

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2021. 02. 004

# CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性检测试剂盒的性能验证\*

李 婧, 李林静, 刘 转, 杨文娟, 马青梅, 张安安, 杨海棠, 刘欣跃<sup>△</sup>  
兰州大学第二医院检验医学中心, 甘肃兰州 730030

**摘 要:****目的** 对华法林代谢相关的人细胞色素 P450 超家族第二亚家族 C9 代谢酶(CYP2C9)和维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1(VKORC1)基因多态性检测试剂盒进行性能验证。**方法** 根据中国合格评定国家认可委员会(CNAS)制定的有关要求,结合试剂说明书,从符合率、精密度、检出限、抗干扰能力 4 个方面对苏州旷远生物分子技术有限公司的人 CYP2C9 与 VKORC1 基因多态性检测试剂盒(荧光 PCR 法)进行性能验证。**结果** 20 例临床标本的荧光 PCR 检测结果与 Sanger 测序法检测结果的符合率为 100%;荧光 PCR 对 1 例临床标本重复检测 15 次,CYP2C9 与 VKORC1 基因荧光通道的 Ct 值变异系数(CV)均<5%;试剂盒最低检测限为 10 ng/ $\mu$ L;已知基因型的血液标本中加入干扰物血红蛋白、胆红素和胆固醇之后的基因型结果与对照组完全一致。**结论** 人 CYP2C9 与 VKORC1 基因多态性检测试剂盒(荧光 PCR 法)符合 ISO15189 质量管理要求,可以在保证项目验收的基础上,为临床提供可靠的检测结果。

**关键词:**华法林; CYP2C9; VKORC1; 基因多态性; 性能验证  
**中图法分类号:**R446. 9 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2021)02-0156-05

## Verifying performance characteristics of the CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms detection kit\*

LI Jing, LI Linjing, LIU Zhuan, YANG Wenjuan, MA Qingmei, ZHANG An'an, YANG Haitang, LIU Xinyue<sup>△</sup>

Clinical Laboratory Center, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou, Gansu 730030, China

**Abstract: Objective** To verify the performance characteristics of warfarin metabolism-related human CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms detection kit (quantitative PCR). **Methods** The verification protocol designed by China National Accreditation (CNAS) combined with reagent manual, performance of the human CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms detection kit manufactured by Suzhou Kuangyuan Molecular Biotechnology Corp., Ltd was verified from four aspects: coincidence rate, precision, detection limit and anti-interference ability. **Results** Twenty clinical samples genotyping were detected both by quantitative PCR and Sanger sequencing simultaneously, the coincidence rate was 100%. The results of 15 times repeated detection in one clinical sample by quantitative PCR were in full accord, the Ct value of both CYP2C9 and VKORC1 gene fluorescence channels coefficient of variation (CV) were all < 5%. The lowest detection limit of the kit was 10 ng/ $\mu$ L. After adding three interfering substances of hemoglobin, bilirubin and cholesterol into the blood samples with known genotype, and the results of the interference group and the control group were exactly the same. **Conclusion** The human CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphism detection kit (quantitative PCR) meets the requirements of the relevant quality management of ISO15189 and can provide reliable test results for the clinic on the basis of ensuring project acceptance.

**Key words:** warfarin; CYP2C9; VKORC1; gene polymorphism; performance verification

华法林是使用最为广泛的口服抗凝药,也是治疗心脑血管疾病的常用药物,主要用于预防和治疗血栓栓塞性疾病,如心房颤动、人工心脏瓣膜置换术后、脑

梗死、深静脉血栓等<sup>[1]</sup>。但华法林存在治疗窗狭窄<sup>[2-3]</sup>、剂量差异大<sup>[4]</sup>、影响因素多<sup>[5]</sup>、反应难预测<sup>[6-7]</sup>等特点,因此在使用过程中容易发生出血或栓塞等不

\* 基金项目:甘肃省青年科技基金计划项目(20JR5RA312);兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划项目(CY2018-QN06);甘肃省教育厅创新能力提升项目(2019B-018)。

作者简介:李婧,女,主管技师,主要从事分子生物学检验及药物基因组学方面的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: liuxy@lzu.edu.cn。

