



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1908188 B

(45) 授权公告日 2011.01.19

(21) 申请号 200510088646.0

(22) 申请日 2005.08.01

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
放射与辐射医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号放
射医学研究所

专利权人 中南大学

广西壮族自治区肿瘤防治研究所

(72) 发明人 贺福初 陈小平 程泽能 汪海健
王黎青 智联腾 周钢桥 谢伟敏
朱云平

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56) 对比文件

ELENI AKLILLU et al. Genetic
Polymorphism of CYP1A2 in
Ethiopians Affecting Induction and
Expression: Characterization of

Novel Haplotypes with Single-Nucleotide
Polymorphisms in Intron 1. MOLECULAR
PHARMACOLOGY 64 3. 2003, 64(3), 659-669.

刘琳琳 等. 细胞色素 P450 酶在化学物质诱
导肝脏癌变作用及研究现状. 卫生毒理学杂志 18
4 suppl. 2004, 18(4 suppl), 313-317.

审查员 王慧

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测与药物代谢能力和肝癌易感性相关
的基因 CYP1A2 基因型的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种与药物代谢能力和肝癌高
发区肝癌易感性相关联的基因 CYP1A2 基因型及
其检测方法, 以及检测 CYP1A2 与药物代谢表型
或肝癌风险相关基因型的试剂盒及其使用。本
发明为临床根据个体的 CYP1A2 基因型确定经由
CYP1A2 代谢药物的剂量提供了分子判据。此外,
本发明为肝癌高发区高危个体的早期筛查和检出
提供了新的遗传标记, 为肝癌高发区肝癌的人群
预防提供了新的遗传咨询内容。

1. 一种与药物代谢能力和肝癌患病风险相关联的基因 CYP1A2 基因型的检测试剂盒,其中包括:如序列 1~6 所示对 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 三个多态位点进行基因分型的引物 6 条;dNTP;用于 PCR 反应的 DNA 聚合酶及其缓冲液的一种或多种;用于 CYP1A2G-3860A 多态位点限制性片段长度多态性分析的限制性内切酶 BseL I,和相应缓冲液的一种或多种,及其酶切图谱;用于 CYP1A2G-3113A 多态位点限制性片段长度多态性分析的限制性内切酶 HpyCHIV 或 Tai I,和相应缓冲液的一种或多种,及其酶切图谱;用于 CYP1A2T5347C 多态位点限制性片段长度多态性分析的限制性内切酶 Eco57I,和相应缓冲液的一种或多种,及其酶切图谱。

2. 一种检测 CYP1A2G-3860A 位点的引物,其特征为:正向引物见序列表中序列 1,反向引物见序列表中序列 2。

3. 一种检测 CYP1A2G-3113A 位点的引物,其特征为:正向引物见序列表中序列 3,反向引物见序列表中序列 4。

4. 一种检测 CYP1A2T5347C 位点的引物,其特征为:正向引物见序列表中序列 5,反向引物见序列表中序列 6。

一种检测与药物代谢能力和肝癌易感性相关联的基因 CYP1A2 基因型的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药物代谢能力个体差异以及肝癌高发区肝癌易感性个体差异及其遗传学检测方法。具体地,本发明涉及与药物代谢能力和肝癌易感性相关的基因 CYP1A2 的基因型检测方法;本发明进一步涉及上述与药物代谢能力和肝癌易感性相关联的基因 CYP1A2 基因型的检测试剂盒,以及该试剂盒的应用;本发明鉴定了导致 CYP1A2 低体内酶活性的 CYP1A2 基因型,从而涉及在临床个体化用药中的应用;本发明还确定了 CYP1A2 为肝癌高发区肝癌的一个新型易感基因,从而涉及对肝癌高危个体进行早期筛查和化学预防以及遗传咨询中的应用。

背景技术

[0002] CYP1A2 是细胞色素 P450 家族的重要成员,参与多种药物和环境致癌物如黄曲霉毒素 B1 的代谢。大量的体内外研究结果表明,人群中 CYP1A2 的表达和活性存在很大的个体差异,如肝脏中个体间 CYP1A2mRNA 的表达水平相差可达 40 倍之多。此外,CYP1A2 的活性还存在显著的地域或种族差异。例如,高加索女性体内 CYP1A2 的活性显著高于中国女性和黑人女性。也有研究发现,在中国人群和非洲人群中,CYP1A2 的体内活性存在二态甚至是三态分布的现象,即有一部分个体分别表现出极高或极低的 CYP1A2 活性。CYP1A2 体内活性的差异可能是造成个体或种族间药物反应性和机体对某些疾病如黄曲霉毒素 B1 暴露相关的肝癌、结肠癌、膀胱癌和睾丸癌等遗传易感性差异的重要原因之一。

[0003] 对双生子进行研究的结果表明,CYP1A2 的体内活性主要由遗传因素决定,遗传度为 0.75。目前,有多项研究对 CYP1A2 基因的功能性 SNP 进行了发掘和功能相关性研究。研究表明,CYP1A2G-3860A(国际细胞色素 P450 命名委员会命名为 CYP1A2*1C)、C-163A(国际细胞色素 P450 命名委员会命名为 CYP1A2*1F)和 C-729T 位点多态性与 CYP1A2 的体内活性或诱导性相关。然而,这些多态性尚不能完全解释人群中 CYP1A2 活性的个体差异。因此,CYP1A2 基因总的遗传变异模式及个体间 CYP1A2 活性个体差异的遗传机制还有待进一步的研究。

