

# 一种基于适配器连接介导的等位基因 特异性扩增法测定多重 SNP

汪维鹏<sup>1,2</sup>, 倪坤仪<sup>1</sup>, 周国华<sup>1,2</sup>

(1. 中国药科大学分析化学教研室, 南京 210038; 2. 华东医学生物技术研究所, 南京 210002)

**摘要:**建立了一种基于 DNA 适配器连接介导的等位基因特异性扩增法测定多重 SNP。以 *CYP2D6* 基因中的 5 个 SNP 位点(100C>T, 1661G>C, 1758G>T, 2470T>C 和 2850C>T)为例, 用 PCR 法预扩增得一段含所有待测 SNP 位点的长片段, 然后用限制性内切酶将其消化成短片段, 在连接酶的作用下与设计的 DNA 适配器(adapter)相连; 该适配器的一端与限制性内切酶降解后留下的粘性末端相同, 另一端带有一段公共序列。在两管中加入与适配器连接的片段作为 PCR 扩增模板, 并分别加入 SNP 特异性引物和一种适配器特异性的通用引物进行 PCR 扩增, 最后用凝胶电泳法分离 PCR 扩增产物。由于每管与 SNP 的两种特异性引物中的一种对应, 可以根据每管中扩增片段的大小判断 SNP 的类型。通过凝胶电泳法可以一次分离与 5 种 SNP 类型相对应的引物特异性延伸反应产物, 采用该法成功测定了 20 名健康中国人的 *CYP2D6* 基因中 5 个 SNP 位点的基因多态性, 与限制性片段长度多态性法(RFLP)测定结果完全一致。该方法采用  $n+1$  种引物( $n$  种 SNP 特异性引物和一种通用引物)进行  $n$  重 PCR 反应, 极大提高了 PCR 反应的特异性, 结果准确, 可用于同时测定多个 SNP 位点。

**关键词:** DNA 适配器; SNP; 多重 PCR; *CYP2D6*

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)02-0219-07

## Adapter-ligation Mediated Allele-specific Amplification (ALM-ASA) for Multiplex SNP Genotyping

WANG Wei-Peng<sup>1,2</sup>, NI Kun-Yi<sup>1</sup>, ZHOU Guo-Hua<sup>1,2</sup>

(1. Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China;

2. Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China)

**Abstract:** To establish adapter-ligation mediated allele-specific amplification ("ALM-ASA" for short) for multiplex SNP genotyping, five SNPs, 100C>T, 1661G>C, 1758G>T, 2470T>C and 2850C>T in *CYP2D6* gene were used as an example for evaluating the method. Firstly, a preamplification was carried out for producing a long target containing all SNPs of interest. Secondly, the preamplified DNA fragments were digested with a restriction endonuclease to form sticky ends. Thirdly, an adapter was ligated to either end of the digested fragment. One end of the adapter was designed as a sequence sticky to the ends of the enzymatically digested fragments, and the other end had a common sequence. Fourthly, an allele-specific amplification was performed by allele-specific primers and a universal primer in one tube by using the adapter-ligated fragments as templates. Finally, the allele-specific amplification products were separated by agarose gel electrophoresis. Because each tube corresponds to one kind of allele-specific primers, the

收稿日期: 2005-08-03; 修回日期: 2005-11-09

基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 30270368)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30270368)]

作者简介: 汪维鹏(1980—), 男, 博士研究生, 研究方向: 分子遗传学。Tel/Fax: 025-84514223; E-mail: wpwang@126.com

通讯作者: 周国华(1964—), 男, 研究员, 中国药科大学兼职教授, 研究方向: 分子遗传学。Tel/Fax: 025-84514223; E-mail: ghzhou@public1.ptt.

genotype of an SNP can be easily discriminated by the length of the amplified products in each tube. The products of 5-plex allele-specific amplification can be separated by agarose gel electrophoresis. Five SNPs in the *CYP2D6* gene were successfully typed for 20 healthy Mainland Chinese and the results were in agreement with those by RFLP. By ALM-ASA,  $n + 1$  primers ( $n$  SNP allele-specific primers and a universal primer) can be used for an  $n$ -plex PCR amplification; the specificity of PCR is thus enhanced significantly. It is concluded that ALM-ASA can be used for typing multiple SNPs simultaneously.

