

# 液相芯片技术快速检测 2 型糖尿病患者相关降糖药物基因多态性的方法学建立

邓任堂<sup>1</sup>, 许红丽<sup>2</sup>, 孔桂兴<sup>1</sup>, 赖丽莎<sup>1</sup>, 揭育帮<sup>1</sup>, 陈梅莲<sup>1</sup>, 付文金<sup>1</sup>

(1. 广东省东莞市厚街医院检验科, 广东东莞 523945; 2. 湖南省武冈市人民医院检验科, 湖南邵阳 422400)

**摘要:** **目的** 建立一种可同时、快速检测 2 型糖尿病患者降糖药相关药物基因多态性的液相芯片检测系统。**方法** 根据 7 个目的基因的 rs 号, 在 Genbank 中查找其靶位点附近碱基序列(目的基因包括磺脲类受体 1, 转录因子 7 类似物 2, 胰岛素受体底物 1, 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ , 有机阳离子转运蛋白与多药和有毒化合物排出家族, 有机阴离子转运蛋白家族成员 1B1 等), 以 PrimerPlex 软件设计等位基因特异性引物, Primer6.0 软件设计含检测位点的 PCR 引物, 通过多重 PCR 扩增, 等位基因特异性引物延伸 (ASPE), MagPlex ~ Tag 微球杂交, 液相芯片系统 Luminex 200 检测荧光信号, 确定基因型, 优化反应体系并以 5 份代表性标本进行方法学评价。收集 2019 年 1 月~12 月东莞市厚街医院新诊 2 型糖尿病患者血液样本 115 例, 采用建立的系统检测上述 7 个靶位点, 并随机选取 25 例与测序结果比较。**结果** 7 个目标基因经 PCR 扩增, 产物电泳成像后清楚可见 7 条目标条带, 无非特异性条带; 经优化 ASPE 杂交条件, 选择退火温度 55℃, Biotin ~ dCTP 浓度与 dCTP 浓度的比值为 3 : 1, 37℃孵育 45 min 时检测效果最佳; 临床样本检测结果显示: 纯合子荧光强度中位值 (median fluorescence intensity, MFI) 比率均 >0.9 或 <0.1, 杂合子 MFI 比率在 0.4~0.6 之间。纯合子 MFI 比率批内批间 CV 在 0.9%~3.3% 和 2.1%~4.6%, 而杂合子则在 2.9%~7.3% 和 5.2%~11.2%; DNA 最低检测限为 0.75ng; 25 例样本的检测结果与测序结果完全一致, 准确度 100%。**结论** 该研究成功建立了一种新的液相芯片检测系统, 高效便捷, 能同时检测 7 个目的基因型, 满足临床的需求。

**关键词:** 液相芯片; 等位基因特异性引物延伸; 2 型糖尿病; 单核苷酸多态性

**中图分类号:** R587.1; Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 02-006-06

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2021.02.002

## Development of A Liquid Phase Chip Technology for Simultaneous and Rapid Detecting of the Gene Polymorphisms in Medications with Type 2 Diabetes Mellitus

DENG Ren-tang<sup>1</sup>, XU Hong-li<sup>2</sup>, KONG Gui-xing<sup>1</sup>, LAI Li-sha<sup>1</sup>, JIE Yu-bang<sup>1</sup>, CHEN Mei-lian<sup>1</sup>, FU Wen-jin<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Dongguan Houjie Hospital, Guangdong Dongguan 523945, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Hunan Wugang People's Hospital, Hunan Shaoyang 422400, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a method for simultaneous and rapid detecting of the gene polymorphisms in medications, based on liquid phase chip technology. **Methods** The seven gene sequences near targeted sites related to Sulfonylurea receptor 1, transcription factor 7-like 2, insulin receptor substrate-1, peroxidase proliferation of activated receptor- $\gamma$  2, organic cation transporters and multidrug and toxin extrusion proteins, Organic Anion Transporters 1B1 were found in Genbank according to their rs number, and the allele specific primers and PCR probes were designed by PrimerPlex software and Primer6.0 software. Through multiple PCR amplification, followed by allele specific primer extension (ASPE), and MagPlex-Tag microspheres hybridization, the suspension array Luminex 200 system step-by-step, the genotypes were determined by fluorescence signal. The reaction system was optimized and its methodological evaluation was performed by five representative specimens. 115 patients with type 2 diabetes Mellitus from Dongguan Houjie Hospital were recruited in this study from January 2019 to December. The seven genotypes of the 115 patients were detected by the established method, and the results of 25 patients were compared with the sequencing results. **Results** Seven target bands were clearly visible after electrophoresis imaging, and no nonspecific bands were found. After optimizing ASPE hybridization conditions, the test results was the best with annealing temperature 55℃, the ratio of Biotin ~ dCTP concentration to dCTP concentration at 3:1, incubating at 37℃ for 45min. The results of 115 samples showed that allelic median fluorescence intensity (MFI) ratios of homozygotes (mutant/wild ~ type) were all greater than 0.9 or less than 0.1, and all the allelic MFI ratios of heterozygotes were between 0.4 and 0.6. The within run and

