



厦门大学学报(自然科学版)
Journal of Xiamen University(Natural Science)
ISSN 0438-0479,CN 35-1070/N

《厦门大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目: 基于多色探针熔解曲线分析技术的华法林个体化用药相关基因多态性快速检测方法
作者: 黄秋英, 夏众敏, 洪国遴, 李庆阁
收稿日期: 2019-05-10
网络首发日期: 2019-07-31
引用格式: 黄秋英, 夏众敏, 洪国遴, 李庆阁. 基于多色探针熔解曲线分析技术的华法林个体化用药相关基因多态性快速检测方法. 厦门大学学报(自然科学版). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.n.20190731.1330.004.html>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于多色探针熔解曲线分析技术的华法林个体化用药相关基因多态性快速检测方法

黄秋英¹, 夏众敏¹, 洪国舜²✉, 李庆阁¹

(1. 厦门大学生命科学学院, 分子诊断教育部工程中心, 福建 厦门 361102;

2. 厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361003)

✉通信作者 18860089899@139.com

摘要 华法林是一种广泛使用的抗凝剂, 其治疗窗口较窄, 患者间达到抗凝所需剂量的变异性大。已有研究表明 *CYP2C9*3* (rs1057910)、*CYP2C9 IVS3-65G>C* (rs9332127)、*VKORC1* c.-1639G>A (rs9923231)和 *CYP4F2*3* (rs2108622) 的单核苷酸多态性 (SNP) 是影响中国人群华法林敏感性的主要遗传因素。该研究利用多色探针熔解曲线 (MMCA) 技术, 建立可同时检测 4 个华法林敏感性基因多态性的单管 PCR 反应体系, 可在 2.5 h 内完成检测, 能检测低至 50 pg/反应的人基因组 DNA。对 218 份厦门地区随机人群各 SNP 进行筛查结果及部分样本测序结果表明, MMCA 体系有极高的准确性, 厦门地区各 SNP 的发生频率与此前报道的中国汉族人群相近, 其中 rs1057910 的等位基因 A 和 C 的频率分别为 96.3%和 3.7%; rs9332127 的等位基因 G 和 C 的频率分别为 96.3%和 3.7%; rs9923231 的等位基因 G 和 A 的频率分别为 92.2%和 7.8%; rs2108622 等位基因 G 和 A 的频率分别为 75.7%和 24.3%。基于 MMCA 技术的 SNP 分型体系具有快速、简便、准确、低成本等优点, 适合在临床实验室推广使用。

关键词 华法林; 熔解曲线分析; 个体化用药; 基因多态性

中图分类号 Q-331 文献标志码 A DOI: 10.6043/j.issn.0438-0479.201905016

Rapid detection of gene polymorphisms affecting warfarin personalized medication based on multicolor melting curve analysis

HUANG Qiuying¹, XIA Zhongmin¹, HONG Guolin²✉, LI Qingge¹

(1. Engineering Research Centre of Molecular Diagnostics, Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

Abstract Warfarin is a widely used anticoagulant with a narrow therapeutic index and large interpatient variability in the dose required to achieve target anticoagulation. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CYP2C9*3* (rs1057910), *CYP2C9 IVS3-65G>C* (rs9332127), *VKORC1* c.-1639G>A (rs9923231) and *CYP4F2*3* (rs2108622) are major genetic factors affecting therapeutic warfarin dose in Chinese population. In this study, we established a single PCR reaction which could simultaneously genotype four SNPs affecting therapeutic warfarin dose by using multicolor melting curve analysis (MMCA). The turnaround time of this closed-tube MMCA assay was within 2.5 h, the limit of detection was 50 pg of human genomic DNA per reaction. 218 Saliva samples from Xiamen area were collected to evaluate the MMCA assay, and 40 samples were sequenced to further confirm the genotyping results. All the four SNPs were accurately genotyped, yielding a 100% concordance with the sequencing results. The frequencies of A and C of rs1057910 were 96.3% and 3.7%. The frequencies of G and C of rs9332127 were 96.3% and 3.7%. The frequencies of G and A of rs9923231 were 92.2% and 7.8%. The frequencies of G and A of rs2108622 were 75.7% and 24.3%. The frequency of each SNP in Xiamen area was similar with the frequency in Han Chinese population by previous studies. Considering its rapidity, ease of use, accuracy, and cost-effectiveness, we concluded that the MMCA assay may be recommended as clinical diagnostic tool for genotyping of SNPs affecting therapeutic warfarin dose.