**Key words:** DNA adapter; SNP; multiplex PCR; *CYP2D6*

随着人类基因组计划的完成,我们的工作重点已从基因组结构的分析转向寻找基因的结构与人类疾病易感性及药物敏感性的关系,力争发现与疾病发生、发展相关的基因多态性标志位点,在疾病发生之前通过改进生活习惯和注意保健来延迟或阻止疾病的发生。同样,现有市售药物不是适用于所有人群,如果能找到不同遗传背景的人与药物毒副作用的关系,则可以真正实现个体化给药,提高药物疗效和降低药物不良反应。因此单核苷酸多态性(SNP)是后基因组计划中的主要内容之一。SNP的数量极其庞大<sup>[1]</sup>,发展一种高通量、快速和低成本的方法十分必要。目前报道的SNP检测方法有很多,按照原理分主要包括:特异性引物延伸反应法(allele-specific primer extension reaction)<sup>[2]</sup>;特异性引物杂交法(allele-specific hybridization)<sup>[3]</sup>;合成测序法(sequencing-by-synthesis)<sup>[4]</sup>;等位基因特异性连接法(allele-specific ligation)<sup>[5]</sup>;结构特异性酶切法等(structure-specific cleavage)<sup>[6]</sup>,并建立了基于质谱仪<sup>[7]</sup>、芯片<sup>[8]</sup>、微球阵列检测仪<sup>[9]</sup>等各种高通量检测平台。这些方法各有优缺点,但其价格通常都很昂贵,限制了普通实验室的广泛使用。我们建立了一种基于适配器连接介导的等位基因特异性扩增的多重SNP测定方法(Adapter Ligation-mediated Allele-specific Amplification,简称ALM-ASA法),这种方法可以同时准确测定多个SNP位点。由于细胞色素P<sub>450</sub>2D6(*CYP2D6*)是体内最重要肝药酶之一,参与30多种常用药物代谢,是药物基因组学的主要研究基因之一<sup>[10~12]</sup>,本文以*CYP2D6*基因中的5个SNP位点为测定对象,进行了多个SNP位点同时测定的方法学研究。

## 1 ALM-ASA法同时测定多重SNP的原理

如图1所示,假设某段基因组DNA上有2个待

检测SNP位点(杂合子C/T和野生型纯合子G/G),设计一对外引物,预扩增得到包含这2个SNP位点的片段;利用限制性内切酶,如Mbo I(切点序列为:5'-GATC-3'),将预扩增片段切成多段两端含有粘性末端的DNA短片段后,加入一个由两条链组成的DNA适配器(其一端为含有酶切切口的粘性末端,另一端为分叉型结构,5'端的不互补部分链较长,含24个碱基,记为“adapter长臂”),在连接酶的作用下,DNA短片段与adapter连接。为了同时测定两个等位基因的类型,取DNA与adapter的连接片段适量,分别加于两支PCR管中,记为管W和管M。由于等位基因通常仅有两种可能的类型,故在管W中加入野生型特异引物和通用引物Pu,管M中加入突变型特异引物和通用引物Pu;再在两管中分别加入其他PCR扩增所必需的试剂,进行PCR扩

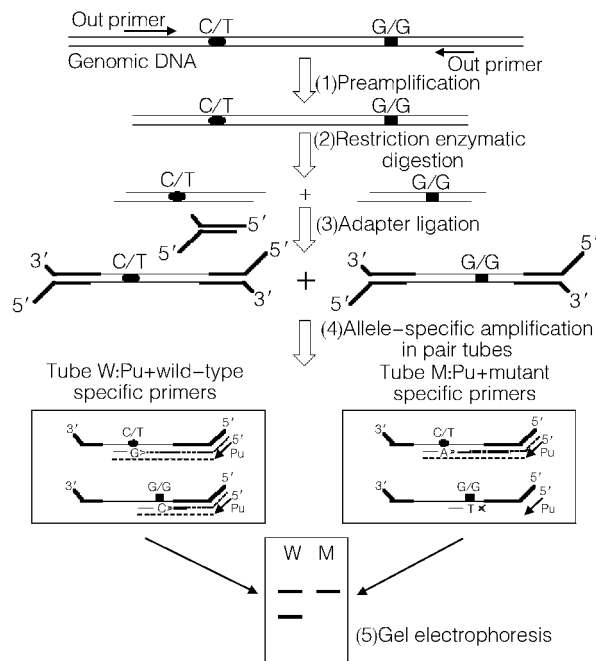


图1 ALM-ASA法测定多重SNP的原理

Fig.1 The schematic of multiplex SNP genotyping by ALM-ASA

增。只有当特异性引物的 3' 端碱基与多态性位点互补时才能发生延伸反应,产生的片段将作为通用引物(adapter 特异性)的模板。如果 SNP 特异性引物的 3' 端碱基与多态性位点不互补,就不会发生延伸反应;同时由于通用引物的序列与 adapter 长臂的序列完全相同,通用引物也无互补序列的模板,故也不发生延伸反应。最后,采用琼脂糖凝胶电泳法对两管中的 PCR 产物进行分离检测,根据凝胶电泳图中 DNA 条带的大小就可以快速判断 SNP 位点的类型。

