

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01484

Tm-shift 基因分型方法在遗传学中的应用

袁芳¹, 徐进^{1,2}, 季林丹^{1,2}, 费丽娟¹, 刘盼盼¹, 张莉娜¹

1. 宁波大学医学院, 宁波 315211;
2. 中国科学院昆明动物研究所-香港中文大学生物资源与疾病分子机理联合实验室, 昆明 650223

摘要: Melting Temperature shift(Tm-shift)是一种新的基因分型方法, 主要通过两条特异性引物 5'端加入不同长度的 GC 序列, PCR 扩增后根据溶解曲线中产物 *Tm* 值的差异来完成分型。文章建立了 Tm-shift 法对 2 048 份样品的 29 个 SNP 进行分型, 通过分型成功率、重复检测一致率、测序验证准确度综合评价分型效果。结果显示, 29 个 SNP 中有 27 个可以采用本方法分型, 分型成功率为 93.1%。测序验证准确性达到 100%。3 种基因型阳性标准对照重复检测一致率为 100%; 100 个随机样品重复检测, 重复率为 97%。因此, Tm-shift 基因分型法是一种成本低廉、准确灵敏、稳定可靠、通量灵活、操作简便的基因分型方法, 可在遗传学研究中推广应用。

关键词: Tm-shift; 基因分型; 遗传学

Application of Tm-shift genotyping method in genetic studies

YUAN Fang¹, XU Jin^{1,2}, JI Lin-Dan^{1,2}, FEI Li-Juan¹, LIU Pan-Pan¹, ZHANG Li-Na¹

1. Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
2. KIZ-CUHK Joint Laboratory of Bioresources and Molecular Research of Common Diseases, Kunming 650223, China

Abstract: Melting Temperature shift (Tm-shift) is a new genotyping method. With two GC-rich tails of unequal length combined to 5'-terminal of allele-specific primers, genotypes can be determined by the distinct Tms of the PCR products with inspection of a melting curve on the real-time PCR machine. In this study, 29 SNPs were genotyped with 2 048 samples by using Tm-shift genotyping method, and the results were assessed by success rate, consistent rate, and accuracy. The results indicated that among 29 SNPs, 27 SNPs could be genotyped by Tm-shift. In other words, the success rate was 93.1%. The accuracy confirmed by direct sequencing was 100%. The consistency was 100% with 3 control samples, and 97% from a replication study in 100 samples. Thus, Tm-shift is a genotyping method with advantages including low cost, high accuracy, stability, reliability, flexible throughput, and easy operation, which can be applied to genetic studies widely.

Keywords: Tm-shift; genotyping; genetics

收稿日期: 2012-08-27; 修回日期: 2012-10-10

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(编号: (Y2100857))、浙江省教育厅重点科研项目(编号: Z201017918)和宁波市自然科学基金项目(编号: 2012A610237, 2011A610037)资助

作者简介: 袁芳, 硕士在读, 专业方向: 高血压分子流行病学。E-mail: yuanfang40@163.com

通讯作者: 张莉娜, 硕士, 副教授, 研究方向: 高血压分子流行病学。E-mail: zhanglina@nbu.edu.cn

网络出版时间: 2012-10-17 09:53:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121017.0953.001.html>

近年来,随着遗传学和基因组学的迅速发展,单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)作为一种遗传标志在医学遗传学、动植物遗传学和基因工程的研究中发挥了重要作用^[1]。因此,SNP已广泛应用于候选基因研究和全基因组关联研究等。

目前用于 SNP 检测的技术方法有多种,包括限制性片段长度多态性检测(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、高分辨率熔解曲线法(High-resolution melting, HRM)、质谱法(Mass spectrometry)、TaqMan 探针法、DNA 测序、基因芯片等。然而,每种方法都存在一定的适用范围。多数检测方法因为通量的限制,难以满足大样本多基因的研究要求;全基因组芯片技术又因其昂贵的费用,不适用于大部分的实验室研究。因此,寻找一种通量灵活、准确可靠,且能高性价比地完成基因分型的方法显得尤为重要。而 Melting Temperature shift(Tm-shift)基因分型技术就是这样一种既能满足中低通量研究需要又能高性价比完成基因分型的方法。

