

单核苷酸多态性检测方法的研究进展

汪维鹏^{1,2},倪坤仪²,周国华^{1,2}

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

摘要:单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的研究已成为人类后基因组时代的主要内容之一。因此建立高度自动化和高通量的 SNP 检测分析技术十分重要。文章系统地介绍了最新发展的几种 SNP 检测技术的原理和检测平台,详细阐述了等位基因特异性杂交、内切酶酶切技术、引物延伸法、寡核苷酸连接反应等 SNP 检测原理,以及平板读数仪、基因芯片、微球阵列技术和质谱仪等检测平台,并对 SNP 高通量检测技术的发展进行了展望。

关键词:单核苷酸多态性;检测技术;检测平台

中图分类号:Q524⁺.3

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2006)01-0117-10

Approaches for SNP Genotyping

WANG Wei-Peng^{1,2}, NI Kun-Yi², ZHOU Guo-Hua^{1,2}

(1. *Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China;*

2. *Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China*)

Abstract: With the completion of the Human Genome Project (HGP), typing single nucleotide polymorphisms (SNPs) has become one of the main tasks in the post-genome era. Consequently, a robust, flexible and cost-effective technique for SNP typing is essential to analyze a large number of SNPs. The latest genotyping technologies and the relative detection platforms were introduced systematically. The principle of SNP typing was described in detail in respect of allele-specific hybridization, restriction enzyme digestion, primer extension and oligonucleotide ligation assay, as well as the genotyping platforms of plate readers, genechips, bead array and mass spectrometry. Moreover, the way to the high-throughput genotyping in the future was briefly discussed.

Key words: SNP; genotyping technologies; genotyping platforms

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),继限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和微卫星多态性(microsatellite polymorphism)这两种遗传标记之后,成为第三代分子标记。2001年,SNP协会(The SNP Consortium)构建了含 1.42×10^6 个SNP、密度达1个SNP/1.9 kb的人类遗传图谱^[1],这对开展致病基因的定位和人类起源与进化的研究非常重

要。据估计,大约有 10^5 个SNP分子标记将被用于基因功能及与疾病的相关性的关联研究^[2]。如此庞大的分析工作量,对检测技术提出了极高的要求。一种理想的SNP测定方法应该具备高度自动化、高通量、高准确性和低成本等优点。由于SNP分析在新药研究和个体化医疗等领域中具有重大的产业价值,许多高通量且自动化程度高的SNP检测技术应运而生,并且得到不断的发展。

收稿日期:2004-12-09;修回日期:2005-02-24

基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30270368)[Supported by the National Nature 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,研究方向:分子遗传学。Tel/Fax:025-84514223;E-mail:ghzhou@public1.ptt.js.cn.

有关单核苷酸多态性检测方面的综述最近比较多^[3,4],本文侧重介绍了几种新出现的 SNP 检测技术的原理和检测平台,并对 SNP 高通量检测技术的发展进行了展望。

1 单核苷酸多态性

单核苷酸多态性是指基因组 DNA 中某一特定核苷酸位置上发生转换、颠换、插入或缺失等变化,而且任何一种等位基因在群体中的频率不小于 1%^[5]。通常认为 SNP 只有两种类型,即双等位基因(biallelic)^[6]。因此,在对已知突变位点检测时只需对 SNP 进行两种不同类型碱基的确认分析,而无须对 DNA 片段进行全序列测定。SNP 具有数量多、分布广和稳定遗传等特点。它与许多疾病直接相关,如血友病和苯酮尿病等,是决定人类疾病易感性和药物反应差异的主要因素。因此,SNP 分析在新药研究、个体化用药、临床检验和分子诊断等领域内存在巨大的产业价值。

2 SNP 检测技术的原理

随着对 SNP 研究的广泛关注,检测技术得到了快速的发展,出现了许多 SNP 检测技术。它们主要基于以下 4 种基本原理:(1)等位基因特异性杂交;(2)内切酶酶切技术;(3)引物延伸法;(4)寡核苷酸连接反应。

2.1 等位基因特异性杂交 (Allele specific hybridization, ASH)