**基金项目:** 东莞市社会科技发展局 (重点) 项目 (201750715023442), 东莞市社会科技发展局 (一般) 项目 (201950715023454)。

**作者简介:** 邓任堂 (1978-), 男, 本科, 副主任技师, 主要研究方向: 临床微生物与免疫学检验, E-mail: 2804787909@qq.com。

between run coefficients of variance for homozygotes allelic MFI ratios were 0.9%~3.3% and 2.1%~4.6%, respectively, while 2.9%~7.3% and 5.2%~11.2%, respectively for heterozygotes. The minimum DNA template requirements were 0.75 ng. The genotypes of 25 patients determined by the established method were completely concordant with the sequencing results.

**Conclusion** A method based on liquid phase chip technology for simultaneous and rapid detecting of the gene polymorphisms in medications has been successfully developed, which can meet the needs of clinical.

**Keywords:** liquid phase chip technology; Allele-specific primer extension; type 2 diabetes mellitus; single nucleotide polymorphism

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是严重影响人类身心健康的重大疾病之一。对于确诊患者,最有效的治疗方法就是药物降糖治疗。然而,不同的T2DM患者在使用降糖药治疗过程中,在药代动力学、疗效以及不良反应中存在显著的个体差异,这是药物基因组学导致的,其中磺脲类受体1(sulfonylurea receptor 1, ABCC8)<sup>[1]</sup>, 转录因子7类似物2(transcription factor 7~like 2, TCF7L2)<sup>[2-3]</sup>, 胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate ~ 1, IRS1)<sup>[4-5]</sup>, 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxidase proliferation of activated receptor~ $\gamma$  2, PPAR $\gamma$  2)<sup>[6]</sup>, 有机阳离子转运蛋白与多药和有毒化合物排出家族(organic cation transporters and multidrug and toxin extrusion proteins, SLC47A1, SLC22A1)<sup>[7]</sup>, 有机阴离子转运蛋白家族成员1B1(Organic Anion Transporters 1B1, SLC01B1)<sup>[8-10]</sup>等有重要临床意义。但目前常用检测单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)的方法并不能很好地满足临床需求。液相芯片技术作为新一代高通量检测技术,特别适用于SNPs检测,在临床各方面发挥越来越重要的作用。本研究旨以液相芯片技术,通过多重PCR联合等位基因特异性引物延伸(allele specific primer extension, ASPE),建立一次性检测上述7个目标基因型的方法,以期临床选择适宜降糖药,减少不良反应,提高药效提供实验室支持。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 115例患者为2019年1~12月我院新诊2型糖尿病患者,均符合WHO颁布的糖尿病诊断标准,其中男性63例,女性52例,年龄52~76岁,中位年龄65岁。所有患者均签署知情同意书,并通过东莞市厚街医院伦理委员会批准,厚街伦理编号:[2019]伦审第(023)号。

1.2 试剂和仪器 多重PCR试剂盒Taq<sup>TM</sup> Hot Start Version(日本TaKaRa公司),DNA提取试剂盒TIANamp Genomic DNA Kit(北京天根生化科技有限公司),核酸外酶I~虾碱性磷酸酶(ExoSAP ~ I),Platinum<sup>TM</sup> GenoType Tsp DNA聚合酶、链霉亲和素-藻红蛋白(SA~PE),Biotin ~ dCTP, dNTPs等(美国赛默飞世尔科技公司),

