

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 检测药物代谢酶基因多态性平台的建立*

叶阿里¹, 张海燕², 窦亚玲¹, 孔令君¹, 张睿¹, 张晓峰²

(1. 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院检验科, 北京 100730;

2. 北京毅新博创生物科技有限公司, 北京 102206)

摘要:目的 建立基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术检测患者体内药物代谢酶基因多态性的平台。方法 选取2013年10月~2014年6月在北京协和医院门诊就诊患者53例 EDTA 抗凝外周血,提取全基因组DNA,用MALDI-TOF-MS技术检测53例患者药物代谢酶基因 CYP2C9 * 2(rs1799853), CYP2C9 * 3(rs1057910), CYP2C19 * 2(rs4244285), CYP2C19 * 3(rs4986893), CYP2C19 * 4(rs28399504), CYP2C19 * 5(rs56337013)和 CYP2C19 * 17(rs12248560)的单核苷酸多态性(SNP)位点,并用Sanger测序法进行验证。结果 用MALDI-TOF-MS技术可以同时完成53份样本,2个药物代谢酶基因,7个SNP位点的检测。53例患者中,发现CYP2C19 * 2(rs4244285)AG型25例,AA型6例,GG型22例,A等位基因频率为34.9%。CYP2C19 * 3(rs4986893)AG型4例,GG型49例,A等位基因频率为3.8%。CYP2C9 * 3(rs1057910)CA型5例,AA型48例,C等位基因频率为4.7%。未发现CYP2C9 * 2(rs1799853), CYP2C19 * 4(rs28399504), CYP2C19 * 5(rs56337013)和 CYP2C19 * 17(rs12248560)位点突变。经与Sanger测序法比较,两种检测方法结果的符合率为100%。结论 成功建立MALDI-TOF-MS技术检测药物代谢酶基因多态性的平台,该平台具有高通量、准确的特点,对个性化用药治疗具有重要的临床应用价值。

关键词:药物代谢酶基因;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术;单核苷酸多态性

中图分类号:R503;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)05-030-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.008

Establishment of MALDI TOF-MS Technique Platform for Detecting Cytochrome P450 Gene Polymorphism

YE A-li¹, ZHANG Hai-yan², DOU Ya-ling¹, KONG Ling-jun¹, ZHANG Rui¹, ZHANG Xiao-feng²

(1. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital,

Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical Collage, Beijing 100730, China;

2. Bioyong (Beijing) Technologies Inc. Ltd. Beijing, 102206, China)

Abstract: **Objective** To establish the MALDI-TOF-MS technique platform for detecting Cytochrome P450 gene polymorphism from patients. **Methods** Collected 53 EDTA anticoagulation peripheral blood samples from October 2013 to June 2014 in Peking Union Medical College Hospital. The whole genomic DNA was extracted from patients' peripheral blood. Used MALDI-TOF-MS to identify the SNP polymorphism of CYP2C9 * 2(rs1799853), CYP2C9 * 3(rs1057910), CYP2C19 * 2(rs4244285), CYP2C19 * 3(rs4986893), CYP2C19 * 4(rs28399504), CYP2C19 * 5(rs56337013) and CYP2C19 * 17(rs12248560). To verify the above SNP polymorphism by Sanger sequencing method. **Results** The MALDI-TOF-MS could perform 53 samples on two cytochrome gene and 7 SNP locus simultaneously. In all the 53 patients, 25 AG, 6 AA and 22 GG genotypes were identified in CYP2C19 * 2(rs4244285), the allele frequency of A genotype was 34.9%. 4 AG and 49 GG genotypes were identified in CYP2C19 * 3(rs4986893), the allele frequency of A genotype was 3.8%. 5 CA and 48 AA genotypes were identified in CYP2C9 * 3(rs1057910), the allele frequency of C genotype was 4.7%. No mutation loci were identified in CYP2C9 * 2(rs1799853), CYP2C19 * 4(rs28399504), CYP2C19 * 5(rs56337013) and CYP2C19 * 17(rs12248560). All the identification data were confirmed by Sanger sequencing. The coincidence rate was 100%. **Conclusion**

The MALDI-TOF-MS technique platform for the cytochrome enzyme SNP was established. This platform has high throughput and accurate characteristics. It has important clinical application value for the treatment of personalized medicine.

