

多色探针熔解曲线法在卡马西平不良反应相关基因检测中的临床评价

裴斌¹, 郭晓彤², 冉鹏¹, 黄秋英², 洪素云¹, 钟雪婷², 李庆阁^{2*} (1.厦门市中心血站, 福建 厦门 361004; 2.厦门大学生命科学院, 福建 厦门 361102)

摘要:目的 对多色探针熔解曲线法(multicolor melting curve analysis, MMCA)用于卡马西平不良反应相关的 *HLA-B*15:02* 基因检测进行临床评价。方法 收集厦门市中心血站 1 147 份厦门地区无偿献血者的外周静脉血样本, 经基因 DNA 提取后, 按双盲对照试验, 分别应用 MMCA 法和 HLA-SBT 测序法对各样本进行 *HLA-B*15:02* 基因检测, 比较 2 种检测方法的符合率。对于检测结果不一致的标本, 采用第三方 Sanger 测序和电泳验证, 计算总符合率。结果 采用 MMCA 法共检出 77 份 *HLA-B*15:02* 阳性标本, 1 070 份 *HLA-B*15:02* 阴性标本。采用 HLA-SBT 测序法共检出 74 份 *HLA-B*15:02* 阳性标本, 1 070 份 *HLA-B*15:02* 阴性标本, 以及 3 份无明确的分型信息的标本(仅显示为 *B*15:VG-B*15:CYS* 型)。该 3 份标本经 Sanger 测序以及电泳验证, 确认为 *HLA-B*15:02* 阳性标本。因此, MMCA 法检测 *HLA-B*15:02* 基因的阳性检出率为 100%(77/77), 阴性检出率为 100%(1 070/1 070), 总符合率为 100%(1 147/1 147)。此外, 在 1 147 份临床标本中共检出 77 份阳性结果, *HLA-B*15:02* 的携带率为 6.7%(77/1147), 这与文献报道的数据基本一致。结论 MMCA 法用于 *HLA-B*15:02* 基因的检测, 具有简便、快速、灵敏度高、特异性强等优点, 可应用于卡马西平不良反应相关的 *HLA-B*15:02* 基因的临床辅助检测。

关键词: 卡马西平; 基因检测; 探针熔解曲线法; *HLA-B*15:02*; 不良反应

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)09-1393-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.09.027

引用本文: 裴斌, 郭晓彤, 冉鹏, 等. 多色探针熔解曲线法在卡马西平不良反应相关基因检测中的临床评价[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(9): 1393-1399.

Clinical Evaluation of Multicolor Melting Curve Analysis for Detecting Gene Related to Carbamazepine-induced Adverse Drug Reactions

PEI Bin¹, GUO Xiaotong², RAN Peng¹, HUANG Qiuying², HONG Suyun¹, ZHONG Xueting², LI Qingge^{2*} (1.Xiamen Blood Center, Xiamen 361004, China; 2.School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effect of multicolor melting curve analysis(MMCA) for detecting *HLA-B*15:02* gene related to carbamazepine-induced adverse drug reactions. **METHODS** A blind test of 1 147 peripheral blood samples collected from Xiamen Blood Center was performed to validate the agreement between MMCA assay and HLA-SBT assay. Sanger sequencing and electrophoresis were used to confirm inconsistent results of two methods, the agreement for all methods was validated. **RESULTS** In this study, 77 cases were identified as positive samples and 1 070 cases were identified as negative samples by MMCA assay. For HLA-SBT assay, 74 *HLA-B*15:02* positive samples, 1 070 negative samples and 3 uncertain samples(only showed *B*15:VG-B*15:CYS*) were detected. Three uncertain samples were confirmed to be *HLA-B*15:02* positive samples by Sanger sequencing and electrophoresis. Therefore, the positive agreement, negative agreement and total agreement of *HLA-B*15:02* gene detection by MMCA assay were 100%(77/77), 100%(1 070/1 070) and 100%(1 147/1 147). The percentage of positive samples was 6.7%(77/1 147) which was reasonable compared to previous reports. **CONCLUSION** MMCA assay is a convenient and rapid method with high sensitivity and excellent specificity, and promises to be a powerful tool for the clinical diagnosis of *HLA-B*15:02* gene.

