

双管单色荧光 PCR 法与基因芯片法 检测 CYP2C19 基因多态性的比较研究*

陈 蕾¹, 刘志忠¹, 贾淑芬¹, 方 芳², 康熙雄²

(1. 中国康复研究中心北京博爱医院检验科, 北京 100068;

2. 首都医科大学附属北京天坛医院实验诊断中心, 北京 100050)

摘要:目的 建立快速检测 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因多态性的实验方法。方法 从样本库中选取 100 例血液样本。设计针对 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因多态性位点的特异性引物和 taqman 荧光探针, 通过双管单色荧光 PCR 法检测基因型, 与基因芯片法进行比较验证。结果 双管单色荧光 PCR 法能很好地鉴别 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因型, 与基因芯片结果一致率为 100%。结论 双管单色荧光 PCR 法能快速有效地进行 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因多态性分型, 该方法期待用于临床实验室以指导个体化用药。

关键词: CYP2C19; 荧光 PCR; 基因芯片; 多态性; 单核苷酸

中图分类号: Q503; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)04-051-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2016. 04. 013

Comparing Study of Double Tube and One-Color Fluorescent PCR Technology and Gene Chip Method in Detecting the CYP2C19 Gene Polymorphisms

CHEN Lei¹, LIU Zhi-zhong¹, JIA Shu-fen¹, FANG Fang², KANG Xi-xiong²

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Bo'ai Hospital, China Rehabilitation

Research Center, Beijing 100068, China; 2. Experimental Diagnosis Center, Affiliated

Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To establish a rapid method for detection of CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 gene polymorphisms.

Methods A total of 100 peripheral blood samples were collected from the sample library of the clinic laboratory. The specific primers and fluorescent probe sequences in the sites of CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 gene polymorphisms were designed, and the two gene polymorphisms were detected by double tube and one-color fluorescent PCR directly, and validated by a commercial gene chip method. **Results** The double tube and one-color fluorescent PCR technology could identify CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 single nucleotide polymorphisms, achieving 100% consistence with gene chip method. **Conclusion** The double tube and one-color fluorescent PCR technology based on the specific probe and primer of CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 single nucleotide polymorphisms is effective, rapid and reliable in identifying genotypes. This method is expected to be applied in clinical laboratory to guide personalized medicine.

Keywords: CYP2C19; fluorescence PCR; gene chip; polymorphism; single nucleotide

细胞色素 P450(CYP)同工酶是体内药物代谢的主要酶系,其中,CYP2C19 酶的遗传多态性使不同个体间酶活性存在显著不同。CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因多态性是两个最主要的基因多态性位点,可解释东方人超过 99% 的弱代谢(PM)表型^[1,2],对其他种族可解释的弱代谢比例从 < 50% ~ > 90%。目前检测基因多态性位点的方法有 Taqman 法、质谱法、芯片法、高分辨率溶解曲线分析法和焦磷酸测序法^[3]等。上海百傲科技有限公司生产的基因芯片方法自 2009 年上市以来得到

了广泛的应用。本研究通过双管单色荧光 PCR 法检测 CYP2C19 基因多态性,比较对于同一样本两种检测方法的差异。

1 材料与方法

1.1 实验样本 自 2010 开展 CYP2C19 基因多态性检测以来,我科共收集样本 1 万多例。从样本库中选择 100 例乙二胺四乙酸二钾抗凝血样,包括基因型:CYP2C19 * 1 / * 1 型 33 例,CYP2C19 * 1 / * 2 型 28 例,CYP2C19 * 1 / * 3 型 15 例,CYP2C19 * 2 / * 2 型 13 例,CYP2C19 * 2 / * 3 型

* 基金项目:首都医科大学科研基金项目(13JL36)。

作者简介:陈 蕾(1975—),女,硕士,主管技师,主要从事临床分子生物学检验工作,E-mail: amoon__cl@163.com。

通讯作者:刘志忠(1970—),男,博士,E-mail: lzzlab@126.com。

11例。血样室温融化后提取DNA用于CYP2C19基因多态性检测。

1.2 试剂和仪器 DNA微阵列芯片法使用的试剂购自上海百傲科技有限公司CYP2C19基因芯片检测试剂。等位基因特异性荧光定量PCR法的引物设计采用Primer 5.0软件,引物和TaqMan探针是Invitrogen公司合成的,其余试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司。

高速离心机(美国Sigma公司);聚合酶链式反应(PCR)仪(美国thermal公司);荧光PCR仪(罗氏480);全自动杂交仪和生物芯片识读仪(上海百傲科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA微阵列芯片法:严格按照上海百傲科技有限公司CYP2C19基因芯片检测试剂盒(DNA微阵列芯片法)使用说明书进行。