偶合Anti-Tag序列微球(美国Luminex公司),LifeECO基因扩增仪(中国透景生命科技有限公司),蛋白核酸分析仪(英国豪沃生物科技有限公司),DYY-6C型电泳仪(北京六一生物有限公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 标本采集与DNA提取:采用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝管采集患者空腹外周血2ml,按照试剂盒说明书提取DNA,使用蛋白核酸分析仪调整样本DNA浓度至25~30 ng/ $\mu$ l。

1.3.2 引物设计及合成:参照课题组之前做法<sup>[11]</sup>,根据7个目的基因的rs号,在Genbank中查找其靶位点附近碱基序列,以PrimerPlex软件设计特异性的ASPE引物,Primer6.0软件设计含检测位点的PCR引物。委托上海生工生物技术有限公司合成所有引物。引物及微球信息见表1。

1.3.3 多重PCR系统:反应总体积共50  $\mu$ l,其中含DNA样本2  $\mu$ l, 5 U/ $\mu$ l Taq<sup>TM</sup> Hot Star DNA聚合酶0.25  $\mu$ l, 10xTaq<sup>TM</sup> Hot Star DNA聚合酶缓冲液5  $\mu$ l, 10mmol/L dNTP 4  $\mu$ l, 上下游混合引物8  $\mu$ l, 超纯水30.75  $\mu$ l。混合物先3 000  $\times$  g离心10s, 94 $^{\circ}$ C预变性30s后, 94 $^{\circ}$ C 30s, 57 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 5个循环;接着94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 30个循环;最后72 $^{\circ}$ C 10 min终止延伸。同时以超纯水作空白对照。

1.3.4 PCR产物纯化:取PCR扩增产物5  $\mu$ l与ExoSAP-IT 2.5  $\mu$ l混合, 37 $^{\circ}$ C孵育30min, 80 $^{\circ}$ C反应20 min。

1.3.5 ASPE反应:反应总体积20  $\mu$ l,含纯化PCR扩增产物2  $\mu$ l, TAG-ASPE引物混合液1  $\mu$ l, 400  $\mu$ mol/L Biotin-dCTP 0.3  $\mu$ l, 300  $\mu$ mol/L dATP/dGTP/dTTP混合液1  $\mu$ l, 10  $\times$  Taq<sup>TM</sup> Hot Star DNA聚合酶缓冲液2  $\mu$ l, 5U/ $\mu$ l Taq<sup>TM</sup> Hot Start DNA聚合酶0.12  $\mu$ l, 100  $\mu$ mol/L dCTP 0.4  $\mu$ l, 超纯水13.18  $\mu$ l。混合物先3 000  $\times$  g离心10s, 接着94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 74 $^{\circ}$ C 1min, 40个循环。

1.3.6 杂交反应:以1.5  $\times$  四甲基氯化铵(tetramethylammonium chloride, TMAC)杂交缓冲液混合14种MagPlex-TAG微球,并稀释至每种微球约50个/ $\mu$ l。取上述混合液25  $\mu$ l与ASPE反应产物2  $\mu$ l混合,先96 $^{\circ}$ C 90s, 37 $^{\circ}$ C 45min,然后加入

100  $\mu$ l 含 7.5  $\mu$ g/ml SA-PE 的 1  $\times$  TMAC 杂交缓冲液, 经 37  $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后, 以 Luminex 200 检测

