoView1.2(Applied Biosystems),根据同位素内标及其相对应的离子峰强度,根据浓度已知的内标,即可自动计算出样品中所含氨基酸的浓度。

1.3.8 尿液酪氨酸代谢产物检测

(1)尿样采集和预处理:通过仔猪代谢笼收集猪尿样 10 mL 于 15 mL 离心管中,迅速置于-20℃冰箱保存待检测。尿液样本经 3500 r/min 离心 10 min 以去除杂质和蛋白质,并取上清测定尿肌酐值。

(2)样品处理方法:将预处理样品根据所测定肌酐值取 0.2 mg 肌酐量的尿液加入 1 U/μL 尿素酶共 20 μL,置于 37℃反应 30 min 后取出加入内标液和纯水补足终体积为 2 mL。然后依次加入 5%盐酸羟胺 500 μL 和 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液 400 μL 混匀后于室温静置 1 h。待反应完成后加入 6 mol/L 盐酸 350 μL 终止反应并加入乙酸乙酯 6 mL 混匀,3500 r/min 离心 5 min 取有机相至另一试管中并重复一次。加入无水硫酸钠离心吸取上清液,于 60℃恒温用氮气吹干样本。向样品中加入 BSTFA+10% TMCS 硅烷化试剂 100 μL,置于 80℃恒温箱中 30 min,衍生完成后待样品冷却即可取样检测。

(3)色谱及质谱条件:本研究所用气相色谱-质谱联用仪为日本岛津 GCMS-QP2010 ultra 分析仪。色谱柱 DB25(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);进样口温度 280℃;柱温 100℃持续 4 min,以 4℃/min 的速率升温至 280℃,保持 10 min,再以 10℃/min 升温至 300℃保持 10 min;载气:高纯氦气(99.999%);气体流速:43.0 cm/s,分流比 20∶1;接口温度 280℃;离子源温度:200℃;质谱扫面范围:50~500 amu。数据分析软件为 GCMS Solution 4.11。

2 结果

2.1 sgRNA 设计及 Cas9 mRNA 和 sgRNA 制备

sgRNA-Hpd 设计位点如图 2 所示。体外转录后经 RNA 电泳显示其中 sgRNA-Hpd 片段大小为 120 bp 左右,Cas9 mRNA 片段大小为 4300 bp 左右。表明成功制备了 Cas9 mRNA 和 sgRNA-Hpd。

2.2 受精卵胞质内共注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA 建立 HPD 基因修饰巴马小型猪

将 20 枚巴马小型猪的单细胞期受精卵予以胞质内显微共注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA-Hpd(图 3)。移植至 2 只代孕母猪。2 只代孕母猪怀孕,共出生 2 窝,获得 F0 代巴马小型猪共 4 只,公母比例为 2∶2(表 2)。

2.3 基因型鉴定

TA 克隆的测序结果如表 3 所示。测序结果显示 4 头 F0 代中 1 只为野生型,*Hpd* 基因未发现有突变,与野生型巴马小型猪的 *Hpd* 基因序列完全一致。其余 3 头 F0 代巴马小型猪在 sgRNA-Hpd 所介导定位的 *Hpd* 基因位点上出现了随机删除或插入若干个碱基(表 3)。结果表明,F0 代巴马小型猪 *Hpd* 基因突变位点具有长度可变或碱基对替换数目可变的特点。这些 DNA 序列的变化通常导致编码区域的截断或编码框架移位,从而导致 *Hpd* 基因功能障碍。