KEY WORDS: carbamazepine; gene detection; multicolor melting curve analysis; *HLA-B*15:02*; adverse reaction

卡马西平(carbamazepine, CBZ)是一种情绪稳定剂, 它作为一线抗惊厥药物, 被广泛用于治疗双相情感障碍和癫痫等精神性疾病, 但由其引发的不良反应也不可小觑。CBZ 引发的不良反应为

大疱性皮肤不良反应, 表现为大面积皮肤剥脱, 临床上按照皮肤剥脱面积占体表总面积的比例对其进行分类, <10%的为史蒂芬斯-强森综合症(Stevens-Johnson syndrome, SJS), >30%的为中

作者简介: 裴斌, 男, 硕士, 副主任技师 Tel: (0592)2292756
(0592)2182100 E-mail: qgli@xmu.edu.cn

E-mail: peibin@139.com *通信作者: 李庆阁, 男, 教授, 博导 Tel:

中国现代应用药学 2018 年 9 月第 35 卷第 9 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2018 September, Vol.35 No.9

• 1393 •

毒性表皮坏死松解症(toxic epidermal necrosis, TEN), 10%~30%的为 SJS/TEN 重叠型^[1-6]。据统计, 在亚洲人群中, CBZ 是最常引发 SJS、TEN 的药物, 占有药物引发皮肤不良反应案例的 25%~33%^[7-8]。发生不良反应的患者会出现全身黏膜受损、多器官受累等并发症, 致死率极高, 幸存者通常伴有视力丧失等后遗症, 危害极大^[9-10]。

2004 年 Chung 等对台湾地区汉族人群进行研究^[11], 在全世界首次报道 *HLA-B*15:02* 基因与 CBZ 引起的 SJS 和 TEN(CBZ-SJS/TEN)存在强烈的相关性, 随后的大量研究证实了 *HLA-B*15:02* 基因与 CBZ-SJS/TEN 的关联^[12-16], 但二者之间的相关性存在种族差异性^[17]。对于亚裔人群, *HLA-B*15:02* 基因可以作为生物标志物用以预测 CBZ-SJS/TEN 的发生^[18-26]。2007 年 12 月, FDA 发布了一则警示, 强调 *HLA-B*15:02* 阳性患者在服用 CBZ 时有发生致命性皮肤不良反应的风险, 并建议亚裔人群在用药前进行 *HLA-B*15:02* 基因筛查^[9,25]。

传统的 HLA 分型多采用血清学分型法, 但由于 HLA 各基因座位间存在的高度同源性会使血清学出现较多、较强的交叉反应, 因此不能保证分型结果的准确性。80 年代后期, 随着分子生物学技术的迅速发展成熟, 人们开始对 HLA 进行 DNA 分型研究。目前常用的 HLA 的 DNA 分型技术主要有测序^[26-28]、限制性片段长度多态性分析(RFLP)^[29-30]、聚合酶链式反应寡核苷酸探针杂交(PCR-SSO)^[31]、聚合酶链式反应单链构象多态性分析(PCR-SSCP)^[32-33]和序列特异性引物聚合酶链式反应(PCR-SSP)^[34-36]等, 但由于现存的 HLA 基因检测技术多用于 HLA 基因的分型, 需同时对大量 HLA 基因型进行区分, 检测成本高, 结果分析过程繁琐, 因此有必要建立一种快速准确的方法有针对性地检测 *HLA-B*15:02* 基因。目前单一检测 *HLA-B*15:02* 多利用 PCR-SSP 技术, 如巢式 PCR^[37], 这些方法需要在 PCR 扩增后对产物进行电泳, 不仅耗时耗力, 也容易受到污染, 影响结果的准确性。因此, 研究和建立一种快速、简便、高通量、低成本的检测方法成为临床医师们追求的目标。为了解多色探针熔解曲线法(multicolor melting curve analysis, MMCA)应用于 CBZ 不良反应相关的 *HLA-B*15:02* 基因检测的可行性和准

确性, 本研究用该方法对 1 147 份外周血标本进行了临床应用评价。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集在厦门市中心血站经过 HLA-SBT 测序法获得 HLA-B 基因型的外周静脉血样本 1 147 份, 样本来源为 2014—2015 年厦门地区无偿献血者。本研究已通过厦门市中心血站伦理委员会审查, 经献血者知情同意后, 用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集外周静脉血。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和浓度测定 采用厦门致善生物科技股份有限公司 Lab-Aid 820 全自动核酸提取仪及配套的磁珠法核酸提取试剂盒对外周静脉血样本进行核酸提取。利用 ND-1000-UV-VIS 波长紫外/可见光扫描分光光度计(美国 NanoDrop)对样本的基因组 DNA 的提取质量和浓度进行检测, 并将 DNA 的终浓度调节至 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 直接使用或置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。DNA 样本的 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 比值在 1.6~2.0 之间, $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$ 比值 ≥ 2.0 。

