

# 一种快速检测UGT1A1\*28基因多态性的方法

黄迎 苏健 黄小穗 卢丹霞 谢至 杨素清 郭伟滨 吕志异 吴红穗 张绪超

**【摘要】**背景与目的 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1, UGT1A1) 是伊立替康代谢最主要的同工酶, UGT1A1基因的多态性影响UGT1A1的活性, 本研究建立片段分析法检测UGT1A1\*28 TATA盒的多态性。方法 调取2014年4月-2015年5月在广东省人民医院的住院肺癌患者库存血液标本286例, 建立片段分析法检测UGT1A1\*28 TATA多态性, 与Sanger测序方法比较其精确度和准确度。结果 286例肿瘤血液中, UGT1A1\*28 TATA盒TA6/6型有236例 (82.5%), TA6/7型有48例 (16.8%), TA7/7型2例 (0.7%)。片段分析法与Sanger测序法比较, 精确度与准确度达100%。结论 片段分析法适用于临床检测UGT1A1\*28多态性, 成本低且方便快捷。

**【关键词】** UGT1A1; 片段分析; 基因多态性

## Detection of UGT1A1\*28 Polymorphism Using Fragment Analysis

Ying HUANG, Jian SU, Xiaosui HUANG, Danxia LU, Zhi XIE, Suqing YANG, Weibang GUO, Zhiyi LV, Hongsui WU, Xuchao ZHANG

Guangdong General Hospital Institute of Lung Cancer, Key Laboratory of Translational Medicine, Medical Research Center, Guangdong General Hospital Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: Xuchao ZHANG, E-mail: zhuchao3000@126.com

**【Abstract】** Background and objective Uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 (UGT1A1), UGT1A1\*28 polymorphism can reduce UGT1A1 enzymatic activity, which may lead to severe toxicities in patients who receive irinotecan. This study tries to build a fragment analysis method to detect UGT1A1\*28 polymorphism. **Methods** A total of 286 blood specimens from the lung cancer patients who were hospitalized in Guangdong General Hospital between April 2014 to May 2015 were detected UGT1A1\*28 polymorphism by fragment analysis method. **Results** Comparing with Sanger sequencing, precision and accuracy of the fragment analysis method were 100%. Of the 286 patients, 236 (82.5% harbored TA6/6 genotype, 48 (16.8%) TA 6/7 genotype and 2 (0.7%) TA7/7 genotype. **Conclusion** Our data suggest that the fragment analysis method is robust for detecting UGT1A1\*28 polymorphism in clinical practice. It's simple, time-saving, and easy-to-carry.

**【Key words】** UGT1A1; Fragment analysis; Polymorphism

This study was supported by the grant from Guangdong Provincial Science and Technology Department Key Laboratory Construction Project (to Xuchao ZHANG)(No.2012A0614000006).

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1 (uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1, UGT1A1) 是伊立替康 (irinotecan) 的主要代谢酶, 其活性与伊立替康的疗效及不良反应密切相关, 而UGT1A1\*28基因多态性可显著影响该酶的表达与活性, 增加伊立替康化疗患者发生腹泻、严重粒细胞减少等不良反应的风险。伊立替康是小细

胞肺癌标准二线治疗方案, 检测UGT1A1\*28基因多态性对于指导肺癌个体化治疗具有一定临床意义<sup>[1-4]</sup>。

目前检测基因多态性常用的方法主要包括: Sanger测序法、变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)、变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)、单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP)、荧光定量PCR、PCR-LDR等多种。Sanger测序法是检测UGT1A1\*28突变的传统和经典方法, 但Sanger测序法耗时, 且灵敏度低, 仅达10%<sup>[5,6]</sup>。本研究尝试用片段分析法, 以期快速、简便地检测UGT1A1\*28多态性, 获得一种更适用于临床的检测方法。

本研究受广东省科技厅重点实验室建设项目 (No.2012A0614000006) 资助

作者单位: 510080 广州, 广东省人民医院, 广东省医学科学院医学研究部, 广东省人民医院肺癌研究所转化医学重点实验室 (通讯作者: 张绪超, E-mail: zhuchao3000@126.com)

