

论著·基础研究

应用焦磷酸测序技术检测 VKORC1 和 CYP2C9 基因型*

徐 琴¹, 黄盛文^{2#}, 杨楠楠¹, 王仕敏², 罗振元², 安邦权^{2△}

(1. 贵州医科大学医学检验学院, 贵州贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院检验科, 贵州贵阳 550002)

摘要:目的 建立基于焦磷酸测序技术的维生素 K 环氧化物还原酶复合物亚单位 1(VKORC1)和细胞色素 P450 2C9(CYP2C9)基因分型的方法,用于检测华法林药物代谢酶相关基因多态性。方法 收集 50 份健康人外周血样本,提取全血基因组 DNA。针对 VKORC1 -1639G>A、CYP2C9 430C>T 和 CYP2C9 1075A>C 3 个单核苷酸多态性(SNP)位点,分别设计一套带生物素标记的扩增引物和测序引物。样本经 PCR 扩增后进行焦磷酸测序,结合信号峰型分析每个样本基因型,以 Sanger 测序法为对照,比较两种方法检测基因型结果的一致性。结果 根据待测位点出峰的碱基和峰高,可以清晰判断 3 个 SNP 位点的基因型,50 份样本中,VKORC1 -1639G>A 基因型 AA 和 AG 分别有 41 例和 9 例,各占 82%和 12%;CYP2C9 基因型 *1/*1 和 *1/*3 分别有 45 例和 5 例,各占 90%和 10%,未检出等位基因 CYP2C9 *2。焦磷酸测序技术与 Sanger 测序法所检测的基因型结果一致。结论 焦磷酸测序技术在 SNP 基因分型中具有操作简便、耗时短、成本低和结果准确可靠等优点,该检测方法可快速对 CYP2C9 和 VKORC1 的 SNP 位点进行分型。

关键词:焦磷酸测序; 华法林; CYP2C9; VKORC1; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.001

中图分类号:R596.2

文章编号:1673-4130(2018)07-0769-04

文献标识码:A

Application of the pyrosequencing technique for detection of VKORC1 and CYP2C9 genotypes*

XU Qin¹, HUANG Shengwen^{2#}, YANG Nannan¹, WANG Shimin², LUO Zhenyuan², AN Bangquan^{2△}

(1. School of Clinical Laboratory science, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China;

2. Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract:Objective To establish genotyping methods for vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) and cytochrome P450 2C9(CYP2C9) based on pyrosequencing technique to detection of warfarin metabolizing enzyme related gene polymorphisms. **Methods** A total of 50 peripheral blood samples from healthy adults were collected and the whole blood genomic DNA was extracted. A set of biotin-labeled amplification primers and sequencing primers were designed respectively for three SNP sites: VKORC1 -1639 G>A, CYP2C9 430C>T and CYP2C9 1075A>C. After PCR amplification of the samples, pyrophosphoric acid sequencing was conducted. And then the signal peaks form were combined to analyze and determine each sample genotype. Genotyping results were verified by Sanger sequencing, and the consistency of the two sequencing methods was compared. **Results** Genotypes of the three SNPs can be clearly determined according to the bases and height of the signal peaks. Among the 50 samples, there were 41 AA and nine AG for VKORC1 -1639G>A, accounting for 82% and 12% respectively, and there were 45 *1/*1, five *1/*3 for CYP2C9, accounting for 90% and 10% respectively, no CYP2C9 *2 allele detected. Genotype results detected by pyrosequencing and Sanger sequencing were consistent with each other. **Conclusion** In SNP genotyping, Pyrosequencing has the advantages of convenience, time-saving, cheap with accurate and reliable results, which can quickly determine the genotypes of CYP2C9 and VKORC1.

Key words: pyrosequencing; warfarin; VKORC1; CYP2C9; single nucleotide polymorphism

* 基金项目:贵州省高层次创新型人才培养计划——“百”层次人才(黔科合平台人才[2016]5670号);贵阳市科技创新平台计划([2016]1001)35号)。

作者简介:徐琴,女,技师,主要从事遗传病基因诊断研究。 # 共同第一作者:黄盛文,男,主任医师,主要从事遗传病分子机制方向的研究。 △ 通信作者, E-mail: anhonggao@sina.com。

本文引用格式:徐琴,黄盛文,杨楠楠,等.应用焦磷酸测序技术检测 VKORC1 和 CYP2C9 基因型[J].国际检验医学杂志,2018,39(7): 769-772.