1.3.2 等位基因特异性荧光定量PCR法(TaqMan-ARMS法)

1.3.2.1 引物及TaqMan探针设计:引物设计采用Primer 5.0软件,Invitrogen公司合成引物和TaqMan探针。CYP2C19*2位点扩增片段长度111bp,野生和突变上游引物3'端-2位引入错配碱基“G”(正配碱基应为“C”),TaqMan探针与上游引物扩增的模板链互补。CYP2C19*3位点扩增片段长度105bp,野生和突变下游引物3'端-2位引入错配碱基“A”(正配碱基应为“T”),TaqMan探针与上游引物扩增的模板链互补。TaqMan探针5'端标记荧光报告基团FAM,3'端标记淬灭基团TAMRA,见表1。

表1 TaqMan-ARMS方法检测CYP2C19*2和CYP2C19*3基因多态性引物及探针序列表

探针或引物	序列(5'→3')
CYP2C19*2 681G>A(rs4244285)	
G Forward primer	CCACTATCATTGATTATTTCCGG
A Forward primer	CCCACTATCATTGATTATTTCCGA
Reverse primer	GTCCATCGATCTTGGTGTCTT
TaqMan probe	CCCATACAAATTACTTAAAAACCTTGCT
CYP2C19*3 636G>A(rs4986893)	
G Reverse primer	AAAACTTGGCCTTACCTGGAAC
A Reverse primer	AAAAAACTTGGCCTTACCTGGAAT
Forward primer	ACGTTTCGATTATAAGATCAGCAA
TaqMan probe	TAAGTTGATGGAAAATTGAATGAAACA

注:G为CYP2C19*2位点扩增片段的野生和突变引物3'端-2位引入的错配碱基;A为CYP2C19*3位点扩增片段的野生和突变引物3'端-2位引入的错配碱基。

1.3.2.2 TaqMan-ARMS方法反应体系及测定

条件:反应体系为20 μl,试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司,产品名称为GoldStar TaqMan Mixture(With ROX),货号为CW0953A。使用荧光定量PCR仪检测TaqMan探针FAM荧光信号。反应条件95℃10 min,95℃15 s,60℃40 s,35个循环,见表2。

表2 TaqMan-ARMS测定CYP2C19*2和CYP2C19*3基因多态性PCR反应体系组成

试剂	用量(μl)
人基因组DNA(28 μl/ml)	2
2×GoldStar TaqMan Mixture	10
上游引物(10 μmmol/L)	0.5
下游引物(10 μmmol/L)	0.5
探针(10 μmmol/L)	0.5
ddH ₂ O	6.5

1.3.2.3 TaqMan-ARMS方法检测不同基因型判定标准的建立:CYP2C19*2 681G>A为例,用到两个PCR管,一个G等位基因引物扩增,一个A等位基因引物扩增。利用引物3'端与模板正配与错配扩增效率不同,以已知浓度梯度不同基因型质粒标准品为模板,按上述反应条件,通过荧光信号检测确定PCR反应有无指数扩增期和循环阈值(Ct)值,确定可区分点突变检测的浓度范围。在可区分点突变检测的浓度范围内,以不同拷贝数的突变引物Ct值(Mct)和野生引物Ct值(Wct)差值ΔCt(ΔCt=Mct-Wct),根据总体均数计算ΔCt及PCR扩增时有无指数增长期,建立各种等位基因型的判定标准。

1.3.3 突变类型分析:所有样本分别用荧光PCR法、基因芯片法检测,根据检测出的碱基序列判断突变类型,当二者结果不一致时应用Sanger测序方法验证。

1.4 统计学分析 运用SAS9.0软件,对两种方法的检测结果进行Kappa一致性检验,Kappa值>0.75被认为两种方法的一致性较好,Kappa值>0.95被认为两种方法高度一致,说明差异有统计学意义(P<0.05)。

2 结果

2.1 CYP2C19*2和CYP2C19*3的基因型判读标准 G/A引物位点荧光定量PCR扩增的最小Ct值在20~25之间,且ΔCt的绝对值>5(纯合子GG或AA型)或<2(杂合子GA型),即可作出准确基因型判断。最小Ct值在20~25之间,是保证样本DNA浓度在合适范围,ΔCt的绝对值<5或>2,保证有效区分扩增效率。根据以上标准,可准确判读基因型,见图1。

样本号	基因型	G位点Ct值	A位点Ct值	ΔCt
532	AA	32.0	21.8	10.2
564	GA	23.9	22.2	1.7
570	GA	23.5	22.2	1.2
571	GA	23.4	22.3	1.12
504	GG	23.2	32.1	-8.8
507	GA	24.0	23.2	0.8
552	GG	23.9	30.5	-6.6