## 1 材料与方

**1.1 主要试剂和仪器** 外周血DNA提取试剂盒(Qiagen公司), 缓冲液、超纯甲酰胺、POP4胶和GeneScan-500 LIZ Size Standard(美国Applied Biosystems, ABI公司)。3730基因分析仪(美国Applied Biosystems, ABI公司), QIASymphony SP高通量全自动样品纯化工作站(Qiagen公司), Nano Drop 8000分光光度计(Thermo公司), PCR仪(北京东胜创新生物科技公司), 水平电泳仪(德国BIO-RAD公司), UVI凝胶成像系统(德国BioRad公司)。

**1.2 样本及质控品** 286例样本均取自广东省人民医院2014年4月-2015年5月住院肺癌患者, 抽取静脉EDTA抗凝全血1 mL。患者临床特征见表1, 所有患者均签署知情同意书; 10份UGT1A1\*28质控品来源于国家卫计委。

**1.2.1 引物合成** 片段分析引物: 上游引物: 5' FAM-CTCCCTGCTACCTTTGTGGACTGA3', 下游引物: 5'TAGCACCTGACGCCTCGTTGT3'; 扩增产物为128 bp。Sanger测序上游引物: 5' CTCCCTGCTACCTTTGTGGACTGA3'; 下游引物: 5' ACAACGAGGCGTCAGGTGCTA3'均由Life公司合成。

**1.2.2 DNA提取** 按试剂说明书提取基因组DNA, 测OD值, 并配成10 ng/μL。

**1.2.3 PCR扩增** 总反应体系10 μL, 含Premix Ex Taq Hot Start Version 5 μL(大连TAKARA公司), DNA模板1 μL, 2 μM上下游引物各0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 3 μL。扩增条件为: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共30个循环。反应结束后4 °C保存。每次实验均加一个无模板空白对照。

**1.3 基本扫描分析** 取荧光标记的PCR产物1 μL, 加69 μL水作1:70稀释, 取1 μL稀释产物与0.5 μL Genescan-500 LIZ Size Standard及9 μL去离子甲酰胺混合, 在ABI-3730 DNA序列分析仪中进行毛细管电泳。计算机自动收集电泳过程中不同时间所出现的不同颜色和强度的荧光素, 以显示出不同的位置、高度、颜色和形态的峰; Gene Scan Genotyper 3.5软件自动分析收获的数据。

**1.4 确定方法学的准确度、精确度及最低检测限** 将DNA配制成不同的浓度(1 ng/μL、2.5 ng/μL、5 ng/μL、10 ng/μL、20 ng/μL), 每个浓度检测三个复孔, 以确定检测方法的最低检测限。所有样本及质控品均用Sanger测序法同时检测以确定检测的准确度; 取4份样本由两个操作者分两个批次进行检测以确定重复性。

**1.5 Sanger测序** 使用本室建立起来的方法, 简述如下:

PCR反应体系: 每个25 μL的PCR反应包括1 μL(20 ng/μL)模板DNA, 12.5 μL Premix Ex Taq HS酶(大连TAKARA公司), 1 μL正向和反向引物混合物, 10.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR反应条件为: 初始变性94 °C 5 min; 变性94 °C 30 s, 退火55 °C 30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C延伸7 min。将扩增的PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测目的片段符合条件后, 纯化产物。纯化的PCR产物用BigDye Terminator V3.1按操作说明书进行标记及纯化, 然后在ABI-3730测序仪上进行双向测序, 测序结果用Chromas 2.31软件分析, 人工校读分析UGT1A1上游启动子序列A(TA)<sub>n</sub>TAA中的TA重复序列。

**1.6 样本检测** 先取20例样本作为实验集, 同时用片段分析法及Sanger测序法检测UGT1A1\*28多态性, 确定三种基因片段在毛细管电泳时的位置; 其余266例为验证集, 与10份质控品一起同时用片段分析法及Sanger测序法检测UGT1A1\*28多态性。