Tm-shift最初是由Roche公司科学家发明的一种基因分型方法,该方法无需序列特异性探针,通过在引物 5'端加入不同长度的GC序列来改变产物的 T_m 值,PCR结束后根据熔解曲线中 T_m 值的差异直接对样品进行分析,即可完成SNP的检测^[2,3]。

Tm-shift基因分型方法共设计3条引物,包括两条特异性引物和一条反向引物。特异性引物

3'末端的碱基与SNP的等位基因变异体配对,5'端分别添加两段长度各异且不与模板配对的序列(14 bp的长序列 5'-GCGGGCAGGGCGGC-3'和 6 bp的短序列 5'-GCGGGC-3')。这两段序列的加入,人为地扩大了PCR产物 T_m 值的差距。在PCR反应体系中,预先加入SYBR Green 荧光染料。SYBR Green 是一种在Real-time PCR中使用广泛且成熟的双链DNA染料^[4-6]。其嵌入到DNA双链,在激发光的作用下发出荧光信号。荧光强度随温度变化,当DNA片段在加热过程中达到熔解温度时,双链分开,SYBR Green

从DNA上释放出来,导致荧光信号减弱^[7]。PCR结束后,运用Real-time PCR仪对产物以 0.11 /s的速度进行 60 ~95 的一个升温变性过程,通过实时荧光信号的监测来绘制熔解曲线,由此根据不同的 T_m 值来对SNP进行分型。在高血压、肺结核遗传

易感性研究及人类群体遗传多样性研究等课题中,我们已运用Tm-shift法对2 048份血液样品29个SNP进行了基因分型,本研究利用这些实验的结果,结合测序验证和重复检测对Tm-shift法进行系统评价。

1 材料和方法

1.1 材料

2 048份血液样本采自无血缘关系的浙江汉族人群,各课题均采用 1:1 配对的病例对照研究设计。采用天根生化科技(北京)有限公司生产的血液基因组DNA提取试剂盒(离心吸附柱法)从外周血白细胞中提取基因组DNA。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

从NCBI dbSNP网站下载目标SNP位点附近序列,引物设计采用Oligo 6或者primer 3软件。Tm-shift基因分型法需对引物的 T_m 值和长度加以限制。其中,特异性引物的 T_m 值应介于59~62(可适当放宽到58.3~63.5);反向引物的 T_m 值应介于63~70(可适当放宽到62~75)。同时,特异性引物和反向引物的长度应分别控制在14~27 bp、22~30 bp,相应的可优化到15~22 bp、22~27 bp。为了充分发挥Taq聚合酶的扩增效率,反向引物与特异性引物的 T_m 值之间(未在5'端加入序列前)需维持4~5左右的差距,并且反向引物应从SNP下游不超过20 bp处开始选取,以便获得相对较短的PCR产物。特异性引物设计成功后,分别在其5'端加入富含GC的序列。通常将14 bp的长序列(5'-GCGGGCAGGGCGGC-3')加入到3'末端含有较高 T_m 值碱基(G/C)的特异性引物上,而将6 bp的短序列(5'-GCGGGC-3')加入到3'末端含有较低 T_m 值碱基(A/T)的特异性引物上,产物的 T_m 值更易区分。引物信息见表1。

1.2.2 Tm-shift基因分型方法实验步骤

PCR反应体系:总反应体系为12.5 μ L,包括25 ng的基因组DNA,0.2 μ mol/L引物,0.4 mmol/L dNTP,1.5~2 μ mol/L镁离子,0.2 \times SYBR Green I,10% DMSO,1 \times Roche TaqGold buffer,0.6 U的ABI金牌Taq Gold polymerase,加高纯水补足至12.5 μ L。PCR