[0004] 肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC,简称肝癌)是严重影响人类健康的重要的恶性肿瘤,在肿瘤引起的人类死亡中位居第五。据估计,世界上每年约有 50~100 万例新发病例。不同的国家和地区肝癌的病因和发病率差异显著。我国是世界范围内有名的肝癌高发区,约 50%的肝癌病例来自中国。目前的流行病学研究资料表明,慢性乙型肝炎(HBV)感染和食物中黄曲霉毒素的污染是我国肝癌高发重要的风险因素。此外,在肝癌的发生发展过程中,HBV 感染和黄曲霉毒素的暴露之间存在协同作用。

[0005] 然而,在肝癌高发区,即使暴露于相同水平的风险因素,也有一部分个体最后发展成肝癌。这表明遗传因素在肝癌的病因和发病过程中起重要的作用。黄曲霉毒素中致突变作用最强的是黄曲霉毒素 B1(AFB1),而 AFB1 致肝癌的作用首先需在肝脏经药物代谢酶细胞色素 P450 超家族成员代谢活化生成具有遗传毒性的活性代谢产物 AFB1-8,9-环氧化

物 (AFB1-8,9-epoxide, AFB0)。有研究表明,人群中生成 AFB0 的能力和使 AFB0 解毒生成无毒代谢产物的能力存在较大的个体差异,而这种差异可能是导致 HCC 易感性个体差异的重要原因。事实上,在多个人群中进行的病例-对照研究业已证明,多种编码 AFB0 解毒酶的基因如 EPHX1、EPHX2、GSTM1 和 GSTT1 的遗传多态性与血浆 AFB1-白蛋白加合物水平或肝癌的易感性相关。然而,目前尚没有有关 AFB1 代谢活化酶基因多态性与肝癌遗传易感性关联的研究报道。

[0006] 人体内 AFB1 的生物转化是一个多途径的复杂过程。大量的证据表明,在与饮食暴露相关的低 AFB1 底物浓度时,CYP1A2 是 AFB1 的一种高亲和力酶,参与 95% 以上 AFB1 的生物活化。除了参与 AFB0 的生成,CYP1A2 同时也催化 AFB1 生成无遗传毒性的代谢产物 AFM1。研究表明,尿液中 AFM1 的排出量与患 HCC 的风险存在剂量依赖关系。奥替普拉是一种具有肝癌化学预防潜在价值的治疗血吸虫的药物。研究表明,其化学预防肝癌的作用部分是通过抑制体内 CYP1A2 的活性而实现的。由于 CYP1A2 在 AFB1 的代谢活化和 I 相解毒中起重要的作用,因此,CYP1A2 是影响与 AFB1 暴露有关的肝癌遗传易感性重要的候选基因。

[0007] 广西壮族自治区扶绥县是全世界有名的肝癌高发区。流行病学研究资料表明,该县居民的食物中普遍存在高水平的 AFB1 污染,而 90% 左右的居民的尿液中可以检测到 AFB1 的代谢产物。抑癌基因 p53G249T 颠换是 AFB1 暴露相关的肝癌癌组织中一种特异性的 DNA 突变,而扶绥及其周边县市约 60% 肝癌患者病理组织中可以检测到这种突变。所有的这些迹象均表明,AFB1 是该县肝癌发生重要的风险因素。

[0008] 本发明的目的是系统筛查 CYP1A2 基因的单核苷酸多态性 (SNP),并通过研究 CYP1A2 基因型与 CYP1A2 特异性的探针药物咖啡因代谢表型间的关系,研究中国人群中 CYP1A2 基因常见的多态与 CYP1A2 体内活性的关系,最后通过病例-对照研究,研究 CYP1A2 的遗传多态性与我国肝癌高发区广西壮族自治区扶绥县肝癌遗传易感性的关系。

发明内容

[0009] 发明人系统筛查了 CYP1A2 基因的 SNP,继而考察了 CYP1A2 基因的 G-3113A、G-3113A 和 T5347C 多态位点与 CYP1A2 体内活性的关系,以及 CYP1A2 多态位点 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 与我国广西壮族自治区扶绥县肝癌遗传易感性的关系。通过基于探针药物的 CYP1A2 基因型与表型关系的研究,鉴定了 CYP1A2-3113A 等位基因与 CYP1A2 体内低酶活性相关,通过病例-对照研究,判明 -3860 位为 GG 基因型同时在 -3113 和 5347 位分别为 GG 和 CC 基因型 (或基因型为 CYP1A2-3860G/-3113G/5347C 单倍型纯合子) 的个体具有更高的肝癌易感性。因此本发明鉴定了与 CYP1A2 体内低酶活性或药物低代谢能力相关的 CYP1A2SNP 位点,以及肝癌高发区肝癌的一种新的易感基因和易感基因型。

[0010] 本发明还提供了一种检测与药物代谢能力和肝癌易感性相关的基因 CYP1A2SNP 位点 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 的基因分型方法,该方法为聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法。

[0011] 本发明还提供了一种通过检测 CYP1A2G-3113A 位点的基因型来判定个体对经由 CYP1A2 代谢的药物代谢能力是否降低的方法。

[0012] 本发明还提供了同时对与肝癌易感性相关联的基因 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 三个多态位点进行检测,以判定个体是否对肝癌易感的检测方法。

[0013] 本发明还提供了用于检测 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 三个 SNP 位点基因型的引物共 6 条。

[0014] 本发明进一步提供了一种检测与药物代谢能力和肝癌易感性相关联的基因的 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 多态位点基因分型的试剂盒,以及上述试剂盒在人群药物代谢能力检测、肝癌高危个体早期筛查和化学预防中的应用。

