

## 检测 CYP2A6 基因多态性的 PCR 技术的基因型方法

胡春松<sup>1\*</sup>, 朱文玲<sup>2</sup>, 程晓曙<sup>1</sup>, 苏海<sup>1</sup>, 罗伟<sup>1</sup>, 洪均言<sup>1</sup>

(1. 江西医学院心血管病研究所, 江西 南昌 330006; 2. 中国医学科学院  
北京协和医院心内科, 北京 100730)

**摘要:** 综述检测 CYP2A6 基因多态性的 PCR 技术的基因型方法。CYP2A6 基因多态性存在于白种人、东方人及非洲裔美国人群中, 包括 CYP2A6 \* 1 至 CYP2A6 \* 12, 总共 12 个变异等位基因。本文列举了检测 CYP2A6 基因型的不同的 DNA 来源、引物和限制性内切酶。已开发 PCR 技术结合诊断性限制性内切酶分析 (RFLP) 如两步 PCR 和一步 PCR-RFLP 方法检测 CYP2A6 基因型。此外, 尚有 PCR-SSCP + RFLP 及直接 DNA 测序方法。

**关键词:** 基因, CYP2A6; 基因多态性; PCR; 基因型

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)03-0233-04

CYP2A 基因家族位于人体 19 号染色体长臂 19q12 和 19q13.2 之间, 约 350 kb 大小<sup>[1]</sup>。它包括 3 个完整基因: CYP2A6, CYP2A13 和 CYP2A7, 以及两个 CYP2A7 假基因。这些基因都具有含 9 个外显子的典型 CYP2A 基因亚族结构。CYP2A6 是一种肝细胞色素 P-450 酶, 它在许多外源物、一些药物和致癌物代谢中起重要作用。CYP2A6 基因多态性特征的最早资料源于体外小鼠模型的研究。1976 年 Kratz<sup>[2]</sup>、1977 年 Kapitulnik 等<sup>[3]</sup>和 1985 年 Pelkonen 等<sup>[4]</sup>分别报道了他们对人体研究的发现。应用香豆素为探针药物进一步研究发现, CYP2A6 基因存在遗传 (基因) 多态性<sup>[5,6]</sup>。人体肝脏 cDNA 克隆实验表明, 除了活性 CYP2A6 外, 存在失活 CYP2A6<sub>v</sub> 变异基因。迄今为止, CYP2A6 基因多态性存在于白种人 (西班牙、法国)、东方人 (日本人、朝鲜人和汉族人) 及非洲-裔美国人<sup>[7,8]</sup>。不同的突变机制如单个碱基变化、缺失和基因转复, 导致多态性等位基因的产生。

用基因型方法, 人们首次发现 CYP2A6 基因外显子 3 存在 2 个基因多态性<sup>[7]</sup>。此后, 相继开发了其他基因型方法。应用等位基因特异性 (allele-specific, AS) 聚合酶链反应 (PCR) 方法测定了不同人群 CYP2A6 基因型频率<sup>[9-11]</sup>。目前, 应用 PCR 基因型方法结合限制性酶片段长度多态性 (RFLP), 测定了导致消除或减少酶活性的不同等位基因变异。他们包括从 CYP2A6 \* 1 至 CYP2A6 \* 12 (完全或部分缺失), 共 12 个变

异等位基因<sup>[12-21]</sup>, 且通过测序其 PCR 产物外显子 3, 6 和 8, 进一步得到证实。然而, 应用已报道的几种不同基因型方法, 得出了 CYP2A6 多态性等位基因变异频率的矛盾结果<sup>[11,12,22]</sup>。

### 1 检测 CYP2A6 基因型材料

#### 1.1 DNA 来源

检测 CYP2A6 等位基因变异的基因组 DNA 源自几个不同种群表皮细胞、外周血 (白细胞) 等。

#### 1.2 引物

由于核苷酸序列高度同源, CYP2A 亚族存在不同基因: CYP2A6, CYP2A7 和 CYP2A13, 故需要特异的 CYP2A6 扩增体系。特异的 PCR 反应引物应位于 CYP2A6 基因的 5' 和 3' 端未粘合区。使其与 CYP2A7 和 CYP2A13 基因相应序列不同源, 也就是, 避免同时扩增 CYP2A13, CYP2A7 和 CYP2A7 假基因。