荧光信号。

表 1 7 个目的基因的相关引物及微球信息

检测位点	长度 (bp)	PCR 引物 (5' $\rightarrow$ 3')	Tm ( $^{\circ}$ C)	基因型	ASPE 引物 (5' $\rightarrow$ 3')	标记序列	微球标号
TCF7L2 C5334T (rs7903146)	384	上游 GAGCCGTCAGATGGAATG	51	野生型	AGAGCTAAGCACTTTTAGATAC	CAATACATAATCTTACATCACT	MATG ~ A013
		下游 CTATGTATTGTTGCCAGTCAG	50.4	突变型	AGAGCTAAGCACTTTTAGATAT	TCATCATTCTTTTACTTTACATT	MATG ~ A044
ABCC8 G84973T (rs757110)	280	上游 GAAGATCCAGATCCAGAACC	50.6	野生型	ACGTCAATGCCCTCATCG	ACAAATATCTAACTACTATCACAA	MATG ~ A039
		下游 GAAGGCAATAGAAGGAGAGG	50.6	突变型	ACGTCAATGCCCTCATCT	TTAATACAATTCTCTCTTCTCTA	MATG ~ A054
IRS1 C971T (rs1801278)	496	上游 TCTGTACGCTGTCATCC	50.5	野生型	GCAATGCTAGCAGCCCG	TTCAATTCAAATCAACACATCAT	MATG ~ A064
		下游 CACTCTGGTTCGGGTTAG	50.6	突变型	GCAATGCTAGCAGCCCA	ATACTTTACAAACAAATAACACAC	MATG ~ A019
PPAR $\gamma$ 2 C68777G (rs1801282)	240	上游 ACTGATGCTTGAATCATGG	50.4	野生型	GTGAAGGAATCGCTTCTGG	AACTTCTCTCTTACTTTTATTT	MATG ~ A043
		下游 TAGCCGTATCTGGAAGGAA	50.1	突变型	GTGAAGGAATCGCTTCTGC	ACTTACAATACTACTAATCTCT	MATG ~ A057
SLC47A1 G>A (rs2289669)	540	上游 AGAGGAGAACATGGTTGT	50.7	野生型	TTTCCACAGTAGCGTGGG	CATCTTCATATCAATCTCTTATT	MATG ~ A035
		下游 CTTAACAGCAGGACACTGAA	51	突变型	TTTCCACAGTAGCGTGGA	ACATCAAATCTTCAATATCTTC	MATG ~ A055
SLC22A1 G>A (rs628031)	450	上游 GTCAGACTCTCATCTATCA	49.6	野生型	CCGCCAACAAATTTGACAC	AATAACAACCTACTATATATAAC	MATG ~ A077
		下游 CAGACAATTACCACTTACC	50.1	突变型	CCGCCAACAAATTTGACAT	ATTAAACAACCTTAACTACACAA	MATG ~ A036
SLCO1B1 T>C (rs4149056)	333	上游 ACCGAGTCTCAGGTATGTAAT	51.3	野生型	GGAAGCATATTACGCATGAACA	TTAACAACCTATACAAACACAAAC	MATG ~ A053
		下游 GTCCTTCTTTAGGAAATCATC	51.5	突变型	GGAAGCATATTACCCATGAACG	ATCTCAATTACAATAACACACAAA	MATG ~ A067

1.3.7 结果判读与基因分型: Luminex 200 检测系统可直接输出 MFI 和 MFI 比率。MFI 比率 =  $MFI_{\text{目标碱基}} / (MFI_{\text{野生型}} + MFI_{\text{突变型}})$ 。MFI 比率 >0.75 或 <0.25 判为野生型或突变纯合子, 而 0.25~0.75 则判为杂合子。

1.3.8 多重 PCR 及 ASPE 反应条件优化: 多重 PCR 优化: 依引物 Tm 值选择 50~60  $^{\circ}$ C 梯度退火温度, 分别检测 100, 50, 25, 12.5 和 6ng DNA 浓度样本, 根据扩增产物电泳结果对 7 对引物间的比例、循环次数、退火时间及  $Mg^{2+}$ /dNTP/Taq 浓度等进行调整。ASPE 反应条件优化: 根据 MFI 和 MFI 比率结果, 调整 ASPE 反应体系中退火温度及 Biotin-dCTP,

dCTP 浓度等。

1.3.9 方法学性能评价: ①重复性实验: 参照李婧婵等<sup>[12]</sup>方法, 用五份代表性样本进行批内和批间重复性实验。②最低检测限: 参照 PICKERING 等<sup>[13]</sup>方法, 以 DNA 浓度 200 ng 为基础, 倍比稀释至 0.75ng, 对各浓度样本重复检测三次, 以三次均能清晰分辨基因型所对应的浓度为最低检测限。③特异性试验: 参照李婧婵等<sup>[12]</sup>方法, 不同的单个靶位点 PCR 扩增产物分别与另外的 ASPE 引物进行混合, 检测信号的特异性。④准确性实验: 选择 25 份样本, 分别用本实验建立的方法和 Sanger 测序法进行检测, 两者结果对比分析。

