·论著·

# 荧光定量 PCR 技术用于 UGT1A1 基因多态性的检测

孙利华[1]　叶建伟[2]

1 北京京煤集团总医院　北京　102300　　2 北京诺赛基因检测有限公司　北京　102600

〔**摘　要**〕**目的**　UGT1A*28 和 *6 基因多态性与伊立替康治疗癌症患者引发毒性反应及严重程度之间关系密切，采取快速有效的检测方法为临床个体化用药提供依据意义重大。本文是应用荧光定量 PCR 技术，建立 UGT1A1*28 和 *6 基因位点的 PCR 快速分型方法。**方法**　应用 PrimerExpress3.0 软件，分别设计 2 对 qPCR 探针和 2 对扩增引物，在探针的 5’端分别标记 FAM 和 VIC 报告荧光，应用 7500 荧光定量 PCR 和普通 PCR 直接 sanger 测序两种方法，分别检测 30 份血样和 10 份血滤纸片样本的 UGT1A1*28 和 *6 两个位点基因的多态性，比较两种方法结果的一致性。**结果**　30 份血样和 10 份血滤纸片样本均得到了可靠的分型结果。**讨论**　建立的荧光定量 PCR 的分型方法操作简单、结果准确，适用于 UGT1A1*28 和 *6 基因多态性的快速分型检验。

〔**关键词**〕伊立替康；基因多态性；UGT1A1；sanger 测序；荧光定量 PCR

〔**中图分类号**〕R440　　〔**文献标识码**〕A　　〔**文章编号**〕2095-7165（2018）06-001-03

抗肿瘤药伊立替康（irinotecan，CPT-11），是一种 S 期特异性的半合成可溶性喜树碱类衍生物，它通过选择性抑制 DNA 拓扑异构酶 I，干扰 DNA 复制和细胞分裂，从而发挥抗肿瘤活性。

伊立替康最主要的毒副作用为严重中性粒细胞减少症或严重胃肠道的不良反应如腹泻、恶心和呕吐等，这两者均为剂量限制性毒性反应，严重时可致命。

伊立替康为前体药物，在体内经过羧酸酯酶转化为活性代谢物 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱（SN-38），其活性较伊立替康强 100 到 1000 倍。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1（UGT1A1）负责将 SN-38 转化成无活性的 SN-38 葡萄糖醛酸苷（SN38G），从胆汁排出，从而保护健康细胞免受伊立替康毒性的影响[1]-[3]。

但是，UGT1A1 基因的启动子区具有一种多态性，其 TATA 盒区域包含 5-8 个 TA 重复序列，随着 TA 重复序列数目的增加，UGT1A1 表达下降。一般人带有 6/6 TA 重复（基因型为 (TA)6/6），少数人则是 6/7 或 7/7 个 TA 重复，7 个 TA 重复的基因型被命名为 UGT1A1*28（基因型为 (TA)7/7）；在中国人群中，上述基因型的频率分别为 77.2%、22% 和 0.8%[4]。UGT1A1*28 突变杂合型对 SN-38 的葡萄糖醛酸化活性比野生型稍低，而 UGT1A1*28 突变纯合型对 SN-38 的葡萄糖醛酸化活性仅是野生型的 UGT1A1 酶的 35%，导致 SN-38 在体内聚集，引发腹泻或中性粒细胞减少等并发症，重者甚至还可能威胁患者生命。因此，美国 FDA 要求伊立替康的标签上加入警示，建议患者在使用伊立替康前需检测患者是否带有 UGT1A1*28 突变[5]。

此外，亚洲人群还存在另一种常见的 211G>A 多态性（UGT1A1*6），其基因型频率在日本、韩国和中国等亚洲人群中的分别为 13%、23% 和 23%；该多态性也可使 UGT1A1 的葡萄糖醛酸化的能力下降 70%，多个亚洲人群的临床研究结果都证实，UGT1A1*6 突变与伊立替康的毒副作用风险增加显著相关，与 UGT1A1*28 基因型患者的毒副作用风险相近。

因此，本文建立应用荧光定量 PCR 技术实验方法进行的分型实验，为荧光定量 PCR 技术应用于 UGT1A1 基因型检测预测临床伊立替康相关的严重毒副作用奠定了基础，可快速准确的得到理想结果[6]。