图1-1

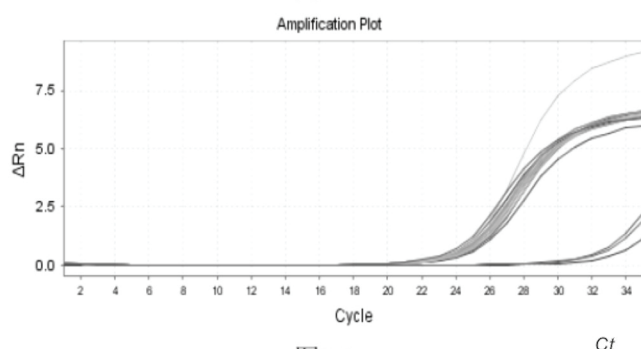
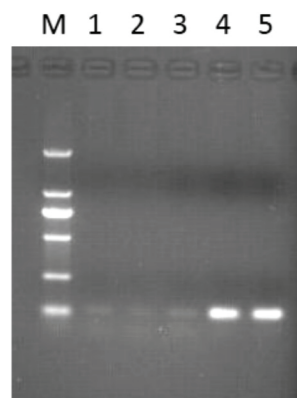


图1-2



- 1: 532号, G位点扩增产物, $Ct = 32.0$
 2: 504号, A位点扩增产物, $Ct = 32.1$
 3: 552号, A位点扩增产物, $Ct = 30.5$
 4: 532号, A位点扩增产物, $Ct = 21.8$
 5: 504号, G位点扩增产物, $Ct = 23.2$

图1-3

注: 1. G和A位点荧光定量PCR扩增的Ct值; 2. G和A位点荧光定量PCR扩增曲线;
 3. G和A位点荧光定量PCR扩增产物电泳图。

图1 CYP2C19 * 2 基因型判读

2.2 不同基因型荧光PCR法、基因芯片法对比结果 采用基因芯片法, 100例血液样本的CYP2C19 * 2 / * 3 基因型检测结果: * 1 / * 1 型 33例, * 1 / * 2 型 28例, * 1 / * 3 型 15例, * 2 / * 2 型 13例, * 2 / * 3 型 11例。荧光PCR法的检测结果与芯片法完全相同, $Kappa = 1$, 表明两种方法检测结果之间的一致性具有统计学意义, 一致率为100%。

2.3 检测时间比较 两种方法提取DNA的过程耗时相同, 对比两者时不考虑。由于荧光PCR法的扩增和信号判读步骤同时进行, 所以总共耗时55 min。芯片法首先进行DNA的特异片段扩增, 耗时约2 h, 将扩增后的产物进行基因芯片杂交需要约3 h。荧光PCR法所需时间明显低于基因芯片杂交需要的时间(节约4 h), 更有利于临床及时得到检验结果, 同时也减轻操作者的负担。

2.4 检测成本比较 每一个样本检测成本根据使用的试剂与耗材成本的和来计算, 荧光PCR法检测每个样本CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 两个位点所需成本为20元, 基因芯片杂交测序需要120元。基因芯片法比焦磷酸测序成本高近6倍, 可见荧光PCR法相对成本较低。

2.5 结果判读比较 在临床检测实际应用中, 荧光PCR法目前只能一次测出一个位点, 而基因芯片杂交可同时读取结果。然而, 基因芯片法需要通过发光对应的不同位置来判断碱基序列, 荧光PCR法能够动态直观检测反应过程, 故基因芯片法结果读取荧光PCR法更方便, 但是荧光PCR法比基因芯片法的结果更直观。

3 讨论 细胞色素P450酶2C19是一种十分重要的药物代谢酶, 主要存在于肝脏微粒体内, 许多内源性底物、环境污染物以及临床上的治疗药物都由其催化代谢。导致CYP2C19呈现出多态性的第一类突变群突变是由于突变产生了提前终止密码, 蛋白合成终止, 而使得CYP2C19酶活性丧失, 如CYP2C19 * 2(m1; 681位单碱基变异G→A)和CYP2C19 * 3(m2; 636位单碱基变异G→A)。研究发现, CYP2C19基因多态性是导致CYP2C19酶活性个体差异, 进而引起个体间和种族间对同一药物表现出不同代谢能力的原因之一^[4]。这种差异可影响到许多重要临床应用药物的代谢。已知与CYP2C19代谢相关的药物大约有90余种, 涉及抗抑郁药、抗血栓形成药物(氯吡格雷)^[5]、糖皮质激素、抗焦虑药、质子泵抑制剂、

(下转57页)