目前的研究中应用了下列引物 (表 1)。

#### 1.3 限制性酶

应用的限制性酶包括 DdeI, XcmI, MspI, BstNI, SacI, AccII 和 Eco81I。CYP2A6 \* 1 有两个 MspI 切点, 但 XcmI 或 DdeI 均不在扩增区域。CYP2A6 \* 2 有 1 个 XcmI 位点和 2 个 MspI 位点; CYP2A6 \* 3 有 1 个 DdeI 位点和一个 MspI 位点<sup>[8,24]</sup>。

### 2 方法

检测 CYP2A6 基因多态性有两步和一步 PCR-RFLP 方法。两步法由 Fernandez-Salguero 等<sup>[7]</sup>和 Oscarson 等<sup>[9]</sup>建立, 一步法由 Kitagawa 等<sup>[24]</sup>和 Chen 等<sup>[12]</sup>建立。近来, 作者采用 Rose 法提取基因组 DNA, 用改良的 PCR 方法 (“三个一致”) 建立了更简单、稳定和可靠的 CYP2A6<sup>[25]</sup>, PON1<sup>[26]</sup> 基因型方法。此外, 尚有 PCR-SSCP, RFLP 和直接 DNA 测序方法。

#### 2.1 两步 PCR-RFLP 方法

Fernandez-Salguero 等和 Gullsten 等<sup>[27]</sup>开发了一种 AS-PCR 扩增方法, 从人基因组 DNA 特异性检测到 CYP2A6 等位基因变异 (wt, v1 和 v2), 并避免了其他 CYP2A 亚簇基因的干扰。PCR 扩增含全长 CYP2A6 基因 7.8 kb 片段。经测序 7.8 kb PCR 产物, 结果与 CYP2A7 和 CYP2A13 基因比较, 以保证没有其他 CYP2A 基因被扩增。然后, 由 CYP2A6 特异的 7.8 kb PCR 片段再扩增单个外显子 3, PCR 产物用限制性内切酶 DdeI (检测 CYP2A6<sub>v2</sub>) 和 XcmI (检测 CYP2A6<sub>v1</sub>)。Oscarson 等开发了一种两步 PCR 方法。用于第一步 PCR 反应的引物位于外显子 1 和 4, 在个体间更显保守。此外, Oscarson 等<sup>[11]</sup>

来稿日期: 2003-05-20 接受日期: 2004-02-16

基金项目: 国家留学基金委员会资助项目 (98836007)

