

# CYP2C19 基因多态性和 ApoE 基因分型检测质量控制品的制备

郝繁运

作者单位: 100176 北京, 北京艾德摩医学检验实验室

通信作者: 郝繁运, Email: 168hao@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.04.004

**【摘要】** 目的 制备 CYP2C19 基因多态性和 ApoE 基因分型检测质量控制(质控)品并评估其质量。方法 收集医院血库过滤血液后的滤膜,经洗脱后稀释,进行基因扩增实验,制备 CYP2C19 基因多态性和 ApoE 基因分型检测质控品,在 6 个月保存期内重复检测,评价均匀性和稳定性。结果 收集样本的 CYP2C19 基因多态性检测出 \*1/\*1、\*1/\*2、\*2/\*2、\*1/\*3、\*3/\*3 基因型,未检出 \*1/\*17、\*2/\*3、\*2/\*17、\*3/\*17、\*17/\*17 基因型; ApoE 基因分型检测出  $\epsilon 3/\epsilon 3$ 、 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 、 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 、 $\epsilon 2/\epsilon 2$ 、 $\epsilon 4/\epsilon 4$  基因型,未检出  $\epsilon 2/\epsilon 4$  基因型。自制质控品在 6 个月保存周期内的检测结果随着时间延长无明显变化,与已知结果一致。结论 自制质控品均匀性和稳定性良好,可用于临床实验室 CYP2C19 基因多态性和 ApoE 基因分型检测的质控。

**【关键词】** 基因分型; 基因多态性; 自制质量控制品

## Preparation of quality control products for CYP2C19 polymorphism and ApoE genotyping detection

Hao Fanyun. Beijing Ademo Medical Laboratory, Beijing 100176, China

Corresponding author: Hao Fanyun, Email: 168hao@163.com

**【Abstract】 Objective** To prepare quality control (QC) products for CYP2C19 polymorphism and ApoE genotyping detection. **Methods** The filter membrane in the hospital blood bank was collected and diluted after elution, and then the gene amplification experiment was carried out. The QC samples for CYP2C19 polymorphism and ApoE genotyping detection were prepared, and repeated detection was conducted within 6 months storage period to evaluate the homogeneity and stability. **Results** The genotypes of \*1/\*1, \*1/\*2, \*2/\*2, \*1/\*3 and \*3/\*3 were detected in CYP2C19 gene polymorphisms, while \*1/\*17, \*2/\*3, \*2/\*17, \*3/\*17 and \*17/\*17 were not detected; the genotypes of  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 2$  and  $\epsilon 4/\epsilon 4$  were detected, and  $\epsilon 2/\epsilon 4$  was not detected. The self-made QC products showed no obvious change in 6-month storage period, and was consistent with confirmed results. **Conclusion** The self-made QC products for nucleic acid testing have good uniformity and stability, and can be used for the QC of CYP2C19 polymorphism and ApoE genotyping detection.

**【Key words】** Genotyping; Genetic polymorphism; Self-made quality control products

CYP2C19 基因多态性检测可用于氯吡格雷等药物用药安全监测和用药指导, ApoE 基因分型检测结果可以作为心脑血管疾病及阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)临床辅助诊断和风险评估的重要指标。CYP2C19 基因多态性和 ApoE 基因分型检测已被越来越多的临床医师重视,因此,准确检测 CYP2C19 基因多态性和 ApoE 基因分型至关重要,但目前临床检测工作中缺少准确可靠的商用质量控制(质控)品,因此,本研究使用医院血库制备滤膜的收集物,进行基因检测质控品的研制,取得预期效果<sup>[1-4]</sup>,现报告如下。

## 1 自制质控品的标本来源

为获得稳定的质控品来源,本研究对医院血库制备“去白细胞红细胞”后弃留在过滤器滤膜上的白细胞进行提取<sup>[5]</sup>,作为自制质控品的标本来源。自制质控品采用来自健康献血者的标本,而非提取后的 DNA,目的在于进行实验全流程质控,包括核酸提取阶段和聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)阶段。