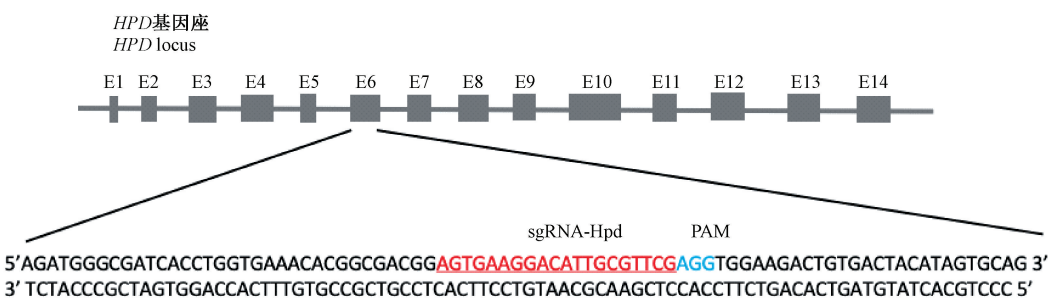

图 2 sgRNA-Hpd 设计位点

Figure 2 The design sites of sgRNA-Hpd

表 2 F0 代巴马小型猪出生情况对比

Table 2 Results of cytoplasmic injection of zygotes in the generation of F0 gene knockout minipigs

代孕编号 Surrogate ID	胚胎移植数 Number of transferred embryos	仔猪出生数 Number of births	出生率 Birth rate	孕期(d) Gestation	性别比(雄:雌) Sex ratio of piglets(male:female)
A	10	3	30%	115	1:2
B	10	1	10%	114	1:0
合计 Total	20	4	20%		2:2

表 3　F0 代仔猪 *Hpd* 基因突变

Table 3　*Hpd* mutation of F0 generation piglets

猪编号 Piglet ID	性别 Sex	基因型 Genotypes	突变 Indel
		TGGTGAAACACGGCGACGG**AGTGAAGGACATTGCGTTCG**AGGTGGAAGACTGTGACTACA	WT
		TGGTGAAACACGGCGACGGAGTGAAGGACATTGCG**T**TTCGAGGTGGAAGACTGTGACTACA	allele 1: +1
#1	雄 Male	TGGTGAAACACGGCGACGGAGTGAAGGACATTGCG**C**TTCGAGGTGGAAGACTGTGACTACA	allele 2: +1
		TGGTGAAACACGGCGACGGAGTGAAGGACATTG----CGAGGTGGAAGACTGTGACTACA	allele 3: △4
#2	雌 Female	TGGTGAAACACGGCGACGGAGTGAAGGACATTGCG**TT**TTCGAGGTGGAAGACTGTGACTACA	allele 1: +2
#3	雌 Female	TGGTGAAACACGGCGACGGAGTGAAGGACATTGCG**TT**TTCGAGGTGGAAGACTGTGACTACA	allele 1: +2
#4	雄 Male	TGGTGAAACACGGCGACGGAGTGAAGGACATTGCGTTCGAGGTGGAAGACTGTGACTACA	allele 1: WT

注：WT：野生型；“△”：碱基删除；“+”：碱基插入。

Note. WT: wild type; “△”: base deletion; “+”: base insertion.

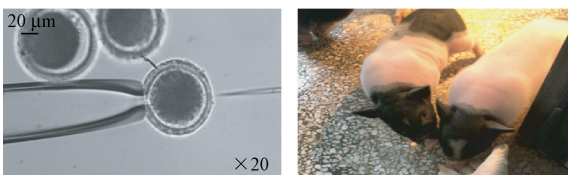

图 3　猪受精卵胞质内共注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA-Hpd 与 F0 代巴马小型猪

Figure 3　F_0 generation of newborn Bama minipig pups with *HPD* gene mutations generated by CRISPR/Cas9 system zygote injection

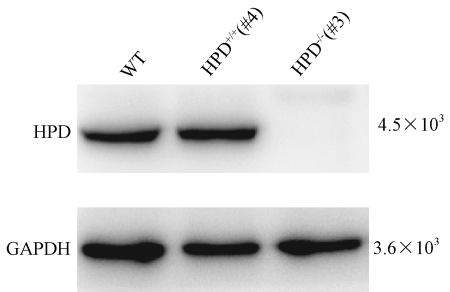

图 4　HPD 蛋白表达水平

Figure 4　The relative expression of HPD protein

2.4　HPD 蛋白表达

Western blot 检测结果如图 4 所示，未发生 *Hpd* 基因敲除的巴马小型猪（#4）与野生型巴马小型猪相比，肝组织 HPD 蛋白表达量未发生任何改变；相反，#3 巴马小型猪由于 *Hpd* 基因敲除后，肝组织 HPD 蛋白则完全没有表达。