作者简介: 胡春松 (1968 -), 男, 江西进贤人, 医学硕士, 副主任医师, 副教授, 主要从事分子心脏病学研究。

\* 联系作者 E-mail: pinehu@hotmail.com Tel: (0791)8886026

表 1 目前用于研究 *CYP2A6* 基因的引物

引物	序列(5'-3')
V60-2A6F	5'-GAT CAG ATC TAA AAT GCT GGC CTC AGG GAT GCT TCT GGT GGC C-3'
V60-2A6F- * 5	5'-GAT CAG ATC TAA AAT GCT TCT GGT GGC CTT GCT G-3'
V60-2A6Rwt	5'-GAT CGG TAC CTC AGC GGG GCA GGA AGC TCA TG-3'
V60-2A6Rmut	5'-GAT CGG TAC CTC AGC GGG GCA GGA AGC TCA TGG TGT AGT TTC CTG GGA TCG TGG CAA AGA CCA CGT G-3'
2A6ex1F <sup>[9-11]</sup>	5'-GCT GAA CAC AGA GCA GAT GTA CA-3'
2A6ex4R <sup>[9-11]</sup>	5'-GGA GGT TGA CGT GAA CTG GAA GA-3'
2A6 * 2wt <sup>[9-11]</sup>	5'-CTC ATC GAC GCC CT-3'
2A6 * 2mut <sup>[9-11]</sup>	5'-CTC ATC GAC GCC CA-3'
2A6 * 3wt <sup>[9-11]</sup>	5'-GCT CCG GCG CTT CT-3'
2A6 * 3mut <sup>[9-11]</sup>	5'-GCT CCT GCG CTT TG-3'
2A6E3F <sup>[7]</sup>	5'-GCG TGG TAT TCA GCA ACG GG-3'
2A6E3R <sup>[7]</sup>	5'-TCG TCC TGG GTG TTT TCC TTC-3'
S2A6F1	5'-TGG CTG TGT CCC AAG CTA GGC A-3'
2A7F1	5'-TGG CTG TGT CCC AAG CTA GGT G-3'
2Aex7F <sup>[9-11]</sup>	5'-GAC CAA CAT GCC CTA CAT G-3'
2A6R1 <sup>[9-11]</sup>	5'-GCA CTT ATG TTT TGT GAG ACA TCA GAG ACA A-3'
2A7R1	5'-GCA CTT ATG TTT TGT GAG ACA TCA GAT AGA G-3'
2A6F4 <sup>[7]</sup>	5'-CCT CCC TTG CTG GCT GTG TCC CAA GCT AGG C-3'
2A6R4 <sup>[7]</sup>	5'-CGC CCC TTC CTT TCC GCC ATC CTG CCC CCA G-3'
2A6ex8F <sup>[9-11]</sup>	5'-CAC TTC CTG AAT GAG-3'
2A7ex8F <sup>[9-11]</sup>	5'-CAT TTC CTG GAT GAC-3'
2A6ex9F <sup>[15]</sup>	5'-CAC CTA AGG ACA TTG ACG TGT CCC-3'
2A6In9F <sup>[15]</sup>	5'-AAA AGG AGA TGA CGG CAC AGC-3'
2A6R2 <sup>[9-11]</sup>	5'-AAA ATG GGC ATG AAC GCC C-3'
2A6 * 5wt	5'-CCC CAA ACA CGT GGG-3'
2A6 * 5mut	5'-CCC CAA ACA CGT GGT-3'
2A6 * 1Bwt	5'-ACT GGG GGC AGG ATG GC-3'
2A6 * 1Bmut	5'-AAT GGG GGC AAG ATG CG-3'
2A6e3F <sup>[23]</sup>	5'-TAA CCT GAT CGA CTA GGC GTG GT-3'
2A6e3R <sup>[23]</sup>	5'-CAT CCC CAG GCA GAA CGC GC-3'
2A6Kd1F <sup>[17, 24]</sup>	5'-CCT GAT CGA CTA GGC GTG GTA-3'
2A6E3R <sup>[17, 24]</sup>	5'-TCG TCC TGG GTG TTT TCC TTC-3'
2A6F03 <sup>[12]</sup>	5'-CTG ATC GAC TAG GCG TGG TA-3'
2A6R06 <sup>[12]</sup>	5'-CGT CCT GG TGT TTT CCT TC-3'
2A6S1F <sup>[15]</sup>	5'-GAA GAG TAG TAA TAA TAG CAG-3'
2A6S2F <sup>[15]</sup>	5'-AGG GAC ACA ACG AGA CAT GA-3'
2A6S3F <sup>[15]</sup>	5'-GCA CAA TCC TTG AAA GAA GC-3'

开发了一种可靠的 PCR 方法,快速扫描一种新型遗传事件——CYP2A6 基因缺失。近来,Oscarson 等<sup>[10]</sup>用 PCR 基因型方法确认了两个新的失活 CYP2A6 等位基因,CYP2A6 \* 4D、CYP2A6 \* 5。