表 2 5 份标本等位基因 MFI 及 MFI 比率 [ $n$  (%) ]

基因型	检测位点	1	2	3	4	5	空白对照
TCF7L2	C	489 (0.98)	2 240(0.43) <sup>a</sup>	4 720 (0.97)	5 128(0.97) <sup>b</sup>	4 254 (0.98)	65
	T	109 (0.02)	2 950(0.57) <sup>a</sup>	156 (0.03)	140(0.03) <sup>b</sup>	100 (0.02)	87
ABCC8	G	3 142(0.51) <sup>a</sup>	180(0.03) <sup>b</sup>	4 670(0.97)	4 105(0.97)	2 658(0.49) <sup>a</sup>	45
	T	3 005(0.49) <sup>a</sup>	5 020(0.97) <sup>b</sup>	121(0.03)	132(0.03)	2 799(0.51) <sup>a</sup>	66
IRS1	C	6 220(0.98)	2 870(0.53) <sup>a</sup>	3 299(0.45) <sup>a</sup>	2 08(0.03) <sup>b</sup>	4 872(0.54)	78
	T	147(0.02)	2 269(0.47) <sup>a</sup>	4 003(0.55) <sup>a</sup>	6 645(0.97) <sup>b</sup>	4 150(0.46)	45
PPAR $\gamma$ 2	C	2 877(0.59) <sup>a</sup>	4 655(0.60)	3 367(0.97) <sup>b</sup>	2 058(0.56) <sup>a</sup>	3 005(0.96)	60
	G	2 002(0.41) <sup>a</sup>	3 120(0.40)	105(0.03) <sup>b</sup>	1 621(0.44) <sup>a</sup>	119(0.04)	58
SLC47A1	G	6 721(0.97) <sup>b</sup>	4 701(0.97)	4 078(0.95)	2 088(0.46) <sup>a</sup>	6 101(0.97) <sup>b</sup>	76
	A	193(0.03) <sup>b</sup>	167(0.03)	201(0.05)	2 008(0.54) <sup>a</sup>	205(0.03) <sup>b</sup>	61
SLC22A1	G	7 988(0.97)	6 433(0.97) <sup>b</sup>	2 321(0.52) <sup>a</sup>	5 233(0.98)	4 611(0.96) <sup>b</sup>	62
	A	241(0.03)	211(0.03) <sup>b</sup>	2 147(0.48) <sup>a</sup>	115(0.02)	198(0.04) <sup>b</sup>	59
SLCO1B1	T	6 379(0.98) <sup>b</sup>	2 614(0.57) <sup>a</sup>	7 124(0.96)	5 841(0.97)	5 299(0.98)	49
	C	118(0.02) <sup>b</sup>	2 005(0.43) <sup>a</sup>	301(0.04)	178(0.03)	100(0.02)	71

注: MFI: 荧光强度中位值; 等位基因 MFI 比率 =  $MFI_{\text{目标碱基}} / (MFI_{\text{野生型}} + MFI_{\text{突变型}})$ ; <sup>a</sup> 为杂合子, <sup>b</sup> 为突变纯合子, 其余数值为野生型。



1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用非配对  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 方法学建立 7 个目标基因经 PCR 扩增, 产物电泳成像后清楚可见七条目标条带, 无非特异性条带; 经优化 ASPE 杂交条件, 选择退火温度  $55^{\circ}\text{C}$ , Biotin-dCTP 浓度与 dCTP 浓度的比值为 3:1,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 45 min 时检测效果最佳。