Keywords: Cytochrome P450 gene; MALDI-TOF-MS; SNP

细胞色素 P450 酶(cytochrome P450, CYP), 又称为混合功能氧化酶(mixed function oxidase)或单加氧酶(mono-oxygenase), 是人类肝脏中一种重要的药物代谢酶系统, 在脑、肺、肾脏、皮肤、胎

盘、胃肠道和乳腺等组织中也有发现^[1]。细胞色素 P450 酶能够代谢临床常用药物及一些重要的内源性物质及前致癌物, 它的活性决定药物的代谢速率, 与药物的清除率有着直接关系, 是药物代谢的

* 作者简介: 叶阿里(1974-), 女, 学士, 检验技师, Tel: 13901326309, E-mail: 13901326309@163.com。

通讯作者: 窦亚玲, E-mail: douyaling@163.com。

第一相酶,因而又称为药物代谢酶^[2]。

目前,困扰临床医疗和制药行业最常见的问题是不同病人对同一药物的反应不同,表现为对相同药物的不同疗效和毒副作用^[3]。CYP450 遗传多态性有可能引起 CYP450 酶活性缺失,表达量降低或增高,底物特异性改变等,从而引起药物代谢动力学的改变。CYP450 的遗传多态性是导致不同个体对同一药物产生不同应答的因素之一。目前研究也发现 CYP450 包含许多亚家族,与药物代谢紧密相关的主要有 CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 和 CYP3A5 等。其中 CYP2C9 和 CYP2C19 为中国人群中遗传多态性频率较高的两种酶,与 100 余种药物的代谢有关,约占临床常用处方药物的 10%~20%^[4],仅 CYP2C19 就参与了 20 余种临床药物的代谢^[5]。因此,在用药前就进行相关药物代谢酶的基因多态性检测并结合临床因素,有助于为患者提供用药指导,降低药物的不良反应发生率。

以往检测药物代谢酶基因多态性通常采用荧光定量 PCR 法,基因芯片法, Sanger 测序法等,上述方法均为化学法检测,会存在不同程度的化学因素干扰。而本研究采用的是基于核酸序列分子量的物理方法测定药物基因多态性,希望能够成为现有化学检测方法的进一步补充。

1 材料和方法

1.1 样本来源 选取 2013 年 10 月~2014 年 6 月在北京协和医院门诊就诊患者 53 例 EDTA 抗凝外周血,取常规检测后无污染的剩余血 200 μ l 用于该研究。平均年龄 43 岁,中位年龄 41 岁,男性 9 例,女性 24 例。

1.2 主要仪器与试剂 MALDI-TOF 飞行时间质谱系统, Typer 4.0 软件分析系统,全血基因组 DNA 提取试剂盒, $MgCl_2$, dNTP 和 HotStarTaq 酶, 虾碱性磷酸酶和缓冲液,延伸酶等相关配套试剂与耗材由北京毅新博创生物科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 人外周血 DNA 提取: 静脉采集外周血 2 ml, EDTA 抗凝, 用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, $-20^{\circ}C$ 保存。

1.3.2 PCR 扩增反应: 扩增引物由 Generay 公司合成。PCR 体系包括 1 μ l 基因组 DNA, 500mmol/L 上下游引物, 50 μ mol/L dNTPs, 0.5 U HotStartTaq DNA 聚合酶, 30 nmol/L Mg^{2+} 和 1 \times PCR 缓冲液。扩增条件为 95 $^{\circ}C$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}C$ 退火 30s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 进行 45 个循环, 最后 72 $^{\circ}C$ 持续 5 min。

1.3.3 SAP 酶消化反应: 反应体系包括 0.5 u 虾

碱性磷酸酶和 10 \times 的 Tris 缓冲液(美国 NEB 公司, New England Biolabs), 将反应混合物加入到上一步的 PCR 产物中。反应条件为 37 $^{\circ}C$ 保温 40 min, 85 $^{\circ}C$ 保温 5 min。

