

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检验科, 福建 厦门 361003)

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 (SNPs) 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分析 (MMCA) 技术, 建立可同时检测 4 个华法林敏感性基因多态性位点的单管 PCR 反应体系, 可在 2.5 h 内完成检测, 每个反应能检测低至 0.05 ng 的人基因组 DNA. 对 218 份厦门市随机人群的 4 类 SNPs 进行筛查及其中 40 份样本测序的结果表明, MMCA 体系准确性高, 厦门市人群的 4 类 SNPs 发生频率与此前报道的中国汉族人群的相近, 其中 rs1057910 的等位基因 A 和 C 的频率分别为 96.4% 和 3.6%, rs9332127 的等位基因 G 和 C 的频率分别为 96.4% 和 3.6%, rs9923231 的等位基因 G 和 A 的频率分别为 7.8% 和 92.2%, rs2108622 的等位基因 G 和 A 的频率分别为 75.7% 和 24.3%. 上述基于 MMCA 技术的 SNP 分型体系具有快速、简便、准确、低成本等优点, 适合在临床上推广用于指导华法林用药剂量.

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

文章编号: 0438-0479(2019)06-0825-08

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. 由于疗效确切且价格低廉, 华法林是目前临床上应用最广泛的口服抗凝药, 主要用于预防和治疗静脉血栓、心肌梗塞、缺血性休克、肺栓塞等多种血栓性疾病, 以及用于心脏人工瓣膜置换术、人工血管移植术等. 华法林的治疗窗口较窄 (剂量不足有血栓风险, 过量服用会出现致命性出血), 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) 且受药物或食物影响较大, 其剂量需求同时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 个基因上的多态性位点^[1].

2017 年临床药物基因组学实施联盟 (CPIC) 发布的遗传药理学指导华法林使用剂量指南^[2]中, 推荐了目前科学证据最强的 3 个基因用于指导华法林剂量, 即 *CYP2C9*、*VKORC1* 和 *CYP4F2*. *CYP2C9* 基因编码华法林在体内代谢的关键酶, 该酶可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 *CYP2C9* * 3 (c. 1075A>C, rs1057910)^[2-4]、*CYP2C9* IVS3-65G>C (rs9332127)^[5] 等, 会导致编码的 *CYP2C9* 蛋白活性降低, 从而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* 基因编码维生素 K 环氧化物还原酶复合体 (VKORC) 的一个亚基, 其基因多态性也会导致 VKORC 的酶活性改变, 从而影响华法林的抗凝效果. 其中, *VKORC1* c. -1639G>A (rs9923231) 可导致基因

收稿日期: 2019-05-10 录用日期: 2019-07-10

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

* 通信作者: 18860089899@139.com

引文格式: 黄秋英, 夏众敏, 洪国舜, 等. 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[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2019, 58(6): 825-832.

Citation: HUANG Q Y, XIA Z M, HONG G L, et al. Rapid detection of gene polymorphisms affecting warfarin personalized medicine based on multicolor melting curve analysis[J]. J Xiamen Univ Nat Sci, 2019, 58(6): 825-832. (in Chinese)



启动子活性差异,携带有等位基因 A 的患者相比 GG 纯合子患者需要的华法林剂量更少^[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,近年来的研究发现 CYP4F2 * 3 (c. 1297G>A, rs2108622) 多态性能影响 1%~2% 的华法林个体差异代谢,其中 AA 纯合子患者需要提高华法林剂量方能达到相同的抗凝效果^[9-11].

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]、高分辨溶解曲线分析(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、需要昂贵仪器、需要 PCR 后处理以及单个 PCR 反应无法同时检测多个多态性位点等缺点,大多数并不适合用于临床检测.

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,形成的双链杂交体稳定性存在差异而造成熔点的差异,以此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的检测^[20-22]. 本研究拟利用 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) 上 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

于 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,用唾液收集器(厦门致善生物科技有限公司)采集厦门地区随机人群(主要是中小学生的)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 全波长紫外-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 的终质量浓度调节为 10 ng/ μ L,直接使用或置于-20℃冰箱中保存备用.

1.2 质粒标准品构建

以 4 个多态性位点的野生型基因组 DNA 为模

板,通过直接扩增法构建野生型序列,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)并转化大肠杆菌(*Escherichia coli*),挑取阳性克隆;经双向测序鉴定正确后,提取纯化质粒 DNA 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、杂合突变型和纯合突变型)质粒 DNA,置于-20℃冰箱中保存备用.