表 1 SNP 的引物序列

引物	序列(5'→3')	<i>T_m</i> (5'添加序列前)	Mg ²⁺ 浓度 (μmol/L)
rs4305			2
rs4305GF	gcgggcagggcggcGCTGGGGCCTGGCG	63.9	
rs4305AF	gattaccgGCTGGGGCCTGGCA	61.6	
rs4305R	CTGCAAGATGCTGCCACTGTCA	67.1	
rs3789678			2
rs3789678CF	gcgggcagggcggcCCAGCCCCAATTCCTGC	62.6	
rs3789678TF	gattaccgCCAGCCCCAATTCCTGT	59.4	
rs3789678R	GGTCCTCTTGCCATCAGGAGGAAT	67.8	
rs4461142			1.5
rs4461142CF	gcgggcagggcggcTCACTTGAGACAGGAAGAGGACC	62.1	
rs4461142TF	gattaccgTCACTTGAGACAGGAAGAGGACT	59.5	
rs4461142R	AGATGGGAGTTTTCAGTCCAGCTCC	67	
rs10935724			2
rs10935724CF	gcgggcagggcggcAAGAGGTGTTTTCTTGCTCTTC	60.3	
rs10935724AF	gattaccgAAGAGGTGTTTTCTTGCTCTTA	58.6	
rs10935724R	TGGCACATTTATGTACTCAATAAATATTAGCTTT	63.9	
rs6414			2
rs6414CF	gcgggcagggcggcCGGGAAGGTCCAGCCC	62.7	
rs6414TF	gattaccgCGGGAAGGTCCAGCCT	59.7	
rs6414R	AGTCCTCCATCCCCATCCCTG	66.8	

扩增程序：95 预变性 15 min，以此来激活酶的活性。三步扩增法：95 变性 20 s，复性 1 min，72 延伸 30 s，35 个循环；最后 72 延伸 7 min，4 保存。

熔解曲线分析：将 PCR 产物放入 Roche Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪中。熔解曲线程序：95 5 s，60 1 min，温度以 0.11 /s 的速度上升到 95 ，期间连续采集荧光信号，40 维持。熔解曲线数据由 Roche 提供的机载软件自动根据荧光强度进行聚类分析获得。

2 结果与分析

熔解曲线完成后，根据每个 SNP 特异性引物的设计，即可获得相应的基因分型结果。判读分型结果时，将 HH 纯合子与 LL 纯合子峰值最小差距 3 作为分型判断的依据。如图 1 所示。

本研究采用 T_m-shift 方法对 29 个 SNP 进行了分型，其中 2 个分型失败，分型成功率为 93.1%。这两个分型失败的 SNP 为 rs10935724 和 rs6414，其中

rs10935724 所处序列中 A/T 含量较多，引物 *T_m* 值难以达到设计要求，即使增加引物的碱基长度依然分型失败。rs6414 所处序列中 G/C 含量高，引物设计相对容易，但是在分别调整引物序列、引物比例、镁离子浓度和复性温度后仍然无法准确分型。

为了保证实验的准确度，针对每一个待检测的 SNP，从基因型已知的 Hap map CHB 的 45 个中国人群标准品中挑选 3 种不同基因型的样本，在每一块 96 孔板中放入标准品作为阳性对照，以区分 3 种基因型的熔解峰。在我们的实验中，标准品对照的重复性达到了 100%。对随机抽取的 100 个样品进行了重复检测，有 97 个与原检测结果一致，重复性为 97%。重复性差的 3 个样品 DNA 浓度较低，导致熔解曲线的荧光值偏低，纯合子出现杂峰、杂合子双峰不明显，从而使得分型错误。因此，T_m-shift 方法要求样品的 DNA 浓度不宜过低。为了验证 T_m-shift 方法的准确性，我们以测序结果作为对照，随机抽取 70 个样品进行了测序，测序一致率为 100%。如表 2 所示。

