

· 论 著 ·

HLA-B*15:02 基因型的快速鉴别方法建立及临床应用*

初亚男, 封利颖, 李玉娇, 张婕妤[△]

中国人民解放军东部战区总医院临床药学科, 江苏南京 210002

摘要:目的 建立 rs144012689 位点的焦磷酸测序方法, 从多个角度评估其预测芳香族类抗癫痫药物严重皮肤不良反应的性能。方法 筛选最优的聚合酶链反应(PCR)扩增体系, 评估该研究建立的 rs144012689 位点焦磷酸测序方法的检测限、灵敏度、特异度, 并分析其与 Sanger 测序、商品化试剂盒的一致性。收集该院 2019—2021 年确诊为史蒂文斯-约翰逊综合征(SJS)的患者, 评价该方法对确诊病例的检出性能。结果 该方法检测 rs144012689 位点筛选出人类白细胞抗原(HLA)-B*15:02 基因型的灵敏度和特异度均为 100%, 检测限为 0.4 ng/ μ L 基因组 DNA。60 份标本焦磷酸测序结果均与 Sanger 测序及商品化试剂盒检测结果一致。2 份 SJS 确诊患者标本的焦磷酸测序和 HLA-B 高分辨分型结果均提示携带 HLA-B*15:02 基因型。结论 该研究建立的方法具备快速、检测限低、灵敏度高和特异度高的优点, 可用于芳香族类抗癫痫药物不良反应高危基因 HLA-B*15:02 的筛查。

关键词:rs144012689 位点; 抗癫痫药物; HLA-B*15:02; 焦磷酸测序; 基因型; 史蒂文斯-约翰逊综合征

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.09.002

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2023)09-1031-04

文献标志码:A

Establishment and clinical application of a rapid identification method
for HLA-B*15:02 genotype*

CHU Ya'nan, FENG Liying, LI Yujiao, ZHANG Jieyu[△]

Department of Clinical Pharmacy, Eastern Theater Command General
Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

Abstract: Objective To establish a pyrosequencing method of rs144012689 site and to evaluate its efficacy in predicting severe skin antiepileptic adverse drug reaction in aromatic family from multiple perspectives. **Methods** The optimal PCR amplification system was screened and established. The detection limits, sensitivity, and specificity of the pyrosequencing method at rs144012689 site established in this study were evaluated. Meanwhile, this method was validated with Sanger sequencing and commercial kit. Patients diagnosed with Stevens-Johnson syndrome (SJS) from 2019 to 2021 in this hospital were collected to evaluate the detection performance of this method. **Results** The sensitivity and specificity of the method for detecting human leukocyte antigen (HLA)-B*15:02 genotype at rs144012689 were 100% and the detection limit was 0.4 ng/ μ L genomic DNA. The pyrosequencing results of 60 samples were consistent with those of Sanger sequencing and commercial kit. Pyrosequencing and HLA-B high resolution typing results of 2 samples of confirmed SJS patients indicated that they carried HLA-B*15:02 genotype. **Conclusion** The method established in this study has the advantages of rapid detection, low detection limit, high sensitivity and high specificity, and it could be used for the screening of high risk gene HLA-B*15:02 of antiepileptic adverse drug reaction in aromatic family.

Key words:rs144012689 site; antiepileptic drugs; HLA-B*15:02; pyrosequencing; genotype; Stevens-Johnson syndrome

卡马西平是常用的抗癫痫药物, 史蒂文斯-约翰逊综合征(SJS)和中毒性表皮坏死松解症(TEN)是这种药物可能引起的致死性皮肤不良反应。VigiBase 数据库中单一药物引起 SJS 排名前三的药物中就包括

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82001422);中国人民解放军东部战区总医院院内课题(22LCZLXJS56)。