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 的全基因序列,找到 rs1057910、rs9332127、rs9923231 和 rs2108622 多态性所在位置,针对每个多态性位点采用 Primer Premier 5.0、Oligo 6.0、T_mUtility v1.3 软件先设计 4 条自淬灭探针,再围绕探针分别设计相应的扩增引物对. 将设计好的引物和探针通过 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

经过优化和调整建立 MMCA 体系,其具体组分(终浓度)为:1×PCR 缓冲液,3 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U Taq HS (TaKaRa, 大连), F1、F2 和 F4 各 0.06 μ mol/L, R1、R2 和 R4 各 0.6 μ mol/L, 1 μ mol/L F3, 0.1 μ mol/L R3, P1 和 P4 各 0.2 μ mol/L, 0.22 μ mol/L P2, 0.12 μ mol/L P3, 5 μ L DNA 模板,用无菌水补齐至总体积 25 μ L.

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

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 2 名操作员分别在 2 个不同的实验室进行连续 5 次实

表 1 引物和探针序列
Tab. 1 Sequences of primer and probe

多态性位点	名称	序列(5'→3')	目的片段长度/bp
CYP4F2 * 3 (rs2108622)	F1	ATCCCCAAAGGTGCTCACAG	208
	R1	CCTTGGAATGGACAAAAACAG	
	P1	HEX-CAGGGCTGTGTGGCCGGACCCTG-BHQ1	
VKORC1 c. -1639G> A (rs9923231)	F2	AGAGGGAAATATCACAGACGCCAG	176
	R2	AAGTGATCCACCCACCTC	
	P2	FAM-ACCTGAAAAACAACCATTGGCCAGGT-BHQ1	
CYP2C9 IVS3-65G> C (rs9332127)	F3	GCTGTTAAGGGAATTTGTAGG	142
	R3	AGGATGAAAGTGGGATCACAGG	
	P3	CY5-CCACTGTATTTGTTAAGAGATAATAGTAGTGG-BHQ2	
CYP2C9 * 3 (rs1057910)	F4	GATTGGCAGAAACCGGAG	160
	R4	CTTACCTTGGAATGAGATAGT	
	P4	ROX-CAGGGTCCAGAGATACCTTGACCTTCTCCCTGA-BHQ2	

注:下划线标记位置为基因多态性位点.

验,每次实验中每个样品设置 3 个重复,以对 MMCA 体系的重复性和再现性进行评价. 每次实验均统计各多态性位点野生型和突变型的 T_m 值,并计算野生型与突变型的 T_m 差值(ΔT_m).

为考察 MMCA 体系的检测灵敏度,用建立好的 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),每个梯度加入的模板量依次为 50,5,0.5,0.05,0.005 ng. 根据 0.01 ng 人基因组 DNA 相当于 3 个拷贝,将体系中的初始模板量转换成人基因组的拷贝数. 为了进一步验证试剂盒的检测灵敏度,在梯度稀释实验的基础上,再对初步确定检测限浓度的人基因组 DNA 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 样品进行 4 个基因多态性位点的检测和基因分型,每次实验均以一份由各多态性位点(rs9923231: AA; rs2108622: GG; rs1057910: AA; rs9332127: GG)相应的质粒等比例混合得到的质粒标准品为阳性对照,以无菌水替代 DNA 模板为阴性对照(NTC). 检测完成后由 Bio-Rad CFX Manager 3.0 软件自动获取各通道信号,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多态性位点不同基因型的共 40 份样本进行 PCR 扩增,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,通过 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, $p<0.05$ 表示有显著差异.

2 结果与分析

2.1 MMCA 体系的设计及基因分型结果

用于华法林相关基因多态性检测的 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不同荧光基团,分别对应实时荧光定量 PCR 仪中的不同检测通道 FAM、HEX、CY5、ROX. MMCA 体系检测流程包括 3 个步骤(图 1(a)):首先将各位点的引物和探针均加入 PCR 反应管,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,采集各通道在整个熔解曲线分析过程的荧光强度(F);最后,利用实时荧光定量 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(b)所示:当模板为野生型时(黑色实线),各基因多态性位点均只有野生型熔解峰;当模板为杂合突变型时(灰色

虚线),各基因多态性位点均有野生型熔解峰和突变型熔解峰;当模板为纯合突变型时(黑色虚线),各均只有突变型熔解峰. 因此,利用熔解峰的个数及 T_m 值的差异,各多态性位点均可实现较好的基因分型。