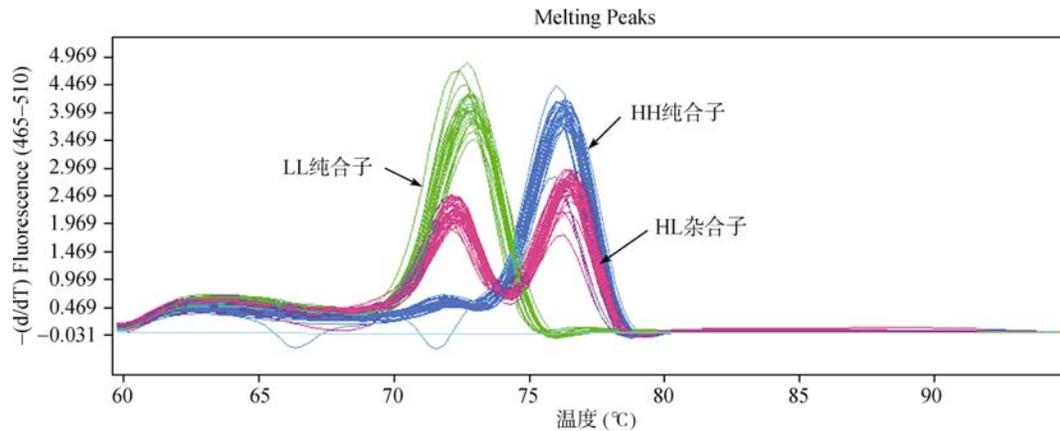


图 1 各基因型的熔解曲线图

HH 纯合子: 有较高 T_m 值即 5'端加入长序列的等位基因纯合子; LL 纯合子: 有较低 T_m 值即 5'端加入短序列的等位基因纯合子; HL: 杂合子基因型。

表 2 Tm-shift 基因分型效果评价

评价指标	百分比
分型成功率	93.1%(29 个 SNP/27 个分型成功)
重复性	97%(100 个样品 97 个一致)
测序验证率	100%(70 个样品 70 个一致)

在实验过程中我们发现特异性引物 5'端添加的 GC 序列可以进一步优化, 14 bp 的长序列(5'-GCGG GCAGGGCGGC-3')维持不变, 将 6bp 的短序列(5'-GCGGGC-3')更换为 8 bp 的短序列(5'-GATTACCG-3'), 在不影响 PCR 效率的基础上进一步扩大了产物的 T_m 值差距, 熔解曲线区分更清晰。

3 讨论

在疾病遗传易感性研究和人类群体遗传多样性研究中, 我们采用 Tm-shift 法对 2 048 份样品 29 个 SNP 进行了候选基因的分型。在成功运用 Tm-shift 进行 SNP 分型的过程中, 我们发现 Tm-shift 方法具有准确度高、低廉、高效等独特的优点。

(1)准确度高。每一块 PCR 板中放入 3 种基因型已知的样品作为阳性标准对照, 而且在随机抽取的 70 个样品进行的测序验证中, 测序一致率为 100%, 确保了实验的高度准确性。

(2)重复性好。随机抽取 100 个样品进行重复实验, 一致率达到了 97%, 每 96 个样品中放入的标准品重复性也达到了 100%。由此说明 Tm-shift 是一种稳定可靠的技术方法, 可大量应用于遗传学研究。

(3)成本低廉。主要的仪器为 PCR 扩增仪和 Real-time PCR 仪, 均为一般实验室常用仪器, 无需其他昂贵的设备, 大大降低了成本。SYBR Green 虽然是一种非饱和染料, 但不影响 SNP 分型效果, 而且与饱和荧光染料 Eva Green、LC Green 等相比价格更占优势。试剂中热启动 *Taq* 酶和 Real-time PCR 管/板的价格较高, 但单个样品的检测成本都能控制在 1.0 元以下, 检测费用远低于测序、*TaqMan* 探针、sequenom 质谱法、SNPstream 等技术, 与 RFLP 比也具有价格优势。