TaqMan 探针技术^[7],动态等位基因特异性杂交(Dynamic allele specific hybridization, DASH)^[8]和分子信标技术(Molecular beacons)^[9]都是基于等位基因特异性杂交原理的 SNP 检测技术。Taq Man 探针技术^[10]是一种通过检测 PCR 过程中和 PCR 之后产生的荧光信号来区分等位基因类型的 SNP 检测技术。每检测一个 SNP 位点需要一对 TaqMan 探针和一条位于待测位点上游的引物。这对探针序列仅区别于多态性位点,其 3' 端连有荧光淬灭剂,5' 端分别连有两种不同的荧光染料。在 PCR 扩增过程中,利用 Taq 酶 5' 核酸酶活性降解与目标序列完全互补的探针,使荧光剂与淬灭剂分离而发出荧光。如果探针与目标序列间存在错配,就

会大大减少荧光的释放量。TaqMan 探针技术最突出的优点是不需要分离或洗脱等 PCR 后处理过程,从而提高了检测速度。确保准确分型的难点在于探针的设计。de Kok 等^[11]采用 DNA 小沟结合分子提高了检测的成功率。

DASH 是由 Howell 等^[8]于 1999 年建立的,其原理是首先将标记有荧光染料的探针与目标序列配对,然后测定互补双链所发出的荧光强度与反应体系的温度之间的关系曲线。当温度达到变性温度时,荧光强度迅速减弱;存在错配碱基的互补双链的变性温度低于不含错配碱基的双链;这样就可以通过测定互补双链的变性温度来判断互补双链中是否含有错配碱基。两年后,他们建立了 DASH 设计标准^[12],包括通过重新设计引物来减少扩增产物的二级结构,并对之前检测失败的 6 次实验重新进行考察,重复性达 100%,1 200 次检测的准确度超过 99.9%。到 2003 年,他们利用 384 孔和 1 536 孔聚丙烯微阵列膜使得检测通量大大提高,同时采用“iFRET”技术增强荧光信号,并将其称之为 DASH-2,即第二代 DASH^[13]。

分子信标技术是由 Tyagi 等^[14]于 1996 年建立的,其基本原理如图 1 所示。分子信标是一个 U 型单链寡核苷酸探针,内部有部分序列互补配对,在探针的两端分别带有荧光素和淬灭剂。探针与目标序列互补之前,由于荧光素和淬灭剂在空间结构上靠得很近,不会产生荧光;探针与目标序列完全互补配对后,荧光素与淬灭剂分开而产生荧光;如果探针与目标序列之间存在错配碱基,就不会产生荧光。可以通过标记不同颜色的荧光染料来达到同时检测多个 SNP 的目的。由于这种技术在单碱基突变检测中显示出了非常高的特异性,两年之后,他们将这种技术应用到了 SNP 检测中^[15,16]。为了能在同一管中同时检测更多的目的序列,他们又发展了多色荧光标记^[17]和波长转移分子信标^[18],如通过 4 种不同颜色的荧光标记,在同一扩增反应中同时检测 4 种单碱基突变类型,特异性很好。但是,适合于荧光标记的染料较少,这大大限制了检测通量。后来,一些研究小组将分子信标固定在固体表面,制成了 DNA 生物传感器^[19,20]。这一技术的应用,使得高通量检测成为可能。