## 2 材料和方法

### 2.1 试剂与仪器

Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.); PCR 引物(上海捷倍思基因技术有限公司合成, PAGE 级); 琼脂糖、凝胶电泳加样液和溴乙锭 (EB) 均为 Sangong 生物公司产品; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus (80 ~ 1 031 bp, 100 ~ 3 000), MBI 公司。PTC-225 型 PCR 仪 (MJ Research, Inc., Massachusetts, USA); POWER PAC1000 型电泳仪 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); GeneGenius 凝胶成像系统 (SYNGENE, Co., Ltd., Cambridge, UK); Gene Spec III 型微量基因光谱测定仪 (Naka Instruments, Co., Ltd., Tokyo, Japan)。

### 2.2 DNA 的提取

取以 EDTA 抗凝的 20 名健康受试者全血 1 mL, 按改进的酚/氯仿提取法提取 DNA, 用 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 50

μL 溶解,并用微量基因光谱测定仪测定其纯度和浓度,4℃ 保存。

### 2.3 PCR 扩增与酶切、酶连反应步骤

第 1 步:采用 PCR 预扩增一段含有多个 SNP 位点的长片段。25 μL PCR 反应体系中含有引物 2D6-RP (5'-ctgcacatccggatgtaggac-3') 和 2D6-LP (5'-tgatagtggccatcttctct-3') 各 0.6 μmol/L, dNTP 0.5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 3.0 mmol/L, 1.25 单位 Taq DNA 聚合酶及 0.1~1.0 μg 模板 DNA。热循环条件为:95℃ 预变性 2 min; 然后以 95℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 3 min, 扩增 35 个循环; 最后 70℃ 延伸 7 min 使反应完全。反应完成后,取反应产物 2 μL, 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳 (1×TAE 电泳缓冲液, 电压 100 V, 恒压电泳 15min), 凝胶成像系统拍摄电泳图谱。

第 2 步:酶切与酶连反应。取 1 μL 第 1 步反应产物作为模板,加入 Mbo I 内切酶 (TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.) 10 U, 反应缓冲液 (10 倍) 1 μL, 加水至 10 μL, 在 37℃ 水浴中保温反应 2 h。将反应液在 70℃ 保温 15 min, 使内切酶失活。在酶切液中加入 DNA 适配器 (即 adp-1: 5'-ccccacttctgttctctcatcaggcgcactactcg-3' 和 adp-3: 5'-gatcgcgagtgtatcgcgtaag-3' 各 50 pmol 的退火产物), 反应缓冲液 (10 倍) 5 μL, T4 DNA 连接酶 (TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.) 50 U, 加水至 50 μL, 16℃ 水浴中保温反应 2 h。取出 4℃ 保存。

第 3 步:多重 PCR 扩增。25 μL 反应体系中含特异性引物混合物 (一管含野生型引物混合物, 另一管含突变型引物混合物; 引物序列见表 1) 共 40 pmol

表 1 用于 CYP2D6 基因中 5 个 SNP 位点测定的等位基因特异性引物序列及其相应的扩增产物长度

Table 1 Sequences of allele-specific primers used for typing five SNPs in CYP2D6 gene and the corresponding length of allele-specific amplification products

SNP <sup>a</sup>	Primer code	Primer sequence (5'→3') <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup>	Product length(bp) <sup>d</sup>
100C>T	100C(T)	CGCTGGGCTGCACGCTTCC(T)	66.6(64.5)	704
1661G>C	1661G(C)	GCAGAGGCGCTTCTCCcTG(C)	64.5(64.5)	293
1758G>T	1758G(T)	GCCTTCGCCAACCACCTgCG(T)	64.5(62.3)	196
2470T>C	2470T(C)	TGTCCCGCTCCTCCTGgAT(C)	62.3(64.5)	515
2850C>T	2850C(T)	CTTCAATGATGAGAACCcAGC(T)	62.6(62.9)	140

a: 所有待测 SNP 查自 <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/CYP2D6.htm>; b: 引物序列 3' 端的黑体字母表示 SNP 类型, 括号外为野生型, 括号内为突变型, 小写字母表示人工引入错配碱基; c: 括号内数字为突变型引物的变性温度; d: 等位基因特异性扩增产物长度。

a: All SNPs are derived from the public domain (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/CYP2D6.htm>); b: The capital letters (in bold) in the 3-terminus of the primer represent the base specific to the SNP type, and the lowercases represent the artificially mismatched base; c: The number in the brackets represents melting temperature of the mutant-specific primer; d: This column represents the length of allele-specific PCR products.