华法林是临床上最常使用的口服抗凝药。但华法林的稳定剂量在人群中存在明显个体差异,正确估算不同个体华法林的安全、有效治疗剂量有助于降低过度抗凝和出血的风险^[1-3]。遗传因素是影响华法林用量个体差异的主要因素,包括维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1 基因(VKORC1)和细胞色素 P450 2C9 基因(CYP2C9)^[4]。VKORC1 -1639G>A 基因位点存在多态性,与华法林剂量和疗效密切相关^[5]。与野生型等位基因 CYP2C9 * 1 相比,CYP2C9 430C>T 和 CYP2C9 1075A>C 变异所对应的等位基因 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 导致酶活性降低,从而使华法林代谢减慢,易出现出血等不良反应^[6]。在用药前对 VKORC1 和 CYP2C9 基因进行分型,可帮助患者预测华法林的维持剂量从而减少出血并发症^[7-8]。本研究采用焦磷酸测序技术,建立 VKORC1 和 CYP2C9 基因分型的快速检测方法,以保证临床能及时对患者进行基因导向的华法林个体化用药。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选自贵州省人民医院健康体检成人 EDTA 抗凝血标本 50 份,其中男 21 例,女 29 例,平均年龄(35.7±9.7)岁。所有标本均通过本院伦理委员会批准,并签署患者知情同意书。检测仪器已经专业工程师调试最佳状态,实验室环境已达检测要求,实验人员通过专业操作培训。

1.2 仪器与试剂 PyroMark 焦磷酸测序仪(Pyro-

Mark® Q24,德国 Qiagen 公司);Veriti 96-Well PCR 扩增仪(veriti 96 well Thermal cycler,美国 Aoolied biosystems 公司);Milli-Q 超纯水机(D3,美国 Merck 公司);核酸蛋分析仪(ASP-2680,美国 ACTGene 公司);专用聚合酶链反应试剂和测序试剂(978703;978705;有效期至 2018 年 5 月 21 日;德国 Qiagen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及 DNA 提取 抽取受试者外周静脉血 2 mL,EDTA-Na₂ 抗凝,取全血 200 μL,用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA(磁珠法),经核酸蛋白分析仪进行 DNA 纯度和浓度检测后于-20℃保存备用。

1.3.2 PCR 扩增 所有引物由 PyroMark Assay Design Software 2.0(德国 Qiagen 公司)软件设计,由上海生工生物工程技术服务公司合成,具体引物名称及序列见表 1。PCR 体系包括:Mix 12.5 μL,MgCl₂ (25 mmol/L)1.5 μL,CoralLoad concentrate(10×)2.5 μL,Taq DNA 聚合酶 5 μL,PrimerA/B 各 0.5 μL,DNA 模板 2 μL,加水补充至 25 μL。PCR 反应条件,预变性 94℃,15 min,变性 94℃,30 s,退火(VKORC1 56℃、CYP2C9 * 2 51℃、CYP2C9 * 3 51℃),30 s,延伸 72℃,30 s,共 45 次扩增循环,最后 72℃延伸 10 min。

表 1 扩增及测序引物及扩增片段长度

SNP 位点	引物序列(5'→3')	片段长度(bp)
VKORC1 -1639G>A	F-TGT TGG CCA GGC TTG TCT TAA ACT	138
	R(Bio)-TGG GAA GTC AAG CAA GAG AAG ACC	
	S-GCG TGA GCC ACC GCA	
CYP2C9 430C>T	F(Bio)-CTC ATG ACG CTG CGG AAT TTT	104
	R-CCA CCC TTG GTT TTT CTC AAC TC	
	S-GGG CTT CCT CTT GAA C	
CYP2C9 1075A>C	F-CCA GGA AGA GAT TGA ACG TGT GA	231
	R(Bio)-TTT GGG GAC TTC GAA AAC ATG	
	S-CAC GAG GTC CAG AGA TAC	