1.2.2 HLA-SBT 测序法检测 *HLA-B* 基因 采用美国 Life Technologies 公司的 SeCore SBT 试剂盒进行 *HLA-B* 基因检测, 其中 B 座位等位基因分型试剂批号为 1540309, 所采用的仪器为 AB-3130 基因分析仪。

1.2.3 MMCA 检测 *HLA-B*15:02* 基因 *HLA-B*15* 是 HLA-B 基因座位上最大、最具多态性的基因家族, 有 150 种以上的等位基因型, 其多态性位点主要集中在外显子 2 和外显子 3 区域。根据 NCBI 数据库提供的序列比对工具 dbMHC Sequence Alignment Viewer 可对 *HLA-B* 座位的各基因型进行序列比对, 决定 *HLA-B*15:02* 基因分型的核心基因位点主要有编码区第 193 位(G)、第 209 位(C)、第 259 位(A)、第 261 位(C)、第 277 位(A)、第 302 位(A)、第 353 位(T)、第 355 位(A)。*HLA-B*15:02* 基因检测试剂盒(荧光 PCR 熔解曲线法)由厦门致善生物科技股份有限公司提供。每份标本仅需通过 1 个 PCR 反应体系进行检测, 每个反应体系内含有相应的引物和三色荧光检测探针[羟基荧光素(FAM), 羟基-X-罗丹明荧光素(ROX), 六氯荧光素(HEX)]及 PCR 的基本组成成分。首先用引物扩增人 HLA 基因, 再通过对荧光标记探针与 PCR

产物形成的双链杂交体进行熔解曲线分析来判断样本是否带有 *HLA-B*15:02* 基因。具体检测流程如下:将 5 μL 浓度为 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的待测 DNA 标本直接加到含 PCR 反应液的管中,短暂离心后,转移至全自动医用 PCR 分析系统(SLAN-96S,上海宏石医疗科技有限公司)上进行 PCR 扩增及熔解曲线分析。PCR 扩增和熔解曲线分析的运行程序为:50 $^{\circ}\text{C}$ UNG 酶处理 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;Touchdown 循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,每次循环减 1 $^{\circ}\text{C}$,76 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,循环 10 次;PCR 扩增循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,76 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,循环 50 次;熔解曲线分析程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 3 min,熔解曲线分析(45~85 $^{\circ}\text{C}$,每 0.04 $^{\circ}\text{C}$ 采集 FAM、HEX、ROX 通道荧光信号)。参照试剂盒说明书进行样本基因型判读。

1.2.4 Sanger 测序验证 应用 Sanger 测序法对 MMCA 法和 HLA-SBT 测序法检测结果不一致的标本进行相应片段的 PCR 扩增测序验证[测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成]。

1.2.5 临床数据分析 按照双盲对照试验,每份标本均采用 MMCA 法和 HLA-SBT 测序法进行 *HLA-B*15:02* 基因检测。试验完成后进行揭盲,计算 MMCA 法和 HLA-SBT 测序法的符合率。对于检测结果不一致的标本,采用第三方 Sanger 测序验证,计算总符合率。

2 结果

2.1 MMCA 法用于 *HLA-B*15:02* 基因检测

该检测体系引入 β -globin 基因作为内控基因(HEX 通道),各通道的阳性特征峰的熔点(T_m)参考值范围见表 1。判读结果时,首先看内控对应的

HEX 通道是否有正常的熔解峰(内控峰)出现:

①若无正常熔解峰出现,表明样本基因组有问题,检测结果无效;②若 HEX 通道有正常熔解峰,且 T_m 值在 HEX 通道阳性特征峰的参考区间内,则检测结果有效,可进一步根据 FAM、ROX 通道的熔解信号判断模板类型,当 FAM 和 ROX 通道同时出现正常熔解峰,并且 T_m 值在阳性特征峰的参考范围内时,表明样品带有 *HLA-B*15:02* 基因;当 FAM 和 ROX 任一通道无熔解峰或任一通道为非阳性特征峰时(T_m 值不在阳性特征峰的参考范围内),表明样品不带有 *HLA-B*15:02* 基因。

表 1 *HLA-B*15:02* 阳性特征峰的熔点(T_m)参考值范围

Tab. 1 Reference range of *HLA-B*15:02* positive melting temperature

基因	荧光通道	阳性特征峰的 $T_m/^{\circ}\text{C}$
β -globin	HEX	61.92~64.54
<i>HLA-B*15:02</i> 特征区域 1	FAM	65.00~67.97
<i>HLA-B*15:02</i> 特征区域 2	ROX	68.87~71.17