本文引用格式:李婧,李林静,刘转,等.CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性检测试剂盒的性能验证[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(2): 156-

良事件。目前最常用的华法林初始给药法为基于经验的固定剂量方案。随着药物基因组学研究的深入,遗传因素与华法林剂量个体差异的关系已得到广泛认可<sup>[8-10]</sup>。2007 年美国食品药品监督管理局(FDA)更改了华法林的说明书,在开始进行华法林抗凝治疗的患者中,有必要检测细胞色素 P450 超家族第二亚家族 C9 代谢酶(CYP2C9)和维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1(VKORC1)的基因型<sup>[11-12]</sup>。

根据 ISO15189 实验室质量管理体系对实验室项目开展的要求,任何一个用于常规检测的新系统或新项目在使用前必须进行性能验证<sup>[13]</sup>,这是保证检测质量的重要环节。根据中国合格评定国家认可委员会(CNAS)制定的有关要求,定性检测项目的性能验证指标宜包括符合率、检出限、抗干扰能力等<sup>[14]</sup>。因此,本研究以该准则为标准,进一步结合试剂说明书和本实验室的具体情况,制订了一套验证方案从符合率、精密度、检出限和抗干扰能力 4 个方面对苏州旷远生物分子技术有限公司的人 CYP2C9 与 VKORC1 基因多态性检测试剂盒(荧光 PCR 法)进行性能验证。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取兰州大学第二医院 2017 年 10 月至 2018 年 5 月因心房颤动或心脏瓣膜病需行人工心脏瓣膜置换术且初次使用华法林,同时未使用其他溶栓药物治疗的患者 20 例,其中男 9 例、女 11 例,平均年龄(65.5±4.7)岁,所有患者无家族遗传史,无血缘关系。

1.2 仪器与试剂 核酸提取试剂盒(苏州旷远生物分子技术有限公司),人 CYP2C9 与 VKORC1 基因多态性检测试剂盒(荧光 PCR 法,苏州旷远生物分子技术有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 7500),核酸定量仪(美国 Life 公司 Qubit3)。

1.3 方法

1.3.1 外周血 DNA 提取 采集所有患者静脉血 2~3 mL 后 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝,4℃保存,采用柱提法提取 DNA,DNA 浓度均大于 50 ng/μL、纯度(A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub>)为 1.8~2.0,置于-20℃保存备用。

1.3.2 荧光 PCR 扩增 按照苏州旷远生物分子技术有限公司的人 CYP2C9 与 VKORC1 基因多态性检测试剂盒(荧光 PCR 法)的要求检测 CYP2C9 基因 c. 1075 位点(A/C)与人 VKORC1 基因-1639 位点(G/A)核苷酸多态性,同时使用试剂盒自带的质控品做阴阳性对照。采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。设置 FAM 和 VIC 双通道采集荧光信号。对于 DNA 样本检测反应体系,其内参扩增曲线的 Ct(VIC)值应≤20,在内参 Ct(VIC)值正常的情况下,计算样本检测信号 Ct(FAM)值与内参信号 Ct(VIC)值的差值,即 ΔCt=Ct(FAM)-Ct(VIC),根据 ΔCt 值判断基因型。

1.3.3 符合率验证 验证方案为使用苏州旷远生物

分子技术有限公司的人 CYP2C9 与 VKORC1 基因多态性检测试剂盒对上述已知 20 例基因型标本进行荧光 PCR 法检测基因型,同时,将 DNA 标本送至北京六合华大基因科技有限公司上海分公司进行 Sanger 测序检测基因型,然后比较两种方法的符合情况,要求符合率≥95%为验证通过。

1.3.4 精密度验证 包含批内精密度和批间精密度验证,荧光 PCR 法检测 CYP2C9 与 VKORC1 的基因分型精密度用每个通道检测的 Ct 值的变异系数(CV)表示。要求 CYP2C9 c. 1075 A、CYP2C9 c. 1075 C、VKORC1-1639 G、VKORC1-1639 A 反应体系 FAM 和 VIC 荧光通道的 Ct 值的 CV 均≤5%为验证通过。以下为验证方案:选择 1 例已知基因型为杂合型的标本(CYP2C9 c. 1075 AA、VKORC1-1639 GA),将该标本在同一批次试验中连续测定 5 次。计算其均值(MEAN1)、标准差(SD1)与变异系数(CV1),为批内精密度;将该标本连续测定 3 d,每批内测定 5 次,共测定 15 次。计算其均值(MEAN2)、标准差(SD2)与变异系数(CV2),为批间精密度。