1.3.4 单碱基延伸反应: 将多重 PCR 反应混合物加到上一步的 SAP 酶消化后的产物中。iPLEX 反应体系为 0.041 μ l iPLEX 酶和 10 \times 的 Tris 缓冲液(GE Healthcare 公司), 1 μ l 引物混合液, 0.2 μ l iPLEX 终止混合液, 以水补齐 2 μ l 反应体系, 再次进行 PCR 反应, PCR 反应条件为 94 $^{\circ}C$ 预变性 30 s; 94 $^{\circ}C$ 变性 5 s, 52 $^{\circ}C$ 退火 5 s, 80 $^{\circ}C$ 延伸 5 s, 内部 5 个循环, 持续外部 40 个循环。最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 3 min。

1.3.5 MALDI-TOF-MS 检测: PCR 反应完成后, 向反应产物的 384 孔板中加入 16 μ l 三蒸水, 2 000 r/min 离心 3 min; 加入 6 mg 树脂, 来回颠倒 35 min 脱盐; 反应完成后再次 2 000 r/min 离心 3 min。将脱盐处理后的样品点在样品靶上, 自然结晶; MALDI TOF 质谱检测, 采用 Typer 4.0 软件检测质谱峰, 并根据质谱峰图判读各样本目标位点基因型。

1.3.6 Sanger 测序分析: 为检验 MALDI-TOF-MS 技术的准确性, 用常规 PCR 方法扩增含有 CYP2C9 * 2 (rs1799853), CYP2C9 * 3 (rs1057910), CYP2C19 * 2(rs4244285), CYP2C19 * 3 (rs4986893), CYP2C19 * 4 (rs28399504), CYP2C19 * 5 (rs56337013), CYP2C19 * 17 (rs12248560) 的片段, 用产物回收试剂盒回收后, 进行 Sanger 测序分析验证(北京六合华大基因科技有限公司)。

2 结果

2.1 MALDI-TOF-MS 检测 用 MALDI-TOF-MS 技术对药物代谢酶基因的单核苷酸多态性(SNP)位点 CYP2C9 * 2(rs1799853), CYP2C9 * 3 (rs1057910), CYP2C19 * 2(rs4244285), CYP2C19 * 3 (rs4986893), CYP2C19 * 4 (rs28399504), CYP2C19 * 5 (rs56337013) 和 CYP2C19 * 17 (rs12248560) 进行检测, 成功检测出以上位点的基因型多态 SNP, 见图 1。53 例患者中, 检出 CYP2C19 * 2(rs4244285) AG 型 25 例, AA 型 6 例, GG 型 22 例, A 等位基因频率为 34.9%; 检出 CYP2C19 * 3(rs4986893) AG 型 4 例, GG 型 49 例, A 等位基因频率为 3.8%; 检出 CYP2C9 * 3 (rs1057910) CA 型 5 例, AA 型 48 例, C 等位基因频率为 4.7%。未发现 CYP2C9 * 2(rs1799853), CYP2C19 * 4 (rs28399504), CYP2C19 * 5 (rs56337013), CYP2C19 * 17(rs12248560) 位点存