MMCA 法检测阳性样本和阴性样本的典型结果图见图 1。图 1A: HEX 内控峰正常且在阳性特征峰的 T_m 参考值范围内, FAM 和 ROX 通道同时出现正常熔解峰且在阳性特征峰的 T_m 参考范围内,为阳性标本;图 1B: HEX 内控峰正常且在阳性特征峰的 T_m 参考值范围内,但 ROX 通道无熔解峰,为阴性标本;图 1C: HEX 内控峰正常且在阳性特征峰的 T_m 参考值范围内, FAM 和 ROX 通道同时出现正常熔解峰,但 FAM 通道为非阳性特征峰(T_m 值不在阳性特征峰的参考范围内),为阴性标本;图 1D: HEX 内控峰正常且在阳性特征峰的 T_m 参考值范围内,但 FAM 和 ROX 通道均无熔解峰,为阴性标本。

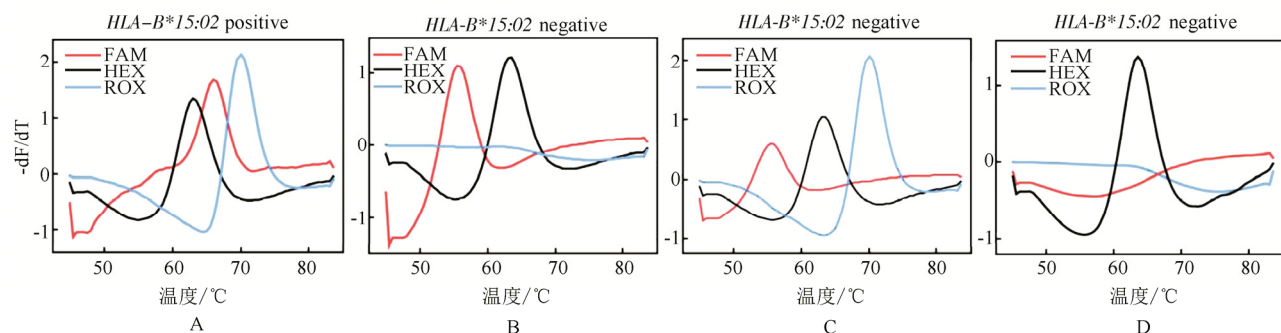


图 1 MMCA 法检测阳性样本和阴性样本的典型结果图

Fig. 1 Detection results of positive sample and negative samples by MMCA

2.2 MMCA法和HLA-SBT测序法的检测结果比较
本研究共检测1147份人类基因组DNA样本。采用MMCA法共检出77份HLA-B*15:02阳性标本,1070份HLA-B*15:02阴性标本。采用HLA-SBT测序法共检出74份HLA-B*15:02阳性标本,1070份HLA-B*15:02阴性标本,以及3份无明确的分型信息的标本(仅显示为B*15:VG-B*15:CYS型),该3份标本检测结果无效。在MMCA法和HLA-SBT测序法都给出有效检测结果的1144例样本中,2种检测方法的符合率为100%。

3份无明确的分型信息的标本仅显示为B*15:VG-B*15:CYS型,其中B*15:VG代表B*15:01或B*15:02,B*15:CYS代表B*15:15或B*15:25,即该3份标本的基因型可能为B*15:01-B*15:15、B*15:01-B*15:25、B*15:02-B*15:15、B*15:02-B*15:25中的一种。为了评估MMCA体系的准确性,需采用Sanger测序验证或电泳等第三方对照方法进一步确认该3份标本的基因型。

2.3 MMCA法和HLA-SBT测序法检测结果不相符的样本分析结果

2种检测方法对3份标本的检测结果出现差异,采用MMCA法检测结果为HLA-B*15:02阳性标本,而采用HLA-SBT测序法无法得出明确分型信息(仅显示为B*15:VG-B*15:CYS型),需采用Sanger测序验证和电泳来确认每份标本的基因型是属于B*15:01-B*15:15、B*15:01-B*15:25、B*15:02-B*15:15、B*15:02-B*15:25中的哪一种。

首先采用Sanger测序验证。在NCBI数据库中进行序列比对,B*15:01、B*15:02、B*15:15、B*15:25 4种等位基因型在外显子区一共有8个差异位点,分别为259,261,353,355,369,409,538,539位点,见图2。图中显示的是B*15:01、B*15:02、B*15:15、B*15:25与参照序列HLA-B*07:02:01的

