

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.05.006

基于焦磷酸测序的 CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 基因分型方法性能验证^{*}张婕妤, 初亚男, 李玉娇, 封利颖[△]

东部战区总医院临床药学科, 江苏南京 210002

摘要:目的 对细胞色素 P450 2C19(CYP2C19) * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性分型的实验室自建焦磷酸测序法进行性能验证, 确保其能为临床提供准确可靠的结果。方法 通过对梯度稀释的杂合型基因组 DNA(gDNA)标本(10.0、2.0、0.4 ng/ μ L)进行检测, 评价方法的最低检测浓度; 比较焦磷酸测序和 Sanger 测序结果, 评价方法的准确度; 将经焦磷酸测序验证的野生型 gDNA 标本进行 Sanger 测序, 评价方法的特异性; 对杂合型 gDNA 标本重复检测 4 次, 评价方法的重复性。结果 焦磷酸测序检测 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性的最低检测浓度为 0.4 ng/ μ L; 20 份临床 gDNA 标本的焦磷酸测序结果与 Sanger 测序结果一致, 准确度为 100%; 10 份野生型的临床 gDNA 标本经 Sanger 测序验证均为野生型, 特异性为 100%; 分别对 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 的杂合型 gDNA 标本重复检测 4 次, 重复性好, 变异系数均 < 5%。结论 焦磷酸测序检测 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性的结果准确可靠, 能够为临床使用氯吡格雷、质子泵抑制剂等药物提供个体化指导。

关键词:性能验证; 焦磷酸测序; 单核苷酸多态性; 细胞色素 P450 2C19

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)05-0600-04

Performance verification of CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 genotyping method
based on pyrophosphate sequencing^{*}

ZHANG Jieyu, CHU Yanan, LI Yujiao, FENG Liying[△]

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

Abstract: Objective The performance of the self-built pyrophosphate sequencing method for single nucleotide polymorphism typing of cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) * 2 and CYP2C19 * 3 was verified to ensure that it can provide accurate and reliable results for clinical use. **Methods** The lowest detection concentration of the method was evaluated by detecting the heterozygous genomic DNA (gDNA) samples (10.0, 2.0, 0.4 ng/ μ L) with gradient dilution. The results of pyrophosphate sequencing and Sanger sequencing were compared to evaluate the accuracy of the method. Carried out Sanger sequencing on the wild type gDNA samples verified by pyrophosphate sequencing to evaluate the specificity of the method. The heterozygous gDNA samples were detected 4 times to evaluate the repeatability of the method. **Results** The minimum detection concentration of single nucleotide polymorphisms of CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 detected by pyrophosphate sequencing was 0.4 ng/ μ L. The pyrophosphate sequencing results of 20 clinical gDNA samples were consistent with Sanger sequencing, with an accuracy of 100%. A total of 10 clinical gDNA samples of wild type were confirmed as wild type by Sanger sequencing, with specificity of 100%. The heterozygous gDNA samples of CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 were detected 4 times, with good repeatability and coefficient of variation less than 5%. **Conclusion** The results of pyrophosphate sequencing for the detection of CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 single nucleotide polymorphism are accurate and reliable, which could provide individualized guidance for the clinical use of clopidogrel, proton pump inhibitors and other drugs.

Key words: performance verification; pyrophosphate sequencing; single nucleotide polymorphism; cytochrome P450 2C19

药物基因组学是一门研究与药物吸收、代谢和转运相关的遗传因素如何影响药物治疗效果或不良反

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(NO. 82001422); 江苏省自然科学基金青年基金项目(NO. BK20200274); 东部战区总医院院内课题项目(NO. YYQN2021080)。