在突变。

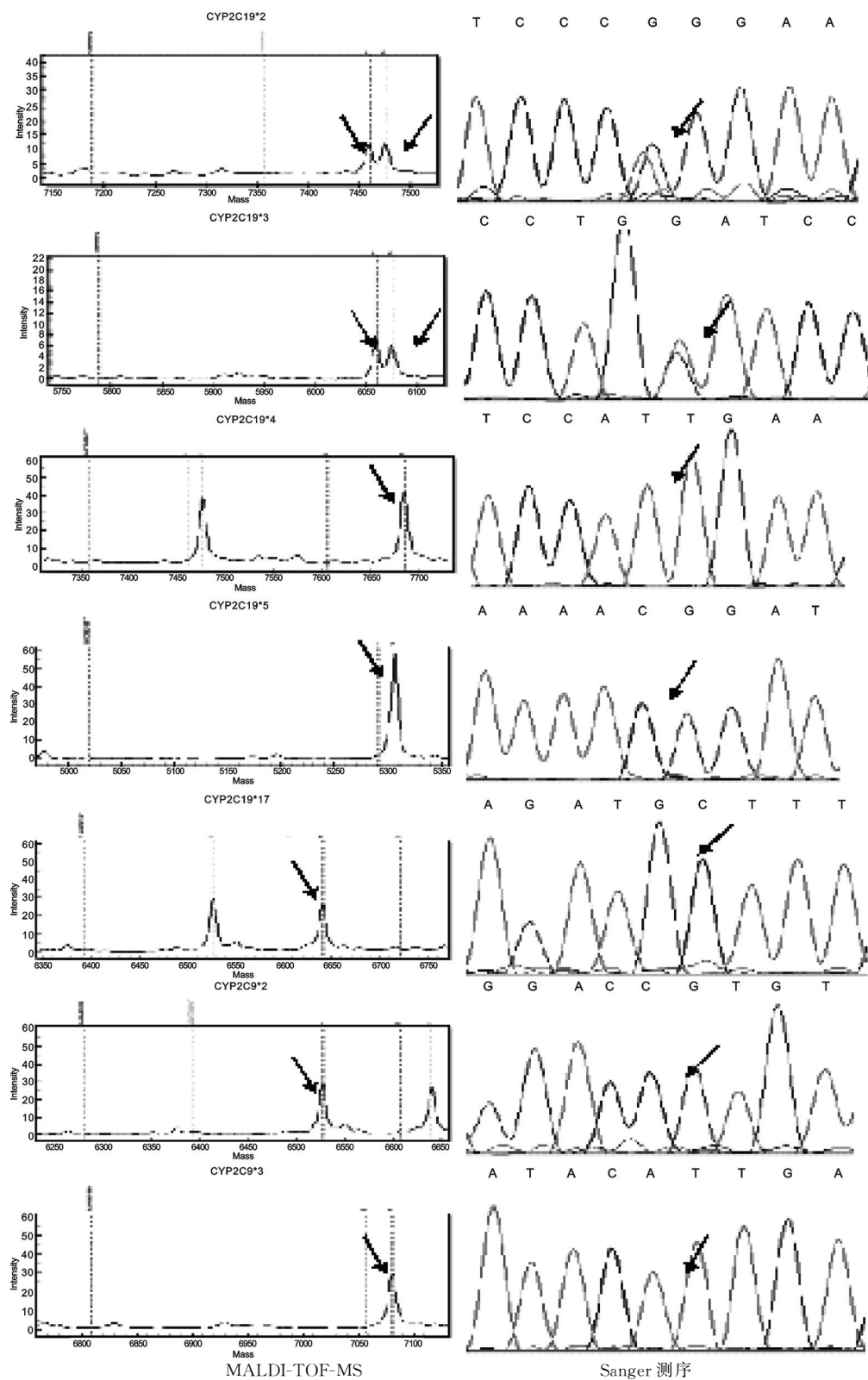


图1 MALDI-TOF-MS质谱图与Sanger测序图比对

2.2 Sanger测序验证结果 MALDI-TOF-MS检测结果经与Sanger测序的结果比较,符合率为100%,见表1。

3 讨论 CYP450遗传多态性是产生药物毒副作用,

降低或丧失药物疗效的主要原因之一^[4,6]。通过CYP450基因型检测可以进行临床用药方案指导和调整,为临床个体化用药提供依据,预防药物不良反应等。

表1 MALDI-TOF-MS与Sanger测序结果比较(n=53)

检测位点	检测方法	野生型	突变杂合子	突变纯合子
CYP2C19 * 2	MALDI-TOF-MS	22	25	6
	Sanger 测序	22	25	6
CYP2C19 * 3	MALDI-TOF-MS	49	4	0
	Sanger 测序	49	4	0
CYP2C19 * 4	MALDI-TOF-MS	53	0	0
	Sanger 测序	53	0	0
CYP2C19 * 5	MALDI-TOF-MS	53	0	0
	Sanger 测序	53	0	0
CYP2C19 * 17	MALDI-TOF-MS	53	0	0
	Sanger 测序	53	0	0
CYP2C9 * 2	MALDI-TOF-MS	53	0	0
	Sanger 测序	53	0	0
CYP2C9 * 3	MALDI-TOF-MS	48	5	0
	Sanger 测序	48	5	0