1.3.5 检出限验证 选择 2 例杂合型标本,基因型分别为 CYP2C9 c. 1075 AA、VKORC1-1639 GA 和 CYP2C9 c. 1075 AC、VKORC1-1639 GA,根据试剂盒说明书“参考品(杂合子)最低检测下限低至 10 ng/μL”,将这两例标本核酸浓度稀释到 10 ng/μL 以下,上机检测,重复 5 次,要求 5 次检测基因型结果与未稀释原浓度的基因型结果符合率达 100%为验证通过。

1.3.6 抗干扰能力验证 选择 1 例已知基因型的血液标本,基因型为 CYP2C9 c. 1075 AA、VKORC1-1639 AA,分装成 10 份标本,每份 200 μL,其中 1 份不添加任何干扰物质,设为对照组;其余 9 份平均分为 3 组,每组分别加入 3 种干扰物质,即血红蛋白、胆红素和胆固醇,每组重复检测 3 次(终浓度为厂家声明的最高干扰浓度),各试验组和对照组检测结果的符合率≥90%表示抗干扰能力验证通过。

2 结果

2.1 符合率验证结果 20 例标本经过荧光 PCR 和 Sanger 测序之后,显示 CYP2C9 与 VKORC1 均有 3 种基因型,2 种基因组合之后有 4 种基因型,两种方法检测的结果完全一致,符合率达 100%,验证通过,见表 1。

表 1 CYP2C9 和 VKORC1 经荧光 PCR 和 Sanger 测序后符合率验证结果

| 标本<br>编号 | 荧光 PCR 基因分型结果  |             | Sanger 测序结果    |             |
|----------|----------------|-------------|----------------|-------------|
|          | CYP2C9 c. 1075 | VKORC1-1639 | CYP2C9 c. 1075 | VKORC1-1639 |
| 1        | AA             | AA          | AA             | AA          |
| 2        | AA             | AA          | AA             | AA          |
| 3        | AC             | AA          | AC             | AA          |
| 4        | AA             | GA          | AA             | GA          |
| 5        | AA             | AA          | AA             | AA          |

续表 1 CYP2C9 和 VKORC1 经荧光 PCR 和 Sanger 测序后符合率验证结果

| 标本<br>编号 | 荧光 PCR 基因分型结果 |             | Sanger 测序结果   |             |
|----------|---------------|-------------|---------------|-------------|
|          | CYP2C9 c.1075 | VKORC1-1639 | CYP2C9 c.1075 | VKORC1-1639 |
| 6        | AA            | GA          | AA            | GA          |
| 7        | CC            | GG          | CC            | GG          |
| 8        | AA            | AA          | AA            | AA          |
| 9        | AA            | GA          | AA            | GA          |
| 10       | AA            | AA          | AA            | AA          |
| 11       | AA            | GA          | AA            | GA          |
| 12       | AA            | AA          | AA            | AA          |
| 13       | AA            | AA          | AA            | AA          |
| 14       | AA            | GA          | AA            | GA          |
| 15       | AA            | AA          | AA            | AA          |
| 16       | AA            | GA          | AA            | GA          |
| 17       | AA            | GA          | AA            | GA          |
| 18       | AA            | AA          | AA            | AA          |
| 19       | AA            | AA          | AA            | AA          |
| 20       | AA            | GA          | AA            | GA          |

2.2 精密度验证结果 所选择的杂合型标本经过 5 次批内精密度检测,结果显示,CYP2C9 两个等位基因 A 和 C 的 FAM 和 VIC 荧光通道检测 CV1 值分别为 1.14%、1.60%、4.69% 和 0.58%,均小于 5%;