比对结果,“-”表示相同的序列,“.”表示缺失的序列。对3份无明确分型信息标本的HLA-B基因进行测序,测序结果见图3,其259和261差异位点均显示为杂合峰,因此排除了该3份标本为B*15:01-B*15:25(纯合峰)和B*15:02-B*15:15(纯合峰)的可能性。

对于剩下2种可能(B*15:01-B*15:15和B*15:02-B*15:25),由于其测序结果在差异位点均显示为杂合峰(无差异),无法判断标本为哪一种基因型。因此又针对差异的259,261和353,355,369位点根据HLA-B*15:02序列设计一对序列特异性上、下游引物:F:5'-GAGTATTGGGACCGGCCGGAAC-3';R:5'-GCAGCCATACATCCTCTGGATGA-3'。等位基因型B*15:01、B*15:02、B*15:15、B*15:25在F、R覆盖区的差异位点见表2。

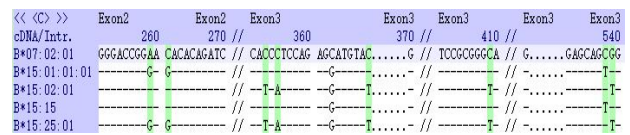


图2 B*15:01、B*15:02、B*15:15、B*15:25差异位点
Fig. 2 The differences among B*15:01, B*15:02, B*15:15 and B*15:25

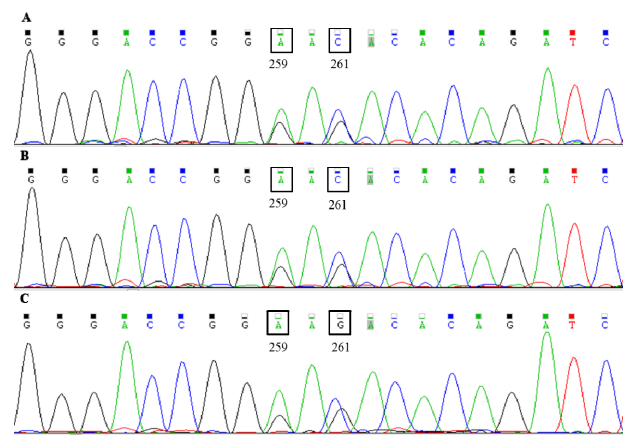


图3 3份B*15:VG-B*15:CYS标本的测序结果
Fig. 3 The sequencing results of three B*15:VG-B*15:CYS samples

表2 B*15:01、B*15:02、B*15:15、B*15:25在Fa、Ra区域差异位点

Tab. 2 Different sites in Fa and Ra regions among B*15:01, B*15:02, B*15:15, B*15:25

HLA-B allele	F 上游引物覆盖区(5'-3') ^a	R 下游引物覆盖区(5'-3') ^{a,b}
HLA-B*15:01	GAGTATTGGGACCGCGGGAG	CCCTCCAGAGGATGTACGGCTGC
HLA-B*15:02	GAGTATTGGGACCGCCGGAAC	TCATCCAGAGGATGTATGGCTGC
HLA-B*15:15	GAGTATTGGGACCGCCGGAAC	CCCTCCAGAGGATGTACGGCTGC
HLA-B*15:25	GAGTATTGGGACCGCGGGAG	TCATCCAGAGGATGTATGGCTGC

注: ^a带下划线的碱基代表与上下游引物错配的碱基; ^bR覆盖区的正链序列。

Note: ^aThe underlined bases denote mismatched sites with primers; ^bsequence of positive strand covered by R.

找出在 F、R 覆盖区与 *B*15:01*、*B*15:02*、*B*15:15*、*B*15:25* 相同的纯合型标本，模拟 *B*15:01*、*B*15:02*、*B*15:15*、*B*15:25* 基因型模板，用 F 和 R 对该 3 份无明确分型信息的标本进行扩增，同时引入一对 HBB 的引物作为内控，PCR 扩增之后对产物进行电泳，F、R 的目的条带为 417 bp，HBB 基因的内控条带为 360 bp。图 4 中泳道 1 为 1 000 bp Marker；泳道 2 为空白对照；泳道 3, 4, 5 为 3 份 *B*15:VG-B*15:CYS* 标本；泳道 6 为 *HLA-B*15:01* 模拟模板；泳道 7 为 *HLA-B*15:02* 阳性对照模板；泳道 8 为 *HLA-B*15:15* 模拟模板；泳道 9 为 *HLA-B*15:25* 模拟模板。电泳结果显示，*B*15:01*、*B*15:15* 和 *B*15:25* 基因型模板仅能扩增出一段 360 bp 的内控片段，而 *B*15:02* 阳性模板除了内控片段还能扩增出一段 417 bp 的 HLA-B 基因片段。由于 3 份无明确分型信息标本的电泳结果显示为与 *B*15:02* 阳性对照相同的 2 个条带，因此可以确定该 3 份标本的基因型不是 *B*15:01-B*15:15* 而是 *B*15:02-B*15:25*，为 *HLA-B*15:02* 阳性，与 MMCA 法的检测结果一致。