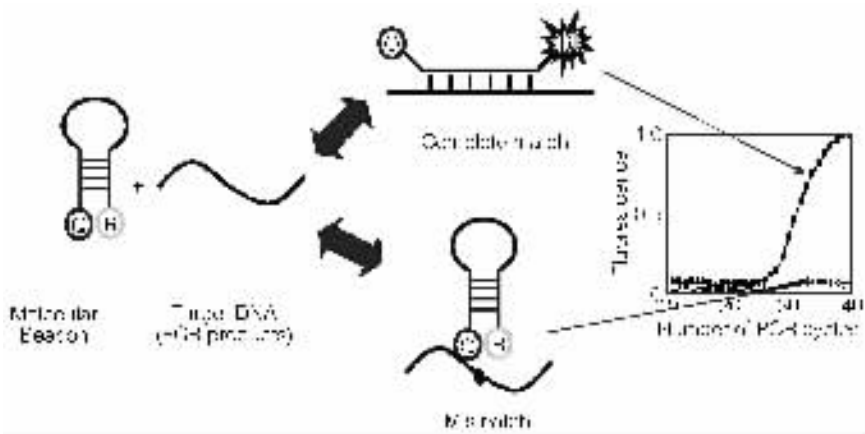


图1 分子信标技术检测 SNP 的原理

Fig.1 SNP genotyping scheme of molecular beacons

2.2 内切酶酶切技术 (Endonuclease digestion)

基于酶切原理的 SNP 检测技术有 RFLP、随机扩增多态性 DNA (random amplification polymorphism DNA, RAPD) 和引物入侵分析技术 (Invader assay)^[21] 等。RFLP 和 RAPD 是两种比较成熟的技术, 已经有很多相关介绍^[22]。Lyamichev 等^[21] 于 1999 年提出了引物入侵分析技术。基本原理如图 2 所示, 每一反应体系包括一对等位基因特异性探针和一条位于待测 SNP 位点上游的入侵探针。如果等位基因特异性探针与目标序列完全互补, 则与入侵探针的 3' 端在 SNP 位点处重叠, 一种特殊的内切酶就能识别这种三级结构并将其切除, 释放出等位基因所特有的尾序列, 它又可以作为入侵探针参加下一轮反应, 从而增强了荧光信号。被切除的尾序列的 5' 端带有等位基因特异性的荧光标记, 当它与共存的淬灭剂分离后就能释放荧光而被检测。如果等位基因特异性探针在 SNP 位点处存在错配, 就不会形成重叠结构, 也就不会发生切除反应。此时, 等位基因特异性探针上的荧光剂与淬灭剂共存而无荧光发出。最后, 通过检测荧光信号来区分等位基因的类型^[23]。引物入侵技术的优点在于等温反应和不依赖于 PCR 扩增, 而直接从基因组 DNA 进行 SNP 检测^[24, 25]。但是, 这需要大量的基因组 DNA 作为模板。Mein 等^[26] 采用 PCR 扩增产物作为模板降低了基因组 DNA 的需求量。Wilkins Stevens 等^[27] 在固相中进行入侵反应, 进一步减少了 DNA 模板的需求量。后来, Olivier 等^[28] 采用双重入侵探针提高了 SNP 检测效率。

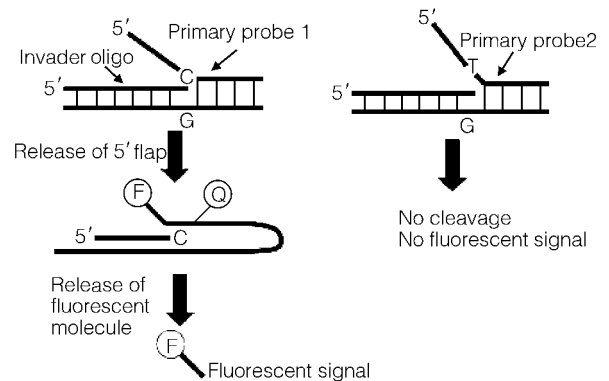


图2 引物入侵分析技术检测 SNP 的原理

Fig.2 SNP genotyping scheme of invader assay

2.3 引物延伸法 (Primer extension)

引物延伸法有基于碱基序列测定的测序法和基于引物 3' 端碱基互补性的等位基因特异性延伸法。

建立在测序反应原理基础上的 SNP 检测技术主要是通过加入不同类型的 dNTP 或 ddNTP 进行延伸反应, 根据延伸反应的信号来确定 SNP 的类型, 主要有单碱基延伸技术^[29] (SBE) 和焦测序技术^[30] (Pyrosequencing) 等。单碱基延伸技术又称为微测序 (Minisequencing)^[31] 或模板介导染料终止剂掺入 (Template-directed dye-terminator incorporation, TDI) 分析^[32], 其原理是设计一条引物位于待测 SNP 位点的上游, 该引物的 3' 端距离 SNP 位点一个碱基, 加入不同荧光标记的 ddNTPs 进行反应, 只有当加入的 ddNTP 与 SNP 位点碱基互补时, 引物才得以延伸, 通过检测延伸碱基所发出的荧光来判断 SNP 的类型。近年来, 在单碱基延伸原理的基础上

