

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.20.010

## 焦磷酸测序法检测 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 基因多态性的性能验证\*

张婕妤, 封利颖, 吴燕子, 初亚男<sup>△</sup>

东部战区总医院药理科, 江苏南京 210002

**摘要:**目的 对实验室自建焦磷酸测序法检测乙醛脱氢酶 2(ALDH2) \* 2 和亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)677 基因多态性的方法进行性能评价。方法 对不同浓度(10.0、2.0、0.4、0.0 ng/ $\mu$ L)的杂合型 DNA 标本进行检测, 评价方法的检出限; 采用经焦磷酸测序法验证的 DNA 标本的 PCR 产物各 20 例, 与 Sanger 测序法进行比较, 评价方法的准确度; 对 3 种(野生、杂合和突变型)基因型标本重复检测 4 次, 评价方法的重复性。结果 焦磷酸测序法检测 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 多态性的检出限为 2 ng/ $\mu$ L 基因组 DNA; 焦磷酸测序法的分型结果与 Sanger 测序法一致, 准确度为 100%; 批内重复 4 次检测结果完全一致。结论 焦磷酸测序法检测 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 基因多态性稳定可靠, 满足江苏省临床检验中心的要求, 可用于临床检测。

**关键词:**性能验证; 焦磷酸测序法; 基因多态性; 乙醛脱氢酶 2 \* 2; 亚甲基四氢叶酸还原酶 677  
中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2019)20-2948-04

## Performance verification of pyrosequencing for detecting ALDH2 \* 2 and MTHFR 677 gene polymorphism\*

ZHANG Jieyu, FENG Liying, WU Yanzi, CHU Yanan<sup>△</sup>Department of Pharmacology, General Hospital of Eastern Theater  
Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

**Abstract: Objective** To evaluate performance verification of laboratory developed pyrosequencing for detecting ALDH2 \* 2 and MTHFR 677 gene polymorphism. **Methods** Different concentration of heterozygous DNA samples (10.0, 2.0, 0.4 and 0.0 ng/ $\mu$ L) were detected to evaluate the detection limit. Separated 20 PCR products genotyped by pyrosequencing were used to compare with Sanger sequencing to evaluate the accuracy. Samples with three genotypes (wild type, heterozygous type and mutant type) were detected for 4 times for evaluating precision. **Results** The detection limit of pyrosequencing detecting ALDH2 \* 2 and MTHFR 677 polymorphism was 2 ng/ $\mu$ L genomic DNA. The results of pyrosequencing were in consistent with Sanger sequencing, so the accuracy was 100%. The detection results in one run for 4 times were completely same. **Conclusion** Pyrosequencing is a stable and reliable method for detecting ALDH2 \* 2 and MTHFR 677 polymorphism, which satisfies with the needs of Jiangsu Center for Clinical Laboratory and is suitable for clinical detection.

**Key words:** performance verification; pyrosequencing; polymorphism; aldehyde dehydrogenase 2 \* 2; methylenetetrahydrofolate reductase 677

近年来药物基因组学发展迅速, 对药物代谢酶、转运体和药物作用靶点基因进行检测已经成为指导临床个体化用药、评估药物疗效和药物不良反应的重要手段。比如乙醛脱氢酶 2(ALDH2) \* 2 位点基因多态性与心绞痛患者和慢性心力衰竭患者服用硝酸甘油的疗效相关<sup>[1-2]</sup>, 亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)677 突变型会引起氟尿嘧啶对结直肠癌耐药<sup>[3]</sup>。如今检测基因多态性的方法层出不穷, 目前已有一系列个体化用药基因诊断试剂盒经过国家食品药品监督管理局批准。对于实验室自建检测方法, 在引入

常规临床使用前必须通过性能评定。根据 2015 年国家卫生和计划生育委员会个体化医学检测技术专家委员会等组织修订的《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)》和江苏省临床检验中心的要求, 定性检测的性能指标包括准确度、重复性/精密度和检出限等。虽然目前检测 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 基因多态性的方法很多, 但少有焦磷酸测序法检测 2 个位点的性能验证报道。本文以 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 基因多态性为例, 对实验室自建检测焦磷酸测序法进行性能验证, 已通过江苏省临床检验中