VKORC1 两个等位基因 G 和 A 的 FAM 和 VIC 荧光通道检测 CV1 值分别为 2.27%、1.26%、1.67% 和 1.50%,均小于 5%;该杂合型标本连续测定 3 d,每批重复测定 5 次,合计 15 次重复检测的批间精密度结果显示,CYP2C9 两个等位基因 A 和 C 的 FAM 和 VIC 荧光通道检测 CV2 值分别为 0.85%、0.73%、2.94% 和 0.48%;VKORC1 两个等位基因 G 和 A 的 FAM 和 VIC 荧光通道检测 CV2 值分别为 2.48%、1.66%、3.56% 和 3.47%;以上 4 组 CV 值均小于 5%,批内和批间精密度验证均符合要求,见表 2、3。

2.3 检出限验证结果 所选择的 2 例杂合型标本浓度均大于 50 ng/μL,经过稀释后,2 例标本的 DNA 浓度均稀释到小于 10 ng/μL,分别为 9.56 ng/μL 和 9.44 ng/μL,重复检测 5 次后得到的基因型与未稀释原浓度的基因型完全符合,验证通过,见表 4。

2.4 抗干扰能力验证结果 1 份已知基因型(CYP2C9 c.1075 AA、VKORC1-1639 AA)的临床标本加入 3 种干扰物质,配制血红蛋白终浓度为 20 g/L,总胆红素终浓度为 60 μmol/L、总胆固醇终浓度为 10.1 mmol/L,结果表明加入血红蛋白、胆红素和胆固醇之后标本的基因型与对照组基因型完全符合,符合率为 100%,验证通过,见表 5。

表 2 CYP2C9 和 VKORC1 经荧光 PCR 测定批内精密度验证结果

| 参数     | CYP2C9 c.1075A |       | CYP2C9 c.1075C |       | VKORC1-1639G |       | VKORC1-1639A |       |
|--------|----------------|-------|----------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|        | FAM            | VIC   | FAM            | VIC   | FAM          | VIC   | FAM          | VIC   |
| Ct 值   | 11.97          | 15.24 | 29.86          | 15.75 | 16.60        | 15.63 | 16.38        | 15.51 |
|        | 12.14          | 15.69 | 30.37          | 15.60 | 15.93        | 15.30 | 16.06        | 15.35 |
|        | 11.97          | 15.02 | 29.97          | 15.56 | 16.31        | 15.45 | 16.42        | 15.40 |
|        | 11.76          | 15.33 | 28.14          | 15.51 | 15.64        | 15.11 | 15.87        | 14.93 |
|        | 11.91          | 15.24 | 32.09          | 15.63 | 16.06        | 15.43 | 15.86        | 15.45 |
| MEAN1  | 11.95          | 15.30 | 30.09          | 15.61 | 16.11        | 15.38 | 16.12        | 15.33 |
| SD1    | 0.14           | 0.24  | 1.41           | 0.09  | 0.37         | 0.19  | 0.27         | 0.23  |
| CV1(%) | 1.14           | 1.60  | 4.69           | 0.58  | 2.27         | 1.26  | 1.67         | 1.50  |

表 3 CYP2C9 和 VKORC1 经荧光 PCR 测定批间精密度验证结果

| 参数   | CYP2C9 c.1075A |       | CYP2C9 c.1075C |       | VKORC1-1639G |       | VKORC1-1639A |       |
|------|----------------|-------|----------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|      | FAM            | VIC   | FAM            | VIC   | FAM          | VIC   | FAM          | VIC   |
| Ct 值 | 11.97          | 15.24 | 29.86          | 15.75 | 16.6         | 15.63 | 16.38        | 15.51 |
|      | 12.14          | 15.69 | 30.37          | 15.60 | 15.93        | 15.30 | 16.06        | 15.35 |
|      | 11.97          | 15.02 | 29.97          | 15.56 | 16.31        | 15.45 | 16.42        | 15.40 |
|      | 11.76          | 15.33 | 28.14          | 15.51 | 15.64        | 15.11 | 15.87        | 14.93 |
|      | 11.91          | 15.24 | 32.09          | 15.63 | 16.06        | 15.43 | 15.86        | 15.45 |
|      | 12.32          | 15.27 | 30.17          | 15.49 | 15.92        | 15.38 | 16.11        | 15.29 |
|      | 12.28          | 15.16 | 30.51          | 15.63 | 16.18        | 15.46 | 16.38        | 15.48 |
|      | 12.37          | 15.35 | 29.44          | 15.58 | 16.73        | 15.76 | 16.50        | 15.46 |
|      | 12.31          | 15.23 | 30.95          | 15.65 | 16.64        | 15.67 | 16.70        | 15.75 |
|      | 12.09          | 15.33 | 30.08          | 15.56 | 16.55        | 15.51 | 16.46        | 15.37 |
|      | 11.95          | 14.97 | 30.53          | 15.50 | 15.79        | 15.00 | 16.09        | 15.23 |