## 1　材料与方法

1.1 试验材料

抽取 2012 年 4 月至 2013 年 10 月期间，在公司检测的 30 份 2ml 恶性肿瘤患者的外周血样标本和 10 份血滤纸片样本进行试验。

1.2 试验试剂与仪器

1.2.1 主要试剂耗材

dNTP：日本 TAKARA 公司

Taq DNA 聚合酶：日本 TAKARA 公司

扩增引物：北京诺赛基因组研究中心有限公司

UGT1A1*28 探针：上海英骏

UGT1A1*6 探针：上海生工

DNA Marker D2000：上海生工

螯合树脂 chelex 100：bio-rad 公司

TIANamp Blood 血液基因组提取试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司

1.2.2 主要仪器

Nano Drop 核酸检测仪：美国 ABI 公司

Veriti 梯度 PCR 仪：美国 ABI 公司

7500 荧光定量 PCR 仪：美国 ABI 公司

引物设计软件：primer premier 5

探针引物设计软件：Primer Express 3.0

1.3 探针及引物

荧光定量 PCR 方法引物及探针序列

应用 Primer Express 3.0 软件分别设计 2 对 qPCR 探针及其扩增引物。UGT1A1*28 正反向荧光定量引物及探针名称分别为 U28F、U28R、U28P1、U28P2；UGT1A1*6 正反向荧光定量引物及探针名称分别为 U6F、U6R、U6PA、U6PG，序列见表 1。

普通 PCR 方法扩增引物序列

应用 Primer Premier 5.0 软件设计普通 PCR 方法 sanger 测序引物，正反向扩增引物命名分别为 UGT1A1-F、UGT1A1-R，序列见表 2。

**表 1：荧光定量 PCR 的探针和引物序列**

| 名称 | | 序列（5’--3’） | 5’荧光基团 | 3’淬灭基团 | 合成单位 |
|---|---|---|---|---|---|
| UGT1A1*28 | U28F | AACATTAACTTGGTGTATCGATTGGT | | | 诺赛基因 |
| 引物 | U28R | AGCAGGCCCAGGACAAGT | | | 诺赛基因 |
| 探针 | U28P1 | TTGCCATATATATATATATAAGTAGGA | FAM | MGB | 上海英骏 |
| | U28P2 | TGCCATATATATATATATATAAGTAGGA | VIC | MGB | 上海英骏 |
| UGT1A1*6 | U6F | GGACATGAAATAGTTGTCC | | | 诺赛基因 |
| 引物 | U6R | TGCAGGAAAGAATCATTC | | | 诺赛基因 |
| 探针 | U6PG | TACATCAGAGACGGAGCATTTTACA | FAM | TAMRA | 上海生工 |
| | U6PA | TACATCAGAGACAGAGCATTTTACA | VIC | TAMRA | 上海生工 |

**表 2：普通 PCR 的扩增引物序列**

| 引物名称 | 序列（5’--3’） | 合成单位 |
|---|---|---|
| UGT1A1-F | TGAAAGTGAACTCCCTGCTACCT | 诺赛基因 |
| UGT1A1-R | CAGAAGATGATGCCAAAGACAGAC | 诺赛基因 |

注：UGT1A1 基因的启动子区和第一外显子区相距较近，设计了一条共用引物；

1.4 试验方法

1.4.1 DNA 提取

从 30 份血液样本中各吸取 300μl 置于 1.5mlep 管中，使用 TIANamp Blood 血液基因组提取试剂盒（DP318）提取全基因组 DNA；

10 份血滤纸片用 5% chelex-100 方法提取基因组 DNA，用打孔器从 FTA 血卡点样中心位置取 3mm$^2$ 圆形小片，置于 1.5ml EP 管中。进行 DNA 提取。

将以上两种血液样本提取 DNA 用 Nano Drop2000 测定 DNA 浓度和纯度[7]。

1.4.2 荧光定量 PCR 反应

UGT1A1*28 和 *6 基因分型采用荧光定量 PCR 进行实时荧光定量，从实时定量扩增图直接进行分型分析。反应体系为 10μl 体系，反应体系详见表 3。将配制好的反应体系振荡混匀离心，7500 荧光定量 PCR 仪上机进行实时定量曲线扩增。荧光定量 PCR 反应条件：预变性 95℃ 3min。95℃ 15s；57℃ 1m 45 个循环。用 Sequence Detection System(SDS)1.4.0.25 软件对数据进行收集和分析。

**表 3：荧光定量 PCR 反应体系**

| 成分（浓度） | 体积 ul/1 个反应 |
|---|---|
| 2*premix buffer | 5 |
| U28P1 或 U6PG（10μM） | 0.05 |
| U28P2 或 U6PA（10μM） | 0.2 |
| U28F 或 U6F（10μM） | 0.4 |
| U28R 或 U6R（10μM） | 0.4 |
| Rox dyeII | 0.2 |
| 模板（基因组 DNA） | 10ng |
| ddH2O | add to 10 |