(每一种引物的量将根据电泳条带强度调节),通用引物(Pu: 5'-ccccacttctgttctctcat-3') 20 pmol, 反应缓冲液(10倍) 2.5  $\mu$ L, 1.25 单位 *Taq* DNA 聚合酶及 1  $\mu$ L 酶连产物, 其中 dNTP 和  $MgCl_2$  的浓度分别为 0.2 和 1.5 mmol/L。热循环条件为: 94 $^{\circ}C$  预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}C$  变性 20 s, 56 $^{\circ}C$  退火 30 s, 72 $^{\circ}C$  延伸 45 s, 扩增 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$  延伸 7 min 使反应完全。反应完成后, 取反应产物 3  $\mu$ L 在 2.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳(1 $\times$  TAE 电泳缓冲液, 电压 100 V, 恒压电泳 15 min), 凝胶成像系统拍摄电泳图谱。

第 4 步: 根据 DNA 条带大小判断各等位基因的类型。可分为以下 3 种情况: 凡只在含有野生型特异性引物管中出现特异条带的, 说明该 SNP 为野生型纯合子(W/W); 凡只在含有突变型特异性引物管中出现特异条带的, 说明该 SNP 为突变型纯合子

(M/M); 若在两管中同时出现等长度特异条带的, 说明该 SNP 为杂合子(W/M)。

## 2.4 PCR-RFLP 法验证

取 1  $\mu$ L 预扩增长片段的 10 倍稀释产物作为模板, 25  $\mu$ L 反应体系中含有 1.25 单位 *Taq* DNA 聚合酶, 其中引物(表 2) 浓度为 0.4  $\mu$ mol/L, dNTP 和  $MgCl_2$  的浓度分别为 0.2 和 1.5 mmol/L。热循环条件为: 94 $^{\circ}C$  预变性 3 min; 然后以 94 $^{\circ}C$  变性 20 s, 58 $^{\circ}C$  退火 30 s, 72 $^{\circ}C$  延伸 30 s, 扩增 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$  延伸 7 min 使反应完全。反应完成后, 取反应产物 5  $\mu$ L, 加反应缓冲液(10倍) 2  $\mu$ L, 限制性内切酶 10 U, 加水至 20  $\mu$ L, 在 37 $^{\circ}C$  水浴中保温消化过夜。取酶解产物 10  $\mu$ L, 在 2.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离(1 $\times$  TAE 电泳缓冲液, 电压 100 V, 恒压电泳 15 min), 凝胶成像系统拍摄电泳图谱, 根据 DNA 条带的大小判断 SNP 的类型。

表 2 RFLP 法测定表 1 中各 SNP 位点的 PCR 引物序列、内切酶及与各等位基因对应的酶消化片段长度

Table 2 Primer sequences, restriction enzymes and the length of enzymatically digested fragments for typing SNPs in Table 1 by PCR-RFLP

SNP	Restriction enzyme	PCR primer sequences (5'→3') <sup>a</sup>	Fragment length (bp) <sup>b</sup>	
			Wild-type	Mutant
100C>T	<i>Hph</i> I	100F: TCAACACAGCAGGTTCACTCACAGCA 100R: CTGTGGTTTCACCCACCATCCAT	433	262/171
1661G>C	<i>BsmA</i> I	1661F: CTAATGCCTTCATGGCCAC 1661R: CTGCTCCAGCGACTTCTTG	145	103/42
1758G>T	<i>Msp</i> I	1758F: TGGGCAAGAAGTCGCTGGAGCAG 1758R: AGATGCGGGTAAGGGGTCGCCTT	73/79	152
2470T>C	<i>Fok</i> I	2470F: ACTTGGTGAGGTCAGTGGT 2470R: TTAGCAGCTCATCCAGCTG	225	141/84
2850C>T	<i>Hha</i> I	2850F: TTGAGCGTCCCAGGAGGAATG 2D6-RP: CTGCACATCCGGATGTAGGATC	195/97	292

a: F 和 R 分别表示正向和反向引物; b: 斜线前后数字表示被酶切后的片段长度, 单一数字表示 PCR 扩增片段长度。

a: F and R represent forward and reverse primer, respectively; b: The two numbers separated by a virgule represent the sizes of two fragments digested with the enzyme listed in the second column. The single number means the size of the PCR fragment amplified by the primers listed in the third column.