Key words warfarin; melting curve analysis; personalized medication; gene polymorphism

收稿日期: 2019-05-10

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20179044); 福建省高校杰出青年科研人才培育计划项目

网络首发时间: 2019-07-31 15:54:05 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.n.20190731.1330.004.html>

华法林是一种香豆素类口服抗凝药,通过抑制维生素 K 及其 2,3-环氧化物(即维生素 K 环氧化物)的相互转化而发挥抗凝作用。由于疗效确切及价格低廉,华法林仍然是目前临床上应用最广泛的口服抗凝药,主要用于预防和治理静脉血栓、心肌梗塞、缺血性休克、肺栓塞等多种血栓性疾病和心脏人工瓣膜置换术、人工血管移植术等。由于华法林治疗窗较窄(剂量不足有血栓风险,过量服用可出现致命性出血)、个体间剂量差异大(达到适宜抗凝效果的个体间剂量差异可达 10~20 倍)、受药物或食物影响较大。华法林的剂量需求受遗传因素和非遗传因素的影响。近年来国内外多项研究显示,遗传因素是造成个体间华法林维持剂量差异的主要原因之一,这些遗传因素包括 *CYP2C9*、*VKORC1*、*CYP4F2* 等约 30 个基因上的基因多态性位点^[1]。

2017 年 CPIC 遗传药理学指导华法林使用剂量指南^[2]推荐了证据最强的 3 个基因用于指导华法林剂量,即 *CYP2C9*、*VKORC1* 和 *CYP4F2*。其中, *CYP2C9* 基因编码华法林在体内代谢的关键酶 *CYP2C9* 蛋白,该酶将华法林代谢为无活性成分。人 *CYP2C9* 基因的遗传多态性(如中国人群常见的多态性包括 *CYP2C9**3 (c.1075A>C; rs1057910)^[2-4]、*CYP2C9* IVS3-65G>C (rs9332127)^[5]等)会导致编码的 *CYP2C9* 蛋白的活性野生型降低,导致患者对华法林的代谢及清除能力降低,临床表现出对华法林敏感,需要减少给药剂量以减少不良反应的发生。*VKORC1* 基因编码 *VKORC* 蛋白,其基因多态性也会导致 *VKORC* 酶活性改变,从而影响华法林的抗凝效果。其中, *VKORC1* c.-1639G>A (rs9923231) 可导致基因启动子活性差异,携带有一个或两个-1639A 的患者需要比-1639GG 纯合子更少的华法林剂量^[6-8]。*CYP4F2* 是 CYP 超家族成员之一,主要存在于肝脏和肾脏,为维生素 K 的单氧酶,近年来研究发现, *CYP4F2**3 (c.1297G>A; rs2108622) 多态性能够影响约 1%~2% 的华法林个体差异代谢, AA 患者需要提高华法林剂量^[9-11],方能达到相同的抗凝效果。

目前检测华法林个体化剂量相关多态性的方法有多种,主要包括限制性内切酶片段多态性分析(RFLP)^[1, 12]、基因芯片^[13]、等位基因特异性 PCR^[14]、变性高效液相色谱法(DHPLC)^[15]、LNA-taqman 探针实时荧光 PCR^[16]、高分辨熔解曲线分析(HRM)^[17]、焦磷酸测序^[18]、Sanger 测序等,但这些方法多数存在操作繁琐、耗时、需要昂贵的仪器、需要 PCR 后处理、单个 PCR 反应无法同时检测多个多态性位点等缺点,大多数方法并不适合用于临床。

多色探针熔解曲线分析(Multicolor Melting Curve Analysis, MMCA)技术利用末端双标记的自淬灭荧光探针与靶序列杂交形成双链杂交体稳定性的差异,从而造成熔点的差异来区分不同的靶基因或突变,在单个 PCR 反应中可以实现多种靶序列的检测和基因分型^[19]。目前,该技术已应用于多种遗传性疾病相关基因突变^[20-22]。本文拟利用 MMCA 技术,在单个 PCR 反应中实现对 3 个华法林个体化用药相关基因(*CYP2C9*、*VKORC1* 和 *CYP4F2*)的 4 个多态性位点(rs1057910、rs9332127、rs9923231 和 rs2108622)的同时检测和基因分型。

1 材料与方法

1.1 样本采集和 DNA 提取

采用唾液收集器(厦门致善生物科技有限公司)采集 2016 年 12 月 3 日厦门大学生命科学学院细胞应激国家重点实验室开放日活动中厦门市随机人群(主要是中小學生)唾液样本 218 份。所有样本的采集均获得采集对象及其监护人知情同意。唾液样本使用厦门致善生物科技有限公司 Lab-Aid 820 全自动核酸提取仪及配套的核酸提取试剂盒进行核酸提取。提取后的基因组 DNA 使用 ND-1000 全紫外/可见光扫描分光光度计(NanoDrop, 美国)对其提取质量和浓度进行检测,并将 DNA 的终浓度调节为 10 ng/ μ L,直接使用或置于-20 °C 冰箱中保存备用。