\* 基金项目: 江苏省青年基金项目(BK20180292)。

作者简介: 张婕妤, 女, 药师, 主要从事分子生物学研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: cyncpu@163.com。

心对基因扩增检验实验室的方法学要求。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2017 年 12 月至 2018 年 6 月于东部战区总医院(原南京军区南京总医院)体检人员 40 例作为研究对象,男 22 例,女 18 例,收集 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝静脉全血标本,要求所选标本尽可能涵盖所有基因型。

**1.2 仪器与试剂** 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 公司)。Wizard<sup>®</sup> 基因组 DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司);PCR 扩增体系试剂盒(日本 Takara 公司);焦磷酸测序试剂盒、变性缓冲液和结合缓冲液(德国 QIAGEN 公司);Streptavidin Sepharose<sup>™</sup> High Performance(美国 GE Healthcare Life Sciences 公司);其他试剂均为分析纯(国药集团);实验用水为灭菌蒸馏水。所有引物由上海 Invitrogen 公司合成,具体引物名称及序列见表 1。

表 1 检测 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 位点基因多态性的引物序列

位点	引物	引物序列
ALDH2 * 2	上游引物	5'-Biotin-CCT TTG GTG GCT ACA AGA TGT CG-3'
	下游引物	5'- CCC CCA ACA GAC CCC AAT C-3'
	测序引物	5'- CAC ACT CAC AGT TTT CAC TT-3'
MTHFR 677	上游引物	5'-Biotin-GAC TGT CAT CCC TAT TGG CAG GTT-3'
	下游引物	5'- AAA GCT GCG TGA TGA AAT CG -3'
	测序引物	5'-AAA GCT GCG TGA TGA TGA AAT CG -3'

### 1.3 方法

**1.3.1 基因组 DNA 提取** 按基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取血液标本中的 DNA。采用微量紫外分光光度计进行 DNA 质量评估和浓度测定,合格(浓度 ≥ 10 ng/μL, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.8~2.0)的标本存放于 -20 °C 待测。

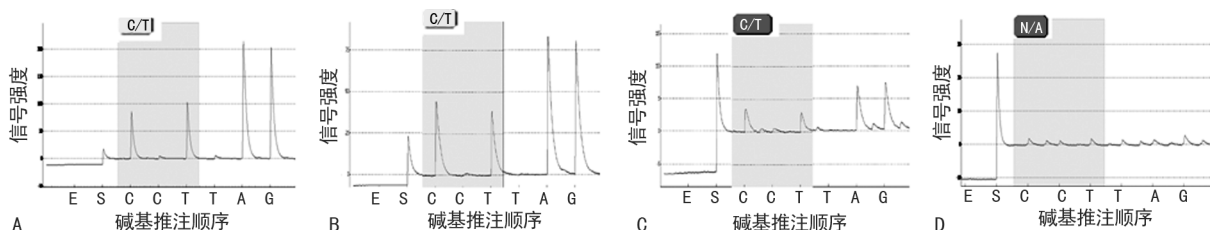
**1.3.2 PCR 扩增** PCR 反应体系体积为 50 μL,包括 dNTP 200 μmol/L,10×PCR Buffer 5 μL,MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L,Taq 酶 1.25 U,上下游引物 0.4 μmol/L,基因组 DNA 2.5 μL。PCR 反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,扩增 35 个循环;72 °C 7 min。

**1.3.3 焦磷酸测序法** 取 20 μL PCR 扩增产物与 2 μL Sepharose,18 μL 蒸馏水、40 μL 结合缓冲液混合,振荡孵育 5 min,采用单链制备模块制备测序需要的单链,加入 1 μL 10 μmol/L 的测序引物和 24 μL 退火缓冲液至 24 孔板中,80 °C 解链 1 min,室温退火,放入焦磷酸测序仪中。ALDH2 \* 2 位点推注顺序为

“CCT TAG”,其中第 1 个“C”为野生型信号峰,第 2 个“C”为 C 碱基的测序本底,第 1 个“T”为突变型信号峰,第 2 个“T”为 T 碱基的测序本底。MTHFR 677 位点推注顺序为“AAG GCT”,其中第 1 个“A”为野生型信号峰,第 2 个“A”为 A 碱基的测序本底,第 1 个“G”为突变型信号峰,第 2 个“G”为 G 碱基的测序本底。根据仪器分析结果判断型别。