因此，MMCA 法的阳性检出率(77/77)，阴性检出率(1 070/1 070)和总符合率(1 147/1 147)均为 100%。此外，MMCA 法在 1 147 份临床标本中共检出 77 份阳性结果，*HLA-B*15:02* 的携带率为 6.7%(77/1 147)，与文献报道的数据^[38]基本一致。

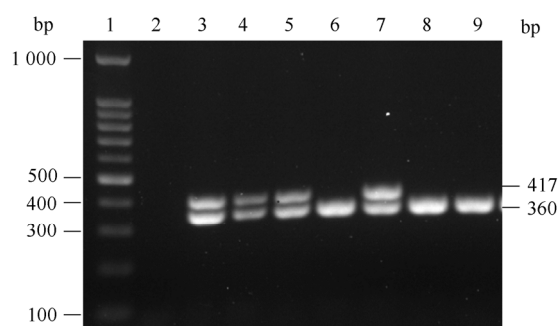


图 4 3 份 *B*15:VG-B*15:CYS* 标本的电泳结果
Fig. 4 The agarose gel electrophoresis results of three *B*15:VG-B*15:CYS* samples

3 讨论

临床药理学实施联盟(Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, CPIC)针对携带 *HLA-B*15:02* 基因的患者发布了 CBZ 的用药指

南：若患者出现不良反应，无论种族，都不应继续使用 CBZ 进行治疗；若患者服药 3 个月以上而未出现皮肤不良反应，CBZ 可以被谨慎使用^[17,39]。2013 年 4 月，新加坡强烈建议在 CBZ 用药前进行 *HLA-B*15:02* 基因筛查，并将其列入医疗保健标准，政府对于患者有最高 25% 的补助。中国香港和台湾的地方行政部门也已经发布指令，规定患者在服用 CBZ 之前，必须进行 *HLA-B*15:02* 基因检测并对患者免费^[14]。由此可见，*HLA-B*15:02* 基因筛查对于预测 CBZ 不良反应、指导药物个体化治疗意义重大，香港、台湾、新加坡等地区相关政策的率先实施也预示了 *HLA-B*15:02* 基因检测项目在亚裔人群中推广的重要和应用前景。

目前 *HLA-B*15:02* 的主要检测方法是 PCR-SSP 技术^[40]，但该方法存在明显缺陷。本研究通过 MMCA 法对 1 147 例外周血标本的 *HLA-B*15:02* 基因进行检测，经与 HLA-SBT 测序法比较，1 070 份 *HLA-B*15:02* 阴性标本的检测结果显示相符，74 份 *HLA-B*15:02* 阳性标本的检测结果显示相符，另有 3 份标本的检测结果显示有差异，这是由于 HLA-SBT 测序法的分辨率只有约 90%，一些相似的基因型无法区分所致，经第三方对照方法验证确认，该 3 份标本为 *HLA-B*15:02* 阳性标本，与 MMCA 法的检测结果相同。

结果表明，MMCA 法可实现对 *HLA-B*15:02* 基因的特异检测，并相较其他方法具有明显的优势：①检测快速简便、通量高。整个过程(包括基因组 DNA 提取、PCR 扩增和熔解曲线分析)在 4 h 之内就能完成，且可一次性同时检测 94 份标本；②不易污染。全程闭管，可有效地避免 PCR 扩增产物的交叉污染；③方法可靠、结果易判读。结果的判读十分直观，通过读取熔解曲线的 T_m 值即可判断样本类型，各熔解峰 T_m 值的读数会由荧光 PCR 仪自带的软件自动给出，保证了检测结果的客观性和可靠性；④普及性强。由于荧光 PCR 仪在各实验室、医院和检验机构的普及，因此 MMCA 法相较其他的技术更适于临床的大规模推广。但 MMCA 法也存在一定的局限性，虽然可以将 *HLA-B*15:02* 与大多数其他 HLA-B 等位基因型区别开来，但是无法区分 15:88, 15:89, 15:112, 15:121, 15:144, 15:194, 15:213, 15:223, 15:265