## 2 结果

**2.1 临床特征** 286例肺癌患者的临床特征见表1, 肺腺癌181例, 鳞癌67例, 小细胞肺癌17例, 其他病理类型21例。17例小细胞肺癌中, 7例放弃治疗; 在10例接受了化疗的患者中, 有3例分别接受一线、二线和三线依立替康治疗, 均无不可耐受的严重不良反应, 基因型均为TA6/6型。

**2.2 片段分析数据判读** 电泳结束后, GenScan3.5软件自动分析生成的图谱文件, 给出各片段位置、峰值大小。由于PCR引物标记上了VIC荧光, UGT1A1不同的分子分型在毛细管电泳图上产生位置和峰高不同的绿色产物峰。通过实验集的20例样本确定UGT1A1三种多态性的峰图特征: 单个124.2大小的峰为TA6/6型, 单个126.4大小的峰为TA7/7型, 124.2及126.4两个峰为TA6/7型(图1)。

**2.3 片段分析** 片段分析10个质控品结果完全正确(表2)。DNA最少上样量为1 ng/μL, 不同操作者两批次检测的结果完全一致。

**2.4 两种方法一致性结果** 286例样本通过片段分析法检测出UGT1A1\*28为TA6/TA6 236例(82.5%), TA6/TA7为48例(16.8%), TA7/7为2例(0.7%); 与Sanger测序结果呈一致性, 准确度达100%。10份质控品结果百分之百正确。

## 3 讨论

本研究建立一种片段分析法快速检测UGT1A1\*28多

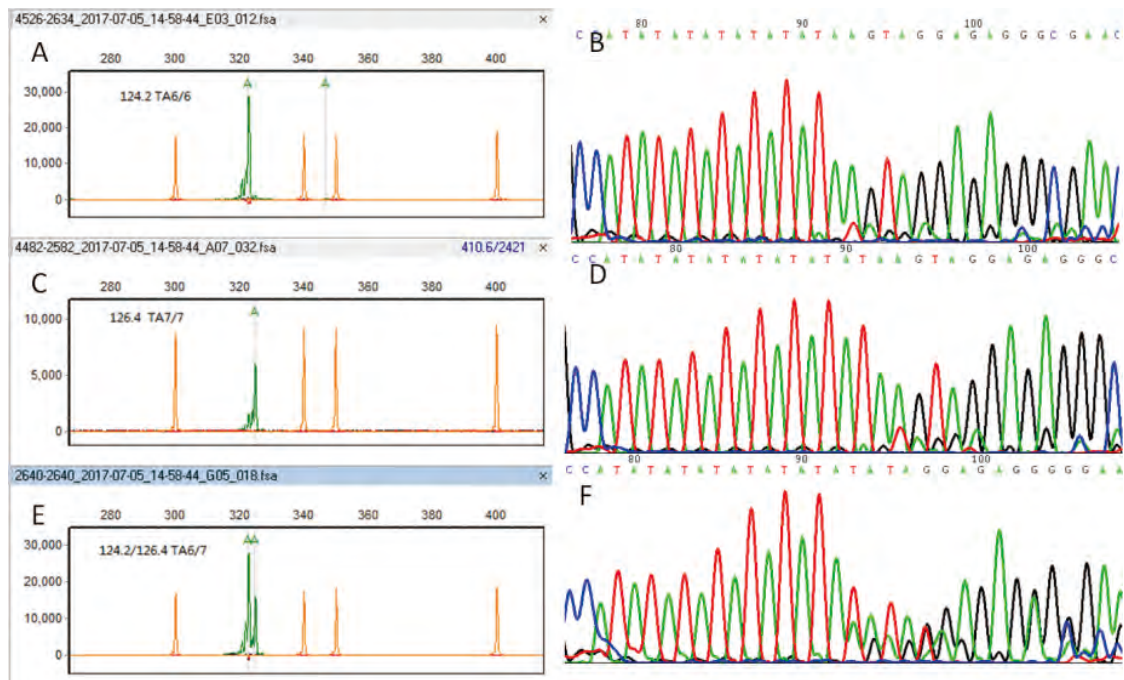


图 1 *UGT1A1*\*28基因分型图例。A、B：*UGT1A1*\*28 TA6/6野生型，峰的位置位于124.2；C、D：*UGT1A1*\*28 TA 7/7纯合突变型，峰的位置位于126.4；E、F：*UGT1A1*\*28 TA6/7杂合型，有两个峰，位置分别为124.2及126.4；A、C和E是片段分析图谱；B、D及F是Sanger测序图谱。