1.4.3 普通 PCR 扩增反应

UGT1A1*28 和 *6 基因分型采用普通 PCR 方法扩增目的片段，产物直接测序分析。反应体系为 50μl 体系，反应体系详见表 4。将配制好的反应体系振荡混匀离心，Veriti 梯度 PCR 仪上机进行目的片段扩增。PCR 反应条件：扩增按 touchdown 程序进行，预变性 95℃ 5min；95℃ 30s，60℃ 30s，70℃ 30s 前 10 个循环，每个循环退火温度下降 0.5℃；95℃ 30s，55℃ 30s，70℃ 30s 30 个循环；72℃延伸 10m，4℃ ∞。反应结束后，取 PCR 产物 2ul，经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定为单一条带，产物大小符合，送至诺赛基因测序部门进行测序。测序结果用 Chromas 2.3.3.0 软件分析 UGT1A1 上游启动子序列 A(TA)nTAA 中的 TA 重复序列和第一外显子 211G>A 突变情况。

**表 4：PCR 反应体系**

| 成分（浓度） | 体积 ul/1 个反应 |
|---|---|
| 10×buffer（15mM Mg2+） | 5 |
| dNTP（10mM） | 1 |
| UGT1A1-F（10μM） | 1 |
| UGT1A1-R（10μM） | 1 |
| 5U Taq | 1 |
| 模板（基因组 DNA） | 50ng |
| ddH2O | Add to 50 |

## 2 结果

2.1 荧光定量 PCR 分型结果

2.1.1 UGTIAI*28 基因多态性结果

本方法 40 例患者中，27 例（67.5%）为野生型 TA6/6，12 例（30%）基因型为杂合突变型 TA6/7，1 例（2.5%）基因型为纯合突变型 TA7/7（图略）。

2.1.2 UGTIAI*6 基因多态性结果

本方法 40 例患者中，27 例（67.5%）为野生型 G/G，10 例（25%）基因型为杂合突变型 G/A，3 例（7.5%）基因型为纯合突变型 A/A（图略）。

2.2 普通 PCR 直接测序结果

2.2.1 UGTIAI*28 基因多态性结果

本方法 40 例患者中，27 例（67.5%）为野生型 TA6/6，12 例（30%）基因型为杂合突变型 TA6/7，1 例（2.5%）基因型为纯合突变型 TA7/7（图略）。

2.2.2 UGTIAI*6 基因多态性结果

本方法 40 例患者中，27 例（67.5%）为野生型 G/G，10 例（25%）基因型为杂合突变型 G/A，3 例（7.5%）基因型为纯合突变型 A/A（图略）。

（下转第 5 页）

**3 讨论与建议**

3.1 政府应建立完善的医学教育体制

在调查数据中大部分被调查人员对国家的继续教育政策并不了解甚至是完全不知情，可见政府对继续教育并未引起足够的重视，在鼓舞医学继续教育发展、标准医学继续教育办学上力度不够，未加大对基层卫生人员宣传继续教育的力度，未建立完善的医学继续教育体制。部分调查人员表示经济条件也限制了参加继续教育的次数，繁重的医疗任务降低了参与的积极性。

政府应加强现有政策的实施力度，增加继续教育相关的政策法规等。完善人才继续教育体制，加大财政对继续教育的支出及加大对其的扶持力度。鼓励更多的医务工作者到基层工作，减轻现有的基层工作人员的工作负荷，让他们能够摆脱经济和时间的限制，积极参与医学继续教育。

3.2 医学院校应注重对继续教育观念的培养

就医学院校而言，其更倾向于关注学历教育和科研成果，对继续教育工作关注度不够。医学生未接收到继续教育的相关知识，未在根本上意识到继续教育的重要性，导致工作以后不能积极参与继续教育。

医学高校要把医学继续教育作为一项重要职能，而不是一项附带的工作任务，可有可无。这既是社会公共卫生发展的需求，也是高校本身发展的需求。其应该充分调动发展的动力，发挥在继续教育工作中的优势，让继续教育的观念深入每一位医学生的内心。

3.3 开展多样化的培训方式

现有的继续教育形式太过单一，无选择的余地。国家应该完善继续教育的内容与形式，确保继续教育与医院实际需要相契合；强化实践教学，使医务人员原有的实践能力可以得到有效提高；拓展网络教育，以便医务人员能够在闲暇时间随时了解医学最新发展动态，及时获取自己需要掌握的知识；强化医学继续教育管理，提高教学质量，改善教育效果。