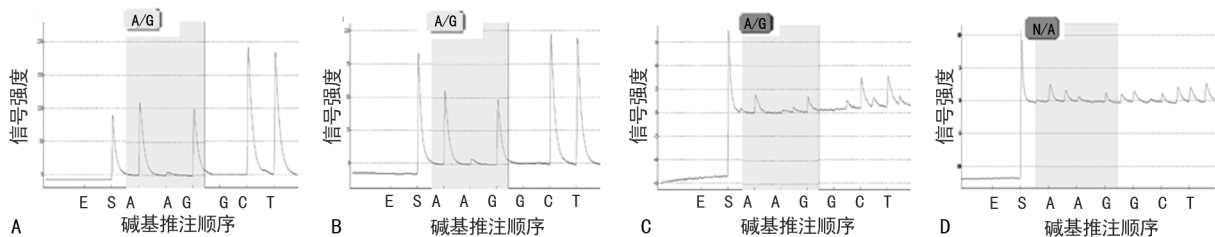
### 2 结果

**2.1 检出限** 考虑到杂合型标本碱基信号只有野生型或突变型标本碱基信号的一半,因此选取 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 位点的杂合型基因组 DNA 各 1 例来验证检出限。DNA 浓度 50~100 ng/μL, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 1.8~2.0,用提取血液基因组 DNA 的溶解液梯度稀释成 10.0、2.0、0.4 ng/μL,采用 DNA 溶解液作为空白对照,每种浓度梯度重复 3 次,结果见图 1 和图 2,焦磷酸测序仪可自动判读低至 2 ng/μL 的基因组 DNA,因此该方法的检出限低至 2 ng/μL。



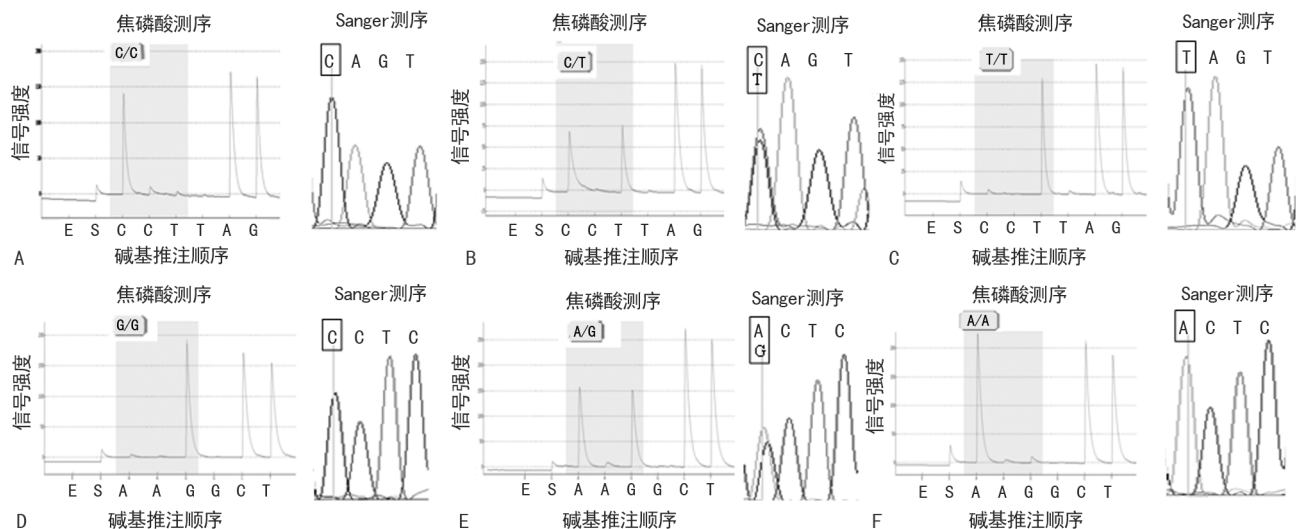
注:A 为 10.0 ng/μL 基因组 DNA;B 为 2.0 ng/μL 基因组 DNA;C 为 0.4 ng/μL 基因组 DNA;D 为空白对照