等罕见基因型。通过在 Allele Frequency Database (<http://www.allelefrequencies.net/>) 中进行等位基因频率查询, 得知 *15:88*, *15:89*, *15:112*, *15:121*, *15:144*, *15:194*, *15:213*, *15:223*, *15:265* 在全世界范围内都十分罕见(基因频率<0.1%), 因此由其造成的假阳性影响可以忽略。

综上所述, MMCA 法应用于 *HLA-B*15:02* 基因检测具有灵敏度高、特异性强等特点。该方法检测结果可靠、简便快捷、不易污染, 检测通量高, 检测成本较低, 结果直观且易判定, 可应用于 CBZ 不良反应相关的 *HLA-B*15:02* 基因的临床辅助检测。

REFERENCES

- NASSIF A, BENSUSSAN A, BOUMSELL L, et al. Toxic epidermal necrolysis: effector cells are drug-specific cytotoxic T cells [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(5): 1209-1215.
- AUQUIER-DUNANT A, MOCKENHAUPT M, NALDI L, et al. Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis: results of an international prospective study [J]. *Arch Dermatol*, 2002, 138(8): 1019-1024.
- HABER J, HOPMAN W, GOMEZ M, et al. Late outcomes in adult survivors of toxic epidermal necrolysis after treatment in a burn center [J]. *J Burn Care Rehabil*, 2005, 26(1): 33-41.
- ISVY-JOUBERT A, INGEN-HOUSZ-ORO S, VINCENT R, et al. Severe cutaneous adverse reactions to drugs: from patients to the national office for compensation of medical accidents [J]. *Dermatology*, 2014, 228(4): 338-343.
- ROUJEAU J C. The spectrum of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a clinical classification [J]. *J Invest Dermatol*, 1994, 102(6): 28S-30S.
- YANG C Y, DAO R L, LEE T J, et al. Severe cutaneous adverse reactions to antiepileptic drugs in Asians [J]. *Neurology*, 2011, 77(23): 2025-2033.
- KHOO A K, FOO C L. Toxic epidermal necrolysis in a burns centre: a 6-year review [J]. *Burns*, 1996, 22(4): 275-278.
- KAMALIAH M D, ZAINAL D, MOKHTAR N, et al. Erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in northeastern Malaysia [J]. *Int J Dermatol*, 1998, 37(7): 520-523.
- LOCHARERNKUL C, SHOTELERSUK V, HIRANKARN N. Pharmacogenetic screening of carbamazepine-induced severe cutaneous allergic reactions [J]. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(10): 1289-1294.
- SOTOZONO C, ANG L P, KOIZUMI N, et al. New grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome [J]. *Ophthalmology*, 2007, 114(7): 1294-1302.
- LONJOU C, THOMAS L, BOROT N, et al. A marker for Stevens-Johnson syndrome | ethnicity matters [J]. *Pharmacogenomics J*, 2006, 6(4): 265-268.
- AMSTUTZ U, ROSS C, CASTRO-PASTRANA L I, et al. *HLA-A 31:01* and *HLA-B 15:02* as genetic markers for carbamazepine hypersensitivity in children [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94(1): 142-149.
- CHUNG W H, HUNG S I, HONG H S, et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome [J]. *Nature*, 2004, 428(6982): 486.
- THONG B Y. Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis: an Asia-Pacific perspective [J]. *Asia Pac Allergy*, 2013, 3(4): 215-223.
- CUMMINS J M, RAGO C, KOHLI M, et al. Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53 [J]. *Nature*, 2004, 428(6982): 1 p following 486.
- HUNG S I, CHUNG W H, LIU Z S, et al. Common risk allele in aromatic antiepileptic-drug induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Han Chinese [J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 11(3): 349-356.
- CHENG C Y, SU S C. HLA associations and clinical implications in T-cell mediated drug hypersensitivity reactions: an updated review [J]. 2014(2014): 565320. Doi: 10.1155/2014/565320.
- MIDDLETON D, HAWKINS B R, WILLIAMS F, et al. HLA class I allele distribution of a Hong Kong Chinese population based on high-resolution PCR-SSOP typing [J]. *Tissue Antigens*, 2004, 63(6): 555-561.
- HUNG S I, CHUNG W H, JEE S H, et al. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2006, 16(4): 297-306.
- ZHANG Y, WANG J, ZHAO L M, et al. Strong association between *HLA-B*1502* and carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in mainland Han Chinese patients [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67(9): 885-887.
- WANG Q, ZHOU J Q, ZHOU L M, et al. Association between *HLA-B*1502* allele and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions in Han people of southern China mainland [J]. *Seizure*, 2011, 20(6): 446-448.
- MEHTA T Y, PRAJAPATI L M, MITTAL B, et al. Association of *HLA-B*1502* allele and carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome among Indians [J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2009, 75(6): 579-582.
- TASSANEYAKUL W, TIAMKAO S, JANTARAROUNG-TONG T, et al. Association between *HLA-B*1502* and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions in a Thai population [J]. *Epilepsia*, 2010, 51(5): 926-930.
- CHANG C C, TOO C L, MURAD S, et al. Association of *HLA-B*1502* allele with carbamazepine-induced toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome in the multi-ethnic Malaysian population [J]. *Int J Dermatol*, 2011, 50(2): 221-224.
- FERRELL P B, MCLEOD H L. Carbamazepine, *HLA-B*1502* and risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: US FDA recommendations [J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(10): 1543-1546.
- PETERSDORF E W, HANSEN J A. A comprehensive approach for typing the alleles of the HLA-B locus by automated sequencing [J]. *Tissue Antigens*, 1995, 46(2): 73-85.
- CASAMITJANA N, FANER R, SANTAMARIA A, et al.