注:F 为上游引物;R 为下游引物;S 为测序引物;Bio 为生物素标记物

1.3.3 PCR 产物凝胶电泳分析 制备 2%的琼脂糖凝胶,加入 2 μL PCR 产物在电压 110 V,电流 400 mA 的条件下电泳 40 min,在凝胶成像仪上观察目的条带电泳结果。

1.3.4 焦磷酸测序 配制测序引物退火缓冲液,固定 PCR 产物,使 Sepharose Beads 与 Biotin 标记的 PCR 产物充分结合,在真空工作站中制备成单链

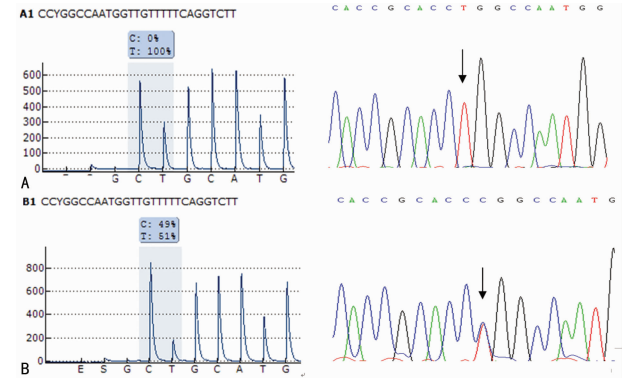
DNA 模板,在试剂仓中依次对应加入 dNTP、底物和酶混合物(DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶)。在 PyroMark Q24 软件上设置测序运行程序,将试剂仓和 24 孔测序孔放入 PyroMark Q24 中进行焦磷酸测序,15 min 后测序结束在同一软件读取结果并分析。

1.3.5 重复性实验和测序验证 于 1 周内随机挑选

20 份样本重复焦磷酸测序 3 次,分析 3 次结果的一致性。50 份样本 3 个 SNP 位点均送上海生工生物工程技术服务公司进行 Sanger 测序,验证两种方法结果的一致性。

2 结 果

2.1 不同基因型测序结果 根据待测位点出峰的碱基和峰高,可以清晰判断 3 个 SNP 位点的基因型。图 1 显示 VKORC1 -1639G>A 位点的 2 种基因型,灰色部分为待测位点。图 1A 中,待测区域出现的两个峰高 C 为模板序列碱基,单个峰高 T(T=100%)表示该位点为 TT 纯合子。由于该位点测序引物设计为反向测序,实际基因型为纯合子 AA。图 1B 中,待测区域出现两个半峰高 C(其中两个峰高为模板序列碱基),半个峰高 T(C=49%,T=51%),即该位点为杂合子 AG。图 2A 显示 CYP2C9 430C>T 位点基因型,图 2B 和图 2C 显示 CYP2C9 1075A>C 位点基因型。图 2A 中,待测区域出现两个峰高 G(其中一个为模板序列,G=93%),该位点为反向测序,即基因型为纯合子 * 1/ * 1。图 2B 中,待测区域出现一个峰高 A(A=97%),即该位点为纯合子 * 1/ * 1;图 2C 中,待测区域出现半个峰高 A 和半个峰高 C(A=48%,C=52%),即该位点为杂合子 * 1/ * 3。左边为焦磷酸测序法检测结果,右边为 Sanger 测序法检测结果。