2.2 方法学性能评价 采用本实验方法检测倍比稀释

释标本, 最低检测限可达 0.75ng, 以 DNA 浓度为 50ng 时分辨率最高。表 2 反映 5 份样本 MFI 及 MFI 比率结果。从重复性实验结果来看, MFI 批内批间 CV 偏高, 分别达 26.3% 和 33.7%; 但纯合子 MFI 比率批内批间 CV 在 0.9%~3.3% 和 2.1%~4.6%; 杂合子 MFI 比率批内批间 CV 在 2.9%~7.3% 和 5.2%~11.2%。结果见表 3。特异性试验结果显示不含靶位点时 MFI 值均小于 250, 含靶位点 MFI 值可高达 1 000 以上。以本实验方法检测 25 份样本, 与测序结果完全一致, 准确度达 100%。

表 3 5 份标本相关基因型批内批间 MFI, MFI 比率及 CV 值

基因型	批 内				批 间			
	MFI		MFI 比率		MFI		MFI 比率	
	范围 (均值)	CV (%)	范围 (均值)	CV (%)	范围 (均值)	CV (%)	范围 (均值)	CV (%)
TCF7L2 杂合子	1 720~3 105(2 536)	17.3	0.40 ~ 0.53(0.50)	2.9	1 346~2 919(1821)	20.3	0.40~0.55(0.5)	5.2
TCF7L2 纯合子	3 781~5 211(4 781)	15.6	0.96 ~ 0.98(0.97)	1.3	3 011~5 543(4311)	22.3	0.94~0.98(0.97)	3.5
ABCC8 杂合子	2 113~3 919(2 702)	20.7	0.41 ~ 0.59(0.48)	3.2	1 945~4 002(3125)	26.1	0.40~0.59(0.52)	8.6
ABCC8 纯合子	3 708~6 196(4 978)	19.2	0.97 ~ 0.99(0.98)	1.1	3 679~6 389(4545)	30.2	0.96~0.99(0.98)	2.6
IRS1 杂合子	1 945~4 099(3 024)	21.3	0.30 ~ 0.45(0.37)	3.9	1 799~5 209(3944)	26.9	0.31~0.47(0.44)	7.9
IRS1 纯合子	4 228~6 751(5 102)	18.7	0.97 ~ 0.98(0.97)	0.9	3 749~7 004(5278)	24.1	0.96~0.98(0.97)	2.1
PPAR $\gamma$ 2 杂合子	1 565~3 859(2 107)	19.7	0.36 ~ 0.66(0.48)	7.3	1 074~3 982(2003)	20.6	0.30~0.61(0.49)	9.9
PPAR $\gamma$ 2 纯合子	2 985~5 400(4 512)	17.2	0.97 ~ 0.98(0.97)	1.3	2 645~5 212(4562)	18.2	0.95~0.97(0.96)	2.1
SLC47A1 杂合子	2 105~4 598(3 041)	19.1	0.40 ~ 0.53(0.46)	5.2	2 278~6 105(4599)	28.2	0.38~0.49(0.45)	6.7
SLC47A1 纯合子	4 702~7 211(5 549)	16.8	0.95 ~ 0.98(0.96)	3.3	3 678~7 412(5202)	33.5	0.94~0.98(0.96)	3.5
SLC22A1 杂合子	2 166~4 522(3 002)	21.2	0.43 ~ 0.56(0.48)	6.5	2 212~5 148(4201)	30.6	0.38~0.52(0.47)	9.7
SLC22A1 纯合子	4 209~8 005(5 248)	20.9	0.96 ~ 0.98(0.97)	2.3	3 718~7 982(6045)	33.1	0.95~0.98(0.96)	4.6
SLCO1B1 杂合子	1 785~3 621(2 811)	26.3	0.40 ~ 0.55(0.47)	5.5	2 078~4 545(3912)	28.8	0.39~0.51(0.45)	11.2
SLCO1B1 纯合子	5 478~7 822(6 545)	22.1	0.96 ~ 0.98(0.97)	2.3	4 103~7 514(5488)	33.7	0.94~0.98(0.96)	4.3