续表 3 CYP2C9 和 VKORC1 经荧光 PCR 测定批间精密度验证结果

| 参数     | CYP2C9 c. 1075A |        | CYP2C9 c. 1075C |        | VKORC1-1639G |        | VKORC1-1639A |        |
|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|        | FAM             | VIC    | FAM             | VIC    | FAM          | VIC    | FAM          | VIC    |
|        | 11. 98          | 15. 10 | 30. 26          | 15. 57 | 16. 05       | 15. 32 | 16. 44       | 15. 55 |
|        | 11. 89          | 15. 20 | 29. 30          | 15. 45 | 16. 60       | 15. 61 | 17. 66       | 16. 61 |
|        | 11. 73          | 15. 09 | 30. 55          | 15. 65 | 16. 57       | 15. 56 | 16. 82       | 15. 48 |
|        | 11. 81          | 14. 92 | 28. 55          | 15. 54 | 16. 72       | 15. 57 | 16. 67       | 15. 50 |
| MEAN2  | 12. 03          | 15. 21 | 30. 05          | 15. 58 | 16. 29       | 15. 45 | 16. 43       | 15. 49 |
| SD2    | 0. 10           | 0. 11  | 0. 88           | 0. 08  | 0. 40        | 0. 26  | 0. 59        | 0. 54  |
| CV2(%) | 0. 85           | 0. 73  | 2. 94           | 0. 48  | 2. 48        | 1. 66  | 3. 56        | 3. 47  |

表 4 CYP2C9 和 VKORC1 经荧光 PCR 测定检出限验证结果

| 标本编号 | 参数   | CYP2C9 c. 1075A |        | CYP2C9 c. 1075C |        | VKORC1-1639G |        | VKORC1-1639A |        |
|------|------|-----------------|--------|-----------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|      |      | FAM             | VIC    | FAM             | VIC    | FAM          | VIC    | FAM          | VIC    |
| H1   | Ct 值 | 14. 53          | 17. 7  | undetermined    | 18. 27 | 18. 79       | 18. 08 | 18. 64       | 17. 91 |
|      |      | 14. 58          | 17. 58 | undetermined    | 18. 10 | 18. 60       | 18. 02 | 18. 70       | 17. 82 |
|      |      | 14. 40          | 17. 52 | 34. 40          | 17. 78 | 18. 55       | 17. 85 | 18. 41       | 17. 59 |
|      |      | 14. 63          | 17. 67 | undetermined    | 18. 30 | 18. 44       | 17. 82 | 18. 57       | 17. 62 |
|      |      | 14. 60          | 17. 58 | undetermined    | 17. 96 | 18. 58       | 17. 97 | 18. 60       | 17. 76 |
|      | 基因型  | AA              |        |                 |        | GA           |        |              |        |
| H2   | Ct 值 | 15. 36          | 16. 92 | 15. 78          | 17. 29 | 18. 16       | 17. 49 | 18. 20       | 17. 34 |
|      |      | 15. 11          | 16. 91 | 15. 65          | 17. 19 | 17. 82       | 17. 29 | 18. 14       | 17. 27 |
|      |      | 15. 10          | 16. 72 | 14. 99          | 16. 34 | 17. 89       | 17. 11 | 17. 71       | 17. 15 |
|      |      | 15. 51          | 17. 27 | 15. 87          | 17. 51 | 18. 24       | 17. 63 | 18. 47       | 17. 59 |
|      |      | 15. 66          | 17. 34 | 15. 88          | 17. 19 | 18. 02       | 17. 23 | 18. 09       | 17. 23 |
|      | 基因型  | AC              |        |                 |        | GA           |        |              |        |