1.2 质粒标准品构建

以各位点野生型基因组 DNA 为模板,采用直接扩增法构建野生型序列,而采用重叠延伸法构建突变型序列,再采用 TA 克隆法将各序列连接至 PMD 18-T 载体(TaKaRa, 大连),进行转化,挑取阳性克隆,经双向测序鉴定正确后,将质粒 DNA 提取纯化并通过 ND-1000 全波长紫外/可见光扫描分光光度计进行定量,随后分别制备成不同浓度梯度的待检基因的不同基因型(即野生型、杂合突变型

和纯突变型) 质粒 DNA, 置于-20 °C 冰箱保存备用。

1.3 引物和探针设计

通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得 *CYP2C9*、*VKORC1* 和 *CYP4F2* 全基因序列, 找到 rs1057910、rs9332127、rs9923231 和 rs2108622 多态性所在的位置, 针对每个多态性位点, 采用 Primer Premier 5.0、Oligo 6.0、*T_m* Utility v1.3 等软件先设计 4 条自淬灭探针, 再围绕着探针分别设计相应的扩增引物对。将设计好的引物和探针均通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对, 保证其扩增和检测的特异性。所有的引物和探针均由上海生物工程有限公司合成, 相应序列见表 1。

1.4 MMCA 体系的建立

经过对体系优化和调整, 我们建立了 MMCA 体系, 其具体组分为: 1×PCR 缓冲液, 3 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U *Taq* HS (TaKaRa, 大连), 0.06 μmol/L F1、F2 和 F4, 0.6 μmol/L R1、R2 和 R4, 1 μmol/L F3、0.1 μmol/L R3, 0.2 μmol/L P1 和 P4、0.22 μmol/L P2、0.12 μmol/L P3, 不足 20 μL 用无菌水补齐, 5 μL DNA 模板, 总体积 25 μL。

表1引物和探针序列
Tab.1 Primer and probe sequences

多态性位点	名称	序列(5'→3')	片段长度/bp
CYP4F2 (rs2108622)	F1	ATCCCCAAAGGTGCTCACAG	208
	R1	CCTTGGAAATGGACAAAACAG	
	P1	HEX-CAGGGCTGTGTGGCCGGACCCTG-BHQ1	
VKORC1 (rs9923231)	F2	AGAGGGAATATCACAGACGCCAG	176
	R2	AAGTGATCCACCCACCTC	
	P2	FAM-ACCTGAAAAACAACCATTTGGCCAGGT-BHQ1	
CYP2C9 (rs9332127)	F3	GCTGTTAAGGGAATTTGTAGG	142
	R3	AGGATGAAAGTGGGATCACAGG	
	P3	CY5-CCACTGTATTTGTTAAGAGATAATAGTAGTGG-BHQ2	
CYP2C9 (rs1057910)	F4	GATTGGCAGAAACCGGAG	160
	R4	CTTACCTTGGGAATGAGATAGT	
	P4	ROX-CAGGGTCCAGAGATACCTTGACCTTCTCCCTGA-BHQ2	

注: 下划线标记位置为基因多态性所在位置。

PCR 和熔解曲线分析均在 Bio-Rad CFX96 实时 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国) 上进行。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 65~56 °C (每个循环下降 1 °C) 退火 15 s, 76 °C 延伸 20 s, 10 个循环; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 76 °C 延伸 20 s, 50 个循环, 在 55 °C 退火阶段采集相应检测通道的荧光信号。PCR 反应结束后, 进行熔解曲线分析, 程序为: 95 °C 变性 1 min, 35 °C 保温 5 min, 随后按 0.5 °C/5 s 的升温速率从 40 °C 递增至 85 °C, 且在此阶段采集探针所对应通道 FAM、HEX、ROX、CY5 的荧光信号。实验结束后, 采用 Bio-Rad CFX96 实时 PCR 仪配套的软件 Bio-Rad CFX Manager 3.0 进行结果分析。

1.5 MMCA 体系的评价

利用各多态性位点不同基因型的质粒标准品, 由两个操作员分别在两个不同的实验室连续 5 次实验, 每次实验对每个样品做三个重复, 以对 MMCA 体系的重复性和再现性进行评价。每次实验均统计每个多态性野生型和突变型的 *T_m* 和野生型与突变型的 *T_m* 差异 (ΔT_m)。

为了考察 MMCA 体系的检测灵敏度, 将建立好的 MMCA 体系检测 10 倍梯度稀释的已知基因型的人基因组 DNA 模板 (rs9923231: AA; rs2108622: GG; rs1057910: AA; rs9332127: GG), 每个梯度加入的基因组 DNA 模板量依次为 50 ng, 5 ng, 500 ng, 50 pg, 5 pg。根据 10 pg 人基因组 DNA 相当于 3 拷贝, 可以将体系中存在的初始模板量转换成基因组 DNA 的拷贝数。为了进一步验证试剂盒的检测灵敏度, 我们在梯度稀释实验的基础上, 对初步定出的人类基因组 DNA 检测限浓度样本进行 20 管平行检测实验。

