

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.015

荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型分析性能验证程序研究*

葛燕梅,樊苏逸,毛源[△],袁杭,曹鹏,张厚智
(南京金域医学检验所,南京 210042)

摘要:目的 探讨荧光聚合酶链反应(PCR)检测 CYP2C19 基因分型分析性能验证程序。方法 依据《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》对荧光 PCR 方法检测 CYP2C19 基因分型进行准确性、精密度、灵敏度、特异度、临界值和最低检测限等的相关性能验证。结果 荧光 PCR 与测序法检测 CYP2C19 基因分型结果符合率为 100%;荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型精密度用 CV 表示,2G、2A、3G 和 3A 反应体系 FAM 和 ROX 荧光通道结果 CV 均小于 10%;以测序法结果为标准,诊断灵敏度和特异度结果均为 100%;验证 cut off 值 2G 反应体系 ΔCt 为 0.95,2A 反应体系 ΔCt 为 0.84,均小于设定的 cut off 值 5;验证的 cut off 值 3G 反应体系 ΔCt 为 1.47,3A 反应体系 ΔCt 为 1.43,均小于设定的 cut off 值 7;最低检测限为 10 ng/ μ L。结论 荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型各项性能验证指标符合要求,可以在实验室内开展。

关键词:荧光聚合酶链反应; 基因分型; 性能验证; 分子诊断

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)16-2409-03

Study on analytical performance verification of CYP2C19 genotyping analysis by fluorescence PCR*

GE Yanmei, FAN Suyi, MAO Yuan[△], YUAN Hang, CAO Peng, ZHANG Houzhi
(Genetic Diagnosis Laboratory, Nanjing KingMed Clinical Laboratory Co. Ltd.,
Nanjing, Jiangsu 210042, China)

Abstract: Objective To explore the analytical performance verification of CYP2C19 genotyping analysis by fluorescence PCR. **Methods** Based on "Guidance on the Application of Accreditation Criteria for the Medical Laboratory Quality and Competence in the Field of Molecular Diagnostics", the relevant performance verification of CYP2C19 genotyping by fluorescence PCR for accuracy, precision, sensitivity, specificity, critical value and minimum detection limit were achieved. **Results** The coincidence rate of CYP2C19 genotyping detected by fluorescent PCR and sequencing was 100%. The "CV" indicated the precision of CYP2C19 genotyping by fluorescent PCR. The CV of FAM and ROX fluorescence channel were less than 10% through 2G, 2A, 3G and 3A reaction system. Based on sequencing results, diagnostic sensitivity and specificity results were both 100%. The cut off value of 2G reaction system was 0.95 and 2A reaction system was 0.84. Both the value were less than the set cut off value 5. The cut off value of 3G reaction system was 1.47 and 3A reaction system was 1.43, both were less than the set cut off value 7. The minimum detection limit was 10 ng/ μ L. **Conclusion** The indicators of performance validation of CYP2C19 genotyping by fluorescence PCR meet the requirements, which could be carried out in the laboratory.

Key words: fluorescence PCR; genotyping; performance verification; molecular diagnosis

CYP2C19 基因具有遗传多态性,其编码的 S-美芬妥英羟化酶是细胞色素氧化酶 P450 的主要成分之一,参与华法林、氯吡格雷、地西洋、普萘洛尔、奥美拉唑等临床常用药物代谢^[1],该种酶类活性存在显著的个体差异,表现为血药浓度的个体差异。临床常用的 CYP2C19 基因分型的检测方法为等位基因特异聚合酶链反应(PCR),限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP),DNA 测序和基因芯片技术等^[2-6]。但是这些方法操作繁琐,费时费力,难以满足临床实验室常规检测需求。PCR 具有高度的灵敏度和特异

度,与其他 CYP2C19 基因分型检测方法相比,操作简单,结果易于判断,因此便于临床常规检测。本研究通过与测序法结果比较,对荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型分析性能进行验证评估,为使用荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型的实验室提供参考。