[0015] 一、如上所述,本发明提供了一种检测与药物代谢能力和肝癌易感性相关联的基因 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C SNP 位点基因型的方法,该方法为 PCR-RFLP 法。具体的说,包括了如下步骤:

[0016] 1) 对 CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 多态位点所在基因组区域设计基因序列特异性引物,并对样本基因组 DNA 进行 PCR 扩增;

[0017] 2) 对 G-3860A 位点、G-3113A 位点和 T5347C 位点的 PCR 产物分别以限制性内切酶 BseLI、HpyCHIV (或其同功酶 Tai I) 和 Eco57I 进行切割,并以琼脂糖凝胶电泳分析内切酶消化后产物的带型,以此判明 CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 多态位点的基因型。

[0018] 二、本发明还提供了与药物代谢能力降低相关联的 CYP1A2SNP 位点,即携带 CYP1A2-3113A 等位基因的个体 CYP1A2 的体内活性和药物代谢能力降低。并提供了一种通过检测 CYP1A2 基因 G-3113A 位点的基因型来判定个体对经由 CYP1A2 代谢的药物其药物代谢能力是否降低的方法。该方法包括:

[0019] 1) 对 CYP1A2 基因 G-3113A 位点所在基因组区域设计基因序列特异性引物,并对样本基因组 DNA 进行 PCR 扩增;

[0020] 2) 对 G-3113A 位点 PCR 产物以限制性内切酶 HpyCHIV 或 Tai I 进行切割,并以琼脂糖凝胶电泳分析内切酶消化产物的带型,以此判明 CYP1A2 基因 G-3113A 位点的基因型。

[0021] 3) 当在某一个体携带 CYP1A2-3113A 等位基因时,该个体体内 CYP1A2 的活性可能降低,而对经由 CYP1A2 代谢的药物的代谢能力可能下降。

[0022] 三、另一方面,本发明还提供了与高发区肝癌遗传易感性相关联的一个易感基因型,即 CYP1A2-3860G/-3113G/5347C 单倍型纯合子基因型为肝癌高发区肝癌的易感基因型。并提供了一种通过检测 CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点的基因型来判定人群或个体对肝癌是否易感的方法。该方法包括:

[0023] 1) 对 CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 多态位点所在基因组区域设计基因序列特异性引物,并对样本基因组 DNA 进行 PCR 扩增;

[0024] 2) 对 G-3860A 位点、G-3113A 位点和 T5347C 位点 PCR 产物分别以限制性内切酶 BseLI、HpyCHIV 或 Tai I 和 Eco57I 进行切割,并以琼脂糖凝胶电泳分析内切酶消化产物的带型,以此判明 CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 多态位点的基因型。

[0025] 3) 当在肝癌高发区某一个体 CYP1A2 的基因型表现为 -3860G/-3113G/5347C 单倍型纯合子基因型,或 -3860 位点为 GG 基因型同时在 -3113 和 5347 位点分别为 GG 和 CC 基因型时,该个体患肝癌的可能性更大。

[0026] 四、检测 CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型的特异性引物对的序列分别为:

[0027] 1) CYP1A2G-3860A 位点:正向引物见序列表中序列 1;反向引物见序列表中序列 2

[0028] 2) CYP1A2G-3113A 位点:正向引物见序列表中序列 3;反向引物见序列表中序列 4

[0029] 3) CYP1A2T5347C 位点 : 正向引物见序列表中序列 5 ; 反向引物见序列表中序列 6

[0030] 五、本发明进一步提供了一种用于检测与药物代谢能力和肝癌遗传易感性相关的基因 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型的试剂盒, 其内装有一个或多个容器, 容器内装有用以检测 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型的一种或多种组分。与之同时提供的可以是经政府食品与药品监督管理部门审核的、有关药品或生物制品制造、使用及销售方面的信息。例如, 在 DNA 的 PCR 扩增方法实施中, 直接检测样品的 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型的试剂盒, 含有 PCR 的引物对 (共 3 对), dNTP, 用于 PCR 反应的 DNA 聚合酶及其缓冲液等。本领域技术人员已知, 以上的组分仅是示意性的, 所述用于 PCR 反应的 DNA 聚合酶可以是 Taq DNA 聚合酶, 例如, Ex Taq DNA 聚合酶、HotStar Taq 酶 Klenow 片段、Tth DNA 聚合酶和 VENT DNA 聚合酶等能够用于 PCR 扩增的酶。在 PCR 产物的 RFLP 分析中, 该试剂盒可含有 BseI I、HpyCHIV (或 Tai I) 和 Eco57I 内切酶及其缓冲液, 显示 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型的 BseI I、HpyCHIV (或 Tai I) 和 Eco57I 酶切图谱等。

[0031] 使用方法说明如下 :

[0032] 1) PCR 扩增

[0033] 对样品基因组 DNA (具体制备方法参见实施例 1), 用本发明提供的引物, 按照如下反应体系和条件进行 PCR 扩增 : 15 μ l 反应体系, 其中包括 20 ~ 100ng 基因组 DNA, 正向和反向引物各 0.2 μ M, 0.2mM dNTP, 0.5U Ex Taq DNA 聚合酶以及 1 $\times$ 缓冲液 (TaKaRa, 含 1.5mM MgCl₂)。95 $^{\circ}$ C 2min 预变性后进行 2 个阶段的 PCR 扩增, 两个阶段的变性和延伸条件一致, 均为 94 $^{\circ}$ C 30s 和 72 $^{\circ}$ C 40s, 在第一阶段的 13 个循环中, 退火温度从 62.0 $^{\circ}$ C 开始每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C, 第二阶段扩增的退火温度则固定在 55.5 $^{\circ}$ C, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。特异性 PCR 产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点 PCR 产物大小分别为 590bp、488bp 和 438bp。