图 1 不同浓度 \* 1 \* 2 型 ALDH2 \* 2 基因组 DNA 检测结果



注:A 为 10.0 ng/μL 基因组 DNA;B 为 2.0 ng/μL 基因组 DNA;C 为 0.4 ng/μL 基因组 DNA;D 为空白对照

图 2 不同浓度 CT 型 MTHFR 677 基因组 DNA 检测结果



注:A 为 ALDH2 \* 1 \* 1 型;B 为 ALDH2 \* 1 \* 2 型;C 为 ALDH2 \* 2 \* 2 型;D 为 MTHFR 677 CC 型;E 为 MTHFR 677 CT 型;F 为 MTHFR 677 TT 型

图 3 不同基因型焦磷酸测序法和 Sanger 测序法结果

**2.2 准确度** 为了验证焦磷酸测序法检测 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 位点基因多态性的准确度,随机选取各 20 例 DNA 标本进行焦磷酸测序法检测,将 PCR 产物送至华大基因进行 Sanger 测序验证,比较两种方法的检测结果,见图 3、表 2、表 3。分别检测出 4 例 ALDH2 \* 1 \* 1 型,10 例 ALDH2 \* 1 \* 2 型;6 例 ALDH2 \* 2 \* 2 型;3 例 MTHFR 677 CC 型,11 例 MTHFR 677 CT 型,6 例 MTHFR 677 TT 型,两种检测方法结果完全一致,因此,焦磷酸测序法的准确度为 100%。

表 2 焦磷酸测序法和 Sanger 测序法检测 ALDH2 \* 2 基因型结果比较 (n)

焦磷酸测序法	Sanger 测序法			合计
	* 1 * 1 型	* 1 * 2 型	* 2 * 2 型	
* 1 * 1 型	4	0	0	4
* 1 * 2 型	0	10	0	10
* 2 * 2 型	0	0	6	6
合计	4	10	6	20

**2.3 重复性** 选取 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 位点的 3 种型别的基因组 DNA 各 1 例,批内重复检测 4 次,检测结果 100% 一致。

表 3 焦磷酸测序法和 Sanger 测序法检测 MTHFR 677 基因型结果比较 (n)

焦磷酸测序法	Sanger 测序法		
	CC 型	CT 型	TT 型
CC 型	3	0	0
CT 型	0	11	0
TT 型	0	0	6
合计	3	11	6

### 3 讨 论

近年来,药物基因组学成为研究热点,它通过影响药代动力学(吸收、分布、代谢和消除)或药效学(比如改变药物的作用靶点功能或影响代谢通路从而改变药物的敏感度)而影响药物的疗效或不良反应<sup>[4]</sup>,从而成为指导个体化药物治疗,评估药物严重不良反应,指导新药研发的工具<sup>[5]</sup>。有研究表明,对于慢性心力衰竭患者,ALDH2 \* 2 位点多态性与神经肽降钙素基因相关肽对硝酸甘油的疗效密切相关<sup>[2]</sup>。此外,虽然机制尚不明确,ALDH2 \* 2 突变者与易受压力影响及多种疾病有关,但可为新药研发和临床预防提供思路<sup>[6]</sup>。MTHFR 677 突变型会引起氟尿嘧啶对结

直肠癌耐药<sup>[3]</sup>,携带 MTHFR 677 野生型患儿相比突变型患儿在接受大剂量氨甲蝶呤后可能更易发生肝损害等较严重的毒副反应<sup>[7]</sup>。因此,对 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 基因多态性的分型检测,能指导临床为患者选择合适的药物或剂量。

药物基因组学在临床应用的道路上越来越规范,根据原国家卫生和计划生育委员会的《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)》《肿瘤个体化治疗检测技术指南(试行)》和江苏省临床基因扩增检验实验室的要求,为保证检测质量,自制试剂或自建方法都应在投入临床使用前进行严格的性能验证和方法学评价。基因分型属于定性检测,再结合参照美国临床实验室标准化协会制定的 EP12-A2 指南<sup>[8]</sup>,定性检测最基本性能验证指标包括检出限、准确度和重复性/精密度 3 个方面。检出限是指可被检测体系检出的最低检测浓度,又称最小检测浓度或检测底线。准确度有两种评价方法,一种是使用待评估的项目对已知标准的标准物质进行分析,将检测结果与已知标准值进行比较;另一种是同时用待评估项目与标准方法(或参考方法)对同一批次样品进行分析,然后将不同方法得到的结果进行对比分析。重复性指在相同测量程序、相同操作者、相同测量系统、相同地点,在短时间段内对 1 份阳性或阴性标本在多次检测中能得到可重复的阳性或阴性结果。