1 资料与方法

1.1 标本来源 江苏地区送往金域检验所进行 CYP2C19 基因分型检测的标本。

1.2 仪器和试剂 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,恒温水浴箱,5145R 高速冷冻离心机。血液核酸提取纯化

* 基金项目:江苏省科技厅临床医学科技专项资助项目(BL2014017)。

作者简介:葛燕梅,女,技师,主要从事医学检验方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:LABMY@kingmed.com.cn。

试剂盒和人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒均由苏州旷远生物分子技术有限公司提供。

1.3 方法 依据《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》对荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型进行准确性、精密度、灵敏度、特异度、临界值和最低检测限等的相关性能验证

1.3.1 准确性评估 使用患者送检的新鲜血液标本 20 例,使用的比对方法为测序法。被评价方法和比对方法在 1~5 d 内同时检测标本,然后观察两种方法的符合情况(结果一致性)。

1.3.2 精密度 定性检测项目以阴阳性作为判断依据,检测结果通常以 Ct 值形式显示。本研究使用在不同条件下的 Ct 的数值的一致程度作为精密度的评价标准,要求变异度(CV)≤10.00%符合要求。

1.3.3 诊断灵敏度 诊断灵敏度采用百分数表达,以公式 $100 \times \text{真阳性值数(TP)} / [\text{TP} + \text{假阴性值数(FN)}]$ 进行计算。取 10 份已知管结论真阳性的标本(从上述已测序标本中挑选),用被评价方法检测,计算检测出来阳性的标本占的比例。

1.3.4 诊断特异度 诊断特异度采用百分数表达,以 $100 \times \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$ 进行计算。取 10 份已知管结论真阴性的标本(从上述已测序标本中挑选),用被评价方法检测,计算检测出来阴性的标本占的比例。

1.3.5 临界值验证 临界值用 $\Delta\text{Ct} (\Delta\text{Ct} = |\text{Ct}(\text{FAM}) - \text{Ct}(\text{ROX})|)$ 表示,作为判断特定疾病、状态或被测量存在或不存在的界限的量值。测量结果低于临界值判断为阳性;高于临界值判断为阴性。临界值的选择决定检验的诊断特异度和灵敏度。选择 10 份杂合变异型(2GA3GA)新鲜血清,上机进行检测,计算均值(\bar{x})、标准差(s),cut off 验证值为: $\bar{x} \pm 3s$ 。要求设定的 cut off 值大于验证的 cut off 值,即为验证通过。

1.3.6 最低检测限 取适量浓度标本,经稀释后测量被测物浓度在 10 ng/μL 左右,上机检测,重复 2~3 次。要求能正常判断出检测结果即为验证通过。

2 结果

2.1 荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型结果 2G 反应体系: $\Delta\text{Ct} \leq 5$, G 阳性; $\Delta\text{Ct} > 5$ 或 Ct(FAM)“Undetermined”, G 阴性。2A 反应体系: $\Delta\text{Ct} \leq 5$, A 阳性; $\Delta\text{Ct} > 5$ 或 Ct(FAM)“Undetermined”, A 阴性。3G 反应体系: $\Delta\text{Ct} \leq 7$, G 阳性; $\Delta\text{Ct} > 7$ 或 Ct(FAM)“Undetermined”, G 阴性。3A 反应体系: $\Delta\text{Ct} \leq 7$, A 阳性; $\Delta\text{Ct} > 7$ 或 Ct(FAM)“Undetermined”, A 阴性。

2.2 荧光 PCR 和测序法同时检测标本结果符合率 两种方法同时检测 20 例标本,检测结果符合率为 100%,符合要求。

2.3 精密度验证结果 PCR 检测 CYP2C19 基因分型精密度验证结果见表 1,2G 反应体系 FAM 和 ROX 荧光通道结果 CV 分别为 2.77%、2.06%,2A 反应体