[0034] 2) RFLP 分析

[0035] 对上述经琼脂糖凝胶电泳鉴定的 PCR 产物, 在 10 μ l 反应体系中进行限制性内切酶切割消化。对于 G-3860A 位点, 3 μ l PCR 产物, 1.5U BseI I, 1 μ l 10 $\times$ 缓冲液和双蒸馏水, 55 $^{\circ}$ C 恒温过夜。限制性酶切反应终止后, 将酶切产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察, 从而进行基因型读取和判定。基因型区分的依据是 : 590bp 的 PCR 产物以 BseI I 限制性内切酶消化后, G/G 基因型被切成生成长度分别为 370bp 和 220bp 的两个片段, 而 AA 基因型因为不含 BseI I 酶切位点, 因此酶切后只出现 590bp 一个条带, A/G 基因型 590bp、370bp 和 220bp 三个条带均出现 (电泳图详见说明书附图 1)。对于 G-3113A 位点, 3 μ l PCR 产物, 1.5U HpyCHIV 或 Tai I, 1 μ l 10 $\times$ 缓冲液和双蒸馏水, 37 $^{\circ}$ C (Tai I 为 65 $^{\circ}$ C) 恒温过夜。限制性酶切反应终止后, 将酶切产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察, 从而进行基因型读取和判定。基因型区分的依据是 : 488bp 的 PCR 产物以 HpyCHIV 或 Tai I 限制性内切酶消化后, G/G 基因型被切成生成长度分别为 318bp 和 170bp 的两个片段, 而 AA 基因型因为不含 HpyCH IV (或 Tai I) 酶切位点, 因此酶切后只出现 488bp 一个条带, A/G 基因型 488bp、318bp 和 170bp 三个条带均出现 (电泳图详见说明书附图 2)。对于 T5347C 位点, 3 μ l PCR 产物, 1.5U Eco57I, 1 μ l 10 $\times$ 缓冲液和双蒸馏水, 37 $^{\circ}$ C 恒温过夜。限制性酶切反应终止后, 将酶切产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染

色,紫外灯下观察,从而进行基因型读取和判定。基因型区分的依据是:438bp 的 PCR 产物以 Eco57I 限制性内切酶消化后,C/C 基因型被切成生成长度分别为 325bp 和 113bp 的两个片段,而 TT 基因型因为不含 Eco57I 酶切位点,因此酶切后只出现 438bp 一个片段,C/T 基因型 438bp、325bp 和 113bp 三个片段均出现(电泳图详见说明书附图 3)。

[0036] 五、本发明还提供了与药物代谢能力和肝癌易感性相关联的基因 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 多态位点的检测方法及其在药物代谢和肝癌高发区人群肝癌高危个体早期筛查和化学预防中的应用。例如,由于本发明证实了 CYP1A2 基因 G-3113 位点多态与 CYP1A2 体内低酶活性和药物代谢能力相关联,而单倍型 -3860G/-3113G/5347C 纯合子基因型与高发区肝癌患病风险的增高有关。因此,在临床应用经由 CYP1A2 代谢的药物进行治疗时,需根据 G-3113A 位点的基因型调整用药剂量,从而达到减少毒副作用发生、提高药物疗效的目的;而在肝癌高发区肝癌的预防和控制中,就需对所咨询对象 CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 三个 SNP 位点的基因型同时进行分析,以判断该对象是否携带与肝癌易感性增高相关的基因型 -3860G/-3113G/5347C 单倍型纯合子基因型。对基因型为 CYP1A2-3860G/-3113G/5347C 单倍型纯合子(表现为对肝癌具有更高的易感性)的个体,则可对之进行科学的干预,包括早期和定期进行肝癌筛查、并采取化学预防等措施,这样可以针对性地降低肝癌高发区这些易感人群的肝癌风险。

附图说明

[0037] 图 1. 限制性内切酶 BseI I(购自 NEB 公司)消化 G-3860A 位点 590bp PCR 扩增产物的电泳图谱。其中,泳道 1、3、4、6 和 8(自左向右):G/G 基因型酶切鉴定的结果,PCR 产物被切割为长度分别为 370bp 和 220bp 的两个条带;泳道 2:A/G 基因型酶切鉴定的结果,出现长度分别为 590bp、370bp 和 220bp 的三个条带;泳道 5 和 7:A/A 基因型酶切鉴定的结果,只出现长度为 590bp 的一个条带,泳道 9 为标准分子量参照物 DL2000(购自 TaKaRa 公司)。

[0038] 图 2. 限制性内切酶 HpyCHIV(购自 NEB 公司)消化 G-3113A 位点 488bp PCR 扩增产物的电泳图谱。其中,泳道 1 和 4-8(自左向右):G/G 基因型酶切鉴定的结果,PCR 产物被切割为长度分别为 318bp 和 170bp 的两个条带;泳道 3:A/G 基因型酶切鉴定的结果,出现长度分别为 488bp、318bp 和 170bp 的三个条带;泳道 2:A/A 基因型酶切鉴定的结果,只出现长度为 488bp 的一个条带,泳道 9 为标准分子量参照物 DL2000。