## 3 结果与讨论

### 3.1 PCR 预扩增含有各 SNP 位点的片段

为了使 5 个 SNP 位点都位于同一 DNA 片段中, 本文选用了一对引物 2D6-LP 和 2D6-RP 扩增了

*CYP2D6* 基因的一段长度为 2 919 bp 的 DNA 片段。但在对不同基因组样本进行长片段扩增时, 发现有些样本扩增条带亮度较低。为了提高扩增效率, 本文在 PCR 反应试剂中添加了 DMSO 或甜菜碱进行实验, 结果见图 2。由图可知, 当甜菜碱的浓度由 0 分别增加

到 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 和 10 mol/L 时, 未发现扩增产物的条带强度有明显变化; 但当加入 10%, 7.5%, 5.0%, 2.0% 和 1.0% 的 DMSO 时, 发现 5% 的 DMSO 可以显著增强特异性条带亮度, 但高浓度和低浓度的 DMSO 不能提高扩增产物的量, 因此本文在 PCR 扩增时添加 5.0% 的 DMSO 来提高扩增效率。

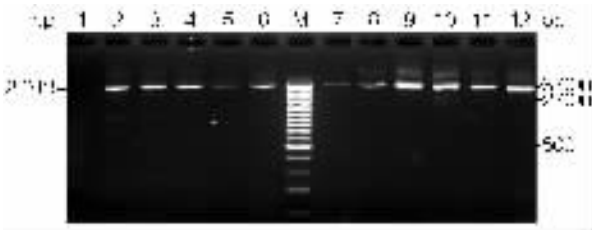


图 2 甜菜碱和 DMSO 对长片段 PCR 扩增的影响

1~6 代表甜菜碱的浓度: 分别为 10.0, 5.0, 2.5, 1.0, 0.5, 0 mol/L; M 为 marker; 7~12 代表 DMSO 的浓度: 分别为 10, 7.5, 5.0, 2.0, 1.0, 0%。

Fig. 2 Effect of DMSO and betaine on the preamplification of a long fragment

1~6: PCR with the following betaine concentrations:

10.0, 5.0, 2.5, 1.0, 0.5 and 0 mol/L; M, GeneRuler TM

100 bp DNA Ladder plus (100~3 000 bp); 7~12: PCR with the following DMSO concentrations: 10, 7.5, 5.0, 2.0, 1.0 and 0%.

### 3.2 各等位基因特异性引物的特异性考察

SNP 检测结果的准确性主要由等位基因特异性引物的延伸开关特性决定, 即当特异性引物的 3' 端碱基与模板上 SNP 位点的碱基互补时就发生延伸反应, 否则不发生延伸反应。可是通常 3' 端的一个碱基不足以完全控制引物的延伸, 根据我们以前的实验结果<sup>[11]</sup>, 在 3' 端倒数第 3 个碱基处人为引入一个错配碱基可以提高引物的开关性能。本文采用相同的方法来提高每个特异性引物的延伸特异性, 为了同时考察两个特异性引物的延伸特异性, 我们选择了基因型分别为野生型纯合子、突变型纯合子和杂合子的基因组 DNA 进行试验, 结果表明每条引物的特异性均很好, 其中杂合子的扩增结果如图 3 所示, 由图可知, 每条等位基因特异性引物都具有良好的特异性, 仅有一条与基因型相一致的扩增条带, 无杂带; 理论上, 与 5 个 SNP 位点对应的扩增产物的长度应该为 704, 293, 196, 515 和 140 bp, 从图 3 的 DNA marker 可知, 所有扩增产物的长度正确。

### 3.3 共用同一模板扩增时各引物之间的相互作用考察

当用内切酶将预扩增的长片段 DNA 切割成短

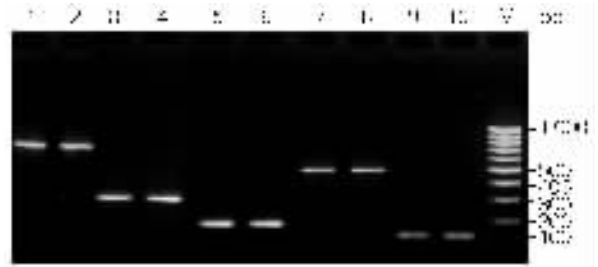


图 3 分别以各等位基因特异性引物进行单重 SNP 测定时的 PCR 扩增产物的凝胶电泳图

各条带所用等位基因特异性引物为: 1=100C; 2=100T;