## 2.2 一步 PCR-RFLP 方法

Kitagawa 等<sup>[24]</sup>开发了一种简便、特异的 CYP2A6 基因型方法,采用一步 PCR 方法结合 RFLP 分析检测 CYP2A6 基因型。Chen 等<sup>[12]</sup>建立了一种简单、费效合理的一步 PCR 基因型方法,高度特异性地测定 CYP2A6 基因多态性。由于特异引物的特异性和有效性,该方法使精确地测定不同种族人群 CYP2A6 等位基因频率更加可行。结果表明,CYP2A6 等位基因频率更低。Fernandez-Salguero 方法需要 7.8 kb 大小以上 DNA 作模板进行第一步 PCR 扩增,而 Oscarson 方法只可检测 CYP2A6 \* 1 和 CYP2A6 \* 2,无法检测 CYP2A6 \* 3,但所得 CYP2A6 基因型和表现型之间有较好相关性。然而,按这两种 PCR 方法,经常出现无法预期的、非特异的产物,甚至假阳性结果。有时,由于同时扩增了 CYP2A7 基因,导致比一步 PCR 方法检测的等位基因频率更高。而且 Kitagawa 和 Chen 的一步 PCR 法使用的特异性引物 Kd1F/E3R 和 F03/R06,只扩增一个小片段(215 或 214 bp)。因此,可用以分析大量 DNA 样本。其方法省时,快速产生结果,且可避免意外产物出现。近来,Paschke 等<sup>[22]</sup>建立了一种新的一步 PCR-RFLP 基因型方法,并发现 CYP2A6 \* 2, CYP2A6 \* 3 等位基因频率均较以前其他方法检测报道的低。

## 2.3 PCR-SSCP 方法

Krause 等<sup>[23]</sup>用巢式 PCR-RFLP-SSCP 方法建立了限制性标准方法检测点突变和单个碱基替换,并评估了 SSCP 分析的作用、可行性和可靠性。巢式 PCR 采用 CYP2A6e3F/R,从 CYP2A6v2 基因序列中设计,使用的每对引物浓度为 300 nmol·L<sup>-1</sup>,退火温度为 60℃。结果在琼脂糖凝胶电泳中出现相同 PCR 产物,但 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)多出一条 DNA 带的机会较高,不干扰 201 bp PCR 产物的酶切分析。由于技术难度大,用改良巢式引物扩增的产物中被 Dde I 和 Xcm I 酶切,并用 PAGE 电泳分离出的标本只有 4 个。按这种方法,CYP2A6 基因多态性发生率分别是 wt/wt 95.8%,wt/mut 4.2%,mut/mut 0。SSCP 和 DGGE 直接比较表明,PCR-SSCP 方法的明显优势在于母本和变性样本可以肩并肩迁移,并直接比较。SSCP 分析可以像 DGGE 一样对结果进行相似的预测。另外,常规分析溴化乙锭(EB)染色的琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物足以确定 CYP 基因型。当 DNA 片段大小 < 200 bp,银染色 PAGE 则更有效。目前,作为一种简单的非活性方法,PCR-SSCP 分析广泛应用于各种目的,包括突变分析和检测基因多态性,而且同源扩增可能性小,且排除假阳性扩增。

## 2.4 其他基因型方法

其他 CYP2A6 基因型方法包括 PCR-BstNI-RFLP, SacI-RFLP, SphI-RFLP, AS-PCR, 长 PCR + 巢式 PCR<sup>[28]</sup>,以及直接 DNA 测序。此外,尚有非 PCR 方法如 Southern 印迹法。

## 3 结语

随着分子生物学技术的快速发展,应用 PCR 技术检测

CYP 基因多态性更加容易。不像表现型方法,CYP 基因型不受介导这些酶活性的药物或其他因素的影响<sup>[29]</sup>。因此,CYP2A6 基因多态性及其基因型方法有待于深入研究,以建立一种简单、稳定、可靠的分析法,进一步明确是否存在新的 CYP2A6 等位基因如 CYP2A6 \* 13, CYP2A6 \* 14, CYP2A6 \* 15,以及 CYP2A6 基因多态性与人类疾病如各种癌的相关性,尤其是与吸烟相关的心血管疾病如肺源性心脏病、高血压病、动脉硬化和冠心病的关系。