(4)通量灵活。Tm-shift 法是一种在扩增结束后, 对 PCR 产物进行熔解曲线分析的终点分析方法, 无需一直进行实时荧光检测^[3]。而且我们也已验证, PCR 扩增产物在 4 能保持一定时期的稳定性, 1~2 d 后再进行荧光检测并不会影响 SNP 的分型效果。因此, 可以先在普通的 PCR 仪上完成目标序列扩增, 再将 PCR 产物放入荧光定量 PCR 仪上进行熔解曲线分析。Tm-shift 法的这一优点, 不仅大大降低了 Real-time PCR 仪的折旧率, 而且节省了操作时间, 增加了分型的通量。在实验室配备一台荧光定量 PCR 仪, 两台 384 孔 PCR 仪的情况下, 通常一个人在正常工作强度下每天可以检测 8~10 板, 即完成 3 500 个样本的分型。故实验室增加 PCR 仪或操作人员, 能充分满足大样本检测的要求。

(5)操作简便。该方法只需要设计特异性引物, 实验操作即 PCR 技术, 因此易于掌握。并且 PCR 结束后只需进行熔解曲线分析, 无需琼脂糖电泳, 更

易快速获得实验结果, 不仅减少了气溶胶的污染, 增加了产物的特异性, 同时也减少了 EB 对人体的危害。

(6) 较之高分辨率熔解曲线 (High resolution melting, HRM) 更为实用。HRM 与 T_m -shift 法的原理相似, 都是对 PCR 产物绘制熔解曲线来进行基因分型。但 HRM 主要是根据 DNA 序列的长度、GC 含量以及碱基互补性差异来对样品进行分型, 当 SNP 位点为 A/T、C/G 多态时, 熔解曲线图中两个峰难以区分, 易导致分型失败^[8]。而且 HRM 要求达到对单个碱基区分的高灵敏度, 因此对 PCR 仪的温度控制精度、均一度等指标要求较高, 大部分 Real-time PCR 仪无法适用。单个样品的检测成本较之 T_m -shift 法高出 10 倍以上, 不适用于大样本研究。

尽管 T_m -shift 基因分型技术较之其他 SNP 检测方法有其独特的优越性, 但在应用过程中我们也发现其存在一定的局限性。

(1) 不适用于所有的 SNP。在 T_m -shift 基因分型技术中, 引物的设计只需要 T_m 值和长度满足一定的要求即可, 因此引物设计较为灵活, 绝大部分的 SNP 都能成功地设计引物。但是对于那些目标序列中 A/T 含量较高的 SNP, 往往难以同时满足引物 T_m 值和长度的要求, 这时需要适当的增加引物的碱基数来使 T_m 值符合要求。通常这类 SNP 的分型失败率较高, 本研究有 3 个 SNP 需要延长引物的长度, 其中有 1 个分型失败。而在引物长度和 T_m 值都符合要求的 SNP 中, 仍然存在分型失败的 SNP, 在本研究的 29 个 SNP 中, 有 1 个 SNP 归于此种情况。

(2) 对 *Taq* 聚合酶的要求较高。 T_m -shift 法对 *Taq*

聚合酶的扩增效果有较高的要求, 扩增效果良好产物的熔解峰就会聚类清晰, 同时也能避免引物二聚体的生成。采用普通的 *Taq* 聚合酶, 容易出现产物熔解峰位置偏移和聚类不清楚的情况。而且非特异性扩增产生的余峰和杂峰, 干扰 3 种基因型的判断, 容易导致错分。ABI 的金牌 *Taq* 酶是一种高效的热启动酶, 它可以提供一个简短的热启动过程, 在保证扩增特异性的同时减少了引物二聚体的生成^[9-11]。如图 2、图 3 所示, 采用金牌 *Taq* 酶进行 PCR 扩增, 获得的熔解曲线较之某合资品牌非热启动 *Taq* 酶聚类更清楚, 熔解峰更为整齐, 有利于快速准确的进行基因分型。