注: MFI: 荧光强度中位值; CV: 变异系数。

## 3 讨论

2 型糖尿病是全球性的公共卫生问题。我国糖尿病患者已超过 1 亿, 是糖尿病第一大国。对于确诊 T2DM 患者, 最有效的治疗方法就是药物降糖治疗。临床常用口服降糖药物主要包括磺脲类、双胍类、噻唑烷二酮类、氯苯磺酸类和  $\alpha$  葡萄糖苷酶抑制剂类。研究已证实药物基因组学可导致不同患者使用降糖药治疗时, 在药代动力学、疗效以及不良反应中存在显著的个体差异。相关研究已筛选出几十个与药物治疗反应相关的基因位点, 其中 ABCC8, TCF7L2, IRS1, PPAR  $\gamma$  2, SLC47A1, SLC22A1 和 SLCO1B1 等有重要临床意义。

目前, 检测基因多态性的方法主要有: 固相芯片法、PCR 法、测序法等, 但这些方法通量低, 成本高, 耗时长、敏感度和特异度低, 操作复杂, 或需特殊仪器, 从而限制其应用<sup>[14]</sup>。液相芯片技术为新一代高通量检测技术, 操作简便、灵敏度高、重复性好,

特别适用于 SNPs 检测, 在临床各个领域应用越来越多。本研究以 Luminex 200 为平台, 成功建立了高效便捷检测 2 型糖尿病降糖药相关药物基因型的方法, 本方法灵敏度、重复性、特异性及准确性均较理想, 有望为临床选择适宜口服降糖药, 减少不良反应, 提高药效提供实验室支持。

影响 Luminex 液相芯片方法学建立的因素较多, 关键在于多重 PCR 反应体系, ASPE 杂交条件等。(1) 在构建多重 PCR 反应体系时, 为保证扩增的特异性, 要重点关注两个指标: ①各引物间 Tm 差值。为避免各目的基因之间发生非特异性扩增, 在设计 PCR 引物时尽可能的减少各引物间 Tm 差值。本试验中各引物间 Tm 差值小于  $2^{\circ}\text{C}$ ; ②退火温度, 退火温度决定 PCR 特异性, 退火温度高特异性强, 退火温度低则非特异性产物增加, 合理的退火温度从  $55^{\circ}\text{C}$  ~  $70^{\circ}\text{C}$ 。本试验从  $50^{\circ}\text{C}$  开始探索, 直到将前 5 个 PCR 循环退火温度设为  $57^{\circ}\text{C}$  时, 取

得较好效果。(2)在摸索 ASPE 杂交条件时,首先,要避免 ASPE 引物之间发生交叉延伸,这可通过调整多重 PCR 延伸温度得以解决。其次,ASPE 反应体系中 Biotin-dCTP 浓度与 dCTP 浓度比值至关重要。我们在上一课题中已发现,该比值过高会影响 ASPE 引物有效延伸,过低则荧光信号弱,维持在 3:1 可取得较好效果<sup>[11,15]</sup>。

方法学评价结果表明:本方法灵敏度高,最低检测限达 0.75ng;特异性强,设计的 ASPE 引物探针与其他位点均无交叉反应;准确性高,25 份样本检测结果与测序结果完全一致,基本可满足临床需求。

本研究也有一定的局限性,本次研究只收集了 115 份临床标本进行实验,属小标本研究事件,同时 MFI 的批内批间 CV 值达 26.3% 和 33.7%,课题组将继续收集临床标本,对系统参数进行调整优化,以解决 CV 值偏高的问题,进一步在大样本层面验证,以期临床应用。

综上所述,本研究成功建立了液相芯片检测系统,可高效便捷检测 7 个 2 型糖尿病降糖药相关药物基因型,满足临床的需求,有望为临床选择适宜降糖药,减少不良反应,提高药效提供实验室支持。