作者简介:初亚男,女,技师,主要从事临床药学方面研究。 [△] 通信作者, E-mail: zjy881021@126.com。

苯妥英钠和卡马西平^[1]。此外,奥卡西平作为卡马西平的酮基衍生物也会发生类似的严重不良反应。卡马西平、苯妥英钠、奥卡西平同属于芳香族类抗癫痫药物。近年发现携带人类白细胞抗原(HLA)-B*15:02 基因的亚洲人群服用上述药物发生 SJS/TEN 的风险显著高于不携带人群,因此,HLA-B*15:02 基因携带者应考虑避免使用上述 3 种药物作为替代药物^[2]。常规的 HLA 分型方法有低分辨的聚合酶链反应-等位基因特异性引物法(PCR-SSP)^[3]、聚合酶链反应-序列特异寡核苷酸探针法(PCR-SSOP)^[4]及高分辨的聚合酶反应-直接测序法(PCR-SBT)^[5]等,上述方法操作烦琐、需要专用软件、检测成本高、耗时长^[6],陆续有研究人员发现可以用单核苷酸多态性位点(SNP)表征特定的 HLA 基因型。本研究拟采用操作简便、灵敏度高、无须荧光标记的焦磷酸测序法建立 rs144012689 位点多态性分析方法,分析其与 Sanger 测序、商品化试剂盒的一致性,并采用已确诊为 SJS 的病例进行验证,初步评估本研究建立的测序方法的临床适用性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 验证标本来源于本科室标本库中已完成 HLA-B 分型的 40 例患者的核酸标本(40 份)及随机核酸标本(20 份),采用中国台湾世基生物公司 HLA-B 位点 1502 基因检测试剂盒(简称世基试剂盒)完成检测的核酸标本 40 份。2019—2021 年在本院确诊为芳香族类抗癫痫药物诱发的 SJS 不良反应患者 2 例。

1.2 仪器与试剂 焦磷酸测序试剂盒及缓冲液购自德国 QIAGEN 公司,HLA-B 位点 1502 基因检测试剂盒购自中国台湾世基生物公司,Taq 酶购自日本 TaKaRa 公司,全血基因组提取试剂盒购自美国 Promega 公司,实验用水为灭菌蒸馏水,其他试剂均为分析纯。Q24 焦磷酸测序仪购自德国 QIAGEN 公司,SLAN96S 实时荧光定量 PCR 仪购自上海宏石公司,A200 基因扩增仪购自杭州朗基科学仪器公司,微量紫外分光光度计购自南京伍义公司。

1.3 方法

1.3.1 全血基因组 DNA 提取 本研究采用 Wizard Genomic DNA Purification Kit 提取全血中基因组 DNA,对提取的基因组 DNA 进行纯度和浓度测定,确保 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0,按照说明书将世基试剂盒检测的基因组 DNA 标本的质量浓度控制在 12.5~50.0 ng/μL。

1.3.2 焦磷酸测序引物的设计和合成 采用 Assay Design Software 2.0 进行引物设计,使用 Primer 5.0 进行筛选,所有引物由 Invitrogen 公司合成,引物序列见表 1。

1.3.3 PCR 体系优化和焦磷酸测序 PCR 反应体

系和焦磷酸测序方法参考作者已发表的文章所述^[7]。测序推注碱基的顺序为“GTAGCA”,其中第 2 个碱基“T”为 rs144012689 位点的野生信号峰,第 3 个碱基“A”为 rs144012689 位点的突变信号峰,根据测序图谱“A”信号峰的有无判别是否携带 HLA-B*15:02 基因。将引物组进行配对后,根据单碱基峰高和比例筛选最佳引物。分别考察 55℃、60℃、65℃退火温度下的扩增效率,根据单碱基峰高评价最适的退火温度。梯度稀释人基因组 DNA 至 10.0 ng/μL、2.0 ng/μL、0.4 ng/μL 及空白对照 4 个梯度平行扩增并测序 3 次,根据单碱基峰高和比例评价本方法的检测限。

表 1 rs144012689 位点的焦磷酸测序引物	
引物	引物序列(5'-3')
正向引物 1	CCACAACCATCAAGGTGATACAT
反向引物 1	Biotin AAGTGTTCCCTGCCTCATTACTG
测序引物 1	CTGCGTTAGCCCTGTG
正向引物 2	CATTGTCACATGTGCTGCACAA
反向引物 2	Biotin TCAAGCCCCAGGTAGAAAGTGTT
测序引物 2	CTGCGTTAGCCCTGTG

1.3.4 灵敏度和特异度考察 HLA-B 基因 PCR-SBT 高分辨分型是鉴别该基因分型的金标准。为了评价本研究建立的 rs144012689 位点焦磷酸测序法表征 HLA-B*15:02 基因型的性能。对 40 份已完成 HLA-B 基因 PCR-SBT 高分辨分型的标本采用焦磷酸测序检测进行 rs144012689 位点检测,评估 rs144012689 位点的灵敏度(采用焦磷酸测序检测 rs144012689 正确判定检测标本含有 HLA-B*15:02 基因型的比例)和特异度(采用焦磷酸测序检测 rs144012689 正确判定检测标本不含有 HLA-B*15:02 基因型的比例)。