2.5　血液酪氨酸水平

血液酪氨酸检测结果显示，和野生巴马小型猪血液酪氨酸水平相比，#1、#2、#3 巴马小型猪发生 *Hpd* 基因敲除后血液酪氨酸水平明显上升，均达到 1200 μmol/L 以上；相反，由于酪氨酸水平上升，苯丙氨酸处于正常水平，苯丙氨酸和酪氨酸比值（Phe/Tyr）在发生 *Hpd* 基因敲除巴马小型猪（#1、#2、#3）中显著降低。见图 5。

2.6　尿液氨基酸代谢产物含量

显著升高的尿液 4-羟基苯乳酸和 4-羟基苯乙酸水平是高酪氨酸血症 III 型的重要临床特征。通过基因型鉴定我们已确认#1 和#2 巴马小型猪模型成功敲除 *Hpd* 基因，通过气相色谱-质谱分析检测尿液酪氨酸代谢产物水平结果显示，与野生型巴马小型猪相比，#1 和 #2 巴马小型猪尿液 4-羟基苯乳酸和 4-羟基苯乙酸水平明显上升。见图 6。

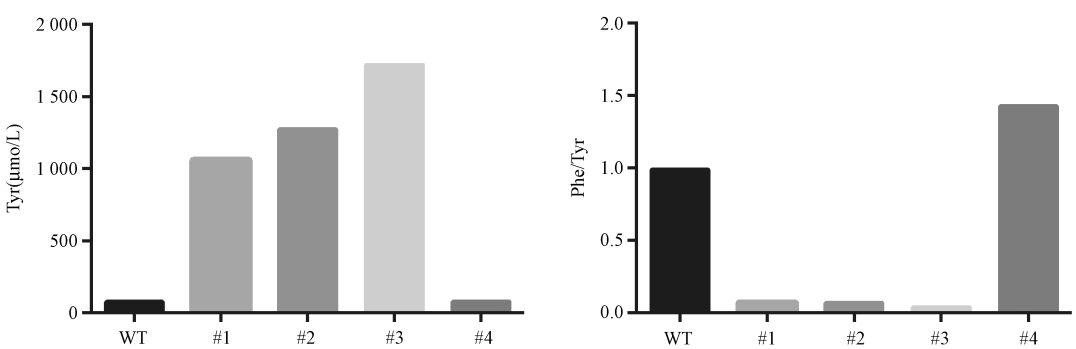

图 5　血液酪氨酸代谢水平

Figure 5　Metabolic profile of the tyrosinemia type III Bama minipigs

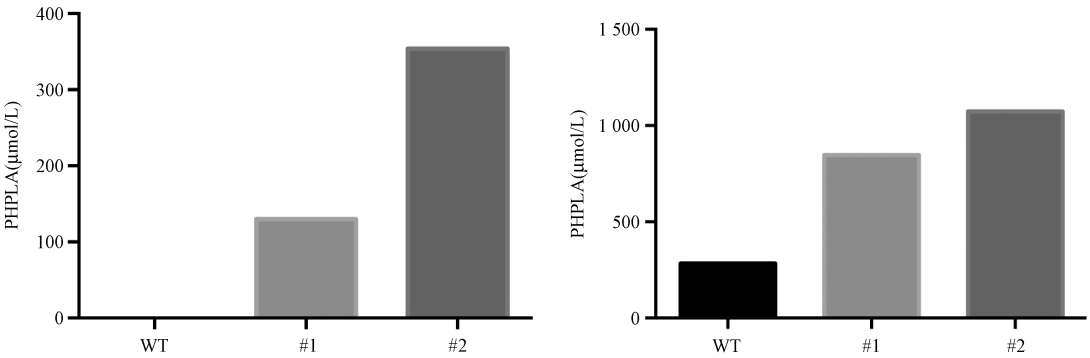

图 6 尿液酪氨酸代谢产物

Figure 6 Urinary excretion of tyrosine metabolites

3 讨论

血液酪氨酸水平的升高和尿液 4-羟苯丙酮酸及其衍生物的增加常被认为是遗传性酪氨酸血症的显著特征。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术靶向编辑巴马小型猪 *Hpd* 基因成功制备了高酪氨酸血症 III 型巴马小型猪模型。通过基因型鉴定确认了其中 3 只巴马小型猪的 *Hpd* 基因发生敲除,1 只未发生敲除,整体敲除效率达到 75%。为检测是否存在脱靶效应,我们将外显子序列中与 sgRNA-Hpd 匹配达到 15 bp 以上基因序列作为潜在可能的脱靶位点。经 PCR 扩增后送样进行 Sanger 测序,所有检测的潜在脱靶位点均未发生突变,所以我们猜想,#4 巴马小型猪未发生突变可能的原因是因为显微注射未成功或是 sgRNA-Hpd 未成功打靶。为进一步确认其表型,我们通过 Western blot 结果发现,敲除 *Hpd* 基因后巴马小型猪肝组织 HPD 蛋白完全不表达,通过检测巴马小型猪的血液氨基酸浓度,发现 *Hpd* 基因敲除的 3 只巴马小型猪酪氨酸浓度显著升高;进一步我们通过气相色谱检测尿液酪氨酸代谢产物发现 *Hpd* 基因敲除巴马小型猪的尿液 4-羟基苯乳酸和 4-羟基苯乙酸水平显著上升,这与人类 III 型酪氨酸血症的临床特征一致(Endo 等人 1983)[7]。而仅仅是 HPD 酶活性缺乏似乎不会引起肝肾功能异常[8]。