发展了很多新的固相单碱基延伸技术。大致可以分为两类:一种是将序列特异性引物固定在固相支持介质表面,加入待测序列和不同荧光标记的 ddNTPs 进行延伸反应,然后去除待测序列和未反应的 ddNTPs,通过检测固定引物所标记上的荧光来判断被测序列的碱基类型^[31];另一种是 Hirschhorn 等^[33,34]发展的在玻璃片上利用单碱基延伸-附加尾序列阵列(SBE-TAGS)检测 SNP 的技术,该技术是将引物设计为具有双重功能,其 5' 端为一段引物特异性序列(Tag),3' 端为等位基因特异性序列;因为每个位点的特异性引物带有独特的尾序列,所以可以在同一反应体系中进行多重单碱基延伸。延伸产物的 5' 端尾序列与固定在玻片上的互补序列杂交,最后通过检测延伸碱基发出的荧光来判断 SNP 的类型。

焦测序技术^[35]是一种基于生物发光分析法测定焦磷酸(PPI)的测序技术。在核酸聚合酶的作用下,依次加入 4 种不同的脱氧核糖核苷酸(dNTPs),如果加入的碱基与模板互补,则发生延伸反应,释放出等摩尔量的 PPI;PPI 在三磷酸腺苷硫酸化酶的催化作用下,与 5'-磷酸化硫酸腺苷反应生成三磷酸腺苷(ATP);ATP 激活荧光素酶发出荧光,产生的荧光强度与结合的碱基数成正比;如果加入的碱基与模板不互补,则无荧光产生,以此来测定引物后的碱基序列。在进行下一轮延伸之前,需要加入三磷酸酰基双磷酸酶将未结合的 dNTPs 和 ATP 降解。焦测序技术已经被广泛用于 SNP 测定中^[35,36]。应用焦测序法测定 SNP 的新进展是多重 SNP 的测定^[37]。其基本原理是首先用带生物素标记的一个或多个引物扩增含有待测 SNP 位点的一段或多段 DNA,然后按常规方法制备单链,加入多个测序引物,由于焦测序法的良好定量特性,根据测得的图谱就可以推断各 SNP 的类型。

等位基因特异性延伸法是利用引物 3' 端的“开关”特性来控制引物的延伸,引物 3' 端正好位于 SNP 位点,设计两条引物分别使其 3' 端与 SNP 的两种碱基互补,根据延伸反应的“有无”信号来判断 SNP 的类型。该法的主要问题是引物的非特异性延伸,为了解决延伸过程中出现的非特异性信号,Ahmadian 等^[38,39]发展了三磷酸酰基双磷酸酶介导的等位基因特异性延伸(AMASE)技术,其原理是在聚合酶的作用下,含错配碱基的引物延伸反应慢于

完全互补的引物延伸反应;加入三磷酸酰基双磷酸酶后,完全互补的引物快速发生延伸反应,而 3' 端含有错配碱基的引物即使发生延伸反应,其速度也很慢,在发生延伸反应之前 dNTP 就被三磷酸酰基双磷酸酶降解了,从而抑制了非特异性延伸反应的发生,提高了延伸特异性和检测正确性。Zhou 等采用引入人工突变碱基的方法提高了引物延伸的特异性,成功测定了 SNP^[40]和等位基因的频率^[41]。

2.4 寡核苷酸连接分析(Oligonucleotide ligation assay, OLA)