氯吡格雷是一种抗血小板药物,广泛用于急性冠脉综合征、缺血性脑血栓、闭塞性脉管炎和动脉粥样硬化及血栓栓塞引起的并发症。心脏支架手术后的患者需长期服用氯吡格雷以防止支架内再梗。氯吡格雷主要经 CYP2C19 代谢活化后发挥抗血小板效应。CYP2C19 慢代谢患者应用常规剂量的氯吡格雷后体内活性代谢物生产减少,对血小板的抑制作用下降。美国 FDA 和美国心脏病学会建议,对于 CYP2C19 慢代谢基因型患者需考虑改变治疗方案^[5],具体意见为:CYP2C19 * 1/* 1 无突变的基因型个体为正常代谢型,应用氯吡格雷有效,可常规使用;CYP2C19 * 2 或 * 3 基因型个体对氯吡格雷疗效降低,建议更换成普拉格雷或替卡格雷;CYP2C19 * 2 或 * 3 突变型纯合子个体应用氯吡格雷效果差,建议换用普拉格雷或替卡格雷^[5]。2010 年 3 月,美国 FDA 再次建议,患者在服用氯吡格雷之前,应该接受基因型检测。

奥美拉唑是目前应用最为广泛的质子泵抑制剂之一,主要由 CYP2C19 酶代谢^[7,8]。CYP2C19 快代谢者,会出现疗效不佳;CYP2C19 弱代谢者,会出现严重不良反应。检测 CYP2C19 基因型,可以更精确地调整药物剂量。

现有的荧光定量 PCR 法,基因芯片法和 Sanger 测序法都是基于化学(荧光)方法,依赖于核苷酸的互补性对核酸序列进行分析。因此对于序列的长度、复杂性、反应条件等都具有较高的要求,容易受到多种化学因素的影响,导致检测结果出现偏差。以荧光 PCR 方法为例,一旦基因突变位点出现在引物杂交区域,则有可能导致探针不能与模板正确结合,导致检测结果出现误差。在基因芯片中,也同样存在探针内突变位点导致杂交结果出现假阴性的现象,甚至还会引起二次杂交时候的不正

确配对,导致出现废片,影响检测结果。

而 MALDI-TOF MS 方法则是根据核酸序列本身的核苷酸组成分子,以及其被电离后在真空管中的飞行时间来确定其分子量大小,最终确定核苷酸序列。其检测结果仅仅依赖于分子量这一物理参数。尤其是在 SNP 位点已经确定的条件下,采用 MALDI TOF MS 的方法还可以将检测大幅度通量提高,可在同一反应体系内对多个 SNP 位点进行多重检测与分析,从而提高检测通量、效率与正确率。这样的检测方法无疑是对现有荧光 PCR、基因芯片和测序等方法的重要补充。如果能够将化学和物理方法结合起来对药物代谢酶基因 SNP 进行检测,将极大地提高检测结果的准确性。

因此, MALDI-TOF-MS 对药物代谢酶基因多态性的检测方法,同样也可以在用药前对药物代谢酶的基因多态性进行检测,结合临床因素,有助于为患者指导用药,降低严重不良反应的发生率,为个体化医疗提高更加多样化的检测手段。

参考文献:

- [1] McDonnell AM, Dang CH. Basic review of the cytochrome p450 system [J]. Journal of the Advanced Practitioner in Oncology, 2013, 4(4): 263-268.
- [2] Zanger WM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2013, 138(1): 103-141.
- [3] Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, et al. Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82562.
- [4] Zanger UM, Klein K, Thomas M, et al. Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes [J]. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2013, 95(3): 258-261.
- [5] Chang M, Tybring G, Dahl ML, et al. Impact of cytochrome P450 2C19 polymorphisms on citalopram/es-citalopram exposure: a systematic review and meta-analysis [J]. Clinical Pharmacokinetics, 2014, 53(9): 801-811.
- [6] Shahabi P, Siest G, Meyer UA, et al. Human cytochrome P450 epoxidegenases: variability in expression and role in inflammation-related disorders [J]. Pharmacology and Therapeutics, 2014, 144(2): 134-161.
- [7] Nakahashi H, Yamamura Y, Usami A, et al. Metabolism of (–)-cis- and (–)-trans-rose oxide by cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes [J]. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 2015, 36(9): 565-574.
- [8] Uehara S, Inoue T, Utoh M, et al. Simultaneous pharmacokinetics evaluation of human cytochrome P450 probes, caffeine, warfarin, omeprazole, metoprolol and midazolam, in common marmosets (Callithrix jacchus) [J]. Xenobiotica, 2016, 46(2): 163-168.

收稿日期: 2016-07-02

修回日期: 2016-08-15