3=1661G; 4=1661C; 5=1758G; 6=1758T;

7=2470T; 8=2470C; 9=2850C; 10=2850T。

Fig. 3 The gel electrophoretogram of PCR products from single SNP typing with each of allele-specific primers and the universal primer

1:100C, 2:100T, 3:1661G, 4:1661C, 5:1758G,

6:1758T, 7:2470T, 8:2470C, 9:2850C, 10:2850T.

片段时, 存在多个 SNP 位点位于同一短片段的可能性, 即多个特异性引物共用同一模板扩增, 这时引物之间的浓度比例就有可能对扩增产物的量产生影响。在本文中, SNP 位点 1661G>C 和 1758G>T 在同一酶切片段上, 其特异性引物共用该模板扩增, 将它们按不同比例混合后进行扩增的结果如图 4 所示, 在该图中扩增用基因组 DNA 的基因型: 位点 1661G>C 为“G/C”; 位点 1758G>T 为: “G/G”。图中条带 1, 2, 3 和 4 为野生型特异性引物的扩增产物; 条带 5, 6, 7 和 8 为突变型特异性引物的扩增产物。由图可知(泳道 1, 2, 3 和 4), 当引物 1758G 的浓度与引物 1661G 相同时, 引物 1758G 的扩增产物量很少, 但随着该引物浓度的增加, 即使引物 1661G 的浓度保持不变, 其扩增产物的量也渐渐减少, 提示两者存在对模板的竞争反应。从条带 5, 6, 7 和 8 的结果发现, 即使引物 1758T 无扩增产物, 但随着其浓度的增加, 引物 1661C 的扩增产物量也下降, 说明引物 1758T 结合了大量的模板影响了引物 1661C 的扩增。但从图中的结果未发现因抑制性反应而影响结果的判断, 在很大的浓度范围内, 引物之间的相互影响可以忽略, 并且可以通过调整各引物的浓度比例使其扩增条带亮度相当, 例如当引物 1661G 和 1758G 的浓度比为 1:5 时可以得到相同强度的电泳条带。

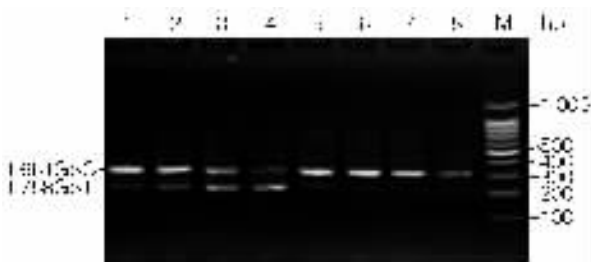


图 4 共用同一模板扩增的引物之间的相互影响

1~4: 引物 1661G 与 1758G 的浓度比分别为 1:1, 1:2, 1:5 和 1:10; 5~8: 引物 1661C 与 1758T 的浓度比分别为 1:1, 1:2, 1:5 和 1:10。

#### Fig. 4 Effect of the concentration of an allele-specific primer on other PCR with the same template

The concentration ratio of primer 1661G to primer 1758G is 1/1, 1/2, 1/5 and 1/10 for lanes 1~4, and the concentration ratio of primer 1661C to primer 1758T is 1/1, 1/2, 1/5 and 1/10 for lanes 5~8, respectively.

### 3.4 五重 PCR 同时测定 5 个 SNP 位点

在本文建立的方法中, 由于采用了 adapter 连接技术, 可以用  $n$  个等位基因特异性引物和一个通用引物进行  $n$  重 PCR 扩增, 通常  $n$  重 PCR 必须加入  $n$  对不同的引物, 即  $2n$  个引物, 这使得 PCR 扩增反应的条件难以控制, 并且设计相互匹配的引物十分困难。本文的方法十分简单, 即将 5 个 SNP 位点的野生型和突变型特异性引物分别按一定比例混合后加入含有底物和扩增试剂的两个 PCR 管中进行扩增, 结果直接明了。我们采用该法分别测定了 20 个健康成年人 *CYP2D6* 基因的 5 个基因型, 5 个 SNP 位点: 100C>T, 1661G>C, 1758G>T, 2470T>C 和 2850C>T 的突变型等位基因频率分别为: 67.5%, 30.0%, 25.0%, 30.0% 和 12.5%。其中 4 个典型样本的测定结果如图 5 所示, 很容易从图谱中峰的出现判断等位基因的类型, 例如对样品 1 来说, 仅有一条与 100C>T 位点突变型对应的条带, 由此可以很快判断样品 1 中五个 SNP 位点的基因型; 又例如对样品 3 来说, 在与 1661G>C 位点突变型对应处出现条带, 而在与 1758G>T 位点野生型和突变型对应处都出现条带, 故 1661G>C 位点为突变型, 1758G>T 位点为杂合子; 同样可以从图中很快读出样品 2 和 4 的各 SNP 基因型。