(3) Mg^{2+} 浓度对实验影响较大。 Mg^{2+} 的浓度会影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响, Mg^{2+} 浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性, 浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至导致扩增失败^[12]。如图 4、图 5 所示, 反应体系中 Mg^{2+} 终浓度为 2 mmol/L 时, PCR 扩增特异性降低, 3 种基因型无法区分, 当 Mg^{2+} 终浓度降低到 1.5 mmol/L 时, 3 种基因型分型清楚。因此, 对于每个 SNP, 实验前都需摸索合适的 Mg^{2+} 浓度, 以保证获得准确的分型结果。

(4) 对模板要求高。DNA 模板浓度偏低会影响 PCR 的扩增效果, 从而降低产物熔解曲线的荧光值, 干扰分型判断。而且反应体系中模板的加入量若不一致, 获得的熔解峰就会聚类不清晰, 出现位移现象, 造成分型错误。因此, 模板浓度及量的均一性是影响实验的关键步骤, 需要准确定量来加以控制。

综上所述, T_m -shift 方法因其经济适用、准确灵

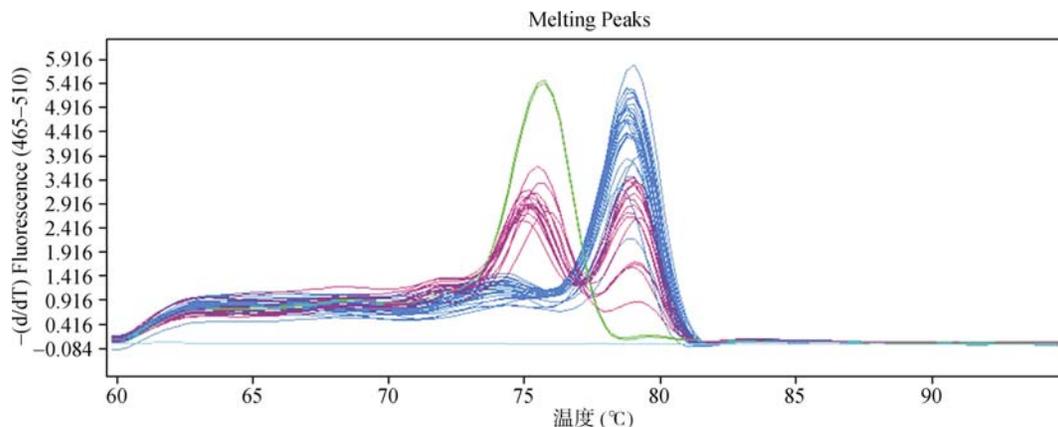


图 2 某合资品牌 *Taq* 酶分型效果图

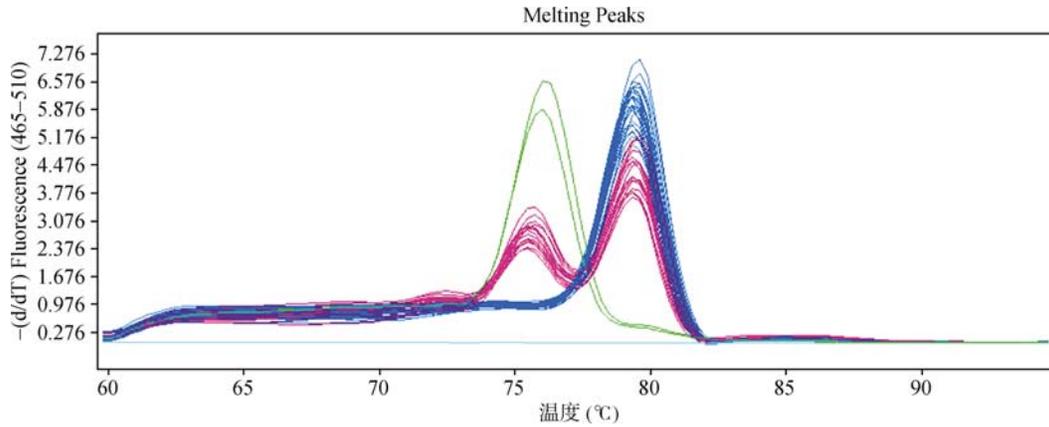


图 3 ABI 金牌 Taq 酶分型效果图

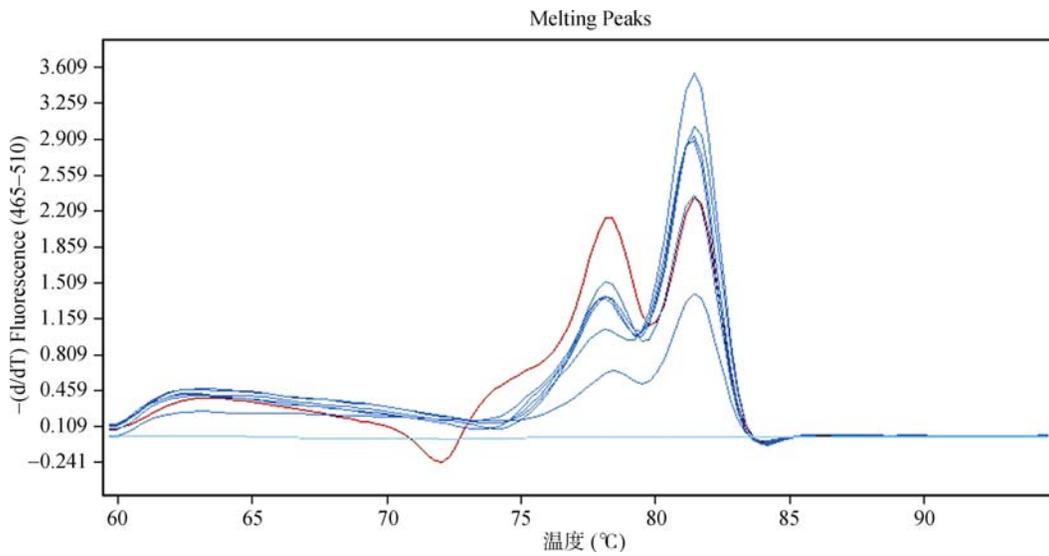


图 4 Mg^{2+} 浓度为 2 mmol/L 时的分型效果图

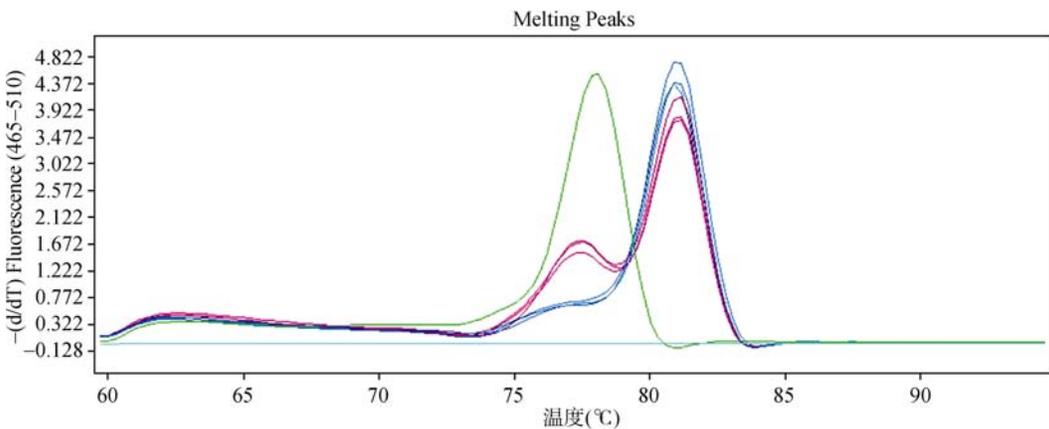


图 5 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时的分型效果图

敏、通量灵活、操作简便等独特优势, 可以作为一种可靠的SNP分型方法应用于遗传学研究。目前, 国

内外已有学者运用该方法来进行基因分型^[13~19]。随着遗传学研究发展的需要及人们对该方法认程

度的加深, Tm-shift 分型技术将会受到更多遗传学研究者的青睐, 在该领域得到更为广泛的应用。

参考文献(References):