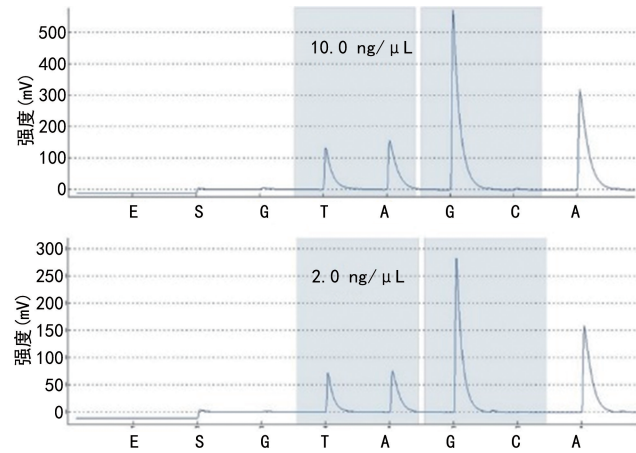
1.3.5 焦磷酸测序与 Sanger 测序和商品化试剂盒的一致性评价 本研究使用的焦磷酸测序技术属于边合成边测序的酶联级联测序技术,Sanger 测序基于双脱氧链终止法进行测序属于一代测序,是验证测序结果准确性的金标准。因此本研究从标本库中选择 20 份标本,同时采用焦磷酸测序和 Sanger 测序对 rs144012689 位点进行检测,比较两种测序方法的一致性。选择标本库中的 40 份标本,按照世基试剂盒说明书要求进行 HLA-B*15:02 基因检测,同时将 40 份标本进行焦磷酸测序,比较本研究建立方法与商品化试剂盒检测的一致性,将筛查出的阳性标本外送进行 HLA-B 基因的高分辨分型,检测结果使用 Kappa 分析进行一致性评价。

1.3.6 建立的方法对 SJS 综合征患者的临床应用 收集本院 2019—2021 年确诊为芳香族类抗癫痫药物所致 SJS 的患者,同步进行 PCR-SBT 分型和

rs144012689 位点焦磷酸测序检测。评价本方法对确诊病例的检出性能。

2 结 果

2.1 PCR 体系优化结果 根据单碱基峰高和测序峰比例筛选出上游引物 1、下游引物 1、测序引物 2 为最



注:图中灰色区域为 SNP 的判别区域。

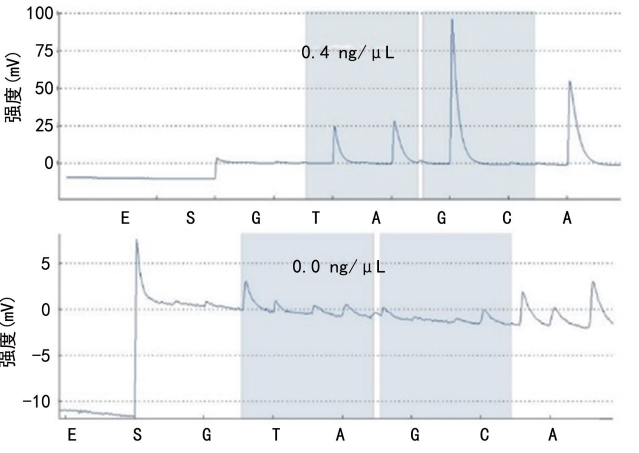
图 1 不同浓度基因组 DNA rs144012689 位点的焦磷酸测序结果

2.2 灵敏度和特异度结果 40 份标本中,HLA-B 高分辨分型含有 HLA-B* 15 : 02 型的标本有 2 份,分别为 HLA-B* 15 : 02 及 HLA-B* 44 : 03 型标本 1 份和 HLA-B* 15 : 02 及 HLA-B* 51 : 01 型标本 1 份,不含有 HLA-B* 15 : 02 型的标本有 38 份,包括与 HLA-B* 15 : 02 型相近的 HLA-B* 15 : 01 型、HLA-B* 15 : 11 型、HLA-B* 15 : 18 等型别。焦磷酸测序结果为 TA 型的标本有 2 份,TT 型标本有 38 份,见表 2。表明使用 rs144012689 位点表征 HLA-B* 15 : 02 基因型的灵敏度和特异度均为 100 %。