## 4 参考文献:

- [1] Miles JS, Bickmore W, Brook JD, McLaren AW, Meehan R, Wolf CR. Close linkage of the human cytochrome P450 II A and P450 II B gene subfamilies: implications for the assignment of substrate specificity[J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**(8):2907-2917.
- [2] Kratz F. Coumarin-7-hydroxylase activity in microsomes from needle biopsies of normal and diseased human liver[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1976, **10**(2):133-137.
- [3] Kapitulnik J, Popper PJ, Conney AH. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene and drugs in human liver[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1977, **21**(2):166-176.
- [4] Pelkonen O, Sotaniemi EA, Ahokas JT. Coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. Properties of the enzyme and inter-species comparisons[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1985, **19**(1):59-66.
- [5] Cholerton S, Idle ME, Vas A, Gonzalez FJ, Idle JR. Comparison of a novel thin-layer chromatographic-fluorescence detection method with a spectrofluorometric method for the determination of 7-hydroxycoumarin in human urine[J]. *J Chromatogr*, 1992, **575**(2):325-330.
- [6] Rautio A, Kraul H, Kojo A, Salmela E, Pelkonen O. Inter-individual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers [J]. *Pharmacogenetics*, 1992, **2**(5):227-233.
- [7] Fernandez-Salguero P, Hoffman SM, Cholerton S, Mohrenweiser H, Rautio H, Rautio A, et al. A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles[J]. *Am J Hum Genet*, 1995, **57**(3):651-660.
- [8] Miyamoto M, Umetsu Y, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H, et al. CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **261**(3):658-660.
- [9] Oscarson M, Gullsten H, Rautio A, Bernal ML, Sinues B, Dahl ML, et al. Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase[J]. *FEBS Lett*, 1998, **438**(3):201-205.
- [10] Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Agundez JA, Benitez J, Rautio A, et al. Identification and characterisation of novel polymorphisms in the CYP2A locus: implications for nicotine metabolism[J]. *FEBS Lett*, 1999, **460**(2):321-327.
- [11] Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Yue QY, Lang MA, Bernal ML, et al. Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a Chinese population[J]. *FEBS Lett*, 1999, **448**(1):105-110.
- [12] Chen GF, Tang YM, Green B, Lin DX, Guengerich FP, Daly AK, et al. Low frequency of CYP2A6 gene polymorphism as revealed by a one-step polymerase chain reaction method [J]. *Pharmacogenetics*, 1999, **9**(3):327-332.
- [13] Hadidi H, Zahlens K, Idle JR, Cholerton S. A single amino acid