1.6 随机人群样本检测及验证

用所建立的 MMCA 体系分批次对 218 份未知人基因组 DNA 的进行 4 个基因多态性位点的检测和基因分型, 每次实验均以一份质粒标准品 (基因型为 rs9923231: AA; rs2108622: GG; rs1057910:

AA; rs9332127: GG, 由各多态性位点相应的质粒等比例混合得到) 为阳性对照, 以无菌水替代 DNA 模板为阴性对照。检测完成后由软件 Bio-Rad CFX Manager 3.0 自动获取各通道熔点, 判读样本各位点基因型, 并对结果进行统计分析。同时根据基因分型结果选择各位点不同基因型共 40 份样本经 PCR 扩增后, 产物送上海生物工程有限公司测序, 以验证 MMCA 体系检测结果的准确性和特异性。

1.7 统计学分析

用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理, 用 χ^2 检验判断所检测的 rs1057910、rs9332127、rs9923231 和 rs2108622 多态性位点的等位基因频率和基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 MMCA 体系的设计及基因分型结果

华法林相关基因多态性检测 MMCA 体系设计如图 1 所示, 整个 MMCA 体系是一个单管四重四色 PCR 体系, 针对 4 个待检测的基因多态性位点分别设计 1 对引物和 1 条覆盖基因多态性位点的自淬灭荧光探针, 其中每个多态性位点的检测荧光探针均标记成不同荧光基团, 分别对应实时 PCR 仪器不同检测通道, 即 FAM、HEX、ROX、CY5。MMCA 体系检测流程包括三个步骤(图 1): 首先将各位点的引物和探针均加入 PCR 反应管后, 进行不对称 PCR 扩增; PCR 扩增后产生大量可与相应荧光探针互补的单链产物, 随后进行低温到高温的熔解曲线分析, 采集各通道整个熔解曲线分析时荧光强度; 最后, 利用实时 PCR 仪配套的软件进行结果分析, 获取各熔解曲线的熔解峰, 根据熔解峰(T_m)的个数及 T_m 值的高低判断各多态性位点的基因型。

利用不同基因型的质粒 DNA 标准品, 建立了 4 个基因多态性位点的标准熔解曲线。如图 1 所示, 当模板为野生型时(图中黑色曲线), 各基因多态性位点均只有野生型的熔解峰; 当模板为杂合突变型时, 各基因多态性位点均有野生型的熔解峰和突变型熔解峰; 当模板为纯合突变型时, 各均只有突变型的熔解峰。因此, 利用熔解峰的个数及 T_m 值的差异, 各多态性位点均实现较好的基因分型。