注:undetermined 表示未知。

表 5 CYP2C9 和 VKORC1 荧光定量 PCR 抗干扰能力验证结果

| 干扰物质 | 参数   | CYP2C9 c. 1075A |        | CYP2C9 c. 1075C |        | VKORC1-1639G |        | VKORC1-1639A |        |
|------|------|-----------------|--------|-----------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|      |      | FAM             | VIC    | FAM             | VIC    | FAM          | VIC    | FAM          | VIC    |
| 血红蛋白 | Ct 值 | 13. 24          | 16. 67 | 30. 84          | 17. 22 | undetermined | 17. 10 | 16. 87       | 17. 19 |
|      |      | 12. 85          | 15. 74 | 29. 86          | 17. 01 | undetermined | 16. 91 | 16. 57       | 17. 11 |
|      |      | 13. 30          | 16. 92 | 30. 45          | 17. 30 | undetermined | 17. 02 | 17. 12       | 17. 78 |
|      | 基因型  | AA              |        |                 |        | AA           |        |              |        |
| 胆红素  | Ct 值 | 12. 76          | 16. 56 | 30. 10          | 16. 78 | undetermined | 16. 76 | 16. 22       | 16. 79 |
|      |      | 12. 52          | 16. 17 | 29. 76          | 16. 32 | undetermined | 15. 82 | 16. 15       | 17. 28 |
|      |      | 12. 58          | 16. 32 | 29. 53          | 16. 27 | undetermined | 15. 49 | 16. 03       | 16. 80 |
|      | 基因型  | AA              |        |                 |        | AA           |        |              |        |
| 胆固醇  | Ct 值 | 12. 72          | 16. 00 | 30. 54          | 16. 54 | undetermined | 16. 40 | 16. 13       | 16. 46 |
|      |      | 12. 88          | 16. 87 | 30. 98          | 17. 23 | undetermined | 16. 73 | 16. 82       | 17. 47 |
|      |      | 13. 12          | 17. 02 | 29. 76          | 16. 88 | undetermined | 17. 55 | 17. 31       | 17. 92 |
|      | 基因型  | AA              |        |                 |        | AA           |        |              |        |

注:undetermined 表示未知。

3 讨 论

CYP2C9 参与抗凝血药华法林的羟化代谢,它的基因多态性可影响华法林在体内的药物浓度。CYP2C9 \* 3(A1075C)是亚洲人群中最主要的基因多态性,中国人群中 CYPC2C9 \* 3 的分布频率约为 4%<sup>[15]</sup>。维生素 K 氧化还原酶是抗凝药物华法林的作用靶点,维生素 K 环氧化物还原酶复合物 1 的编码基因 VKORC1-1639 G>A 的单核苷酸多态性可通过

影响 VKORC1 表达,从而影响华法林的敏感性。VKORC1-1639A 等位基因频率在中国人群中高达 90%<sup>[16]</sup>。所以本研究在标本选择上尽可能多的包含了中国人群中出现的各种基因型。

符合率验证试验中,两种检测方法共检测出 CYP2C9 基因 18 例纯合野生,1 例杂合突变,1 例纯合突变;VKORC1 基因 1 例纯合野生,8 例杂合突变,11 例纯合突变;以上两种基因组合之后共检测出 4 种



基因型组合。荧光 PCR 检测结果与基因突变检测的“金标准”Sanger 测序结果完全一致,表明该试剂盒符合率符合要求。

精密密度检测验证试验中,包含了批内精密度和批间精密度的验证。杂合型标本(CYP2C9 c. 1075 AA、VKORC1-1639 GA)在批内同时检测 5 次后,其 CV 值均小于 5%;同一标本每批测定 5 次,连续 3 d 共测定 15 次的批间精密密度结果显示,其 CV 值均小于 5%,表明该试剂盒精密密度验证符合要求。

检出限指可以准确判断基因型的最低基因组 DNA 浓度。本试剂盒说明书中判定 10 ng/ $\mu$ L 为最低检出限,因此,本研究将基因组 DNA 稀释至 10 ng/ $\mu$ L 以下进行检测,结果表明稀释后的基因组 DNA 的荧光 PCR 检测结果与稀释前结果完全一致,表明该试剂盒最低检出限验证符合要求。