**[ 参考文献 ]**

[1] 陈华琼，谭祥华，陈和安 . 基层医院医学继续教育的现状及对策 [J]. 中国基层医药，2014，(8)

[2] 韩永祥，胡敏，汪红兵 . 基层中医药人才继续教育及对策思考 [J]. 中医药管理杂志，2011，19(3)

[3] 王春梅 . 构建以岗位胜任力为核心的医学继续教育课程体系的实践 [J]. 卫生职业教育，2016，34(24)

（上接第 2 页）

通过以上两种方法对 UGTIAI*28 和 UGTIAI*6 位点突变的测定，结果一致。

**3 讨论**

荧光定量 PCR 检测单核苷酸多态性 (SNP)，采用特异性高的探针杂交技术。每个反应中都含有一对探针和一对扩增引物，探针的 5’端分别标记 FAM 和 VIC（或 HEX）报告荧光，其中一条探针与野生型 SNP 完全匹配，另一条探针与突变型 SNP 完全匹配。在 PCR 反应过程中，由于 Taq 酶具有 5’端到 3’端外切酶活性，可将与模板 DNA 结合的探针 5’端的报告荧光剪切下来，游离状态的报告荧光被激发光源激发而发出荧光，信号可被检测器检测。通过检测 FAM 或者 VIC 报告荧光，就可以作为相应 SNP 位点分型的指示物。探针 3’端的淬灭基团为非荧光淬灭基团 (NFQ)，发出的黑色荧光不能被仪器检测到，降低了本底荧光信号强度。

本文中所建立的荧光定量 PCR 方法针对 UCT1A1*28 和 *6 位点进行 SNP 分型，其结果与直接测序法一致，且耗时短、操作简单，降低污染可能性，结果准确，适用于 UGT1A1*28 和 *6 基因多态性的快速分型检验。

**[ 参考文献 ]**

[1]Chabot GG.Clinical pharmacokinetics of irinotecan[J].Clin Pharmacokinet,1997,33(4)：245-259.

[2] 杨立学，马韬，等 . 伊立替康化学治疗的不良反应与 UGT1A1*28 基因多态性的关系 [J]. 内科理论与实践，2009，4（4）：300-304.

[3] 吕雅蕾，刘巍，等 .UGT1A1 基因多态性与伊立替康安全性和有效性的临床研究 [J]. 中国肿瘤临床，2012，39（20）：1542-1546.

[4] 王洋 .UGT1A1 基因多态性对伊立替康不良反应的预测价值 [D]. 山东：山东大学，2012.

[5] 田玉廷，史健，等 .UGT1A1 基因多态性研究进展 [J]. 实用癌症杂志，2013，28(3)：324-326.

[6] 郝金萍，李万水，陈松，等 . 荧光定量 PCR 技术研究线粒体 DNA nt16519 单核苷酸多态性 [J]. 中国法医学杂志，2009，24(2)：80-82.

[7] 张睿喆，闫良，刘晓嘉，等 .UGT1A1*6 和 *28 基因多态性与伊立替康毒性关系研究 [J]. 医药论坛杂志，2013，34(7)：98-100.

（上接第 3 页）

后 15-30 分钟后服用。

药源性胃肠病的重点在预防，使用前充分了解药物的不良反应，用药前必须了解患者有无胃溃疡及其他胃病，并尽可能的减少剂量、缩短疗程，安全合理使用药物。应用对胃有刺激的药物应密切观察胃部症状。许多药物均可导致药源性胃病，应该对药源性疾病给予重视，充分认识到药物不单纯是治疗手段，也有可能是一种致病的因素，为预防药源性疾病，在用药过程中要严密观察药物反应，以便及时调整剂量或调换药物，禁止乱用药物，提倡合理用药，明确用药指针，尽量避免多种药物联合使用，熟悉药物配伍禁忌，掌握各种药物的解救治疗措施，提高合理用药的水平，减少药源性疾病的发生。

**[ 参考文献 ]**

[1] 李玢 . 非甾体类抗炎药相关性胃病流行病学调查 [J]. 广州中医药大学学报，2016，26（11）:284-285

[2] 牟燕 . 药源性胃肠道疾病 [J]. 药物与临床，2015，18（4）:445-116

[3] 黄洁 . 药源性胃肠道不良反应 [J]. 海峡药物，2017，20（7）:263-265