- [1] Shastry BS. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *J Hum Genet*, 2007, 52(11): 871–880. [DOI](#)
- [2] Germer S, Higuchi R. Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Res*, 1999, 9(1): 72–78. [DOI](#)
- [3] Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, Patel S, Umblas N, Mirel D, Higuchi R, Germer S. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. *Biotechniques*, 2005, 39(6): 885–893. [DOI](#)
- [4] Cardozo GP, Santos EV, Fachin AL, Franca SC, Marins M. A glass bead protocol for recovery of host cell free *Herlichia canis* and quantification by Sybr-green real-time PCR. *Biocell*, 2011, 35(1): 35–36. [DOI](#)
- [5] Gupta M, Yates CR, Meibohm B. SYBR Green-based real-time PCR allelic discrimination assay for beta₂-adrenergic receptor polymorphisms. *Anal Biochem*, 2005, 344(2): 292–294. [DOI](#)
- [6] Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, 2003, 3: 18. [DOI](#)
- [7] Papp AC, Pinsonneault JK, Cooke G, Sadée W. Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves. *Biotechniques*, 2003, 34(5): 1068–1072. [DOI](#)
- [8] Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(6): 597–608. [DOI](#)
- [9] Birch DE, Kolmodin L, Wong J, Zangenberg GA, Zoccoli MA, McKinney N, Young KKY. Simplified hot start PCR. *Nature*, 1996, 381(6581): 445–446. [DOI](#)
- [10] Germer S, Holland MJ, Higuchi R. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res*, 2000, 10(2): 258–266. [DOI](#)
- [11] Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl*, 1993, 2(4): 275–287. [DOI](#)
- [12] Hsia K, Spector D, Lawrie J, Spector SA. Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1989, 27(8): 1802–1809. [DOI](#)
- [13] Huang SW, Li Q, Zhu SY, Li L, Xiong F, Jia YK, Xu XM. SYBR Green-based real-time PCR assay for detection of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms that modulate warfarin dose requirement. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(1): 26–31. [DOI](#)
- [14] Tang NL, Liao CD, Ching JK, Suen EW, Chan IH, Orwoll E, Ho SC, Chan FW, Kwok AW, Kwok T, Woo J, Leung PC. Sex-specific effect of Pirin gene on bone mineral density in a cohort of 4000 Chinese. *Bone*, 2010, 46(2): 543–550. [DOI](#)
- [15] Chen HY, Chan IHS, Sham AL, Leung VHK, Ma SL, Ho SC, Tang NLS. Haplotype effect in the IGF1 promoter accounts for the association between microsatellite and serum IGF1 concentration. *Clin Endocrinol*, 2011, 74(4): 520–527. [DOI](#)
- [16] Derzelle S, Mendy C, Laroche S, Madani N. Use of high-resolution melting and melting temperature-shift assays for specific detection and identification of *Bacillus anthracis* based on single nucleotide discrimination. *J Microbiol Meth*, 2011, 87(2): 195–201. [DOI](#)
- [17] Liang KH, Fen JJ, Chang HH, Wang HW, Hwang YC. A base-calling algorithm for Tm-shifted melting curve SNP assay. *J Clin Bioinforma*, 2011, 1(1): 3–8. [DOI](#)
- [18] Zhou SH, Liu M, An WX, Liang XH, Yu WJ, Gong BL, Piao FY. Genotyping of human platelet antigen-15 by single closed-tube Tm-shift method. *Int J Lab Hematol*, 2012, 34(1): 41–46. [DOI](#)
- [19] Tang NL, Chan CY, Leung CC, Tam CM, Blackwell J. Tuberculosis susceptibility genes in the chemokine cluster region of chromosome 17 in Hong Kong Chinese. *Hong Kong Med J*, 2011, 17(Suppl. 6): 22–25. [DOI](#)