为验证 ALM-ASA 法的准确性, 用 PCR-RFLP 法同时测定了上述 20 个不同基因组 DNA, 其中 3 种

SNP 类型(野生型、突变型和杂合子)的典型结果如图 6 所示, 根据 DNA 条带的大小可以判断等位基因的类型。经过对比可知, ALM-ASA 法的测定结果与 PCR-RFLP 法完全一致, 说明 ALM-ASA 法结果准确。但实验中我们发现 RFLP 法要求 PCR 扩增产物纯度高、产量大, 并且酶切时间长, 还会经常发生酶切不完全影响杂合子与纯合子区分的问题; 对不同的 SNP 来说, 选择合适的内切酶也较费时, 有些内切酶的价格也很昂贵。相比之下, ALM-ASA 法却没有这些不足。

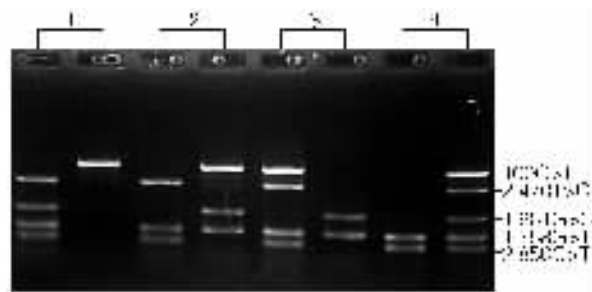


图 5 4 个样本经凝胶电泳检测的图谱

每对通道的左边为 5 个 SNPs 的野生型引物扩增片段, 右边为 5 个 SNPs 的突变型引物扩增片段。

#### Fig. 5 Agarose gel electrophoretograms of 5-plex genotyping of 4 typical genomic samples

Each pair of lanes contains the products from wild type primers (left lane) and mutant primers (right lane).

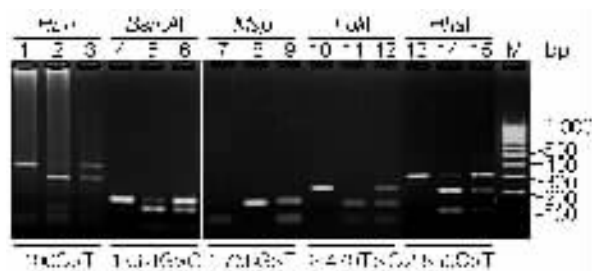


图 6 PCR-RFLP 法测定 5 种 SNP 的野生型、突变型和杂合子的典型电泳图谱

1, 4, 7, 10 和 13: 各 SNP 位点的野生型; 2, 5, 8, 11 和 14: 各 SNP 位点的突变型; 3, 6, 9, 12 和 15: 各 SNP 位点的杂合型。

#### Fig. 6 A typical profile of wild type, mutant and heterozygote of five SNPs by PCR-RFLP

1, 4, 7, 10 and 13: Wild types; 2, 5, 8, 11 and 14: Mutants; 3, 6, 9, 12 and 15: Heterozygotes.

## 4 结 论

本文建立的方法对引物优化设计的要求低, 无

需专门技术和特殊软件就可以完成任何多重 SNP 测定用的引物设计。采用 DNA 适配器的方法使得  $n + 1$  个引物能够扩增  $n$  重 PCR, 每个 PCR 有一个相同的引物, 该引物的序列与适配器长臂相同, 无需设计; 其中  $n$  个引物用于测定  $n$  个 SNP 的类型, 其 3' 端与 SNP 位点正好重叠, 位置固定, 除了长度应该根据  $T_m$  值调整外, 无需其他任何设计, 每条引物的  $T_m$  值应尽量接近, 以保证它们在同一反应体系中扩增均衡<sup>[12]</sup>。如果实验中出现特异性引物位于 GC 高含量区域或特异性不好, 可以根据互补链序列选择另外一条引物。