系 FAM 和 ROX 荧光通道结果 CV 分别为 3.36%、2.78%,3G 反应体系 FAM 和 ROX 荧光通道结果 CV 分别为 2.49%、1.17%,3A 反应体系 FAM 和 ROX 荧光通道结果 CV 分别为 1.27%、1.45%,均小于 10%,符合要求。

表 1 PCR 检测 CYP2C19 基因分型精密度验证结果

参数(Ct)	2G		2A		3G		3A	
	FAM	ROX	FAM	ROX	FAM	ROX	FAM	ROX
\bar{x}	14.64	15.03	14.88	15.32	15.14	14.56	15.99	14.87
s	0.41	0.31	0.50	0.43	0.38	0.17	0.20	0.22
CV(%)	2.77	2.06	3.36	2.78	2.49	1.17	1.27	1.45

2.4 诊断灵敏度和特异度验证结果 PCR 检测 CYP2C19 基因分型,验证的灵敏度和特异度均为 100%,符合要求。

2.5 临界值验证结果 PCR 荧光法检测 CYP2C19 基因分型设定的 cut off 值:2G 和 2A 反应体系 ΔCt 为 5,3G 和 3A 反应体系 ΔCt 为 7。验证的 cut off 值 2G 反应体系 ΔCt 为 0.95,2A 反应体系 ΔCt 为 0.84,均小于设定的 cut off 值 5;验证的 cut off 值 3G 反应体系 ΔCt 为 1.47,3A 反应体系 ΔCt 为 1.43,均小于设定的 cut off 值 7,验证通过,符合要求,见表 2。

表 2 PCR 检测 CYP2C19 基因分型临界值验证结果

参数(ΔCt)	2G	2A	3G	3A
\bar{x}	0.39	0.44	0.49	1.12
s	0.19	0.13	0.33	0.1
$\bar{x} \pm 3s$	0.95	0.84	1.47	1.43

2.6 最低检测限验证结果 PCR 荧光法检测 CYP2C19 基因分型最低检测下限要求 DNA 浓度不低于 10 ng/μL。取提取好的 DNA 模板(浓度为 50 ng/μL)稀释浓度至 10 ng/μL,重复检测 3 次,检测结果与稀释前一致,验证通过。

3 讨论

CYP2C19 * 2(rs244285)基因在 5 号外显子 681 位点的 G→A 单碱基突变可产生一个异常剪接位点; CYP2C19 * 3(rs4986893)基因在 4 号外显子 636 位点的 G→A 单碱基突变可提前产生一个终止密码子,从而导致表达非功能性蛋白。这 2 个基因突变所表达的 CYP 酶将导致形成氯吡格雷等药物活性代谢物的量减少。携带 CYP2C19 * 2(c. 681G > A)或 CYP2C19 * 3(c. 636G > A)多态性基因的患者表型为慢代谢型,基因型表型为纯合子 CYP2C19 * 2/* 2 或 * 3/* 3 或杂合子 * 2/* 3。这类人群代谢药物缓慢,易导致药物不良反应的产生。

荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型,操作简单,结果易于判断,因此便于临床常规检测使用。临床实验室在使用 PCR 时,需要充分了解其方法学性能,而且需采取严格的室内质量控制措施才能确保实验结

果的准确。ISO15189 和 CAP 认可体系明确要求实验室在开展新的检测项目前需进行方法学分析性能验证。因此,方法学性能验证是实验室开展 PCR 项目前必须要进行的工作^[7]。

有两类突变可引起 CYP2C19 基因多态性:一类是(如 CYP2C19 * 2、* 3、* 4、* 5、* 7、* 8 等)可降低酶活性位点的突变^[8-9];另一类是可以增强酶活性的突变,目前仅发现 CYP2C19 * 17 位点突变。黄杰等^[10]针对 CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 和 CYP2C19 * 17 多态性位点设计引物和探针,建立检测 CYP2C19 基因多态性的 PCR-荧光探针法,评价了准确性、灵敏度和特异度。刘秀卿等^[1]自建 CYP2C19 基因多态性荧光定量 PCR,主要评价了准确性、灵敏度和重复性。以往学者在研究检测 CYP2C19 基因多态性时,多为针对 CYP2C19 基因特定位点设计引物和探针,自建相应 PCR 检测 CYP2C19 基因分型并进行相关性能评价。