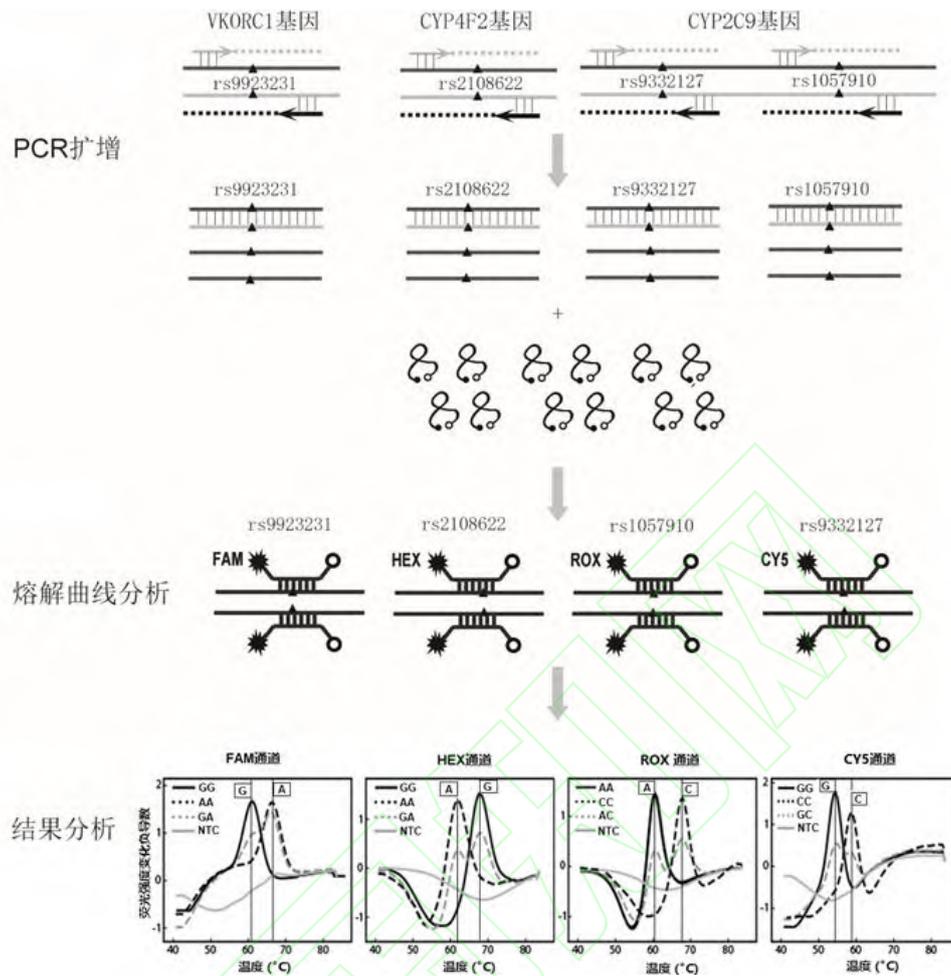


图 1 MMCA 体系设计、基因多态性检测流程及各位点典型基因分型结果

Fig.1 Design of the MMCA assay, the flowchart for the single polymorphisms detection, and the typical genotyping results with plasmid of each polymorphism

2.2 MMCA 体系的评价结果

MMCA 体系对各多态性进行区分是通过熔解峰 T_m 值的不同，四个多态性位点分别分布在四个不同的检测通道，每个通道可能有两个不同的熔解峰。为避免各熔解峰 T_m 值波动范围太大导致结果误判，我们对各熔解峰 T_m 值的重复性和再现性进行考察。考察结果表明（表 2），各熔解峰 T_m 值稳定较好，其 3 SD（标准偏差）均小于 0.9 °C，相邻的熔解峰之间没有交叉，区分度良好；各多态性不同等位基因之间的 T_m 值差异波动也很稳定， ΔT_m 均大于 3.5 °C，3 SD 均小于 0.53 °C。以上结果表明，不同操作员在不同实验室使用不同批次配置的 MMCA 体系检测多份质粒标准品均能获得稳定的检测结果，说明 MMCA 体系具有良好的重复性和再现性。

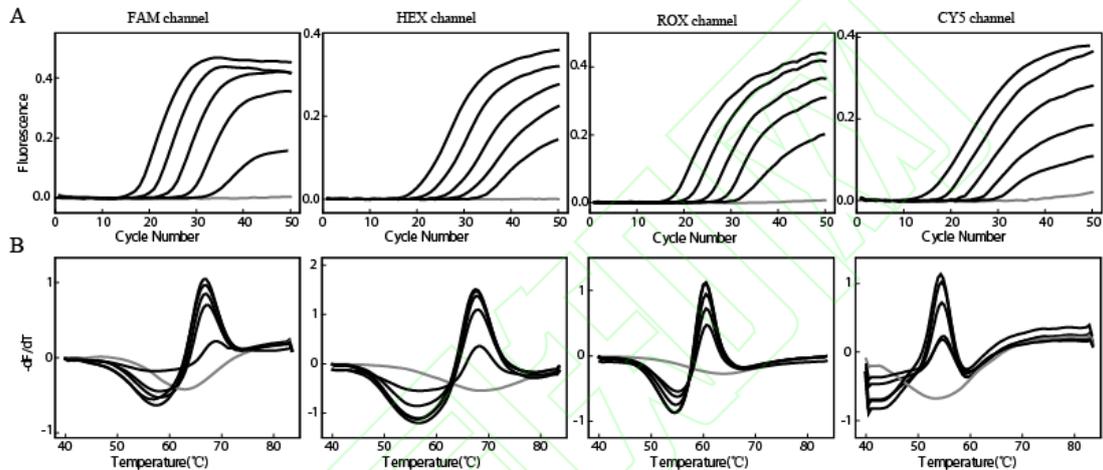
表2各基因多态性位点的野生型和突变峰的 T_m 值波动范围

Tab.2 The T_m values of wild-type and mutant melting peak of each gene polymorphism

多态性位点	等位基因	$T_m \pm 3\text{SDs} / ^\circ\text{C}$	$\Delta T_m \pm 3\text{SDs} / ^\circ\text{C}$
rs2108622	G	67.55±0.53	-
	A	61.47±0.58	6.01±0.53
rs9923231	G	60.70±0.84	-
	A	65.73±0.75	-5.03±0.38
rs9332127	G	54.08±0.54	-
	C	58.06±0.48	-3.98±0.27
rs1057910	A	60.05±0.45	-
	C	67.03±0.37	-6.98±0.27