注:该位点焦磷酸测序为反向测序,Sanger 法为正向测序,即 A 基因型为纯合子 AA,B 为杂合子 AG

图 1 VKORC1 -1639G>A 基因型焦磷酸测序与 Sanger 测序对比图

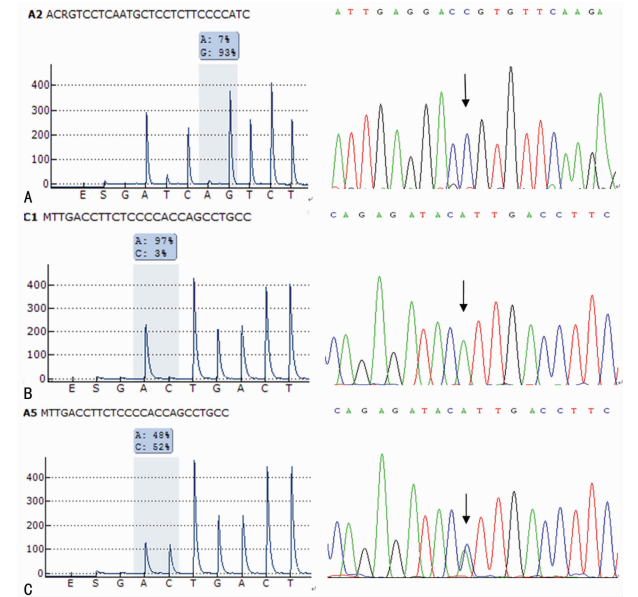
2.2 基因型分布 50 份标本中,VKORC1 -1639G>A 纯合子 AA 41 例,杂合子 AG 9 例,各占 82%和 18%,未检出 GG 纯合子。CYP2C9 430C>T 只检出纯合子 * 1/ * 1,未检出等位基因 CYP2C9 * 2。根据 CYP2C9 1075A>C 分型结果,纯合子 * 1/ * 1 和杂合子 * 1/ * 3 分别有 45 例和 5 例,各占 90%和 10%,未检出纯合子 * 3/ * 3。见表 2。

2.3 重复性实验和测序验证结果 20 份标本在 1 周内重复 3 次焦磷酸测序,其检测基因型结果完全一致。经 Sanger 测序法验证,所有样本 3 个位点的两种

基因分型方法的结果完全一致。

表 2 50 份标本 VKORC1 -1639G>A 和 CYP2C9 1075A>C 等位基因和基因型频率的分布

基因位点	等位基因	n(%)	基因型	n(%)
VKORC1 -1639G>A	A	91(91)	A/A	41(82)
	G	9(9)	A/G	9(18)
CYP2C9 1075A>C	* 1	95(95)	* 1/ * 1	45(90)
	* 3	5(5)	* 1/ * 3	5(10)



注:A 为 CYP2C9 430C>T 分型,焦磷酸测序为反向测序,Sanger 法为正向测序,即基因型为纯合子 * 1/ * 1;B 和 C 为 CYP2C9 1075A>C 基因型,两种方法均为正向测序,即基因型分别为纯合子 * 1/ * 1 和杂合子 * 1/ * 3

图 2 CYP2C9 430C>T 和 CYP2C9 1075A>C 基因型焦磷酸测序与 Sanger 测序对比图

3 讨 论

对 VKORC1-1639G>A、CYP2C9 430C>T 和 CYP2C9 1075A>C 3 个位点的基因分型有助于华法林个体化治疗[9]。目前对这 3 个 SNP 位点的分型方法可以分为两类:一类是单链构象多态性(SSCP)、变性梯度凝胶电泳(DDGE)、酶切扩增多态性序列(CAPS)、等位基因特异性 PCR(AS-PCR)等传统的检测方法。另一类是直接测序、DNA 芯片、变性高效液相色谱(DHPLC)、质谱检测技术、高分辨率溶解曲线(HRM)等新型技术。传统方法对设备要求不高、成本低,但检测速度慢,很难实现高通量的检测;新方法能够实现高通量、自动化检测,但对设备和技术要求高,成本较高。焦磷酸测序技术是近年发展起来的一种能够通过对基因序列来实现检测和确诊的 DNA 实时定量酶促及偶联反应测序技术[10],通过待测序列碱基的掺入量而释放相应荧光信号,定量检测基因型,特别适用于短序列的测定,被广泛应用于 SNP 分

