

经验交流

细胞色素 P450 2D6 酶缺陷等位基因的分析*

陈枢青 孙红颖 赵鲁杭

P. J. WEDLUND

(浙江医科大学生物化学教研室, 杭州 310006) (College of Pharmacy, University of Kentucky, Lexington KY 40536 USA)

摘要 细胞色素 P450 2D6 (CYP2D6) 第 1 795 位胸腺嘧啶核苷缺失造成 CYP2D6 酶活性缺陷, 该等位基因被称为 CYP2D6T。对该等位基因的测定有助于准确预测 CYP2D6 表现型。利用等位基因特异扩增法的基本原理, 建立了测定 CYP2D6T 的方法。经 396 例测定, 证明比利用 PCR 扩增后再酶切的方法更为快捷、更少污染, 为该项测定应用于临床奠定基础。

关键词 细胞色素 P450 2D6 (CYP2D6), 基因分型, CYP2D6T, 等位基因特异扩增法

学科分类号 Q559, Q75

细胞色素 P450 2D6 (CYP2D6) 参与 50 多种药物代谢, 据报道其羟化活性可激活前致癌物引发肺癌和膀胱癌^[1], 因此其多态性研究在药物代谢和致癌机理研究等领域受到重视。1994 年, Evert 等^[2]发现了 CYP2D6T 等位基因。CYP2D6T 是 CYP2D6 基因第三外显子上 T1795 丢失, 导致读框位移产生终止密码, 使表达产物失活。该等位基因造成了 5% 的 CYP2D6 慢代谢者, 进行 CYP2D6T 分析对准确测定 CYP2D6 慢代谢者有着重要意义。Evert 等^[2]报道的 PCR-RFLP 法结果准确, 但步骤较繁。本研究旨在利用等位基因特异扩增法 (ASA) 基本原理, 建立更为快捷方便的基因

分型法来测定 CYP2D6T 等位基因, 从而为深入研究 CYP2D6 多态性的临床意义奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 PCR 反应管是 Perkin-Elmer 产品 (Norwalk, USA); PCR 引物 (表 1) 由 Operon Technologies Inc (Alameda, USA) 合成并经 HPLC 纯化; 琼脂糖 (Type V)、凝胶电泳加样液和溴化乙锭是 Sigma Chemical 产品 (St. Louis, USA); 1 kb DNA 分子质量标准是 Gibco 产品 (Gaithersburg, USA)。

表 1 CYP2D6T 等位基因测定时的引物

基因型		序 列	基因位置
野生型	正向	5'-GCA AGA AGT CGC TGG AGC AGT-3'	1 775~ 1 795
	反向	5'-CAG AGA CTC CTC GGT CTC TCG CT-3'	2 102~ 2 124
突变型	正向	5'-GCA AGA AGT CGC TGG AGC AGG-3'	1 775~ 1 796
	反向	5'-CAG AGA CTC CTC GGT CTC TCG CT-3'	2 102~ 2 124

1.1.2 仪器: PCR 仪 (Perkin Elmer, USA), 电泳仪 (Mupid-2) (COSMO, Japan), 紫外检测器 (FBTIV-88) 和电泳照相机 (FB-PDC-34) 是 Fisher Scientific (USA) 的产品, 高速低温离心机是 International Equipment Co. (USA) 的产品。

1.1.3 受试者: 所有受试者抽 20 ml 静脉血 (EDTA 抗凝), 用于提取 DNA 进行基因分型, 并在睡前口服 60 mg 右旋美沙芬, 收集 8 h 内全部尿液

用于表型分型。接受表型分型的受试者经体检肝、肾功能正常, 参加研究前半月内未服任何药物。

1.2 方法

1.2.1 等位基因特异扩增法: 50 μl PCR 反应体系含有 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3、50 mmol/L

* 浙江省卫生厅科研基金资助项目 (1996 年)。

收稿日期: 1997-11-10, 修回日期: 1998-02-27

KCl、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L 各 dNTP、0.2 μmol/L 各引物和 50~1 000 ng 的 DNA 模板, 1.0 单位的 Taq DNA 聚合酶. 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min 扩增 35 循环. 最后, 72℃ 延长 7 min. 1.25% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增目的产物, 扩增片段应为 350 bp.

1.2.2 基因分型结果重复性与质量控制: 取已测定结果的 DNA 样本 24 份, 这些样本中含有野生型、杂合型和突变型 CYP2D6T 等位基因, 每份样本分成二份. 然后, 随机编号得到 48 份 DNA 样本, 进行盲法测定基因分型. 将结果与原来的测定结果对比, 检测其一致性. 由于 PCR 方法灵敏度较高, 较易污染. 为减少污染, PCR 扩增和 PCR 产物检测在不同实验室进行. 同时, 在基因分型时做阳性对照和空白对照进行 PCR 质量控制. 阳性对照为已知基因型的 DNA 样本, 这些样本中含有

各种等位基因, 并将其分装, 随机编号, 测定时进行盲法试验; 空白对照不加任何样本.

1.2.3 表型分型法: 参照 Guttendorf 等^[3]的方法, 稍加修改.

2 结果与讨论

2.1 等位基因特异扩增法

等位基因特异扩增法利用 PCR 扩增中引物 3' 端碱基互配时要求最为严格的原理, 设计了等位基因特异的引物. 扩增后的结果有三种可能性: 野生型等位基因特异的引物有扩增, 说明检样含野生型等位基因; 突变型等位基因特异的引物有扩增, 说明检样含突变型等位基因; 野生型和突变型等位基因均有扩增, 说明检样是杂合子. 图 1 是 CYP2D6T 测定时的典型结果.