焦磷酸测序结果	HLA-B 高分辨分型结果		合计
	不含有 HLA-B* 15 : 02 型	含有 HLA-B* 15 : 02 型	
TT 型	38	0	38
TA 型	0	2	2
AA 型	0	0	0
合计	38	2	40

2.3 一致性评价结果 20 份标本 rs144012689 位点 Sanger 测序和焦磷酸测序检测得到 TT 型 16 份,TA 型 4 份,2 种方法一致性比较的 Kappa 值为 1,见表 3; 40 份标本焦磷酸测序结果显示有 4 份为 TA 型,与商品化试剂盒检测出的 4 份阳性标本一致;2 种方法一致性比较的 Kappa 值为 1,见表 4。2019—2021 年共计对 89 例考虑服用芳香族类抗癫痫药物和已经发生药物性皮炎(药疹)的患者进行 rs144012689 位点的检测,共计筛查出 12 份“A”型基因携带者,其中 2 例为 SJS 确诊患者,1 例为服用卡马西平后诱发的药疹,1

例为奥卡西平过敏史,在服用丙戊酸钠和托吡酯时发生了交叉过敏反应^[8],2 例患者 rs144012689 位点检测结果为 TA 型。将上述 10 份 TA 型标本外送进行 HLA-B 基因的高分辨分型,结果显示 10 份标本均含有 HLA-B* 15 : 02 基因型。上述验证结果说明本研究建立的方法与另外两种方法的一致性良好,具有良好的临床应用潜力。



例有奥卡西平过敏史,在服用丙戊酸钠和托吡酯时发生了交叉过敏反应^[8],2 例患者 rs144012689 位点检测结果为 TA 型。将上述 10 份 TA 型标本外送进行 HLA-B 基因的高分辨分型,结果显示 10 份标本均含有 HLA-B* 15 : 02 基因型。上述验证结果说明本研究建立的方法与另外两种方法的一致性良好,具有良好的临床应用潜力。

焦磷酸测序结果	Sanger 测序结果			合计
	TT 型	TA 型	AA 型	
TT 型	16	0	0	16
TA 型	0	4	0	4
AA 型	0	0	0	0
合计	16	4	0	20

焦磷酸测序结果	世基试剂盒结果		合计
	不含有 HLA-B* 15 : 02 型	含有 HLA-B* 15 : 02 型	
TT 型	36	0	36
TA 型	0	4	4
AA 型	0	0	0
合计	36	4	40

3 讨 论

我国已经在一些地区施行了按疾病诊断相关分组(DRGs)完成支付的试点改革,对细化临床用药方案,提升合理用药水平和提高医疗质量做出了更高的要求。药物的不良反应是造成患者住院时间延长、住

院和药品费用增加的重要因素^[9]。用药前进行 HLA-B* 15 : 02 基因型筛查将为避免不良反应发生,降低患者治疗成本,实现个体化给药提供技术支撑。本研究结果表明,rs144012689 位点“A”等位基因与 HLA-B* 15 : 02 基因型存在 100% 的连锁关系,与前期中国香港汉族人群和美国亚洲人群中的研究结果(96.7%~100.0%)相近^[10-11]。因此,可以使用 rs144012689 位点的分型检测代替传统的 HLA 分型方案。rs144012689 位点附近的 rs2596496 多态性会影响 rs144012689 位点的分型结果,尤其干扰以杂交原理为基础的 TaqMan 探针法、芯片法等技术的灵敏度和特异度,直接测序可以克服这一缺点,常见的一代测序方法中焦磷酸测序法因其操作简单、检测时间短、通量高的优点更适用于 SNP 分型。本研究基于焦磷酸测序建立的 rs144012689 位点检测方法,检测限低至 0.4 ng/ μ L 基因组 DNA,高于商品化试剂盒的 12.5~50.0 ng/ μ L 基因组 DNA,检测时间从获得标本采集到测序完成仅需要 3 h,远低于 HLA 高分辨分型 3~5 d 的检测时间,与 HLA 高分辨分型和 HLA-B 位点基因检测试剂盒阳性和阴性的筛查结果一致。该方法较高分辨分型方法^[12]的检测成本低,是实现成本效益优势的一个可行手段。但是本研究也存在一些不足,需要进一步增加样本量和阳性病例数对本方法的检测性能进行进一步评价。

参考文献

[1] ZHENG Y,ZHOU W,GUO X,et al. Drug-induced Stevens-Johnson syndrome: a disproportionality analysis from the pharmacovigilance database of the World Health Organization [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2022, 21 (8): 1127-1133.