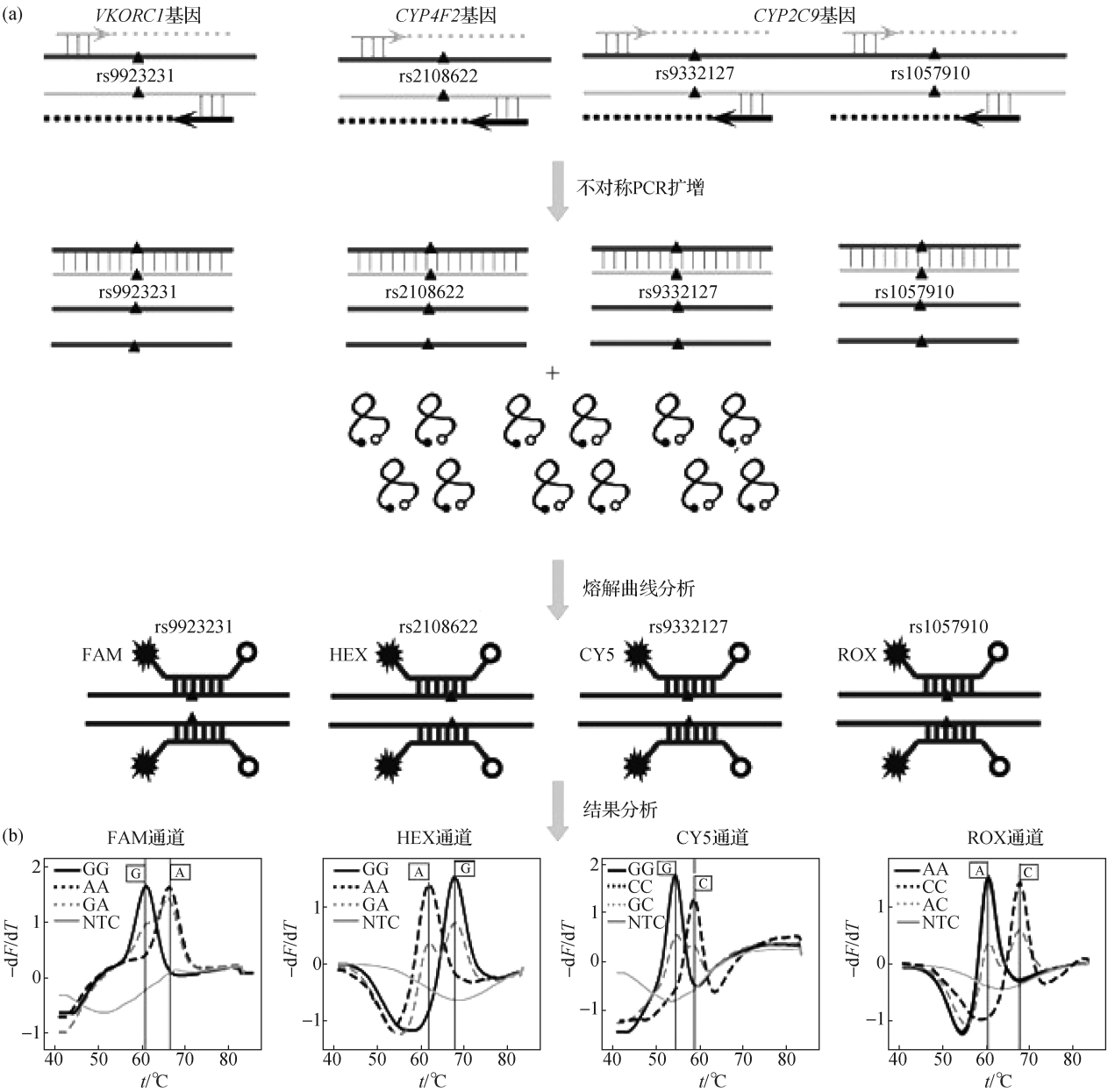


图 1 MMCA 体系的基因多态性检测流程(a)及各多态性位点的典型基因分型结果(b)
Fig. 1 Flowchart of the MMCA assay for gene polymorphism detection (a), and the typical genotyping results with plasmid of each polymorphism site (b)

2.2 MMCA 体系的评价结果

MMCA 体系对各多态性进行区分是依据熔解峰 T_m 值的不同,4 个多态性位点分别分布在 4 个不同的检测通道,每个通道可能有 2 个不同的熔解峰. 为避免各熔解峰 T_m 值的波动范围太大而导致结果误判,