Fig 1 Representative figures of *UGT1A1*\*28 polymorphysin. A, B: *UGT1A1*\*28 TA6/6. The trace is located in 124.1; C, D: *UGT1A1*\*28 TA 7/7. The trace is located in 126.4; E, F: *UGT1A1*\*28 TA6/7. There are two traces which are located in 124.2 and 126.4, respectively. A, C and E are generated with fragment analysis, while B, D and F are generated with Sanger sequencing.

表 1 286例患者的临床特征及*UGT1A1*\*28多态性

Tab 1 Characteristics of patients with lung cancer and *UGT1A1*\*28 polymorphism

Characteristics	Cases	%
Age, median (yr, range)	51 (29-84)	
Gender		
Male	197	68.9
Female	89	31.1
Smoking status		
Non-smoking	139	48.6
Smoking	147	51.4
History		
AC	181	63.3
SCC	67	23.4
SCLC	17	5.9
Others	21	7.3
Stage		
I-III	147	51.4
IV	138	48.3
<i>UGT1A1</i> *28		
TA6/6	236	82.5
TA6/7	48	16.8
TA7/7	2	0.7

AC: adenocarcinoma; SCC: squamous cell carcinom; SCLC: small cell lung cancer.

表 2 片段分析检测10例*UGT1A1*质控品结果

Tab 2 Results of 10 standards detected with Sanger sequencing and Fragment analysis

ID	Sanger sequencing	Fragment analysis
1,611	TA6/6	TA6/6
1,612	TA6/6	TA6/6
1,613	TA6/6	TA6/6
1,614	TA7/7	TA7/7
1,615	TA6/6	TA6/6
1,621	TA6/7	TA6/7
1,622	TA6/7	TA6/7
1,623	TA6/6	TA6/6
1,624	TA6/6	TA6/6
1,625	TA6/6	TA6/6



态性,一共检测286例肺癌患者血液标本,与Sanger测序比较,准确性均达100%,参加国家卫计委室间质评结果完全正确。最少DNA用量可达1 ng/μL。3例小细胞肺癌患者分别接受一线、二线和三线依立替康治疗,均无不可耐受的严重不良反应,基因型均为TA6/6型。

UGT1A1启动子区域的TATAA区若插入一个TA,即A(TA)7TAA;野生型则为A(TA)6TAA。UGT1A1\*28多态性有三个基因型:TA6/TA6(野生型)、TA6/TA7(杂合突变型)和TA7/TA7(纯合突变型)。TA6/7和TA7/7基因型的UGT1A蛋白质的代谢中间产物SN-38的糖脂化作用下降,因而增加了伊立替康的毒副作用,临床通过减少药物用量,可以减轻毒副作用,但对药物疗效影响不大,因此,UGT1A1\*28基因的多态性有助于指导临床用药<sup>[4]</sup>。

目前,检测UGT1A1\*28基因的多态性的方法主要是Sanger测序法<sup>[7,8]</sup>,但Sanger测序法步骤繁琐、一个检测周期需要两天,结果判读较复杂,不能为临床提供快速的检测服务。

片段分析方法基本工作原理是用荧光标记的引物扩增DNA目的片段,若目的片段由于突变导致片段大小发生改变,将荧光标记的PCR产物置于ABI-3730基因分析仪上进行毛细管电泳,电泳结果用GenScan 3.5软件进行分析,电泳图上出现两个位置不一样的峰形,根据产物峰的位置大小可作出结果判断。毛细管电泳分辨率高,可以区分1个碱基的差异。由于此技术操作简便、耗时短、费用少,已得到广泛的应用。Furtado等<sup>[9]</sup>在真性红细胞增多症样本中比较Sanger测序法、熔解曲线法(high resolution melting, HRM)及片段分析法检测JAK2基因12外显子的突变,包括缺失突变、插入突变、K539L点突变,发现片段分析更灵敏,可检测突变含量为2%的样本(极限为0.5%),而HRM法及Sanger测序灵敏度则为10%;片段分析法结果解读更容易。该研究者设计了单管检测JAK2基因缺失突变、插入突变、K539L突变,提高了检测通量,缺点是不能同时检测其他类型的点突变。Gardner等<sup>[10]</sup>在47例血液肿瘤标本中比较了片段分析法、Sanger测序法及二代测序法检测CALR基因外显子9的缺失及插入突变。发现1例缺失突变,2例插入突变;片段分析法与Sanger测序法结果完全一致,二代测序法用常规流程检测时,该1例缺失突变未能检测,用IGV软件分析,发现是因为该区域的复盖度不够导致结果为阴性。但IGV可同时发现1个小缺失及几个点突变。