可以预料,随着串联质谱法的使用越来越多,以及在新生儿筛查项目中纳入酪氨酸测量,持续高酪氨酸水平的无症状婴儿数量将越来越多。根据本文提供的数据,巴马小型猪高酪氨酸血症 III 型模型可作为人类 III 型酪氨酸血症的理想的模型。这一新的基因敲除巴马小型猪遗传性酪氨酸血症可以用来深入了解 4-羟基苯丙酮酸氧化酶在遗传性酪氨酸血症中的作用,为更好地研究和治疗酪氨酸代谢相关疾病奠定基础。

参考文献:

[1] Goldsmith LA, Laberge C. Tyrosinemia and related disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic basis of inherited disease, 7th ed [M]. New York: McGraw-Hill, 1989, 547-562.

[2] Buckthal DJ, Roche PA, Moorehead TJ, et al. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from pig liver [J]. Methods Enzymol, 1987, 142: 132-138

[3] Cerone R, Holme E, Schiaffino MC, et al. Tyrosinemia type III: diagnosis and ten year follow up [J]. Acta Paediatr, 1997, 86: 1013-1015

[4] Yang H, Wang H, Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. Nat Protoc, 2014, 9(8): 1956-1968.

[5] Shao Y, Guan Y, Wang L, et al. CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos [J]. Nat Protoc, 2014, 9(10): 2493-2512.

[6] 田国力,许洪平,朱伟明,等. 新生儿苯丙酮尿症两种实验室筛查方法的质量评价 [J]. 检验医学, 2007, 22(2): 171-173.

[7] Endo F, Kitano A, Uehara I, Nagata N, et al. Four-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase deficiency with normal fumarylacetoacetase: a new variant form of hereditary hypertyrosinemia [J]. Pediatr Res, 1983, 17: 92-96

[8] Russo PA, Mitchell GA, Tanguay RM. Tyrosinemia: a review [J]. Pediatr Dev Pathol, 2001, 4: 212-221.

〔收稿日期〕2019-01-26