作者简介: 张婕妤, 女, 主管药师, 主要从事分子生物学研究。 [△] 通信作者, E-mail: flying870831@163.com。

应的学科^[1-3]。细胞色素 P450 2C19(CYP2C19)是细胞色素 P450 超家族的一种同工酶,参与约 2% 的药物代谢过程^[4-5]。CYP2C19 拥有的多种基因多态性表现为不同的酶活性,其中 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 的多态性与氯吡格雷抵抗、质子泵抑制剂的疗效相关^[6-7]。临床药物基因组学实施联盟(CPIC)、荷兰药物遗传学工作组(DPWG)和加拿大药物基因组学药品安全网(CPNDS)均建议临床在使用氯吡格雷和质子泵抑制剂等药物前检测 CYP2C19 基因型^[8-9]。根据《医学实验室质量和能力认可准则(ISO15189:2012, IDT) :CNA5-CL02》和江苏省临床检验中心对临床基因扩增检验实验室的要求^[10-11],任何一项用于常规检测的项目在引入临床使用前必须通过性能验证。定性检测的性能指标包括最低检测浓度、准确度、特异度和重复性/精密度等。本文旨在对实验室自建焦磷酸测序检测 CYP2C19 * 2(rs424485, c. 681G>A)和 CYP2C19 * 3(rs4986893, c. 636G>A)单核苷酸多态性的方法进行性能验证,保证其检测结果的准确、稳定及可靠。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 9 月至 2022 年 5 月在

东部战区总医院进行 CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性检测的乙二胺四乙酸抗凝全血标本作为研究对象。

1.2 仪器与试剂 Wizard[®] 基因组 DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司);TaKaRa Taq[™](日本 TaKaRa 公司);PyroMark Gold Q96 Reagents、Annealing buffer 和 Binding buffer(德国 QIAGEN 公司);Streptavidin Sepharose[™] High Performance(美国 GE Healthcare Life Sciences 公司);屈臣氏蒸馏水。Q24 焦磷酸测序仪(德国 QIAGEN 公司);A200 基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司);微量紫外分光光度计(南京伍义科技有限公司);VORTEX-GENIE 2 涡漩混匀器(美国 Scientific Industries 基因公司);Legand Micro 21R 冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。所有引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA(gDNA)提取 根据 DNA 提取试剂盒说明书提取血液标本中的 gDNA。选取浓度 ≥ 30 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 的 gDNA 标本储存在-30℃冰箱中备用。

表 1 检测 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性的引物序列

位点	引物	引物序列
CYP2C19 * 2	上游引物	5'-Biotin-CCAGAGCTTGGCATATTGTATCTA-3'
	下游引物	5'-CGCAAGCAGTCACATAACTAAGC-3'
	测序引物	5'-TTAAGTAATTTGTTATGGGTTCC-3'
CYP2C19 * 3	上游引物	5'-TGCAATGTGATCTGCTCCATTAT-3'
	下游引物	5'-Biotin-AGCAAAAACTTGGCCTTACCTG-3'
	测序引物	5'-TGTAAGCACCCCCTG-3'

1.3.2 PCR 扩增 反应体系为 50 μ L,包括 10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 5 U Taq 酶 0.25 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 2 μ L, gDNA 1 μ L, 蒸馏水补足总体系至 50 μ L。扩增程序:94℃ 5 min;扩增 35 个循环(94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s);72℃ 7 min。

1.3.3 焦磷酸测序 取 20 μ L PCR 产物、2 μ L Sepharose、18 μ L 蒸馏水、40 μ L Binding buffer 振荡混匀 8 min,再制备单链至已加入 1 μ L 10 μ mol/L 的测序引物和 24 μ L Annealing buffer 的 24 孔板中, 80℃ 孵育 30 s,室温放置 1 min。CYP2C19 * 2 位点核苷酸推注顺序为 CCTTGA, CYP2C19 * 3 位点核苷酸推注顺序为 GGAATC。检测结果可由仪器分析后自动判读,也可根据信号峰的比值来判断。

1.3.4 最低检测浓度验证 随机挑选 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因型分别为 * 1 * 2 型和 * 1 * 3 型的 gDNA 标本各 1 份,用 DNA Rehydration Buffer 梯

度稀释成 10.0、2.0、0.4 ng/ μ L,每个浓度梯度设置 3 个复孔。

1.3.5 准确度验证 随机选取 20 份临床 gDNA 标本进行焦磷酸测序,并将扩增产物送至深圳市华大科技有限公司进行双向 Sanger 测序验证。

1.3.6 重复性验证 选取经 Sanger 测序证实 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因型分别为 * 1 * 2 型和 * 1 * 3 型(杂合型)的 gDNA 标本各 1 份,批内连续检测 4 次,计算荧光信号值的平均值($\bar{x}$)、标准差(s)与变异系数(CV),以 $CV \leq 5\%$ 为验证通过。

