

· 论 著 ·

应用变性高效液相色谱对 EPHX1 基因进行分型*

黄盛文¹, 黄 凌¹, 向道康², 安邦权¹, 李贵芳¹, 罗振元¹

(贵州省人民医院:1. 检验科;2. 心外科, 贵阳 550002)

摘要:目的 基于变性高效液相色谱技术,建立一种快速检测环氧化物水解酶(EPHX1)基因多态位点 rs4653436(G>A)的基因分型方法。方法 标准酚-氯仿法提取 275 例健康人外周血基因组 DNA,应用聚合酶链反应/变性高效液相色谱(PCR/DHPLC)方法检测 rs4653436(G>A)位点基因型。结果 275 例无关个体中,基因型 GG、GA 和 AA 分别有 176 例、93 例和 6 例,各占 64.0%、33.8% 和 2.2%,G 和 A 等位基因的频率分别为 80.9% 和 19.1%。结论 变性高效液相色谱技术检测 EPHX1 rs4653436 基因型简便、准确,为研究 rs4653436 多态性与华法林用量个体差异的相关性打下基础。

关键词:环氧化物水解酶;基因多态性;华法林

中图分类号:R446.61;Q781

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)07-0780-02

Detection of EPHX1 rs4653436 polymorphism by denaturing high performance liquid chromatography*

HUANG Sheng-wen¹, HUANG Ling¹, XIANG Dao-kang², et al.(1. Department of Laboratory Medicine;2. Department of Cardiac Surgery,
Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China)

Abstract: Objective To develop a genotyping assay for detection of EPHX1 rs4653436 polymorphism by using denaturing high performance liquid chromatography(DHPLC). **Methods** Genome DNA samples of 275 normal subjects were extracted by phenol-chloroform method from peripheral blood. A PCR/DHPLC genotyping assay was developed to detect the genotypes of EPHX1 rs4653436 in the subjects. **Results** Among the 275 individuals, the numbers of GG, GA and AA genotype were 176, 93 and 6, with the frequencies of 64.0%, 33.8% and 2.2%, respectively. The frequencies of G and A allele were 80.9% and 19.1%, respectively. **Conclusion** The DHPLC assay for detection of EPHX1 rs4653436 polymorphism is simple and accurate, which is helpful for the further study of the association of the EPHX1 rs4653436 polymorphism with individual warfarin dose requirement.

Key words: microsomal epoxide hydrolase; gene polymorphism; warfarin

微粒体环氧化物水解酶(microsomal epoxide hydrolase, mEH)是参与外源性化学物质体内生物转化第二时相反应的一种重要代谢酶。近年来,有研究表明 mEH 可能还是维生素 K 环氧化物还原酶复合体的亚单位,参与了体内将氧化型维生素 K 还原成还原型维生素 K 的催化作用,从而对华法林的抗凝作用产生一定的影响^[1-2]。mEH 的编码基因是 EPHX1,其 5'端侧翼区的单核苷酸多态位点 rs4653436(G>A)被认为与华法林用量个体差异有一定的相关性^[3]。为了解 rs4653436 的多态性在中国人群中的分布情况,本研究应用变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)技术对中国人的这一多态位点的基因型进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2008 年 8~12 月来本院进行健康体检的 275 人作为研究对象,其中男 125 例,女 150 例,年龄 16~87 岁。

1.2 检测方法

1.2.1 标本采集与 DNA 提取 抽取受检者外周静脉血 5 mL,予 EDTA-Na₂ 抗凝。用标准酚-氯仿法提取基因组 DNA,核酸蛋白分析仪(Eppendorf Biophotometer)检测样本 DNA 纯度和浓度后于-20℃保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 设计一对引物扩增包含 rs4653436(G>

A)位点的片段,上游引物:5'-TGT TTC CTT TTT GTT GAA TCA G-3',下游引物:5'-CTA AAA GCC ATT GAA AGG TTT AC-3',扩增片段大小为 211 bp,引物由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 扩增在 ABI 9700 PCR 仪上进行,50 μL PCR 反应体系:10×PCR 缓冲液 5 μL,2.5 mmol/L dNTP 4 μL,上、下游引物各 10 pmol,Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)2 u,基因组 DNA 100 ng。循环参数:95℃预变性 5 min;95℃、30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 25 s,共 35 个循环;72℃延伸 7 min。PCR 反应结束后,取 5 μL 扩增产物在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳,观察 PCR 产物的特异性和片段大小。

1.2.3 基因型分析 本研究基因型分析应用变性高效液相色谱技术。DHPLC 检测的上样量为 5 μL,缓冲液流速为 0.9 mL/min,柱温 56℃。待测样本的洗脱峰为双峰者,其基因型为 GA;洗脱峰为单峰者,再将其 PCR 产物与已知基因型为 GG 的 PCR 产物等体积混合,在 PCR 仪上进行变性-复性处理,即 95℃变性 5 min,然后以 1℃/min 的速度降至 45℃,再上机检测,如洗脱峰为双峰者,其基因型为 AA,如洗脱峰仍为单峰者,其基因型为 GG。随机抽取经 DHPLC 检测的 3 种基因型样本各 5 份,PCR 扩增后,用 QIAGEN QIA quick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化回收 DNA 片段。将纯化的 DNA 片段送上海英骏生物技术有限公司进行双向测序验证。