最初,OLA^[42]技术是通过两步来完成的,即先用 PCR 技术对目标序列进行扩增,再将 PCR 产物变性为单链;然后加入两条互补于待测 SNP 位点一侧序列的等位基因特异性探针和一条互补于待测 SNP 位点另一侧序列的公共探针;在 DNA 连接酶的作用下,与目标 DNA 单链完全互补的等位基因特异性探针和公共探针发生连接反应。连接产物变性后作为探针的模板进入下一个循环。如果等位基因特异性探针的 3' 端存在错配,则不会发生连接反应。Eggerding 等^[43]在同一反应体系中使用具有较高退火温度的引物在高温下进行 PCR 扩增,退火温度较低的探针在 PCR 结束后在较低温度下发生连接反应,从而实现一步完成连接分析。Chen 等^[44]在位于 SNP 位点上游的公共探针的 5' 端标记淬灭剂,而在位于 SNP 位点下游的等位基因特异性探针的 3' 端标记荧光染料;通过检测荧光共振能量转移信号来判断 SNP 的类型,从而实现了在同一反应中同时检测多个突变位点。

滚环扩增(Rolling circle amplification, RCA)技术^[45]与 OLA 技术相结合可以进行 SNP 检测,其基本原理如图 3 所示。该技术采用一对等位基因特异性开环探针(OCP)和两条引物(RCA 引物 I 和 RCA 引物 II)进行指数扩增。反应过程主要包括两步,即在连接酶的作用下,与目标序列完全互补的 OCP 的 5' 端和 3' 端发生连接反应,形成闭环 DNA 序列;然后,RCA 引物 I 和 II 分别与闭环 DNA 序列退火,并在 DNA 聚合酶的作用下进行等温延伸反应。OCP 的 5' 端碱基磷酸化并紧邻 SNP 位点;3' 末端碱基区别于等位基因。RCA 引物 II 具有发夹结构。该技术可以用基因组 DNA 作为连接反应的模板^[46],但可能出现因闭环 DNA 序列未与模板分开而导致 RCA 失败的结果^[47],这就需要采用不对称 PCR 扩

增制备单链 DNA 作为连接反应的模板^[48]。在信号检测方面,可以利用荧光能量共振转移原理,在 RCA 引物 I 的两端分别标记荧光剂和淬灭剂,当它与 OCP 形成双链时,荧光剂与淬灭剂分开,释放荧

光而被检测^[45];也可以不作标记,而将 RCA 产物与荧光探针杂交后进行检测^[48]。RCA 扩增产物是由许多连续重复的序列组成的单链 DNA 分子,所以它比较适合于固相技术^[49]。

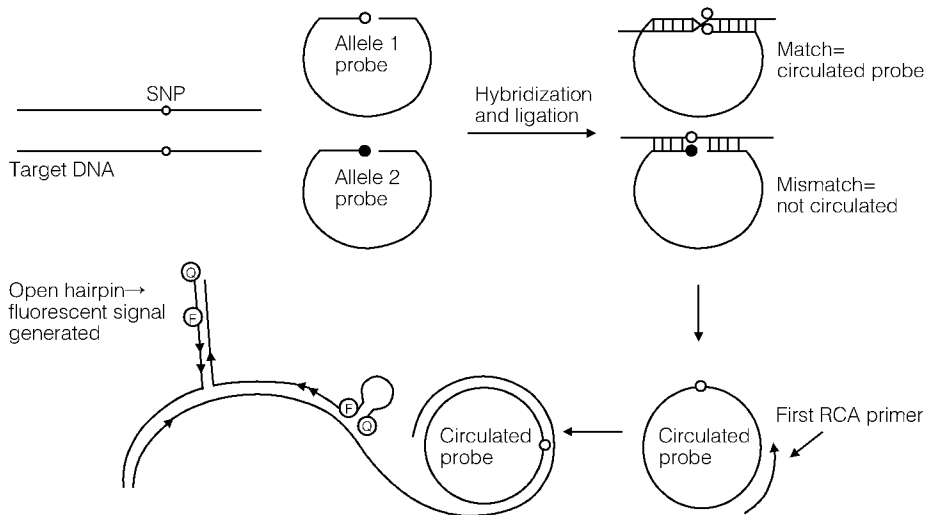


图 3 滚环扩增(RCA)法检测 SNP 的原理

Fig.3 SNP genotyping scheme of RCA

3 检测平台

测定激光诱导荧光是检测 SNP 最为常用的方法,有许多检测系统都采用了荧光检测的原理,如平板读数仪、基因芯片和微球阵列技术等。为了实现特异性 SNP 检测,荧光共振能量转移和荧光偏振是常用的两种信号指示系统,被多种检测平台成功利用。除了荧光检测平台以外,质谱仪也被广泛用于 SNP 的检测。