## 2 自制质控品的制备与分型检测

**2.1 仪器与试剂** 美国应用生物系统公司生产的 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(已校准,该检测系

统已经通过性能验证和室内准确性比对); CYP2C19 基因多态性试剂盒(批号: 20181001H, 武汉海吉力生物科技有限公司), ApoE 基因分型试剂盒(批号: AE201811005, 厦门人瑞生物医药科技有限公司)。

**2.2 标本收集** 使用无菌生理盐水冲洗去白细胞过滤器, 采用无菌操作将洗涤下来的液体小心收集在 50 mL 离心管中备用, 总量约 50 mL, 取 0.5 mL 样本在血液分析仪中进行测定, 以白细胞计数达到  $5.0 \times 10^9/L$  为合格。本次实验共收集标本 28 份, 测得白细胞计数都在  $10 \times 10^9/L$  以上。

**2.3 收集标本盲测** 将收集的 28 份标本使用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行基因测试分型, 采用 CYP2C19 基因多态性试剂盒和 ApoE 基因分型试剂盒进行基因扩增实验。

**2.3.1 CYP2C19 基因多态性的判断** 本实验采用的基因扩增试剂每个标本占据 1 条 6 连管。选择 1、2 号管, 根据每个反应管到达 FAM 通道(450~490 nm) 信号阈值时所经历的循环数差值( $\Delta C_t$  值)判断样本 CYP2C19\*2 的基因多态性; 选择 3、4 号管, 根据 FAM 信号  $\Delta C_t$  值判断样本 CYP2C19\*3 的基因多态性; 选择 5、6 号管, 根据 FAM 信号  $\Delta C_t$  值判断样本 CYP2C19\*17 的基因多态性, 然后根据表 1 判断标本的基因型。对分装的自制质控品进行核酸提取后按照基因扩增操作程序在 PCR 仪上机检测。

表 1 CYP2C19 基因多态性分型判断

CYP2C19*2		CYP2C19*3		CYP2C19*17		基因型 (野生)(突变)
2G	2A	3G	3A	17C	17T	
GG		GG		CC		*1/*1
GA		GG		CC		*1/*2
GG		GA		CC		*1/*3
AA		GG		CC		*2/*2
GG		AA		CC		*3/*3
AA		AA		CC		*2/*3
AA		GA		CC		
GA		AA		CC		
CA		GA		CC		*1/*17
GG		GG		CT		
GG		GG		TT		*17/*17

**2.3.2 ApoE 基因分型判断** 待测样品 DNA 内控 HEX 通道(515~535 nm) 信号正常时观察样品在  $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$  和  $\epsilon 4$  基因检测试剂中的 FAM 信号有无曲线升起。如有扩增曲线, 计算  $C_t$  和  $\Delta C_t$  值( $\Delta C_t = C_{t_{FAM}} - C_{t_{HEX}}$ ), 以  $\leq \Delta C_t$  临界值判断为阳性。见表 2。

本研究筛选出 25 份符合要求样本, CYP2C19 基因多态性检测出 \*1/\*1 基因型 10 份, \*1/\*2 基因型

表 2 ApoE 基因分型判断

基因检测试剂 基因型	$\epsilon 2$ 基因 检测试剂	$\epsilon 3$ 基因 检测试剂	$\epsilon 4$ 基因 检测试剂
$\epsilon 2/\epsilon 2$	+	-	-
$\epsilon 3/\epsilon 3$	-	+	-
$\epsilon 4/\epsilon 4$	-	-	+
$\epsilon 2/\epsilon 3$	+	+	-
$\epsilon 2/\epsilon 4$	+	-	+
$\epsilon 3/\epsilon 4$	-	+	+

注: + 为阳性, - 为阴性

10 份, \*2/\*2 基因型 3 份, \*1/\*3 基因型 1 份, \*3/\*3 基因型 1 份, 未检出 \*1/\*17、\*2/\*3、\*2/\*17、\*3/\*17、\*17/\*17 基因型; 筛选出 27 份符合要求样本中 ApoE 基因分型检测出  $\epsilon 3/\epsilon 3$  基因型 19 份,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  基因型 2 份,  $\epsilon 2/\epsilon 3$  基因型 4 份,  $\epsilon 2/\epsilon 2$  基因型 1 份,  $\epsilon 4/\epsilon 4$  基因型 1 份, 未检出  $\epsilon 2/\epsilon 4$  基因型。