1.3.7 特异度验证 选取经焦磷酸测序验证 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因型均为 * 1 * 1 型(野生型)的 gDNA 标本各 10 份,将其扩增产物送至深圳市华大科技有限公司进行双向 Sanger 测序。

1.3.8 临床标本检测 对 2021 年 1 月至 2022 年 5 月本院临床科室申请进行 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性检测的 144 份血液标本进行焦磷酸测序。

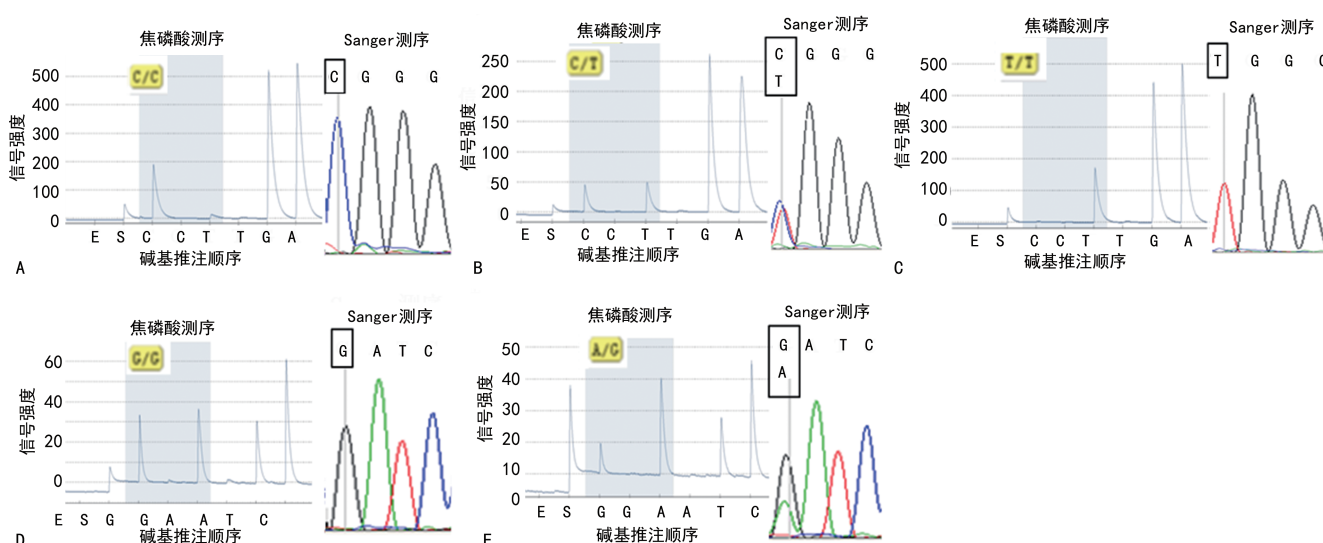
1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。计数资料以例数或百分率表示, Hardy-Weinberg 平衡验证采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最低检测浓度 由于杂合型标本的荧光强度只有野生型或突变型标本的一半, 因此选择 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 位点的杂合型标本进行检测更能反映最低检测浓度。不同浓度标本的焦磷酸测序结果与稀释前结果比对一致, 焦磷酸测序仪

可分析浓度低至 $0.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 gDNA 标本, 故该方法的最低检测浓度为 $0.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

2.2 准确度 20 份临床 gDNA 标本进行焦磷酸测序, 分别检测出 9 份 CYP2C19 * 2 * 1 * 1 型, 10 份 CYP2C19 * 2 * 1 * 2 型, 1 份 CYP2C19 * 2 * 2 * 2 型; 19 份 CYP2C19 * 3 * 1 * 1 型, 1 份 CYP2C19 * 3 * 1 * 3 型, 未检测出 CYP2C19 * 3 * 3 * 3 型。与 Sanger 测序验证结果比对, 两种检测方法结果完全符合(图 1), 焦磷酸测序方法准确率为 100%。



注: A 为 CYP2C19 * 2 * 1 * 1 型测序结果; B 为 CYP2C19 * 2 * 1 * 2 型测序结果; C 为 CYP2C19 * 2 * 2 * 2 型测序结果; D 为 CYP2C19 * 3 * 1 * 1 型测序结果; E 为 CYP2C19 * 3 * 1 * 3 型测序结果。