- Development of a new HLA-DRB real-time PCR typing method [J]. Hum Immunol, 2005, 66(1): 85-91.
- [28] YANG G, DENG Y J, HU S N, et al. HLA-A, -B, and -DRB1 polymorphism defined by sequence-based typing of the Han population in Northern China [J]. Tissue Antigens, 2006, 67(2): 146-152.
- [29] CASTELLI E C, GIL D S, VEIGA L C, et al. Typing class I HLA-A gene using a nested PCR-RFLP procedure [J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38(6): 837-842.
- [30] MORIBE T, KANESHIGE T, INOKO H. Complete HLA-A DNA typing using the PCR-RFLP method combined with allele group- and sequence-specific amplification [J]. Tissue Antigens, 1997, 50(5): 535-545.
- [31] RAMON D, BRADEN M, ADAMS S, et al. Pyrosequencing trade mark: A one-step method for high resolution HLA typing [J]. J Transl Med, 2003, 1(1): 9.
- [32] PIETRAVALLE F, TKACZUK J, THOMSEN M, et al. Evaluation of HLA-DPB incompatibility by PCR-SSCP in the choice of a bone marrow donor [J]. Transplant Proc, 1994, 26(1): 238.
- [33] TAMAKI J, ARIMURA Y, KODA T, et al. Heterogeneity of HLA-G genes identified by polymerase chain reaction/single strand conformational polymorphism(PCR/SSCP) [J]. Microbiol Immunol, 1993, 37(8): 633-640.
- [34] SADLER A M, PETRONZELLI F, KRAUSA P, et al. Low-resolution DNA typing for HLA-B using sequence-specific primers in allele- or group-specific ARMS/PCR [J]. Tissue Antigens, 1994, 44(3): 148-154.
- [35] YU N, OHASHI M, ALOSCO S, et al. Typing of *HLA-B*15* alleles using sequence-specific primers [J]. Tissue Antigens, 1998, 52(3): 260-269.
- [36] 傅茜, 曾文涛, 邓素雄, 等. 应用 PCR-SSP 和 SSOP 对 HLA-I 类进行基因分型[J]. 实用医学杂志, 2004, 20(11): 1249-1250.
- [37] VIRAKUL S, KUPATAWINTU P, NAKKUNTOD J, et al. A nested sequence-specific primer-polymerase chain reaction for the detection of *HLA-B*15:02* [J]. Tissue Antigens, 2012, 79(4): 295-301.
- [38] WEI C Y, KO T M, SHEN C Y, et al. A recent update of pharmacogenomics in drug-induced severe skin reactions [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 27(1): 132-141.
- [39] LECKBAND S G, KELSOE J R, DUNNENBERGER H M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for *HLA-B* genotype and carbamazepine dosing [J]. Clin Pharmacol Ther, 2013, 94(3): 324-328.
- [40] WANG L B, MENG L. Monitoring the safety of carbamazepine by loop mediated isothermal amplification [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(5): 574-577.

收稿日期: 2017-11-28

(本文责编: 李艳芳)