3.1 荧光共振能量转移(FRET)和荧光偏振(FP)

FRET 是指荧光剂与淬灭剂之间的作用,当它们相互靠近时无荧光发出;分离后荧光剂发出荧光而被检测。但只有荧光剂的发射光谱与淬灭剂的吸收光谱重叠时 FRET 才会发生。*TaqMan* 探针技术^[7]、分子信标技术^[9]、引物入侵分析技术^[21]和滚环扩增技术^[45]等都可以利用这一原理进行检测,其主要缺点是探针合成的费用较高。

FP 是指荧光分子受平面偏振光激发后发出偏振荧光。在相同的温度和溶剂黏度条件下,荧光的偏振度与荧光剂的分子量成正比。通过监测荧光分子的荧光偏振,不需纯化和分离就能检测出荧光分

子分子量的变化。因为在许多 SNP 检测反应中探针的大小都会发生改变,所以可以利用荧光偏振现象检测 SNP。FP 已被成功用于引物延伸^[50,51]、引物入侵分析^[52]和 *TaqMan* 探针技术^[53]等检测方法中。FP 可使用比 FRET 更少的荧光染料,但任何非特异性产物都会影响信噪比。

3.2 平板读数仪(Plate readers)

近年来,已商品化的荧光平板读数仪有很多,如 BECHMAN COULTER 公司的 Affinity 型荧光平板读数仪、APPLIED BIOSYSTEMS 公司的 7900 型荧光平板读数仪和 HYBAID 公司的 Chimera 型荧光平板读数仪等。它们适合于 96、384 或 1536 孔板的荧光检测;使用的光源可以是激光(如 Affinity 型荧光平板读数仪),也可以是白光(如 Chimera 型荧光平板读数仪);检测参数包括荧光强度(FI)、FRET、FP、荧光吸收(Fluorescence absorbance)和发光(Luminescence)。Affinity 型荧光平板读数仪能完成所有这些参数的检测。有的荧光平板读数仪使用 CCD 检测器实时监测 PCR 过程的荧光信号的改变,发展了实时监测荧光 PCR 技术,并与 *TaqMan* 探针技术^[54]、分子信标技术^[55]和单碱基延伸技术^[56,57]结合实时检测 SNP。

3.3 基因芯片 (Genechips)

基因芯片是利用核酸杂交原理建立起来的一种高度集成化、并行化、多样化、微型化和自动化的 SNP 检测技术,是一种高通量 SNP 检测平台。主要包括等位基因特异性杂交^[58]的直接杂交方式,标记阵列^[34]捕捉液相反应产物的间接杂交方式和基于电场控制的杂交方式^[59,60]等。具体检测过程为:通过 PCR 扩增制得的带荧光标记的单链待测 DNA 样品,在一定条件下与固定在芯片上的阵列探针杂交;或者是 PCR 扩增制得的无荧光标记的 DNA 样品,在一定条件下与固定在芯片上的阵列探针杂交后,用链霉亲和素偶连的荧光素作为显色剂进行染色。如果待测序列与探针完全互补,就发出强的荧光;否则,荧光信号就会很弱。利用激光共聚焦显微镜或其他荧光显微装置对片基进行扫描,由计算机收集荧光信号并转化为数字信号后进行分析。