图 1 焦磷酸测序和 Sanger 测序结果比对

2.3 特异度 10 份 CYP2C19 * 2 和 10 份 CYP2C19 * 3 基因型均为野生型的 gDNA 标本, 对其扩增产物进行双向 Sanger 测序均未检出突变型, 检测特异度为 100%。

2.4 重复性 CYP2C19 * 2 * 1 * 2 型 gDNA 标本的两个等位基因 C 和 T 的荧光信号值 CV 分别为 4.20% 和 4.40%, CYP2C19 * 3 * 1 * 3 型 gDNA 标本的两个等位基因 A 和 G 的荧光信号值 CV 分别为 3.75% 和 3.21%, 均 $< 5\%$, 重复性验证符合要求, 见表 2。

表 2 CYP2C19 * 2 * 1 * 2 和 CYP2C19 * 3 * 1 * 3 型

重复性验证结果

项目	CYP2C19 * 2 * 1 * 2 型		CYP2C19 * 3 * 1 * 3 型	
	等位基因		等位基因	
	C	T	A	G
荧光信号值				
第 1 次检测	84.62	86.48	46.72	47.07
第 2 次检测	91.92	91.53	49.90	50.21
第 3 次检测	91.36	95.72	46.25	49.47
第 4 次检测	85.95	88.67	49.20	50.61
$\bar{x}$	88.47	90.60	48.02	49.34
s	3.72	3.99	1.80	1.59
CV(%)	4.20	4.40	3.75	3.21

2.5 临床标本检测 144 份临床标本的焦磷酸测序结果显示, CYP2C19 * 2 多态性位点 * 1 * 1 型(野生型) 71 份 (49.3%), * 1 * 2 型(杂合型) 59 份 (41.0%), * 2 * 2 型(突变型) 14 份 (9.7%); CYP2C19 * 3 多态性位点 * 1 * 1 型(野生型) 139 份 (96.5%), * 1 * 3 型(杂合型) 5 份 (3.5%), 未检出 * 3 * 3 型(突变型)标本(在中国人群中分布频率极低), 分布情况符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$)。

3 讨论

药物基因组学结合了药理学和基因组学, 主要用于探索有效、安全的药物和使用剂量, 在精准医学中有着重要的意义^[12-14]。药物基因组学的检测可用于指导医师采取更好的治疗决策, 根据人体的基因型精准选择药物及剂量^[15]。CYP2C19 是 CYP2C 酶体系的一员, 其基因多态性可导致酶活性的差异^[16]。CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性是中国人人群中常见的突变, 分别会导致酶活性丧失和形成无活性的酶蛋白^[17]。对于携带两个 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 功能缺失性等位基因的患者, 如果常规使用氯吡格雷, 发生心血管事件的风险将明显增加,

因此治疗前应进行 CYP2C19 基因型检测,以减少不良事件发生风险^[18-19]。奥美拉唑经 CYP2C19 代谢形成无活性的代谢产物,不同的 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 基因型会造成不同的人体血药浓度,进而形成抑酸疗效上的差异,因此需要针对基因型进行剂量调整^[20]。

目前,检测 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性的一些方法已通过性能验证,但关于焦磷酸测序的方法学验证报道少见。因此,本研究根据江苏省临床检验中心对扩增实验室的要求和医学界普遍执行的关于医学实验室能力要求的标准 ISO15189,设计了 4 个方面的性能验证。经验证,本研究采用焦磷酸测序检测 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性的最低检测浓度为 0.4 ng/ μ L;采用 Sanger 测序为参考方法,两种方法测序结果完全符合,准确度为 100%;特异度验证中真阴性野生型标本均未检出阳性突变,特异度良好;批内重复检测 4 次结果稳定。上述结果提示该方法性能指标符合药物基因组学检测项目的要求,符合临床基因扩增检验实验室检测质量要求。

综上所述,本文建立的基于焦磷酸测序检测 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 单核苷酸多态性的方法准确、稳定、灵敏度高,能为临床提供可靠结果,进而为临床使用氯吡格雷、质子泵抑制剂和抗抑郁药等提供个体化指导。