- 压早期肾损害诊断中的临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(1): 130-132.
- Jiang CL, Wang HX, Niu JZ, et al. Clinical application of serum cystatin C in early renal damage of hypertension[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(1): 130-132.
- [11] 彭俊华, 张全华, 赵勇, 等. 血清 β_2 -MG, Cys-C 及 U-mALB 在高血压肾损伤中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(4): 147-149.
- Peng JH, Zhang QH, Zhao Y, et al. Clinical application of β_2 macroglobulin, cystatin C and urinary albumin in diagnosis of hypertensive renal injury[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(4): 147-149.
- [12] Weinert LS, Prates AB, do Amaral FB, et al. Gender does not influence cystatin C concentrations in healthy volunteers[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(3): 405-408.
- [13] Alvelos M, Pimentel R, Pinho E, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin in the diagnosis of type 1 cardio-renal syndrome in the general ward[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2011, 6(3): 476-481.
- [14] Padhy M, Kaushik S, Girish MP, et al. Serum neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and cystatin C as early predictors of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. Clin Chim Acta, 2014 (435): 48-52.
- 收稿日期: 2016-05-09
修回日期: 2016-06-01
- (上接 53 页) HMG-CoA 还原酶抑制剂等。
- 单管双色荧光 PCR (MGB 探针^[6] 和 Taqman 探针^[7]) 法, 是通过特异探针与模板 DNA 的特异结合来区分单个碱基的变异, 而双管单色荧光 PCR 法, 是通过等位基因特异性引物的设计, 通过 PCR 特异扩增来鉴别单个碱基的变异。这种方法, 只要引物设计合适, 受干扰因素更少, 适合于大样本检测^[8]。
- 目前, 基于 CYP2C19 基因型的临床个体化用药方案成为人们关注的焦点, 特别是这两个多态性与抗血小板药氯吡格雷疗效的相关性。有利的基因型分析工具是开展大规模流行病学研究和使广大患者受益的前提。基因型分析方法需兼顾以下方面: 准确、快速、价廉、仪器设备简单、结果分析直观简便。本方法具有以上优点, 适合临床常规快速检测。
- 参考文献:
- [1] Tod M, Nkoud-Mongo C, Gueyffier F. Impact of genetic polymorphism on drug-drug interactions mediated by cytochromes: a general approach[J]. AAPS J, 2013, 15(4): 1242-1252.
- [2] Wu Z, Zhang X, Shen L, et al. A systematically combined genotype and functional combination analysis of CYP2E1, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 in different-geographic areas of mainland China—a basis for personalized therapy [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e71934.
- [3] 施宏, 虞闰六, 马金飞, 等. PCR-Pyrosequencing 快速检测药物代谢酶基因 CYP2C19 多态性方法的建立及应用[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(1): 66-70.
- Shi H, Yu RL, Ma JF, et al. Development of a PCR-Pyrosequencing method for detecting rapidly the genetic polymorphism of CYP2C19 about drug metabolizing enzymes genes[J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(1): 66-70.
- [4] Xie X, Ma YT, Yang YN, et al. Personalized antiplatelet therapy according to CYP2C19 genotype after percutaneous coronary intervention: A randomized control trial[J]. Int J Cardiol, 2013, 168(4): 3736-3740.
- [5] 韩瑞玲, 李艳, 吴薇. 武汉地区冠心病患者氯吡格雷药物代谢相关基因 CYP2C19 的多态性分布分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 21-23.
- Han RL, Li Y, Wu W. Analysis of the polymorphism distribution of clopidogrel metabolism related gene CYP2C19 in patients with coronary artery disease in wuhan[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(3): 21-23.
- [6] 王娟, Anders B, 苏明权, 等. TaqMan MGB 蛋白探针法检测 IL28b rs 12979860 位点基因多态性[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(8): 722-726.
- Wang J, Anders B, Su MQ, et al. Development of diagnostic procedure of Taqman MGB probe-based real-time PCR of prediction of response to HCV therapy [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2013, 36(8): 722-726.
- [7] 刘立明, 李永利, 马洪滨, 等. 快速检测 IL-28B rs12979860 基因多态性双色荧光 PCR 法的建立[J]. 传染病信息, 2014, 27(5): 279-281.
- Liu LM, Li YL, Ma HB, et al. Establishing a rapid two-color fluorescent PCR method for detecting the IL-28B (rs12979860) gene polymorphisms[J]. Infect Dis Info, 2014, 27(5): 279-281.
- [8] 李珊珊, 殷悦, 贾玫. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 酶活性水平及其基因多态性与冠心病的相关性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(10): 899-904.
- Li SS, Yin Y, Jia M. Correlation between lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and its gene polymorphism in coronary heart disease[J]. Chin J Lab Med, 2012, 35(10): 899-904.
- 收稿日期: 2016-03-21
修回日期: 2016-05-05