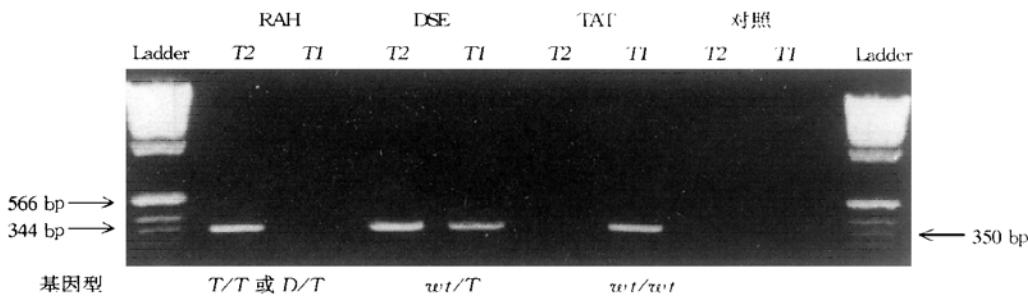


图 1 CYP2D6T 等位基因测定时的三种典型结果

T1: 野生型引物; T2: 突变型引物; wt/wt: 野生型纯合子; wt/T: CYP2D6T 杂合子; T/T: CYP2D6T 突变型纯合子; D/T: 一份基因丢失, 另一份为 CYP2D6T; RAH, DSE 和 TAT 为受试者姓名第一字母缩写.

2.2 基因分型与表型分型的一致性

本研究对 396 例受试者进行了 CYP2D6T 基因分型测定, 并把结果与其表型分型比较, 发现 CYP2D6T 突变型纯合子为慢代谢者, CYP2D6T 杂合子为快代谢者, 但 CYP2D6T 杂合子与其他酶缺陷等位基因如 CYP2D6A 和 CYP2D6B 共存的受试者, 发现亦为慢代谢者 (表 2), 说明 CYP2D6T 与 CYP2D6A 和 CYP2D6B 不连锁发生.

2.3 PCR 结果重复性与质量控制

对随机编号的已知基因型 DNA 样本进行盲法基因分型分析, 发现本实验室建立的 CYP2D6T 等位基因测定方法重复性很好, 所有测定结果与已知基因型完全一致. 空白对照实验证明, 本实验室所进行的 PCR 分析法无污染问题. 阳性对照的结果说明基因分型分析方法完全可信, 每次分析均设置

阳性对照有助于发现一些不可预料的因素对实验的影响, 从而提高结果的可信度.

表 2 CYP2D6T 基因分型与表型分型的一致性

基因型	例数	表现型
T/T	2	慢代谢
A/T	1	慢代谢
B/T	2	慢代谢
wt/T	2	快代谢
其他	389	

wt: 野生型等位基因; A: CYP2D6A 等位基因; B: CYP2D6B 等位基因 (按 Chen 等^[4]的方法测定); 其他: 未检测到 CYP2D6T 等位基因 (包括 wt/wt).

参 考 文 献

1 Agundez J A, Martinez C, Ladero J M, et al. Debrisoquine oxidation genotype and susceptibility to lung cancer. Clin Pharmacol Ther, 1994, 55 (1): 10~14

2 Evert B, Griese E U, Eichelbaum M. Cloning and sequencing of a new non-functional CYP2D6 allele: deletion of T1795 in exon 3 generates a premature stop codon. *Pharmacogenetics*, 1994, **4** (5): 271~ 274

3 Guttendorf R J, Britto M, Blouin R A, *et al.* Rapid screening for polymorphisms in dextromethorphan and mephenytoin metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, 1990, **29** (4): 373~ 375

4 Chen S, Chou W H, Blouin R A, *et al.* The cytochrome P450-2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharm Ther*, 1996, **60** (5): 522~ 534

Analysis of Cytochrome P450 2D6 Enzyme Deficient Allele CYP2D6T by Allele-Specific Amplification.
CHEN Shu-Qing, SUN Hong-Ying, ZHAO Lu-Hang (*Department of Biochemistry, Zhejiang*

Medical University, Hangzhou 310006, China);
P. J. WEDLUND (*College of Pharmacy, University of Kentucky, Lexington KY 40536 USA*).

Abstract An allele-specific amplification based PCR method was built up for the detection of CYP2D6T allele which is a 1 795 T deletion on CYP2D6 gene and results in a function deficient enzyme. This method was employed to genotype 396 subjects and proved to be simple, quick and less contamination. It has made a basis for this detection a clinical tool.

Key words cytochrome P450 2D6, genotyping, CYP2D6T, allele-specific amplification

优惠的价格 优质的服务

欢迎您在《生物化学与生物物理进展》刊登广告

《生物化学与生物物理进展》报道生物化学、分子生物学、生物物理学及神经科学等领域的国内外最新进展。设有微型述评、综述与专论、研究报告、技术与方法、研究快报等十几个栏目。内容丰富新颖，印装规范美观，在我国生物学界和基础医学界拥有大量的读者。曾于 1996 年荣获国家优秀科技期刊评比一等奖。

欢迎垂询，欢迎刊登广告。

地址：北京市朝阳区大屯路 15 号，中国科学院生物物理研究所内
邮政编码：100101
电话：(010) 64888459
E-mail: prog@sun5.ibp.ac.cn

《生物化学与生物物理进展》1999 年广告价目表

版 位	价格 (人民币元/次)
内页对封二	1200
封 四	1200
封 三	1000
第 二 页	1000
普通内页	800

注：以上价格为黑白广告价格，彩色广告需附加彩色印刷成本费。