ALM-ASA 法具有特异性高的优点。为了提高扩增特异性, 本文采用了 3 种方法: PCR 预扩增含待检测位点 DNA 片段; 在等位基因特异性引物的 3' 端倒数第 3 位人工引入错配碱基; 特殊设计的 adapter。

ALM-ASA 法测定通量高, 所需 DNA 模板量少。虽然 ALM-ASA 的测定步骤较多, 包括 PCR 预扩增、酶切反应、酶连反应和等位基因特异性扩增, 但所有这些步骤都可以批量操作, 由仪器完成。本法可以一次同时可以测定多个 SNP, 所以测定通量相对较高, 通常一个熟练操作者一天可以同时测定 96 个样本, 对测定 5 重 SNP 来说, 则一天可以测定近 500 个 SNP。又由于本法采用了预扩增, 少量的基因组 DNA 样本就足够用于多个 SNP 的测定。如果一次测定  $n$  个 SNP, 则每个 SNP 所需基因组 DNA 量将是  $1/n$ 。

ALM-ASA 法操作简单方便, 不需特殊仪器, 成本低廉, 适合临床医院用于个体化用药所需的等位基因快速检测, 也可以用于病原微生物的准确分型。

## 参 考 文 献 (References):

[1] Mullikin J C, Hunt S E, Cole C G, Mortimore B J, Rice C M, Burton J, Matthews L H, Pavitt R, Plumb R W, Sims S K, Ainscough R M, Attwood J, Bailey J M, Barlow K, Bruskiwich R M, Butcher P N, Carter N P, Chen Y, Clee C M, Coggill P C, Davies J, Davies R M, Dawson E, Francis M D, Joy A A, Lamble R G, Langford C F, Macarthy J, Mall V, Moreland A, Overton-Larty E K, Ross M T, Smith L C, Steward C A, Sulston J E, Tinsley E J, Turney K J, Willey D L, Wilson G D, McMurray A A, Dunham I, Rogers J, Bentley D R. An SNP map of human

chromosome 22. *Nature*, 2000, 407(6803): 516~520.

[2] Zhou G H, Shirakura H, Kamahori M, Okano K, Nagai K, Kambara H. A gel-free SNP genotyping method: bioluminometric assay coupled with modified primer extension reactions (BAMPER) directly from double-stranded PCR products. *Hum Mutat*, 2004, 24(2): 155~163.

[3] Hampe J, Wollstein A, Lu T, Frevel H J, Will M, Manaster C, Schreiber S. An integrated system for high throughput TaqMan based SNP genotyping. *Bioinformatics*, 2001, 17(7): 654~655.

[4] Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson A C, Sterky F, Nyren P, Uhlen M, Lundberg J. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem*, 2000, 280(1): 103~110.

[5] Ye F, Li M S, Taylor J D, Nguyen Q, Colton H M, Casey W M, Wagner M, Weiner M P, Chen J. Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum Mutat*, 2001, 17(4): 305~316.

[6] Olivier M. The Invader assay for SNP genotyping. *Mutat Res*, 2005, 573(1-2): 103~110.

[7] Griffin T J, Smith L M. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(2): 77~84.

[8] Hardenbol P, Baner J, Jain M, Nilsson M, Namsaraev E A, Karlin-Neumann G A, Fakhrai-Rad H, Ronaghi M, Willis T D, Landegren U, Davis R W. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 673~678.

[9] Xu H, Sha M Y, Wong E Y, Uphoff J, Xu Y, Treadway J A, Truong A, O'Brien E, Asquith S, Stubbins M, Spurr N K, Lai E H, Mahoney W. Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(8): e43.

[10] Ji L, Pan S, Marti-Jaun J, Hanseler E, Rentsch K, Hersberger M. Single-step assays to analyze CYP2D6 gene polymorphisms in Asians: allele frequencies and a novel \*14B allele in mainland Chinese. *Clin Chem*, 2002, 48(7): 983~988.

[11] WU Xiao-Yong, ZHANG Xiao-Dan, GU Zhuo-Liang, ZHOU Guo-Hua. Artificially modified bi-allele-specific amplification for typing I1823M variant in ABC1 gene. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2004, 21(1): 86~88.

伍小勇, 张晓丹, 古卓良, 周国华. 人工修饰双等位基因特异性引物扩增法测定人 ABC1 基因突变点 I823M. *中华医学遗传学杂志*, 2004, 21(1): 86~88.

[12] Kaderali L, Deshpande A, Nolan J P, White P S. Primer-design for multiplexed genotyping. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(6): 1796~1802.