[2] PHUNG T H,CONG DUONG K N,JUNIO GLORIA M A,et al. The association between HLA-B* 15 : 02 and phenytoin-induced severe cutaneous adverse reactions: a meta-analysis [J]. *Pharmacogenomics*, 2021, 23 (1): 49-

59.

[3] LARA-ARMÍ F F,VISENTAINER J E L,ALVES H V, et al. Optimization of HLA-B* 27 allele genotyping by PCR-SSP [J]. *Clinics*, 2020, 75: e1840.

[4] DECATES T S,VELTHUIS P J,SCHELKE L W,et al. Increased risk of late-onset, immune-mediated, adverse reactions related to dermal fillers in patients bearing HLA-B* 08 and DRB1* 03 haplotypes [J]. *Dermatol Ther*, 2021, 34 (1): e14644.

[5] PHAM T T H,TRAN Q B,SUKASEM C,et al. A novel allele-specific PCR protocol for the detection of the HLA-C* 03 : 02 allele, a pharmacogenetic marker, in Vietnamese Kinh People [J]. *Appl Clin Genet*, 2021, 14: 27-35.

[6] 胡泽斌,王瑞霞,代蕾颖,等. 人类白细胞抗原基因分型检测试剂盒行业标准的修订与验证[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13 (11): 1748-1751.

[7] 初亚男,张婕妤,封利颖,等. 人类白细胞抗原基因 HLA-B* 58 : 01 基因型的快速低成本鉴别方法[J]. *分析化学*, 2016, 44 (5): 693-697.

[8] 吴燕子,初亚男,黄晓晖. HLA-B* 1502 阳性患者抗癫痫药交叉过敏 1 例[J]. *中国药师*, 2020, 23 (9): 1817-1818.

[9] 李玉娇,初亚男,黄晓晖,等. 基因多态性与药物不良反应发生风险的相关性及其临床证据[J]. *药学进展*, 2021, 45 (2): 100-111.

[10] GUI H,KWOK M,BAUM L,et al. SNP-based HLA allele tagging, imputation and association with antiepileptic drug-induced cutaneous reactions in Hong Kong Han Chinese [J]. *Pharmacogenomics J*, 2018, 18 (2): 340-346.

[11] FANG H,XU X,KAUR K,et al. A screening test for HLA-B* 15 : 02 in a large United States patient cohort identifies broader risk of carbamazepine-induced adverse events [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 149.

[12] WONG C S,YEUNG C K,CHAN C Y,et al. HLA-B* 58 : 01 screening to prevent allopurinol-induced severe cutaneous adverse reactions in Chinese patients with chronic kidney disease [J]. *Arch Dermatol Res*, 2022, 314 (7): 651-659.

(收稿日期:2022-01-27 修回日期:2022-12-25)

(上接第 1030 页)

Chinese preschoolers[J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 31 (5): e22095.

[12] CINI C,YIP C,ATTARD C,et al. Differences in the resting platelet proteome and platelet releasate between healthy children and adults[J]. *J Proteomics*, 2015, 123: 78-88.

[13] 丛玉隆,金大鸣,王鸿利,等. 中国人群血小板各项参数的调查分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27 (6): 35-37.

[14] 黄燕,张珏,张文霞,等. 上海地区 29 614 例健康成人血小板相关参数分析[J]. *临床输血与检验*, 2021, 23 (4): 506-510.

[15] 罗春丽,刘成玉. 临床检验基础[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2013: 49-50.

[16] ROCA M,RODRIGUEZ V A,DONAT E,et al. Fecal calprotectin and eosinophil-derived neurotoxin in healthy children between 0 and 12 years[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017, 65 (4): 394-398.

[17] LEE H R,SHIN S,YOON J H,et al. Reference intervals of hematology and clinical chemistry analytes for 1-year-old Korean children[J]. *Ann Lab Med*, 2016, 36 (5): 481-488.

(收稿日期:2022-10-31 修回日期:2023-02-02)