本研究使用荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型使用的是商品化的试剂盒,评价了准确性、重复性、灵敏度和特异度,并且对试剂盒给出的临界值和检测限进行了验证,对于该方法的性能验证程序评价比较全面。准确性使用临床标本进行检测与测序法结果进行比较,评估符合率,两种方法检测结果的符合率为 100%。由于该项目尚未参加室间质评,也未与其他实验室进行结果比对,所以准确性可以进一步进行评价。本研究对荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型性能验证程序进行较全面评估,为使用荧光 PCR 检测 CYP2C19 基因分型的实验室提供了一些参考。

参考文献

[1] 刘秀卿,李卓成,李延武. CYP2C19 基因多态性荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2): 95-99.

(上接第 2408 页)

[7] PASTERAN F, MENDEX T, RAPOPORT M, et al. Controlling False-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of Enterobacteriaceae by incorporating boronic acid[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1323-1332.

[8] DI PILATO V, ARENA F, TASCINI C, et al. mcr-1, 2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Strain of Sequence Type 512[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(9): 5612-5615.

[9] ABDUL G K. An obituary-on the death of antibiotics[J]. J Assoc Physicians India, 2010, 58(2): 143-144.

[10] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes

[2] 夏长胜,刘畅,孙媛媛,等. 等位基因特异荧光 PCR 法检测 CY92C19 基因型[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(3): 330-334.

[3] BIN SAYEED M S, HASAN APU M N, MUNIR M T, et al. Prevalence of CYP2C19 alleles, pharmacokinetic and pharmacodynamic variation of clopidogrel and prasugrel in Bangladeshi population[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015, 42(5): 451-457.

[4] AHN S G, JI H L, LEE J W, et al. Individualized anti-platelet treatment based on genotyping in patients with acute coronary syndromes[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(12): A108.

[5] KIM H K, KANG H J, KO D H, et al. Comparison of the microarray based assay, the real-time PCR assay, and the bidirectional sequencing method for CYP2C19 genotyping [J]. Clin Lab, 2015, 61(8): 1109-1112.

[6] DONG Y, XIAO H, WANG Q, et al. Analysis of genetic variation in CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 genes using oligonucleotide microarray[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10): 18917-18926.

[7] 罗卉丽,袁杭,毛源,等. 分子诊断定量项目分析性能验证程序探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(16): 2360-2362.

[8] LI Y, YANG H, ZOU X, et al. Analysis of the CYP2C19 genetic polymorphism in Han and Uyghur patients with cardiovascular and cerebrovascular diseases in the Kashi area of Xinjiang[J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 2213-2218.

[9] LIN M, TODARO M, CHAN J, et al. Association between CYP2C19 polymorphisms and outcomes in cerebral endovascular therapy [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2016, 37(1): 108-113.

[10] 黄杰,于婷,张喆,等. CYP2C19 基因多态性检测方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1562-1567.

(收稿日期:2017-12-14 修回日期:2018-02-08)

[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.

[11] 杨莉,张红岩. 碳青霉烯酶基因型的研究进展[J]. 中国微生物生态学杂志, 2014, 26(3): 366-368.

[12] DOUMITH M, ELLINGTON M J, LIVERMORE D M, et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant Klebsiella and Enterobacter spp. clinical isolates from the UK[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(4): 659-667.

[13] LANDMAN D, BRATU S, QUALE J. Contribution of OMPK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing Klebsiella pneumonia [J]. J Med Microbiol, 2009, 58(10): 1303-1308.

(收稿日期:2017-12-26 修回日期:2018-02-20)