## 2.4 自制质控品的制备

**2.4.1 CYP2C19 基因多态性检测质控品的制备** 取上述不同基因型(\*1/\*2、\*2/\*2、\*1/\*3、\*3/\*3) 的阳性标本, 分别颠倒混匀 10 次。室温下以 2 000 r/min (离心半径为 15 cm) 离心 30 min。然后用一次性塑料吸管小心吸出位于红细胞和血浆层中间的白细胞层(白膜), 置于 5 mL 双蒸水(ddH<sub>2</sub>O) 中, 颠倒混匀后静置 10 min, 使吸出的少量红细胞低渗溶血, 以 3 500 r/min 离心 15 min; 吸弃上清, 保留细胞层, 视溶血效果可重复低渗溶血操作 1~2 次。合并相同基因型的白细胞, 以适量(按原血标本总体积的 1/2) 模拟血浆重悬。充分混匀后按照每管不少于 200  $\mu$ L 分装到 0.5 mL 离心管中, 于 -70  $^{\circ}$ C 保存备用。

**2.4.2 ApoE 基因分型检测质控品的制备** 取上述不同基因型( $\epsilon 3/\epsilon 4$ 、 $\epsilon 2/\epsilon 3$ 、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) 的阳性标本, 按照 2.4.1 项下方法制备 ApoE 基因分型检测质控品并分装, 于 -70  $^{\circ}$ C 保存。

**2.5 自制质控品的分装** 上述自制质控品按 6 个月量进行配制。用 0.5 mL 离心管分装, 每支分装量应足够进行至少 1 次检测, 在质控品外部粘贴标签, 需注明质控品名称、配制日期、有效期及配制人。

## 3 实验评价自制质控品的方式和频率

**3.1** 每日取 1 支自制质控品作为外部阳性质控(不同基因型交替轮换使用), 随日常标本进行核酸提取及 PCR 上机检测, 外部阳性质控标本位置随机。每块反应板均需运行室内质控, 包括试剂盒自带的阴性、阳性质控以及空白对照, 自制质控品每日检测 1 次。

**3.2** 根据室内质控结果与已知结果的一致性判断本批次结果是否正常, 报告能否发出。

#### 4 自制质控品均匀性和稳定性评估<sup>[6-7]</sup>

**4.1 均匀性评估** 每批新制质控品均需进行 1 次均匀性评价,每个基因型质控品配制成一定浓度后混匀分装并上机检测,以不同瓶间无明显差别(本实验为判定分型结果一致)作为均匀性评价指标。每个分型标本取 5 瓶在 1 d 内进行核酸提取后扩增检测,根据试剂盒要求判读结果,定型结果与已知结果一致为合格。见表 3~4。

**表 3 CYP2C19 基因多态性自制质控品同批次均匀性结果**

基因型	标本 1	标本 2	标本 3	标本 4	标本 5
*1/*2	正确	正确	正确	正确	正确
*2/*2	正确	正确	正确	正确	正确
*1/*3	正确	正确	正确	正确	正确
*3/*3	正确	正确	正确	正确	正确

注:“正确”为与已知结果一致

**表 4 ApoE 基因分型自制质控品同批次均匀性结果**

基因型	标本 1	标本 2	标本 3	标本 4	标本 5
ε 3 ε 4	正确	正确	正确	正确	正确
ε 2 ε 3	正确	正确	正确	正确	正确
ε 3 ε 3	正确	正确	正确	正确	正确
ε 4 ε 4	正确	正确	正确	正确	正确

注:“正确”为与已知结果一致

**4.2 稳定性评估** 将自制质控品保存于 -70 ℃,每批次选取 3 瓶进行上机检测,记录第 0、1、3、6 个月后检测结果,与预期阳性结果一致则为稳定性良好,稳定期为检测时间,否则将上一次检测时间作为稳定时间。见表 5~6。

**表 5 CYP2C19 基因多态性自制质控品阶段性复测结果**

时间	*2/*2	*1/*3	*3/*3	*1/*2
第 0 个月	正确	正确	正确	正确
第 1 个月	正确	正确	正确	正确
第 3 个月	正确	正确	正确	正确
第 6 个月	正确	正确	正确	正确