[0039] 图 3. 限制性内切酶 Eco57I(购自 NEB 公司)消化 T5347C 位点 438bp PCR 扩增产物的电泳图谱。其中,泳道 1、2、5 和 7(自左向右):C/C 基因型酶切鉴定的结果,PCR 产物被切割为长度分别为 325bp 和 113bp 的两个条带;泳道 2:C/T 基因型酶切鉴定的结果,出现长度分别为 438bp、325bp 和 113bp 三个条带;泳道 5 和 7:T/T 基因型酶切鉴定的结果,只出现长度为 438bp 的一个条带,泳道 9 为标准分子量参照物 DL2000。

[0040] 实施例

[0041] 实施例 1

[0042] 该实施例设计并合成了一套引物对,并且在该引物对的基础上,设计了一种检测与药物代谢能力和肝癌易感性相关联的基因 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 三个 SNP 位点基因型的方法。

[0043] 1、基因组 DNA 的提取

[0044] 采取本领域常规的 Miller 改良盐析法提取外周血白细胞基因组 DNA。

[0045] 1) 取柠檬酸钠或 EDTA- Na_2 抗凝全血 5ml (尽量不用肝素抗凝), 置于 50ml 有盖离心管 ;

[0046] 2) 加入 3-5 倍体积冷蒸馏水, 反复颠倒混匀, 冰中放置 5 分钟, 4℃ 2000rpm 离心 20 分钟 ;

[0047] 3) 缓慢倾倒上清, 沉淀加入冰预冷的 0.1% Triton-X100 (体积同上), 轻柔混匀沉淀, 如上离心, 弃上清 ;

[0048] 4) 沉淀加入 4ml 裂解液 (50mM Tris-Cl-10mM EDTA, pH8.0), 彻底打碎沉淀, 然后加入 10% SDS 至终浓度为 0.5%, 混匀 ;

[0049] 5) 加入蛋白酶 K (10mg/ml) 至终浓度为 200 μ g/ml, 混匀, 55℃ 3 小时或 37℃ 过夜消化 (以过夜消化为佳);

[0050] 6) 加入 6M NaCl 1.2ml, 剧烈振荡 20 秒, 2, 200rpm 离心 10 分钟, 将上清转移至另一个有盖离心管 ;

[0051] 7) 加入 2 倍体积冰预冷无水乙醇, 反复颠倒混匀至出现絮状 DNA 沉淀, 挑出 DNA 沉淀至另一 Eppendorf 管 ;

[0052] 8) 以冰预冷的 75% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次 ;

[0053] 9) 以 0.5ml TE (10mM Tris-Cl-EDTA, pH8.0) 溶解 DNA 沉淀, 电泳检测 DNA 片段大小, 或测定 260/280nm OD 比值和 DNA 的浓度。

[0054] 2、PCR 扩增

[0055] 用本发明提供的引物, 按照如下反应体系和条件进行 PCR 扩增 : 15 μ l 反应体系为 : 20 ~ 100ng 基因组 DNA, 正向引物和反向引物各 0.2 μ M, 0.2mM dNTP, 0.5U Ex Taq DNA 聚合酶以及 1 $\times$ 缓冲液 (TaKaRa, 含 1.5mM MgCl_2)。95℃ 2min 预变性后进行 2 个阶段的扩增, 两个阶段的变性和延伸条件一致, 均为 94℃ 30s 和 72℃ 50s, 在第一阶段的 13 个循环中, 退火温度从 62.0℃ 开始每个循环降 0.5℃, 第二阶段扩增的退火温度则固定在 55.5℃。最后在 72℃ 延伸 7min。特异性 PCR 产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点 PCR 产物大小分别为 590bp、488bp 和 438bp。

[0056] 3、RFLP 分析

[0057] 对上述经琼脂糖凝胶电泳鉴定的 PCR 产物, 在 10 μ l 反应体系中分别用如下条件进行限制性内切酶切割消化 : 对于 G-3860A 位点, 3 μ l PCR 产物, 1.5U BseI I, 1 μ l 10 $\times$ 缓冲液和双蒸馏水, 55℃ 恒温过夜。限制性酶切反应终止后, 将酶切产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察, 从而进行基因型读取和判定。基因型区分的依据是 : 590bp 的 PCR 产物以 BseI I 限制性内切酶消化后, G/G 基因型被切成生成长度分别为 370bp 和 220bp 的两个片段, 而 AA 基因型因为不含 BseI I 酶切位点, 因此酶切后只出现 590bp 一个条带, A/G 基因型 590bp、370bp 和 220bp 三个条带均出现 (电泳图详见说明书附图 1)。对于 G-3113A 位点, 3 μ l PCR 产物, 1.5U HpyCHIV (或 Tai I), 1 μ l 10 $\times$ 缓冲液和双蒸馏水, 37℃ (TaiI 内切酶为 65℃) 恒温过夜。限制性酶切反应终止后, 将酶切产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察, 从而进行基因型读取和判定。基因型区分的依据是 : 488bp 的 PCR 产物以 HpyCH IV (或 Tai I) 限制性内切酶消化后, G/G 基因型被切成生

成长度分别为 318bp 和 170bp 的两个片段,而 AA 基因型因为不含 HpyCHIV(或 Tai I) 酶切位点,因此酶切后只出现 488bp 一个条带,A/G 基因型 488bp、318bp 和 170bp 三个条带均出现(电泳图详见说明书附图 2)。对于 T5347C 位点,3 μ l PCR 产物,1.5U Eco57I,1 μ l 110 $\times$ 缓冲液和双蒸馏水,37 $^{\circ}$ C 恒温过夜。限制性酶切反应终止后,将酶切产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,紫外灯下观察,从而进行基因型读取和判定。基因型区分的依据是: 438bp 的 PCR 产物以 Eco57I 限制性内切酶消化后,C/C 基因型被切成生成长度分别为 325bp 和 113bp 的两个片段,而 TT 基因型因为不含 Eco57I 酶切位点,因此酶切后只出现 438bp 一个片段,C/T 基因型 438bp、325bp 和 113bp 三个片段均出现。