注：表中所显示的 T_m 为平均值； ΔT_m 由 T_m (野生) - T_m (突变) 得到。

由于人类基因组 DNA 来源（如血液、唾液、头发等）的不同可能造成基因组 DNA 提取的量及浓度的不同，而 MMCA 体系最终检测的对象是人类基因组 DNA 模板，故有必要对所建立的突变检测体系能够检测基因组 DNA 浓度的范围进行考察。因此，我们首先将野生型的人类基因组 DNA 模板进行 10 倍梯度稀释，用于体系灵敏度的考察。图 2 的结果表明，MMCA 体系可以对 50 pg~50 ng 的人基因组 DNA 模板进行检测，不论基因组 DNA 模板起始浓度的高低，熔解曲线分析均只产生同一个熔点峰，故不会对标本基因型的判断造成影响，但基因组 DNA 模板起始浓度会影响熔点峰的高度。由于在起始模板量为 5 pg 时，有个别通道的熔解峰较低，但是对 50 pg 的人基因组模板（相当于 15 拷贝的人类基因组 DNA），各通道均能稳定检测，故我们把 MMCA 体系的最低检测限初步定为 50 pg 的人基因组 DNA。随后对 50 pg 人基因组 DNA 的 20 管平行检测实验结果表明，20 管在各通道均有稳定的熔解峰，检出率为 100%，因此 MMCA 体系的最低检测限为 50 pg 的人基因组 DNA，说明该体系具有较高的检测灵敏度。



(A) 图为每个通道的扩增曲线，从左到右加入的基因组 DNA 量依次 50 ng, 5 ng, 500 pg, 50 pg 和 5 pg，灰色曲线为未加模板的阴性对照；(B) 图为每个通道熔解曲线分析结果，从上到下加入的基因组 DNA 量依次 50 ng, 5 ng, 500 pg, 50 pg 和 5 pg，灰色曲线为未加模板的阴性对照。

图 2 MMCA 体系检测灵敏度检测
Fig.2 Detection sensitivity of the MMCA assay

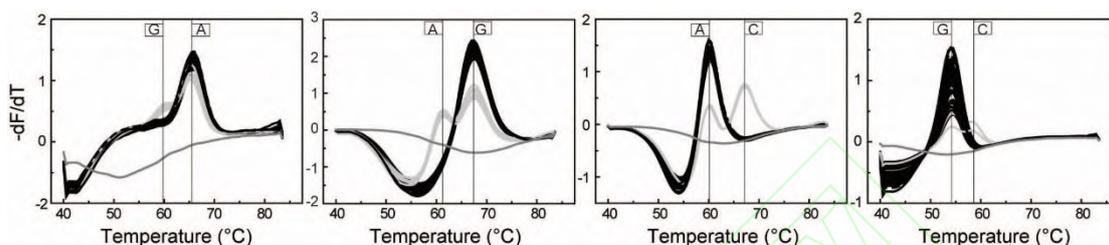
2.3 随机人群样本检测结果

MMCA 体系对 218 份人基因组 DNA 的 *CYP4F2*、*VKORC1* 和 *CYP2C9* 的四个多态性位点进行基因分型，各位点基因型参考表 2 进行判读，基因分型结果见表 3，典型结果见图 3。在 218 例样本中检测到 *CYP4F2* rs2108622 位点的基因型 GG, GA 和 AA 分别为 124, 82 和 12 例，各占 56.9%, 37.6% 和 5.5%；检测到 *VKORC1* rs9923231 位点的基因型 GA 和 AA 分别为 34 和 184 例，各占 15.6% 和 84.4%，未检测到野生型纯合子 GG 基因型；检测到 *CYP2C9* rs9332127 位点的基因型 GG, GC 和 CC 分别为 204, 12 和 2 例，各占 93.6%, 5.5% 和 0.9%；检测到 *CYP2C9* 位点的 rs1057910 基因型 GG, GC 和 CC 分别为 203, 14 和 1 例，各占 93.1%, 6.4% 和 0.5%。抽取其中 40 份不同基因型样本测序结果与 MMCA 体系基因分型结果完全一致，说明 MMCA 体系具有很强的特异性和准确性。

表3 218例样本的基因分型结果及各SNP位点的频率统计表

Tab.3 Genotyping results of 218 samples and the frequency of each SNP detected in this study

多态性位点	基因型频率			等位基因频率	
	GG	GA	AA	G	A
rs2108622	124 (56.9)	82 (37.6)	12 (5.5)	75.7	24.3
rs9923231	0	34 (15.6)	184 (84.4)	7.8	92.2
rs9332127	204 (93.6)	12 (5.5)	2 (0.9)	96.3	3.7
rs1057910	203 (93.1)	14 (6.4)	1 (0.5)	96.3	3.7