抗干扰能力是指临床标本中的溶血、黄疸和脂血现象对检测结果不产生影响的能力。血液标本的血红蛋白、总胆红素和总胆固醇的浓度根据厂家声明的最高干扰浓度配制,加入 3 种干扰物质的基因分型结果与不加任何干扰物质的对照组基因分型结果完全一致,表明试剂盒抗干扰能力良好。

综上所述,苏州旷远生物分子技术有限公司的人 CYP2C9 与 VKORC1 基因多态性检测试剂盒(荧光 PCR 法)的符合率、精密密度、检出限和抗干扰能力验证均符合 ISO15189 的要求,以上验证已经可以在保证项目验收的基础上,为临床提供可靠的检测结果,更好地为患者服务。如果条件允许,还可以在性能验证中使用其他无关位点突变的标本或质控品进行交叉反应试验,进一步完善性能验证结果。

## 参考文献

- [1] AVEZUM A, LOPES R D, SCHULTE P J, et al. Apixaban in Comparison With Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation and Valvular Heart Disease: Findings From the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) Trial[J]. *Circulation*, 2015, 132(8): 624-632.
- [2] RISHAVY M A, HALLGREN K W, WILSON L, et al. Warfarin alters vitamin K metabolism: a surprising mechanism of VKORC1 uncoupling necessitates an additional reductase[J]. *Blood*, 2018, 131(25): 2826-2835.
- [3] CLAUDIO-CAMPOS K, LABASTIDA A, RAMOS A, et al. Warfarin Anticoagulation Therapy in Caribbean Hispanics of Puerto Rico: A Candidate Gene Association Study[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 347.
- [4] HULSE M L. Warfarin resistance: diagnosis and therapeutic alternatives [J]. *Pharmacotherapy*, 1996, 16(6): 1009-1017.
- [5] DE CURTIS A, D'ADAMO M C, AMORE C, et al. Experimental arterial thrombosis in genetically or diet induced hyperlipidemia in rats—role of vitamin K dependent clotting factors and prevention by low-intensity oral anticoagulation[J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86(6): 1440-1448.
- [6] ABOHELAIKA S, WYNNE H, AVERY P, et al. Individual and monitoring centre influences upon anticoagulation control of AF patients on warfarin: a longitudinal multi-centre UK-based study [J]. *Eur J Haematol*, 2018, 101(4): 486-495.
- [7] 汪亚南, 冯晓俊, 张蕾, 等. 基于 CYP2C9 和 VKORC1 基因型检测的华法林个体化用药分析[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 28(4): 277-281.
- [8] LEE M T, KLEIN T E. Pharmacogenetics of warfarin: challenges and opportunities [J]. *J Hum Genet*, 2013, 58(6): 334-338.
- [9] RIEDER M J, REINER A P, GAGE B F, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(22): 2285-2293.
- [10] VERHOEF T I, REDEKOP W K, DALY A K, et al. Pharmacogenetic-guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 77(4): 626-641.
- [11] U. S. Food and Drug Administration. FDA Approves Updated Warfarin (Coumadin) Prescribing Information [EB/OL]. (2007-10-15) [2020-01-19]. <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2007/new01684.html>.
- [12] ABE J, UMETSU R, KATO Y, et al. Evaluation of Dabigatran and Warfarin-Associated Hemorrhagic Events Using the FDA-Adverse Event Reporting System Database Stratified by Age [J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12(4): 312-321.
- [13] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则: CNAS-CL02 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [14] 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南: CNAS-GL039 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2019: 1-11.
- [15] WEI M, YE F, XIE D, et al. A New Algorithm to Predict Warfarin Dose From Polymorphisms of CYP4F2, CYP2C9 and VKORC1 and Clinical Variables: Derivation in Han Chinese Patients With Non Valvular Atrial Fibrillation [J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(6): 1083-1091.
- [16] CEN H J, ZENG W T, LENG X Y, et al. CYP4F2 rs2108622: A Minor Significant Genetic Factor of Warfarin Dose in Han Chinese Patients With Mechanical Heart Valve Replacement [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2010, 70(2): 234-240.