* 基金项目:贵州省科技厅基金资助项目(黔科合 J 字[2008]2296 号)

1.3 统计学方法 用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,用 χ^2 检验判断 EPHX1 rs4653436 的等位基因频率和基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2 结 果

2.1 样本基因型的判定 样本的基因型通过 DHPLC 检测判定,并通过测序证实。各基因型的峰型及测序结果见插图 1。

2.2 EPHX1 rs4653436 等位基因和基因型分布 275 例无关个体中,基因型 GG、GA 和 AA 分别有 176 例、93 例和 6 例,各占 64.0%、33.8%和 2.2%,G 和 A 等位基因的频率分别为 80.9%($n=445$)和 19.1%($n=105$)。经 χ^2 检验分析,所选随机人群 rs4653436 等位基因频率和基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2=1.404$, $P=0.495$),说明所选样本具有人群代表性。

3 讨 论

随着药物基因组学的发展,个体化用药已得到了国内外学者的广泛重视。药物基因组学涉及整个基因组中所有编码与药物代谢、体内转运、效应有关的蛋白质的基因,研究这些基因的多态性与药物反应个体差异之间的关系,为个体化用药提供理论依据^[4-5]。近年来,国内外对华法林个体化用药的研究成为药物基因组学研究的典范。华法林是预防房颤血栓栓塞的常用口服抗凝药^[6]。有研究表明维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1 基因(VKORC1)和细胞色素 P450 2C9 基因(CYP2C9)是影响华法林用量个体差异最主要的遗传因素^[7-8]。然而,这 2 个基因结合年龄、性别和体质量等非遗传因素,也只能解释华法林用量个体差异 50%左右的原因^[8-10]。目前已知与华法林的药效学和药动学相关的基因达 30 余种^[11],其中大多数基因的多态性与华法林用量个体差异的相关性尚未明确。微粒体环氧化物水解酶作为维生素 K 环氧化物的结合位点,被认为参与了华法林的作用底物,即维生素 K 环氧化物还原酶复合体的催化作用,从而对华法林用量个体差异产生一定的影响。

EPHX1 基因定位于 1q42.12,包含 9 个外显子和 8 个内含子。Wadelius 等^[3]首先报道位于 EPHX1 基因 5'端侧翼区的单核苷酸多态位点 rs4653436(G>A)与华法林用量个体差异有一定的相关性。Wang 等^[12]的研究也证实 rs4653436 位点与中国汉族人群的华法林用量个体差异有关,携带有等位基因 A 的患者,华法林用量较高。

不同种族间由于遗传背景的不同,同一个 SNP 位点的等位基因频率和基因型频率也会有所不同。本研究结果显示中国人 rs4653436 多态位点的基因型 GG、GA 和 AA 的频率为 64.0%、33.8%和 2.2%,与 Wang 等报道的中国人 GG、GA 和 AA 的频率(59.4%、36.4%和 4.2%)差异无统计学意义($P=0.632$)。同样,与欧洲人的 GG、GA 和 AA 频率(53.9%、39.0%和 7.1%)差异也无统计学意义($P=0.138$),说明中国人与欧洲人在 rs4653436 这一位点的基因型频率分布并无统计学意义。

本研究采用了近年常用的 DHPLC 技术,对中国人的 rs4653436 位点进行分型。DHPLC 的原理是在 DNA 部分变性的条件下,异源双链因有错配区的存在而更易变性,被色谱

柱保留时间短于同源双链,故先被洗脱下来,在色谱图中表现为双峰或多峰的洗脱曲线,从而将错配的异源 DNA 双链和完全匹配的同源 DNA 双链分离开来。该方法省略了繁琐的凝胶制作及电泳,不需纯化 PCR 产物,是一种自动化、高效、快速、准确的 DNA 位点变异检测技术。通过 DHPLC 技术平台,为研究 rs4653436 位点与中国人华法林用量个体差异的相关性建立了一种准确、简便的基因分型方法。

参考文献:

- [1] Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, et al. Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9[J]. Clin Pharmacol Ther, 2005, 77(5):365.
- [2] Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005, 45:311.
- [3] Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism[J]. Hum Genet, 2007, 121(1):23.
- [4] Siest G, Jeannesson E, Berrahmoune H, et al. Pharmacogenomics and drug response in cardiovascular disorders[J]. Pharmacogenomics, 2004, 36(7):779.
- [5] Richard DH, Sandra CK, Bruce HM, et al. Pharmacogenomics in endocrinology[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(6):2495.
- [6] 吴非飞, 梅霞, 罗羽慧. 华法林预防非瓣膜病房颤血栓栓塞[J]. 重庆医学, 2005, 34(3):371.
- [7] Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1-rationale and perspectives[J]. Thromb Res, 2007, 120(1):1.
- [8] Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, et al. Cytochrome P450 2C9(CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase(VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity[J]. Blood, 2005, 106(1):135.
- [9] Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen[J]. Blood, 2005, 106(7):2329.
- [10] Huang SW, Chen HS, Wang XQ, et al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients[J]. Pharmacogenet Genomics, 2009, 19(3):226.
- [11] Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges[J]. Pharmacogenomics J, 2007, 7(2):99.
- [12] Wang TL, Li HL, Tong WY, et al. Genetic factors contribute to patient-specific warfarin dose for Han Chinese[J]. Clinica Chimica Acta, 2008, 396(1):76.