UGT1A1\*28基因在启动子区域的TATAA盒在野生型为6个TA,其多态性插入了一个TA,野生型及突变型DNA片段之间相差两个碱基,在毛细管电泳时可以明显区分开

来。本研究中所建立的片段分析法DNA用量少,可节约样本量;检测通量高(一次可检测96个样本),检测周期短,一个检测周期仅需1天;精确度及准确度均达到100%;成本低,适用于临床检测。近几年,虽然二代测序法以更高的灵敏度及更高的通量广受瞩目,但也因其存在一定的错误率及高费用、高技术要求,让基层单位望而却步。

毛细管电泳时,DNA产物的上样量对电泳图谱的质量影响较大,上样量过少,产物峰过低,可能会导致实验失败;若上样量过大,背景过高可导致误判结果。用水稀释PCR产物至一合适浓度,使产物的峰高与分子量标记LIZ500的峰高相当,则电泳图谱为最佳。

有研究<sup>[11,12]</sup>认为:依立替康毒副作用与UGT1A1\*6多态性有强相关关系而与UGT1A1\*28多态性非相关;也有研究指出在亚裔患者中,依立替康毒副作用与UGT1A1\*6/28均非相关。由于本研究小细胞肺癌的病例数较少,且没有检测UGT1A1\*6多态性,未能阐明中国小细胞肺癌患者依立替康毒副作用与UGT1A1\*6/28多态性的相关性。

综上所述,片段分析法适用于临床检测UGT1A1\*28多态性,成本低且方便快捷。

### 参 考 文 献

- 1 Ma D, Zhang XC, Yang DY, et al. Association of UGT1A128 polymorphism with toxicity and efficacy of irinotecan in Chinese patients. Zhongshan Da Xue Xue Bao, 2011, 32(4): 495-546. [马冬, 张绪超, 杨冬阳, 等. 中国人UGT1A1\*28的基因多态性以及其与伊立替康毒性和疗效的关系. 中山大学学报, 2011, 32(4): 495-546.]
- 2 Xu C, Tang X, Qu Y, et al. UGT1A1 gene polymorphism is associated with toxicity and clinical efficacy of irinotecan-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 78(1): 119-130.
- 3 Schulz C, Heinemann V, Schalhorn A, et al. UGT1A1 gene polymorphism: impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal cancer. World J Gastroenterol, 2009, 15(40): 5058-5066.
- 4 Fukuda M, Suetsugu T, Shimada M, et al. Prospective study of the UGT1A1\*27 gene polymorphism during irinotecan therapy in patients with lung cancer: Results of Lung Oncology Group in Kyusyu (LOGIK1004B). Thorac Cancer, 2016, 7(4): 467-472.
- 5 Su J, Guo AL, Huang Y, et al. Detection of exon 19 deletion mutation in EGFR in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. Shi Yong Yi Xue Za Zhi, 2010, 26(11): 1897-1899. [苏健, 郭爱林, 黄迎, 等. 突变体富集法检测表皮生长因子受体基因19外显子的缺失突变. 实用医学杂志, 2010, 26(11): 1897-1899.]
- 6 Young EC, Owens MM, Adebisi I, et al. A comparison of methods for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer. Diagn Mol Pathol, 2013, 22(4): 190-195.