- substitution (Leu160His) in cytochrome P450 *CYP2A6* causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin[J]. *Food Chem Toxicol*, 1997, **35**(9):903–907.
- [14] Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF. Nicotine metabolism defect reduces smoking[J]. *Nature*, 1998, **393**(6687):750.
- [15] Rao Y, Hoffmann E, Zia M, Bodin L, Zeman M, Sellers EM, *et al.* Duplications and defects in the *CYP2A6* gene: identification, genotyping, and *in vivo* effects on smoking[J]. *Mol Pharmacol*, 2000, **58**(4):747–755.
- [16] Ariyoshi N, Miyamoto M, Umetsu Y, Kunitoh H, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, *et al.* Genetic polymorphism of *CYP2A6* gene and tobacco-induced lung cancer risk in male smokers[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, **11**(9):890–894.
- [17] Kitagawa K, Kunugita N, Kitagawa M, Kawamoto T. *CYP2A6* \* 6, a novel polymorphism in cytochrome p450 2A6, has a single amino acid substitution (R128Q) that inactivates enzymatic activity[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(21):17830–17835.
- [18] Xu C, Rao YS, Xu B, Hoffmann E, Jones J, Sellers EM, *et al.* An *in vivo* pilot study characterizing the new *CYP2A6* \* 7, \* 8, and \* 10 alleles[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **290**(1):318–324.
- [19] Pitarque M, von Richter O, Oke B, Berkkan H, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M. Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the *CYP2A6* gene: impairment of its promoter activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **284**(2):455–460.
- [20] Daigo S, Takahashi Y, Fujieda M, Ariyoshi N, Yamazaki H, Koizumi W, *et al.* A novel mutant allele of the *CYP2A6* gene (*CYP2A6* \* 11) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype towards tegafur[J]. *Pharmacogenetics*, 2002, **12**(4):299–306.
- [21] Oscarson M, McLellan RA, Asp V, Ledesma M, Ruiz ML, Simues B, *et al.* Characterization of a novel *CYP2A7/CYP2A6* hybrid allele (*CYP2A6* \* 12) that causes reduced *CYP2A6* activity[J]. *Hum Mutat*, 2002, **20**(4):275–283.
- [22] Paschke T, Riefler M, Schuler-Metz A, Wolz L, Scherer G, McBride CM, *et al.* Comparison of cytochrome P450 2A6 polymorphism frequencies in Caucasians and African-Americans using a new one-step PCR-RFLP genotyping method[J]. *Toxicology*, 2001, **168**(3):259–268.
- [23] Krause G, Garganta F, Kosytorz P, Scherer G. Genotyping metabolic polymorphisms in a cohort of Caucasians and single strand conformation polymorphism analysis of point mutations in human hprt exons 7 and 8[J]. *Electrophoresis*, 1998, **19**(14):2380–2388.
- [24] Kitagawa K, Kunugita N, Katoh T, Yang M, Kawamoto T. The significance of the homozygous *CYP2A6* deletion on nicotine metabolism: a new genotyping method of *CYP2A6* using a single PCR-RFLP[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **262**(1):146–151.
- [25] Hu CS, Hong JY, Zhao YJ, Deng CJ. One step PCR-RFLP method for analysis of *CYP2A6* gene polymorphism[J]. *Acta Acad Med Jiangxi*, 2002, **42**(5):23–25.
- [26] Hu CS, Pan JM, Zhao YJ, Hong JY. A simple, stable and reliable method for analysis of paraoxonase 1 gene polymorphism[J]. *Acta Acad Med Jiangxi*, 2002, **42**(3):8–10.
- [27] Gullsten H, Agundez JA, Benitez J, Laara E, Ladero JM, Diaz-Rubio M, *et al.* *CYP2A6* gene polymorphism and risk of liver cancer and cirrhosis[J]. *Pharmacogenetics*, 1997, **7**(3):247–250.
- [28] Gu DF, Hinks LJ, Morton NE, Day IN. The use of long PCR to confirm three common alleles at the *CYP2A6* locus and the relationship between genotype and smoking habit[J]. *Ann Hum Genet*, 2000, **64**(Pt 5):383–390.
- [29] Hong JY, Yang CS. Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity[J]. *Environ Health Perspect*, 1997, **105**(Suppl 4):759–762.

## PCR-based genotyping methods for genetic polymorphism of *CYP2A6* gene

HU Chun-Song<sup>1\*</sup>, ZHU Wen-Ling<sup>2</sup>, CHENG Xiao-Shu<sup>1</sup>, SU Hai<sup>1</sup>, LUO Wei<sup>1</sup>, HONG Jun-Yan<sup>1</sup>

(1. Institute of Cardiovascular Disease, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China; 2. Department of Cardiology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

**Abstract:** To review PCR-based genotyping methods for genetic polymorphism of *CYP2A6* gene. Genetic polymorphism of *CYP2A6* has been found in Caucasians, Oriental and African-American population, which includes from *CYP2A6* \* 1 to *CYP2A6* \* 12, totally 12 variant alleles. In this article, different DNA source, primers and restriction enzymes for *CYP2A6* genotypes were reviewed. Protocols for identification of *CYP2A6* genotypes with PCR-based techniques combined with diagnostic restriction enzyme digestion such as two-step and one-step PCR-RFLP

methods have been developed. Besides, methods of PCR-SSCP combined with RFLP and direct DNA sequencing are also introduced.

**Key words:** gene, *CYP2A6*; genetic polymorphism; PCR; genotyping

**Foundation item:** The project supported by China Scholarship Council (98836007)

\* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)