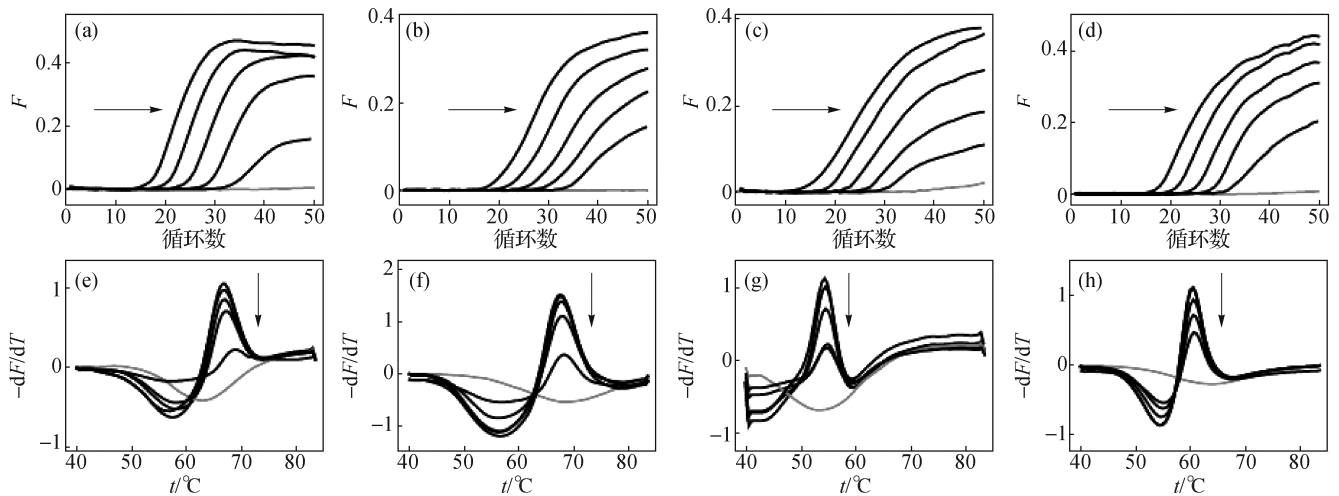
对各熔解峰 T_m 值的重复性和再现性进行考察. 结果表明(表 2):各熔解峰 T_m 值较稳定,其 3 倍标准偏差 (3SDs) 均小于 0.9 $^\circ\text{C}$,相邻的熔解峰之间没有交叠,区分度良好;各多态性位点的不同等位基因之间 T_m 值差异波动也很稳定, ΔT_m 均大于 3.5 $^\circ\text{C}$,3SDs 均小

表 2 各基因多态性位点的野生型和突变型熔解峰的 T_m 值
Tab. 2 The T_m values of wild-type and mutant melting peaks of each gene polymorphism site

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

注: T_m 为平均值; $\Delta T_m = T_m(\text{野生型}) - T_m(\text{突变型})$ 。

于 0.53℃。由以上结果可见不同操作员在不同实验室使用不同批次配制的 MMCA 体系检测多份质粒标准品时,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。



(a)~(d)分别为 FAM、HEX、CY5、ROX 通道的扩增曲线,(e)~(h)分别为对应的熔解曲线分析结果;
各图中按箭头指示方向加入的人基因组 DNA 量依次为 50,5,0.5,0.05,0.005 ng,灰色曲线为未加模板的阴性对照。

图 2 MMCA 体系的检测灵敏度
Fig. 2 Detection sensitivity of the MMCA assay

2.3 随机人群样本检测结果

利用 MMCA 体系对 218 份人基因组 DNA 样本的 *CYP4F2*、*VKORC1* 和 *CYP2C9* 的 4 个多态性位点进行基因分型,各多态性位点检测结果参考图 1(b)进行判读。如表 3 所示,在 218 份样本中检测到 *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

由于人基因组 DNA 来源(如血液、唾液、头发等)的不同可能造成基因组 DNA 的提取质量及浓度有所不同,而 MMCA 体系最终检测的对象是人基因组 DNA 模板,所以有必要对所建立体系适用的人基因组 DNA 浓度检测范围(即灵敏度)进行考察。图 2 的结果表明:MMCA 体系可对 0.05~50 ng 的人基因组 DNA 模板进行检测,不论模板起始浓度的高低,熔解曲线分析均只产生同一个熔解峰,故不会对标本基因型的判断造成影响;但模板起始浓度会影响熔解峰的高度,在起始模板量为 0.005 ng 时,有个别通道的熔解峰较低,但对于 0.05 ng 的模板(相当于 15 个拷贝的人基因组 DNA)则各通道均能稳定检测,故将此 MMCA 体系的最低检测限初定为 0.05 ng 的人基因组 DNA。

随后对 0.05 ng 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%,验证了 MMCA 体系的最低检测限为 0.05 ng 人基因组 DNA,说明该体系具有较高的检测灵敏度。