- 7 Zhang JX, Wang CL, Huang MJ, *et al.* Relationship between *UGT1A1* gene polymorphisms and toxicity/efficacy of irinotecan-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi*, 2012, 28(5): 823-828. [张君孝, 王晨亮, 黄美近, 等. *UGT1A1* 基因多态性与转移性结直肠癌伊立替康化疗毒性及疗效的关系. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(5): 823-828.]
- 8 Chen YZ, Wei WJ, Zhao N. Toxicity and efficacy relationship between *UGT1A1* gene polymorphisms and irinotecan-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Qiqihaer Yi Xue Yuan Xue Bao*, 2015, 36(22): 3277-3280. [陈妍张, 威威吉, 兆宁. *UGT1A1* 基因多态性与伊立替康治疗晚期非小细胞肺癌毒性和疗效的关系. *齐齐哈尔医学院学报*, 2015, 36(22): 3277-3280.]
- 9 Furtado LV, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KS, *et al.* A multiplexed fragment analysis-based assay for detection of *JAK2* exon 12 mutations. *J Mol Diagn*, 2013, 15(5): 592-599.
- 10 Gardner JA, Peterson JD, Turner SA, *et al.* Detection of *CALR* mutation in clonal and nonclonal hematologic diseases using fragment analysis and next-generation sequencing. *Am J Clin Pathol*, 2016, 146(4): 448-455.
- 11 Chen X, Liu L, Guo Z, *et al.* *UGT1A1* polymorphisms with irinotecan-induced toxicities and treatment outcome in Asians with Lung Cancer: a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(6): 1109-1117.
- 12 Bai Y, Wu HW, Ma X, *et al.* Relationship between *UGT1A1*\*6/\*28 gene polymorphisms and the efficacy and toxicity of irinotecan-based chemotherapy. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 3071-3081.

(收稿: 2017-07-20 修回: 2017-09-17 接受: 2017-10-10)

(本文编辑 丁燕)



Cite this article as: Huang Y, Su J, Huang XH, *et al.* Detection of *UGT1A1*\*28 Polymorphism Using Fragment Analysis. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2017, 20(12): 817-821. [黄迎, 苏健, 黄小穗, 等. 一种快速检测*UGT1A1*\*28基因多态性的方法. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(12): 817-821.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2017.12.04

## • 消息 •

### 《中国肺癌杂志》被CSCD (2017-2018年度) 收录

2017年3月, 由中国科协主管、中国抗癌协会、中国防痨协会和天津医大总医院主办的《中国肺癌杂志》继续被中国科学引文数据库 (CSCD) 2017-2018年度收录为核心期刊 (以C标记), 至此, 《中国肺癌杂志》已经被美国Medline, 荷兰SCOPUS, 中国统计源目录, 北大核心与中科院CSCD数据库全部收录为核心期刊!

中国科学引文数据库 (Chinese Science Citation Database, CSCD) 创建于1989年, 收录我国数学、物理、化学、天文学、地学、生物学、农林科学、医药卫生、工程技术和环境科学等领域出版的中英文科技核心期刊和优秀期刊千余种, 目前已积累从1989年到现在论文记录4,690,808条, 引文记录57,967,579条。中国科学引文数据库内容丰富、结构科学、数据准确。系统除具备一般的检索功能外, 还提供新型的索引关系——引文索引, 使用该功能, 用户可迅速从数百万条引文中查询到某篇科技文献被引用的详细情况, 还可以从一篇早期的重要文献或著者姓名入手, 检索到一批近期发表的相关文献, 对交叉学科和新学科的发展研究具有十分重要的参考价值。中国科学引文数据库还提供了数据链接机制, 支持用户获取全文。

中国科学引文数据库具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点, 自提供使用以来, 深受用户好评, 被誉为“中国的SCI”。

2017年-2018年度中国科学引文数据库收录来源期刊1,229种, 其中中国出版的英文期刊201种, 中文期刊1,028种。中国科学引文数据库来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库885种; 扩展库344种。

中国科学引文数据库来源期刊每两年遴选一次。每次遴选均采用定量与定性相结合的方法, 定量数据来自于中国科学引文数据库, 定性评价则通过聘请国内专家定性评估对期刊进行评审。定量与定性综合评估结果构成了中国科学引文数据库来源期刊。