#### 参考文献:

- [1] 李晓红,严丽,段茉莉,等.妊娠期糖尿病与磺脲类药物受体基因 1 多态性的相关性研究[J].医药前沿,2019,9(33):21-23.  
LI Xiaohong, YAN Li, DUAN Moli, et al. Study on the relationship between gestational diabetes melitus and sulfonylurea receptor gene 1 polymorphism [J]. Journal of Frontiers of Medicine, 2019, 9(33):21-23.
- [2] 俞宁娟,陈南刚,程媛.TCF7L2 基因多态性与糖尿病患者微血管病变及终末期肾病发生的关系[J].中国卫生检验杂志,2020,30(2):192-194.  
YU Ningjuan, CHEN Nangang, CHENG Yuan. Association of TCF7L2 gene polymorphism with microangiopathy and end-stage renal disease in diabetic patients [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2020, 30(2):192-194.
- [3] 骆时木,叶宇宸,欧阳航,等.福建省泉州地区汉族人群 TCF7L2 rs11196205 基因多态性与 T2DM 的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2020,35(4):22-25,31.  
LUO Shimu, YE Yuchen, OUYANG Hang, et al. Correlation between TCF7L2 rs11196205 gene polymorphism and onset risk of T2DM in han population of Quanzhou, Fujian province [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4): 22-25, 31.
- [4] LI Qiuyan, QIAO Yuandong, WANG Chuntao, et al. Associations between two single-nucleotide polymorphisms (rs1801278 and rs2943641) of insulin receptor substrate 1 gene and type 2 diabetes susceptibility: a meta-analysis[J]. Endocrine. 2016, 51(1):52-62.
- [5] 郭宜晨,鲁亚静,钟伟传,等.2 型糖尿病患者外周血 miRNA 表达谱差异研究[J].现代检验医学杂志,2018,33(6):5-8.  
GUO Yichen, LU Yajing, ZHONG Weichuan, et al. Study on the difference of serum miRNA expression profile in peripheral blood of patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(6):5-8.
- [6] 王慧,皇甫建,肖瑞,等.2 型糖尿病患者血清脂肪酸结合蛋白 4、PPAR $\gamma$  表达变化及其与胰岛素抵抗的相关性[J].山东医药,2020,60(6):28-30.  
WANG Hui, HUANG Fujian, XIAO Rui, et al. Expression changes of serum fatty acid-binding protein 4 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in diabetic patients and their correlation with insulin resistance [J]. Shandong Medical Journal, 2020, 60(6):28-30.
- [7] HE Rui, ZHANG Dandan, LU Wei, et al. SLC47A1 gene rs2289669 G > A variants enhance the glucose-lowering effect of metformin via delaying its excretion in Chinese type 2 diabetes patients[J].Diabetes Research and Clinical Practice, 2015, 109(1): 57-63.
- [8] 赵玲,柯亭羽,郭佳,等.SLC01B1 多态性及脂代谢与糖尿病肾病的相关性研究[J].医学研究杂志,2019,48(6):46-50.  
ZHAO Lin, KE Tingyu, GUO Jia, et al. Correlation between SLC01B1 gene polymorphism and type 2 diabetic nephropathy[J]. Journal of Medical Research, 2019, 48(6):46-50.
- [9] ZHOU Shuang, XIANG Qian, MU Guangyan, et al. Effects of CYP2C8 and SLC01B1 genetic polymorphisms on repaglinide pharmacokinetics: a systematic review and meta-analysis[J]. Curr Drug Metab, 2019, 20(4):266-274.
- [10] 孙谦,周辉,郭丽娜.血脂异常人群 ApoE 和 SLC01B1 基因多态性及相关性研究[J].现代检验医学杂志,2017,32(6):28-31.  
SUN Qian, ZHOU Hui, GUO Lina. Analysis of dyslipidemia correlation and polymorphisms of apoE and SLC01B1 gene in dyslipidemia people [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(6):28-31.
- [11] 许红丽,邓任堂,陈梅莲,等.液相芯片技术快速检测 CYP2C9, CYP2C19, CYP4F2, VKORC1 及 ABCB1 基因多态性[J].中华检验医学杂志,2019,42(12):1042-1050.  
XU Hongli, DENG Rentang, CHEN Meilian, et al. Rapid detection of CYP2C9, CYP2C19, CYP4F2, VKORC1 and ABCB1 gene polymorphisms by liquid phase chip technology [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2019, 42(12):1042-1050.
- [12] 李婧婵,姜春来,于源华,等.液相芯片技术联合多位基因特异性引物延伸反应检测结核分枝杆菌耐药突变[J].临床检验杂志,2016,34(3):165-168.  
LI Jingchan, JIANG Chunlai, YU Yuanhua, et al. Detection of multidrug-resistant *Mycobacterium Tuberculosis* by suspension array technology and allele-specific primer extension reaction [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016, 34(3): 165-168.