图中黑色虚线为质粒标准品阳性对照的熔解曲线分析结果，深灰色实线为无模板阴性对照熔解曲线分析结果，黑色实线和浅灰色实线为未知样本的熔解曲线分析结果。

图3 MMCA 体系检测样本的典型结果

Fig.3 Typical melting curve results of unknown genomic DNA samples by the MMCA assay

2.4 统计学分析

经 χ^2 检验分析，所选人群 rs2108622、rs9923231、rs9332127 和 rs1057910 的等位基因频率和基因型频率分别符合 Hardy-Weinberg 平衡， χ^2 值分别为 0.008，1.139，1.077 和 1.077， $p > 0.05$ 。

3 讨论

本研究选用这三个基因中中国人群出现频率高的 SNP 位点作为检测对象，利用多色探针熔解曲线分析技术，在单个四重四色 PCR 反应中成功实现对 4 个 SNP 位点的同时检测和基因分型。对体系的性能评价结果表明，该体系有较好的重复性和重现性，不同操作人员在不同的实验室采用不同批次配置的 MMCA 体系检测已知标准品均能获得稳定的结果，各多态性位点 T_m 值的标准偏差 (SD) 均小于 0.3 °C；同时体系的分析灵敏度的考察结果表明，该体系可检测低至 50 pg 的人基因组 DNA，具有很高的检测灵敏度，可以满足对临床各种不同来源（唾液、血液、头发等）DNA 样本的检测要求；而对不同基因型质粒 DNA 标准品和 218 例随机人群基因组 DNA 的基因分型结果与部分样本的测序结果完全一致，说明基于 MMCA 体系具有良好的特异性和准确性。

通过对 218 份厦门市随机人群基因组 DNA 的 4 个 SNP 位点的基因分型，我们考察了华法林个体化用药相关基因的 4 个 SNP 位点在厦门地区的发生频率。如表 3 所示，*CYP4F2**3 (c.1297G>A; rs2108622)等位基因 G 和 A 的频率分别为 75.7%和 24.3%，其中 A 等位基因携带者需要提高华法林用药剂量；*VKORC1* c.-1639G>A (rs9923231) 等位基因 G 和 A 的频率分别为 92.2%和 7.8%，其中 A 等位基因携带者需要减少华法林用药剂量；*CYP2C9**3 (c.1075A>C; rs1057910) 等位基因 A 和 C 的频率分别为 96.3%和 3.7%，其中 C 等位基因携带者需要减少华法林用药剂量；*CYP2C9 IVS3-65G>C* (rs9332127) 等位基因 G 和 C 的频率分别为 96.3%和 3.7%，其中 C 等位基因携带者需要减少华法林用药剂量。上述 4 个 SNP 位点在厦门地区的发生频率均符合既往中国汉族人群的研究结果^[23-24]。因此，*CYP2C9**3、*CYP2C9 IVS3-65G>C*、*VKORC1* c.-1639G>A 和 *CYP4F2**3 基因多态性在中国人群具有一定的发生率，是影响中国人群华法林个体剂量差异的主要因素，在用药前进行这些基因多态性检测，结合患者身高、体重等临床信息，有助于为患者作出合理的华法林剂量，缩短调整时间，降低严重不良反应的发生率。

目前国内外常用的检测华法林个体化用药相关 SNP 的方法可分为需要 PCR 后处理的方法（如

PCR-RFLP、基因芯片、等位基因特异性 PCR、变性高效液相色谱法、焦磷酸测序、Sanger 测序等)和无需 PCR 后处理的基于实时 PCR 的方法(如 LNA-taqman 探针实时荧光 PCR、高分辨熔解曲线分析)两种。其中前者在 PCR 后需要多步骤操作,容易造成 PCR 产物污染,耗时长,检测通量低,造成临床适用性差;后者不用 PCR 后处理,简便、快速,但单管能同时检测的位点有限,在一定程度上也限制了技术在临床上的应用。本研究基于多色探针熔解曲线分析技术开发的检测体系可在一个常规四重四色个 PCR 反应中同时实现 4 个 SNPs 位点的基因分型,整个过程扩增和检测在封闭的管中进行,无任何 PCR 后处理,在 2.5 h 内即可完成检测,操作简便,检测通量高,在一台 96 孔的实时 PCR 仪可实现对 96 个样本的同时检测。因此,本研究所建立的 MMCA 体系与目前方法相比具有多方面的优势。

4 结 论

本研究所建立的 MMCA 体系具有简便、快速、无需 PCR 后开盖处理、检测通量高等优点,在进行更深入的临床性能评价后,有望用于华法林个体化用药相关基因 *CYP2C9*、*VKORC1* 和 *CYP4F2* 多态性的临床分子诊断。

参考文献:

- [1] GU Q A, KONG Y, SCHNEEDE J, et al. *VKORC1*-1639G > A, *CYP2C9*, *EPHX1691A* > G genotype, body weight, and age are important predictors for warfarin maintenance doses in patients with mechanical heart valve prostheses in southwest China[J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2010, 66(12): 1217-1227.
- [2] JOHNSON J A, CAUDLE K E, GONG L, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for pharmacogenetics-guided warfarin dosing: 2017 Update[J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2017, 102(3): 397-404.
- [3] CAVALLARI L H, LIMDI N A. Warfarin pharmacogenomics[J]. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2009, 11(3): 243-251.
- [4] ZHONG S L, LIU Y, YU X Y, et al. The influence of genetic polymorphisms and interacting drugs on initial response to warfarin in Chinese patients with heart valve replacement[J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2011, 67(6): 581-590.
- [5] CHERN H D, UENG T H, FU Y P, et al. *CYP2C9* polymorphism and warfarin sensitivity in Taiwan Chinese[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 367(1-2): 108-113.
- [6] LIMDI N A, WADELIUS M, CAVALLARI L, et al. Warfarin pharmacogenetics: a single *VKORC1* polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups[J]. *Blood*, 2010, 115(18): 3827-3834.
- [7] YUAN H Y, CHEN J J, LEE M T, et al. A novel functional *VKORC1* promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity[J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(13): 1745-1751.
- [8] RIEDER M J, REINER A P, GAGE B F, et al. Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose[J]. *New England Journal of Medicine*, 2005, 352(22): 2285-2293.
- [9] CALDWELL M D, AWAD T, JOHNSON J A, et al. *CYP4F2* genetic variant alters required warfarin dose[J]. *Blood*, 2008, 111(8): 4106-4112.
- [10] ZHANG J E, JORGENSEN A L, ALFIREVIC A, et al. Effects of *CYP4F2* genetic polymorphisms and haplotypes on clinical outcomes in patients initiated on warfarin therapy[J]. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2009, 19(10): 781-789.
- [11] LIANG R J, WANG C L, ZHAO H, et al. Influence of *CYP4F2* genotype on warfarin dose requirement—a systematic review and meta-analysis[J]. *Thrombosis Research*, 2012, 130(1): 38-44.
- [12] 陈晓英, 彭齐, 何蕾. *CYP2C9*、*VKORC1* 基因多态性及患者临床特征对心脏瓣膜置换术后华法林稳态剂量的影响[J]. *解放军医药杂志*, 2014, 26(12): 24-27.
- [13] 曹红, 王建华, 王捷, 等. *CYP2C9* 和 *VKORC1* 基因多态性对新疆少数民族患者华法林初始抗凝效果的影响[J]. *中国药房*, 2013(32): 3005-3007.
- [14] ZHU J, ZHANG W J, LI Y Y, et al. ARMS test for diagnosis of *CYP2C9* and *VKORC1* mutation in patients with pulmonary embolism in Han Chinese[J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 11(1): 113-119.
- [15] HUANG S W, CHEN H S, WANG X Q, et al. Validation of *VKORC1* and *CYP2C9* genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients[J]. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2009, 19(3): 226-234.
- [16] 尹栩芳, 蒋卫霞, 饶品彬. LNA-taqman 探针实时荧光 PCR 快速检测 *CYP4F2*-C1347T, *CYP2C9**3, *VKORC1*-C1173T 与 *VKORC1*-G1639A 基因多态性方法的建立[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(6): 1-5.
- [17] CHEN C X, LI S Y, LU X J, et al. High resolution melting method to detect single nucleotide polymorphism of *VKORC1* and *CYP2C9*[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2014, 7(5): 2558-2564.
- [18] KING C R, PORCHE-SORBET R M, GAGE B F, et al. Performance of commercial platforms for rapid genotyping of polymorphisms affecting warfarin dose[J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 2008, 129(6): 876-883.
- [19] HUANG Q Y, LIU Z Z, LIAO Y Q, et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19206.
- [20] XIONG F, HUANG Q Y, CHEN X Y, et al. A Melting curve analysis-based PCR assay for one-step genotyping of beta-thalassemia mutations a multicenter validation[J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2011, 13(4): 427-435.
- [21] HUANG Q Y, WANG X D, TANG N, et al. Rapid detection of non-deletional mutations causing alpha-thalassemia by multicolor melting curve analysis[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2016, 54(3): 397-402.
- [22] XIA Z M, CHEN P, TANG N, et al. Rapid detection of *G6PD* mutations by multicolor melting curve analysis[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2016, 119(1-2): 168-173.
- [23] WANG T L, LI H L, TJONG W Y, et al. Genetic factors contribute to patient-specific warfarin dose for Han Chinese[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2008, 396(1-2): 76-79.