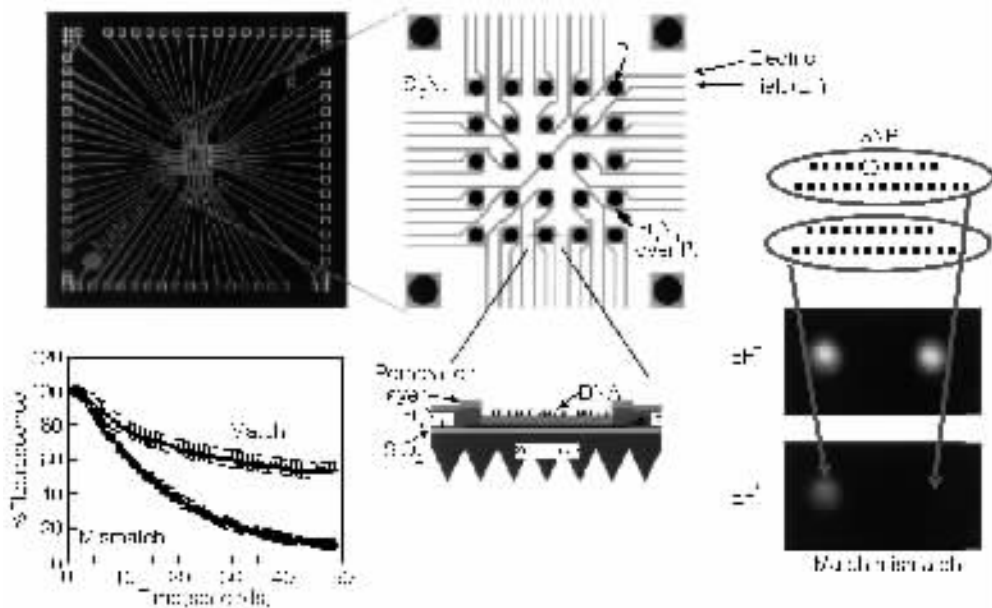


图 4 电场控制芯片测定 SNP

Fig. 4 SNP genotyping scheme of nanochip

3.4 微球阵列技术 (Bead array)

将探针固定在微球 (Beads 或 Microsphere) 表面的技术称为微球阵列技术 (Bead array^[61] 或 Microsphere array^[62]) 或悬浮阵列技术^[63]。其基本原理是:在微球表面共价结合上探针形成微球阵列,这种探针上有与 SNP 互补的链码 (ZipCodes);通过扩增目标序列,得到带有荧光标记的扩增产物;后者再与微球阵列杂交;根据微球存在的环境,选择不同的

为加快杂交反应速度,美国 Nanogene 公司研制了 Nanochip 电子微阵列^[59,60],通过在杂交位点引入电场而使杂交和冲洗过程的速度大大增加。在每平方毫米的位点上制作微电极阵列(图 4),其上覆以链亲和素标记的琼脂糖。其过程为:当位于待测位点链亲和素标记的琼脂糖凝胶下方的微电极引入直流正电压后,溶液中的生物素标记的探针就可以在电场的作用下快速泳动并浓缩结合于该处;同样的道理,可以使待测 DNA 分子快速浓缩于此,使杂交反应迅速进行;杂交完成后,改变电场方向即可将未杂交的样品 DNA 从检测位点“洗”去,选择适当的电场强度就可以选择性地从特定位点除去非特异性杂交的 DNA 和未杂交的探针,而只保留完全杂交的 DNA 分子。由于电场的这种浓缩和选择特性,极大提高了检测灵敏度和特异性,使数小时的杂交反应缩短到二三十秒钟。

方式进行检测。如果微球是悬浮于溶液中,则从反应液中分离出荧光微球,再用流式细胞仪进行检测,根据杂交上的扩增产物所发出的荧光来判断 SNP 的类型^[64]。Luminex 公司采用荧光 Qdot™ 半导体纳米晶(即量子点)来编码微球,发展了 Qbead™ 系统并用于 SNP 的高通量检测^[62]。用于杂交的待测片段可以是寡核苷酸连接产物^[65],也可以是单碱基延伸产物^[66]。另一种微球阵列技术是将微球阵列固