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* rs1057910 位点的基因型 AA、AC 和 CC 分别为 203, 14 和 1 例,各占 93.1%, 6.4% 和 0.5%。抽取其中 40 份不同基因型样本进行测序,结果与 MMCA 体系基因分型结果完全一致,说明 MMCA 体系具有很高的特异性和准确性。

表 3 218 例样本的基因分型结果及所检测的各基因多态性位点的频率

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

多态性位点	基因型	样本数	基因型频率/%	等位基因	等位基因频率/%
rs2108622	GG	124	56.9	G	75.7
	GA	82	37.6	A	24.3
	AA	12	5.5		
rs9923231	GG	0	0	G	7.8
	GA	34	15.6	A	92.2
	AA	184	84.4		
rs9332127	GG	204	93.6	G	96.4
	GC	12	5.5	C	3.6
	CC	2	0.9		
rs1057910	AA	203	93.1	A	96.3
	AC	14	6.4	C	3.7
	CC	1	0.5		

经 χ^2 检验分析,所选人群的 4 个多态性位点 rs2108622、rs9923231、rs9332127 和 rs1057910 的等位基因频率和基因型频率均符合 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 *VKORC1*、*CYP4F2* 和 *CYP2C9* 这 3 个基因上中国人群出现频率高的 4 个单核苷酸多态性(SNP)位点作为检测对象,利用 MMCA 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再现性,不同操作人员在不同的实验室采用不同批次配制的 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 3SDs 均小于 0.9℃;同时该体系可检测低至 0.05 ng 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 样本的基因分型结果与部分样本的测序结果完全一致,说明 MMCA 体系检测具有很高的特异性和准确性.

通过对 218 份厦门地区随机人群基因组 DNA 的 4 个 SNP 位点的基因分型,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)的等位基因 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)的等位基因 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) 的等位基因 A 和 C 的频率分别为 96.4%和 3.6%,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) 的等位基因 G 和 C 的频率分别为 96.4%和 3.6%,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已有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,这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,并结合患者的身高、体质量等临床信息,有助于为患者提供合理的华法林剂量,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 位点的方法可分为需要 PCR 后处理的方法(如 PCR-RFLP、基因芯片、等位基因特异性 PCR、DHPLC、焦磷酸测序、Sanger 测序等)和无需 PCR 后处理的基于实时荧光定量 PCR 的方法(如 LNA-taqman 探针实时荧光定量 PCR、HRM)两类.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,临床适用性差;后者不需要 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临床上的应用.本研究基于 MMCA 技术开发的检测体系可在单个常规四重四色 PCR 反应中同时实现 4 个 SNP 位点的基因分型,扩增和检测整个过程均在封闭的管中进行,且无需任何 PCR 后处理,在 2.5 h 内即可完成检测,操作简便,检测通量高,因此与目前方法相比具有多方面的优势,适合推广用于临床实验.

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*, *EPHX* 1691A>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 M, 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, 24(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 β -thalassemia mutations a multicenter validation[J]. The 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 α -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.
- [24] ZHANG J H, CHEN Z J, CHEN C M. Impact of *CYP2C9*, *VKORC1* and *CYP4F2* genetic polymorphisms on maintenance warfarin dosage in Han-Chinese patients: a systematic review and meta-analysis [J]. Meta Gene, 2016, 9: 197-209.

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

HUANG Qiuying¹, XIA Zhongmin¹, HONG Guolin^{2*}, LI Qingge¹

(1. Engineering Research Centre of Molecular Diagnostics, Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. Department of Laboratory Medicine, 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 detect the genotype of four SNPs affecting therapeutic warfarin dose using multicolor melting curve analysis (MMCA). The turnaround time of this closed-tube MMCA assay was within 2.5 h, and the limit of detection was 0.05 ng of human genomic DNA per reaction. 218 saliva samples from Xiamen were collected to evaluate the MMCA assay, and 40 samples were sequenced to further confirm the genotyping results. All of the four SNPs were accurately genotyped, and the frequency of each SNP in Xiamen was similar to the frequency in Han Chinese population reported in previous studies. The frequencies of A and C of rs1057910 were 96.3% and 3.7%, the frequencies of G and C of rs9332127 were 96.4% and 3.6%, the frequencies of G and A of rs9923231 were 7.8% and 92.2%, and the frequencies of G and A of rs2108622 were 75.7% and 24.3%. Considering its rapidity, ease of use, accuracy, and cost-effectiveness, we concluded that the MMCA assay might be recommended as a clinical diagnostic tool for genotyping SNPs affecting therapeutic warfarin dose.

Keywords: warfarin; melting curve analysis; personalized medicine; gene polymorphism