[0058] 实施例 2

[0059] 该实施例应用实施例 1 建立起来的方法,在 419 名健康的中国人群中 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点进行了基因分型,并观察了三个位点的基因型与血浆咖啡因代谢比值或 CYP1A2 体内活性之间的关系。

[0060] 1. 试验对象:

[0061] 419 名(男性 237 名,女性 182) 年龄为 18 ~ 33 岁(平均年龄 20 $\pm$ 2 岁)的健康受试者参与了本试验。所有的受试者均为中南大学的在校学生。所有受试者均为非吸烟个体,在进行咖啡因代谢率检测前 1 周之内未曾摄入咖啡、茶、可口可乐、巧克力以及其它含咖啡因的饮料。同时,所有的受试者试验前 1 周之内未曾服用任何药物,包括避孕药。整个实验过程按照国家人类基因组研究伦理学准则进行,并获得了所有受试者的知情同意。

[0062] 2. 受试者 CYP1A2 体内活性的测定

[0063] 以咖啡因为探针药物,对所有受试者 CYP1A2 的体内活性进行测定。受试者晨起(7:00 ~ 8:00Am) 空腹口服咖啡因胶囊 100mg。分别在服药前(0 小时)和服药后 5 小时抽取静脉血 5ml,用 EDTA 抗凝。离心分离血浆和血细胞,并保存于 -20 $^{\circ}$ C,分别用于进行咖啡因代谢表型的测定和 DNA 的提取。应用高效液相色谱-紫外检测法对血浆中咖啡因(137X) 及其代谢产物 1,7-二甲基黄嘌呤(17X) 的浓度进行测定。具体方法为,0.5ml 待测血浆中加入 80 μ M 的 β -羟乙基茶碱(作为内标)100 μ l 和 300mg 硫酸胺,然后加入 5ml 氯仿:异丙醇(体积:体积,9:1),振荡 2 分钟后于 2000g 离心 5 分钟,取下层有机相于 37 $^{\circ}$ C 在氮气下挥干,50 μ l 流动相重新溶解,取 20 μ l 上色谱柱。高效液相色谱系统包括 Agilent1100 系列、C18 色谱柱(250mm X4mm,颗粒直径为 5 μ m)。流动相的组成包括甲醇(A)、0.05% 的醋酸(B) 和乙腈(C)。采用梯度洗脱的方式进行洗脱,洗出条件为:0-8 分钟 A:B:C 的体积比为 10:82:8,流速为 0.75ml/min;8-12 分钟 A:B:C 的体积比为 10:78:12,流速为 1ml/min,柱温恒定在 45 $^{\circ}$ C。紫外检测的波长为 282nm。以口服咖啡因 100mg 后第 5h 血浆 17X 与 137X 浓度比值的对数值作为反应 CYP1A2 体内活性的指标。

[0064] 3. CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型的确定及三个 SNP 位点的基因型与 CYP1A2 体内活性的关系

[0065] 419 个健康中国人群中 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型的分布情况如表 1 所示。应用方差分析的统计学分析结果表明,CYP1A2G-3113A 位点不同基因型间血浆中咖啡因的代谢比值或 CYP1A2 的体内活性存在显著的差异,主要表现为该位点携带 -3113A 等位基因的个体 CYP1A2 的体内活性显著降低。因此,本发明的方法鉴定了 CYP1A2 基因的 G-3113A 位点与 CYP1A2 低体内酶活性相关。

[0066] 表 1. 中国人群 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型与 CYP1A2 体内活性的关系

[0067]

多态位点	基因型	例数 (%) ^a	Lg(17X/137X)	P值
G-3860A	G/G	256 (61.5)	-0.29 ± 0.16 ^b	0.176
	A/G	140 (33.7)	-0.29 ± 0.15 ^c	
	A/A	20 (4.8)	-0.36 ± 0.16	
G-3113A	G/G	332 (80.2)	-0.29 ± 0.16 ^d	0.038
	A/G	79 (19.1)	-0.32 ± 0.16 ^e	
	A/A	3 (0.7)	-0.45 ± 0.05	
C5347T	C/C	302 (72.9)	-0.30 ± 0.16	0.068
	C/T	104 (25.1)	-0.28 ± 0.15	
	T/T	8 (1.9)	-0.19 ± 0.15 ^f	

[0068] ^a由于PCR失败,每个位点总人数少于419;与相应的GG基因型相比较,^bp = 0.064,^cp = 0.078;与相应的AA基因型相比较,^dp = 0.036,^ep = 0.096;与相应的CC基因型相比较,^fp = 0.052。

[0069] 实施例 3

[0070] 该实施例应用实施例 1 建立起来的方法,对来自广西壮族自治区扶绥县及其周边县市的 431 例肝癌患者和 550 例对照 DNA 标本 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型和单倍型组合基因型进行了分析。

[0071] 1、试验对象:

[0072] 自 2003 年 6 月至 2004 年 12 月,我们在扶绥县肝癌研究所和广西壮族自治区肿瘤医院(距扶绥县城约 40 公里)收集了肝癌病例标本共计 431 例。广西壮族自治区肿瘤医院的大部分病例来自扶绥县及周边县市。肝癌病例的诊断依据包括:89 例(20.6%)经组织病理确诊,247 例(57.3%)为影像学诊断(B 超检查和/或 CT 扫描)阳性同时伴有血清甲胎蛋白升高,95 例(22.0%)为影像学诊断(B 超检查和 CT 扫描同时阳性)并结合临床症状。同时,在该县及邻县多个村庄中收集到无血缘关系的志愿者外周血标本 550 例,性别比例为 1:4(女:男)。考虑到 HBV 感染是该地区肝癌高发重要的风险因素之一,为使病例组和对照组在 HBV 暴露方面尽量匹配,在对照标本的收集过程中,我们从另一肝癌早期筛查的项目中已确定为血清 HBsAg 阳性的志愿者中随机选取了部分个体作为对照。对照组受试者的入选标准包括:(a) 经 B 超检查和血清甲胎蛋白检查排除了肝癌;(b) 没有任何组织类型肿瘤病史。同时,我们对所有的病例和对照标本血清中 HBV 感染标志物(包括 HBsAg、HBsAb、HbeAg、HbeAb 和 HBcAb)、丙肝抗体(anti-HCV)、谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)和谷草转氨酶(Aspartate Transaminase, AST)进行了测定。通过调查问卷,对所有受试者的性别、入选或肝癌诊断时的年龄、吸烟、饮酒史和一级亲属肝癌家族史等进行了登记。样本收集过程按照国家人类基因组研究伦理学准则进行,并获得了所有被募集对象的知情同意。

[0073] 2. CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 三个位点构成的单倍型组合基因型的确定

[0074] 对 431 例肝癌病例和 550 例对照人群 CYP1A2 基因 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 三

个 SNP 位点的基因型数据,用软件 Phase2.0 进行单倍型的构建,确定每个个体的单倍型组合基因型。431 例肝癌病例和 550 例对照人群 CYP1A2 基因由 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 多态位点基因型构成的单倍型组合基因型的频率分布如表 2 所示。在所有的病例和对照标本中,病例组单倍型 -3860G/-3113G/5347C 纯合子基因型的频率显著高于对照组(病例组和对照组中该基因型的频率分别为 19.7%和 14.8%,OR 值为 1.65, $P = 0.014$);在血清 HBsAg 阴性人群中,病例组和对照组中单倍型 -3860G/-3113G/5347C 纯合子基因型的频率存在显著的差异(病例组和对照组中该基因型的频率分别为 25.6%和 13.5%,OR 值为 2.69, $P = 0.002$);在吸烟人群中,病例组和对照组中单倍型 -3860G/-3113G/5347C 纯合子基因型的频率存在显著的差异(病例组和对照组中该基因型的频率分别为 20.6%和 14.4%,OR 值为 2.00, $P = 0.017$)。因此,用本发明的方法解析了 CYP1A2 基因由 G-3860A、G-3113A 和 T5347C 多态位点构成的单倍型组合基因型与肝癌高发区肝癌的易感性的相关性,尤其是在血清 HBsAg 阴性人群和吸烟人群中与肝癌的易感性的相关性。

[0075] 表 2. 肝癌病例组和对照组中 CYP1A2G-3860A、G-3113A 和 T5347C 位点基因型构成的单倍型组合基因型的分布

[0076]

单倍型组合基因型	病例组	对照组	OR 值 (95%CI)	P 值
所有个体 (n=966)				
其它单倍型组合	338 (80.3%)	462 (85.2%)	1.00 (Ref)	
-3860G/-3113G/5347C 纯合子	83 (19.7%)	80 (14.8%)	1.65 (1.11-2.46)	0.014
血清 HBsAg 阴性个体 (n=441)				
其它单倍型组合	64 (74.4%)	307 (86.5%)	1.00 (Reference)	
-3860G/-3113G/5347C 纯合子	22 (25.6%)	48 (13.5%)	2.69 (1.43-5.06)	0.002
血清 HBsAg 阳性个体 (n=522)				
其它单倍型组合	274 (81.2%)	155 (82.9%)	1.00 (Reference)	
-3860G/-3113G/5347C 纯合子	61 (18.2%)	32 (17.1%)	1.25 (0.75-2.09)	0.398
吸烟个体 (n=440)				
其它单倍型组合	135 (79.4%)	231 (85.6%)	1.00 (Reference)	
-3860G/-3113G/5347C 纯合子	35 (20.6%)	39 (14.4%)	2.00 (1.13-3.53)	0.017
不吸烟个体 (n=527)				
其它单倍型组合	207 (81.2%)	231 (84.9%)	1.00 (Reference)	
-3860G/-3113G/5347C 纯合子	48 (18.9%)	41 (15.1%)	1.40 (0.86-2.29)	0.177

[0078] CI:可信限。通过执行非条件 logistic 回归分析检测关联,并对性别、年龄、吸烟史的有或无(吸烟分层分析除外)、喝酒史的有或无、HBV 感染史的有或无(血清 HBsAg 携带状态分层分析除外)、HCV 感染史的有或无以及一级亲属肝癌家族史的有或无进行了校正。

[0079] 应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,但所作改动或修改的等价形式同样落在本申请权利书所限定的范围之内。

[0080] 参考文献

[0081] 1.Landi MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF. Human cytochrome P4501A2. IARC Sci Publ 1999 ;148 :173-195.

[0082] 2.Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5' -flanking region of human CYP1A2 gene :effect on the CYP1A2 inducibility in humans. J Biochem 1999 ;125 :803-808

[0083] 3. Obase Y, Shimoda T, Kawano T, Saeki S, Tomari SY, Mitsuta-Izaki K, Matsuse H, Kinoshita M, Kohno S. Polymorphisms in the CYP1A2 gene and theophylline metabolism in patients with asthma. Clin Pharmacol Ther 2003 ;73 :468-474.