目前检测 ALDH2 \* 2<sup>[9-10]</sup> 和 MTHFR 677 基因多态性<sup>[11-13]</sup>的方法多种多样,但少有焦磷酸测序法检测 2 个位点的性能验证报道。因此,本研究根据上述指南要求设计了 3 个方面的性能验证。本研究建立的焦磷酸测序法检测 ALDH2 \* 2 和 MTHFR 677 多态性的最低检出限为 2 ng/ $\mu$ L 基因组 DNA;采用 Sanger 测序法作为参考方法,两种方法结果一致,准确度为 100%;批内重复 4 次检测结果完全一致。由此证明焦磷酸测序法性能验证符合检测要求,在方法学上稳定可靠,为临床应用提供了可靠保证。

## 参考文献

[1] MIZUNO Y, MORITA S, HARADA E, et al. Alcohol flushing and positive ethanol patch test in patients with coronary spastic angina: possible role of aldehyde dehydrogenase 2 polymorphisms [J]. Intern Med, 2013, 52(23):2593-2598.

[2] PENG L M, CHEN X P, SUN J, et al. Influence of ALDH2 Glu504Lys polymorphism on nitroglycerin response

in chronic heart failure and involvement of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2012, 50(10):701-711.

- [3] NAGHIBALHOSSAINI F, SHEFAGHAT M, MANSOURI A, et al. The Impact of Thymidylate Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotypes on Sensitivity to 5-Fluorouracil Treatment in Colorectal Cancer Cells[J]. Acta Med Iran, 2017, 55(12):751-758.
- [4] RELLING M V, EVANS W E. Pharmacogenomics in the clinic[J]. Nature, 2015, 526(7573):343-350.
- [5] 帅志云, 梁小燕, 张玉英, 等. ISO15189 认可关于 CYP2C19 基因多态性检测性能验证评价[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(4):448-452.
- [6] MATSUMOTO A. Fundamental Properties of Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2) and the Importance of the ALDH2 Polymorphism [J]. Nihon Eiseigaku Zasshi, 2016, 71(1):55-68.
- [7] 孟琳懿, 田怀平, 王小洁, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性对儿童甲氨蝶呤化疗后毒副反应的影响[J]. 儿科学杂志, 2013, 19(2):1-4.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. User protocol for evaluation of qualitative test performance; EP12-A2 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.
- [9] MA C, YU B, ZHANG W, et al. Associations between aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rs671 genetic polymorphisms, lifestyles and hypertension risk in Chinese Han people[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):11136-11139.
- [10] YE X, WANG X, SHANG L, et al. Genetic variants of ALDH2-rs671 and CYP2E1-rs2031920 contributed to risk of hepatocellular carcinoma susceptibility in a Chinese population[J]. Cancer Manag Res, 2018, 4(10):1037-1050.
- [11] LUPU-HERRERA E, SOTO-LÓPEZ M E, LUGO-DIMAS A J, et al. Polymorphisms C677T and A1298C of MTHFR Gene: Homocysteine Levels and Prothrombotic Biomarkers in Coronary and Pulmonary Thromboembolic Disease[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2018, 6(19):1076-1079.
- [12] RAI V. Association of C677T polymorphism (rs1801133) in MTHFR gene with depression[J]. Cell Mol Biol(Noisy-le-grand), 2017, 63(6):60-67.
- [13] MAHMOUD L B, MDHAFFAR M, FRIKHA R, et al. Use of MTHFR C677T polymorphism and plasma pharmacokinetics to predict methotrexate toxicity in patients with acute lymphoblastic leukemia[J]. Adv Clin Exp Med, 2018, 27(8):1061-1068.

(收稿日期:2019-02-25 修回日期:2019-05-20)