参考文献

- [1] RODEN D M, MCLEOD H L, RELLING M V, et al. Pharmacogenomics[J]. Lancet, 2019, 394 (10197): 521-532.
- [2] CACABELOS R. Pharmacogenomics of Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. Neurosci Lett, 2020, 726: 133807.
- [3] THORN C F, WHIRL-CARRILLO M, HACHAD H, et al. Essential characteristics of pharmacogenomics study publications[J]. Clin Pharmacol Ther, 2019, 105 (1): 86-91.
- [4] WARING R H. Cytochrome P450: genotype to phenotype[J]. Xenobiotica, 2020, 50 (1): 9-18.
- [5] PATRINOS G P. Sketching the prevalence of pharmacogenomic biomarkers among populations for clinical pharmacogenomics[J]. Eur J Hum Genet, 2020, 28 (1): 1-3.
- [6] JOOB B, WIWANITKIT V. CYP2C19 * 2 polymorphism and clopidogrel resistance[J]. Arch Cardiol Mex, 2020, 90 (4): 544.
- [7] EL ROUBY N, LIMA J J, JOHNSON J A. Proton pump inhibitors: from CYP2C19 pharmacogenetics to precision medicine[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2018, 14 (4): 447-460.
- [8] WESTERGAARD N, SØGAARD N R, JØRGENSEN S, et al. Drug use in denmark for drugs having pharmacogenomics (PGx) based dosing guidelines from CPIC or DPWG for CYP2D6 and CYP2C19 drug-gene pairs: perspectives for introducing PGx test to polypharmacy patients[J]. J Pers Med, 2020, 10 (1): 3.
- [9] HESHU A K, ANTONIUS M K, MARGA N, et al. Pharmacogenetics guidelines: overview and comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPgx guidelines[J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 595219.
- [10] 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(ISO15189:2012. IDT): CNA5-CL02[S]. 北京: 中国计量出版社, 2013.
- [11] 江苏省临床检验中心. 江苏省临床基因诊断实验室技术验收申请表[EB/OL]. (2017-07-17) [2022-07-01]. <http://jscl.clinet.cn/aboutcenter/?type=detail&id=216>.
- [12] SHI W H, DAN P, XUE Y X, et al. CTLA-4 rs5742909 polymorphism and cervical cancer risk[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99 (11): e19433.
- [13] MERIEM A, KARIM G, DONIA A, et al. Conserved DNA-derived polymorphism, new markers for genetic diversity analysis of Tunisian Pistacia vera L[J]. Physiol Mol Biol Plants, 2019, 25 (5): 1211-1223.
- [14] HARIOM S, RANJANA C, VIJAY N, et al. ACE2 and TM-PRSS2 polymorphisms in various diseases with special reference to its impact on COVID-19 disease[J]. Microb Pathog, 2021, 150: 104621.
- [15] KELLY E C, NICHOLAS J K, TERI E K, et al. Standardization can accelerate the adoption of pharmacogenomics: current status and the path forward[J]. Pharmacogenomics, 2018, 19 (10): 847-860.
- [16] 吴贻晨, 陈点, 王尧城, 等. 福州地区汉族人群 CYP2C19 基因多态性分析及方法学比较[J]. 检验医学与临床, 2022, 19 (14): 1907-1911.
- [17] 张涵煦, 向倩, 谢秋芬, 等. 细胞色素 P450 酶 2C19 基因多态性的氯吡格雷个体化用药临床研究分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38 (11): 1274-1277.
- [18] SHERRY B, NAVEEN P. Pharmacogenomic impact of CYP2C19 variation on clopidogrel therapy in precision cardiovascular medicine[J]. J Pers Med, 2018, 8 (1): 8.
- [19] NAVEEN L P, CHARANJIT S R, DEREK S, et al. Clopidogrel pharmacogenetics: state of the art review and the TAILOR-PCI study[J]. Circ Cardiovasc Interv, 2019, 12 (4): e007811.
- [20] EDWARD B M, ANDRE W, ASHLAN J K, et al. CYP2C19 and STAT6 variants influence the outcome of proton pump inhibitor therapy in pediatric eosinophilic esophagitis[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2019, 69 (5): 581-587.

(收稿日期: 2022-09-08 修回日期: 2022-11-08)