[0084] 4. McGlynn KA, Rosvold EA, Lustbader ED, Hu Y, Clapper ML, Zhou T, et al. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 ;92 :2384-2387.

[0085] 5. Wang JS, Huang T, Su J, Liang F, Wei Z, Liang Y, et al. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui County, People ' s Republic of China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001 ;10 :143-146.

[0086] 6. Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. Cancer Research 1994 ;54 :101-108.

[0087] 7. Gallagher EP, Kunze KL, Stapleton PL, Eaton DL. The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. Toxicol Appl Pharmacol 1996 ;141 :595-606.

[0088] 8. Sun Z, Lu P, Gail MH, Pee D, Zhang Q, Ming L, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have detectable urinary aflatoxin metabolite M1. Hepatology 1999 ;30 :379-383.

[0089] 9. Guillouzo A. Inhibition of CYP1A2 and CYP3A4 by oltipraz results in reduction of aflatoxin B1 metabolism in human hepatocytes in primary culture. Cancer Res 1995 ;55 :5574-5579.

[0090]

序列表

[0091] <110> 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所

[0092] 中南大学药学院 广西壮族自治区肿瘤防治研究所

[0093] <120> 一种检测与药物代谢能力和肝癌易感性相关联的基因 CYP1A2 基因型的方法

[0094] <160>6

[0095] <210>1

[0096] <211>20

[0097]	<212>DNA	
[0098]	<213> 人工序列	
[0099]	<400>1	
[0100]		
	GAACACAACG GGACTTCTTG	20
[0101]	<210>2	
[0102]	<211>20	
[0103]	<212>DNA	
[0104]	<213> 人工序列	
[0105]	<400>2	
[0106]		
	GGATTACGCT CCTTCTCCTT	20
[0107]	<210>3	
[0108]	<211>20	
[0109]	<212>DNA	
[0110]	<213> 人工序列	
[0111]	<400>3	
[0112]		
	TCCCACCAAC AAACCATAAC	20
[0113]	<210>4	
[0114]	<211>20	
[0115]	<212>DNA	
[0116]	<213> 人工序列	
[0117]	<400>4	
[0118]		
	GGATCAACCT GTGAAGATGC	20
[0119]	<210>5	
[0120]	<211>20	
[0121]	<212>DNA	
[0122]	<213> 人工序列	
[0123]	<400>5	
[0124]		
	AGGTCCCATC TCCTCTGTTC	20
[0125]	<210>6	
[0126]	<211>20	
[0127]	<212>DNA	
[0128]	<213> 人工序列	
[0129]	<400>6	
[0130]		
	GCACTTGGCT AAAGCTGCTA	20

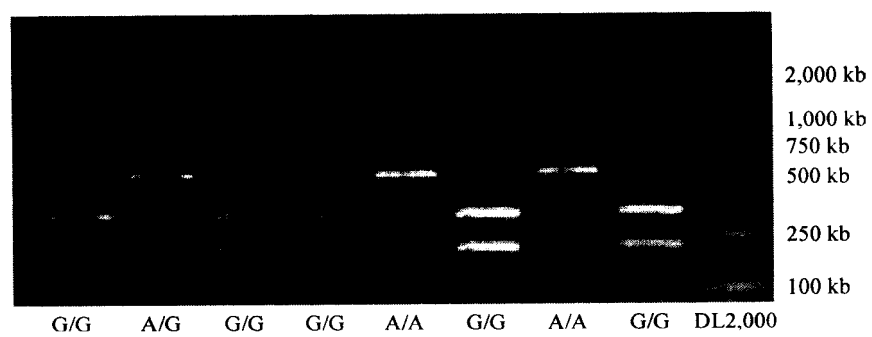


图 1

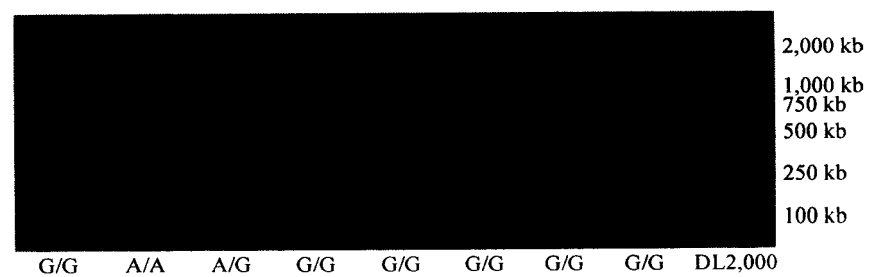


图 2

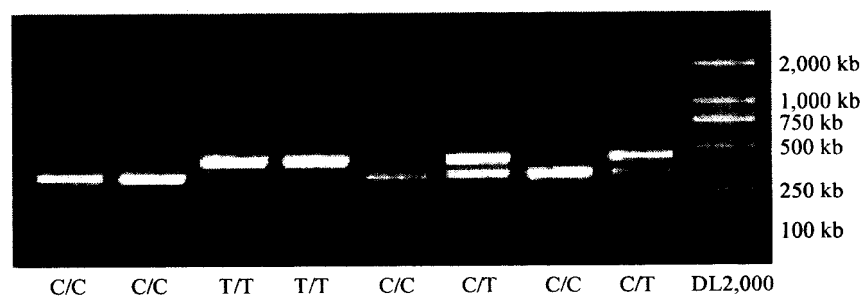


图 3