型^[11]。本研究所有样本的检测结果显示与 Sanger 测序法检测结果完全一致,可以满足临床上对 VKORC1 和 CYP2C9 基因进行准确分型的要求。

焦磷酸测序用于 SNP 或点突变位点分型时,测序引物设计在待检突变点附近,待检序列在 50 个碱基以内,使待检的特异性突变区域比较集中,其区域前后的序列高度保守,便于设计扩增引物和测序引物。与 Sanger 测序法相比,Sanger 测序法仅在对大片 DNA 进行序列测定时才显示出优势,且周期长、通量低;该技术无需送公司检测,在普通实验室即可完成,其耗时短(1 次测序仅需 15 min)、成本低;一次可同时完成 96 个样本,并能同时检测不同样本的不同 SNP 位点,具有极高灵活性;能满足高通量检测要求,实现临床大样本检测需求;并可直观地通过测序峰的高度定量检测基因型,结果判读简单迅速,可避免人为误差;Sanger 测序所检测的基因型,用焦磷酸测序法同样能稳定测出,其灵敏度和准确性高^[12]。与 Sanger 测序法不同的是,该法不需毛细管电泳和荧光信号激发装置,具有普通测序仪器缺少的内部标准化控制系统,操作简便易行,能实现程序化检测,有助于标准规范化操作流程的建立^[13]。与 Taqman 探针、PCR-RFIP 和毛细管测序等传统技术相比,焦磷酸测序能够直接检测指定目标序列的基因型,同样体现出可靠性高、重复性好、特异性强、利于自动化,能够快速准确对患者的基因突变分型等更佳优势^[14-15]。因此,焦磷酸测序法更适于临床分子检验的应用。

本研究成功建立了基于焦磷酸测序技术的 VKORC1 和 CYP2C9 基因快速、准确的分型方法,可对这 2 个基因进行批量基因型检测,有助于临床上开展华法林个体化用药。

参考文献

- [1] OLDENBURG J, WATZKA M, ROST S, et al. VKORC1: molecular target of coumarins[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(Suppl 1): 1-6.
- [2] POOPAK B, RABIEIPOOR S, SAFARI N, et al. Identification of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms in Iranian patients who are under warfarin therapy[J]. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2015, 9(4): 185-192.
- [3] 管文燕, 徐航, 叶庆. 基因型指导我国汉族人群华法林稳定治疗剂量预测模型的验证及评价[J]. 中国药房, 2016, 27(11): 1445-1450.
- [4] HUANG S W, CHEN H S, WANG X Q, et al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients[J]. Pharmacogenet Genomics, 2009, 19(3): 226-234.
- [5] SANTOS P L, DINARDO C L, SCHETTERT I T, et al. CYP2C9, and VKORC1, polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2013, 69(4): 789-797.
- [6] SCOTT S A, SANGKUH K, STEIN C M, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy: 2013 update[J]. Clin Pharmacol Ther, 2013, 90(2): 328-332.
- [7] EPSTEIN R S, MOYER T P, AUBERT R E, et al. Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES(Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study)[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(25): 2804-2812.
- [8] ANDERSON J L, HORNE B D, STEVENS S M, et al. A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing(CoumaGen- II)[J]. Circulation, 2012, 125(16): 1997.
- [9] SRIDHARAN K, MODI T, BENDKHALE S, et al. Association of genetic polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 with bleeding following warfarin: a Case-Control study[J]. Curr Clin Pharmacol, 2016, 11(1): 62-68.
- [10] AHMADIAN A, EHN M, HOBER S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future[J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1/2): 83-94.
- [11] ALDERBORN A, KRISTOFFERSON A, HAMMERLING U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing[J]. Genome Res, 2000, 10(8): 1249-1258.
- [12] ZHANG H, CHEN X, WANG Z, et al. Pyrosequencing analysis for mutations in embB codon306 among clinical mycobacterium tuberculosis isolates from Qingdao, China[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7): 11276-11282.
- [13] TSCHENTSCHER F, FREY U H, BAJANOWSKI T. Amelogenin sex determination by pyrosequencing of short PCR products[J]. Int J Legal Med, 2008, 122(4): 333-335.
- [14] 王秀芳, 张艳, 廖映红, 等. Real-time PCR、焦磷酸测序及基因芯片快速检测 ALDH2 * 2 基因多态性[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2017, 38(1): 142-146.
- [15] 周霞辉, 吴成就, 肖乐东, 等. 焦磷酸测序技术检测 k-ras 基因突变方法的建立[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(4): 430-434.

(收稿日期: 2017-09-29 修回日期: 2017-11-19)