注:“正确”为与已知结果一致

**表 6 ApoE 基因分型自制质控品阶段性复测结果**

时间	ε 3/ε 4	ε 2/ε 3	ε 3/ε 3	ε 4/ε 4
第 0 个月	正确	正确	正确	正确
第 1 个月	正确	正确	正确	正确
第 3 个月	正确	正确	正确	正确
第 6 个月	正确	正确	正确	正确

注:“正确”为与已知结果一致

**4.3 稳定性回顾评价<sup>[8-10]</sup>** 定期对质控数据进行回顾性评价,每月质控小结回顾首先确认质控品的有效性。如果自制质控品 Ct 值有降低趋势,或无明确原因与预期结果不一致,则需停止使用并重新确认该批次质控品的有效性,更换新批次的质控品。

自制室内质控品在 PCR 扩增仪中的位置不能永久固定在 1 个孔,应尽量在每次扩增检测时进行相应顺延,使得在一定时间内可以尽可能地监测每 1 个孔的扩增有效性。

#### 5 讨论

本研究以医院血库制备“去白细胞红细胞”后弃留在滤膜上的白细胞作为原料,对其进行提取,自制基因检测质控品,结果显示,自制质控品的均匀性和稳定性符合预期质量要求。并且可获得稳定充足的样本,克服通过其他渠道获得样本来源有限、不能有效监测实验反应全过程等缺点,制备的质控品在临床实验室中可用于 ApoE 基因分型和 CYP2C19 多态性检测。自制质控品需较长时间冻存,本研究未加入甘油、二甲基亚砷、血清等外源性保护剂和稳定剂,可以避免检测中可能存在的非特异性干扰。

**利益冲突** 作者声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- 1 Grammer TB, Hoffmann MM, Renner W, et al. Apolipoprotein E genotypes, circulating C-reactive protein and angiographic coronary artery disease: the ludwigshafen risk and cardiovascular health study [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 215 (2): 487-493. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.005.
- 2 Zende PD, Bankar MP, Kamble PS, et al. Apolipoprotein e gene polymorphism and its effect on plasma lipids in arteriosclerosis [J]. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7 (10): 2149-2152. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6195.3455.
- 3 Oestreich JH, Best LG, Dobesh PP. Prevalence of CYP2C19 variant alleles and pharmacodynamic variability of aspirin and clopidogrel in native Americans [J]. *Am Heart J*, 2014, 167 (3): 413-418. DOI: 10.1016/j.ahj.2013.10.028.
- 4 Han Y, Lyu HH, Liu X, et al. Influence of genetic polymorphisms on clopidogrel response and clinical outcomes in patients with acute ischemic stroke CYP2C19 genotype on clopidogrel response [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21 (9): 692-697. DOI: 10.1111/cns.12426.
- 5 曾毅彪,王丹.血小板型白细胞过滤器制备多袋汇集浓缩血小板的去白效果分析[J].*临床和实验医学杂志*, 2014, 13 (19): 1642-1643. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2014.19.030.
- 6 王雪亮,刘芬,蒋玲丽,等.人乳头瘤病毒 16 和 18 型核酸检测用质控品制备及其应用[J].*临床检验杂志*, 2016, 34 (1): 56-59. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2016.01.16.
- 7 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL05 2016 实验室内部研制质量控制样品的指南[S].北京:中国合格评定国家认可委员会,2016.
- 8 Valentine-Thon E, van Loon AM, Schirm J, et al. European proficiency testing program for molecular detection and quantitation of hepatitis B virus DNA [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39 (12): 4407-4412. DOI: 10.1128/JCM.39.12.4407-4412.2001.
- 9 Caliendo AM, Valsamakis A, Bremer JW, et al. Multilaboratory evaluation of real-time PCR tests for hepatitis B virus DNA quantification [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49 (8): 2854-2858. DOI: 10.1128/JCM.00471-11.
- 10 王雪亮,肖艳群,王华梁.临床分子病理检测质控品的研究进展[J/CD].*中华临床实验室管理电子杂志*, 2018, 6 (2): 80-83. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-5820.2018.02.004.

(收稿日期:2020-08-14)

(本文编辑:邵文)