定在光纤的末端,荧光通过光纤传导给传感器而被检测^[67]。近年来,Kohara 等^[61]将微球按一定顺序固定在毛细管内,与标记序列杂交后进行检测。

3.5 质谱仪

目前用于 SNP 检测的质谱法主要是基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法(MALDI-TOF)^[68~70]。该技术主要有 3 种不同的测定方式:(1)单碱基引物延伸反应法(又称 PinPoint 法),即引物的 3'末端位于 SNP 位点的上游,在 4 种 ddNTPs 的存在下,该引物进行单碱基延伸,根据 SNP 位点的碱基类型而引入不同质量的 ddNTP^[71],为提高分辨率和准确度,可以在引物或 ddNTP 上引入附加质量^[72];(2)多碱基引物延伸法(又称 PROBE 法),即引物的 3'末端位于 SNP 位点的上游,在 3 种 dNTPs 和一种 ddNTP 的存在下,该引物延伸并终止于第一个与 ddNTP 互补的碱基处,延伸产物因 SNP 的不同而具有不同的分子量^[73]。该法可以高度自动化,并且与芯片技术结合可以实现高通量的分析^[74,75];(3)肽核酸探针(PNA)杂交法,即将变性的单链 DNA 与 PNA 杂交,再利用质谱检测杂交产物的质量差异^[76,77],该法的主要缺点是必须合成与每个 SNP 对应的 PNA 和优化每种引物的杂交条件,使测定自动化和通量受到限制。此外也有不用 PCR 反应,直接用引物入侵技术通过质谱来测定 SNP 的报道^[78]。除 MALDI-TOF 质谱法外,电喷雾质谱(ESI-MS)法也可以用于 SNP 的测定(称为 SOMA 法)^[79]。质谱技术是目前测定 SNP 最准确的平台之一,具有广泛的应用前景。

4 结 语

由于 SNP 检测在后基因组计划中的重要性,高通量检测 SNP 的新技术正在不断发展,《Human Mutation》、《Genome Research》和《Nucleic Acids Research》等高水平国际杂志有很多关于 SNP 高通量检测技术的报道。从目前已有的报道来看,SNP 检测方法主要集中在综合利用纳米材料技术、多重 PCR 技术、各种荧光探针设计技术和各种荧光标记技术等提高检测的准确性和通量,基因芯片和微球阵列技术在高通量检测 SNP 方面也显示出了独特的优势。在检测技术方面,DNA 阵列无疑是最为理想的,最具有发展潜力,但仍然存在问题,例如检测成本高、重复性不够好等。质谱法凭借其高灵敏度和高准确度的优势也必将得到广泛使用。采用

纳米材料和单分子检测技术有望实现不通过 PCR 扩增就可以高通量检测 SNP 的最终目标。

参 考 文 献(References):

- [1] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S C, Kakol J M, Stein L D, Marth G, Sherry S, Mullikin J C, Mortimore B J, Willey D L, Hunt S E, Cole C G, Coggill P C, Rice C M, Ning Z, Rogers J, Bentley D R, Kwok P Y, Mardis E R, Yeh R T, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston R H, McPherson J D, Gilman B, Schaffner S, Van Etten W J, Reich D, Higgins J, Daly M J, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody M C, Linton L, Lander E S, Altshuler D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million SNP. *Nature*, 2001, 409: 928~933.
- [2] Eric L. Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. *Genome Res*, 2001, 11: 927~929.
- [3] GAO Xiu-Li, JING Feng-Xiang, YANG Jian-Bo, ZHAO Jian-Long. Detection for Single Nucleotide Polymorphisms. *Hereditas* (Beijing), 2005, 27 (1): 110~122.
高秀丽,景奉香,杨剑波,赵建龙.单核苷酸多态性检测分析技术. *遗传*, 2005, 27(1): 110~122.
- [4] ZHAO Guang-Rong, YANG Fan, YUAN Ying-Jin, GAO Xiu-Mei, ZHANG Jun-Ping. Progress in detection methods of single nucleotide polymorphisms. *Hereditas* (Beijing), 2005, 27 (1): 123~129.
赵广荣,杨帆,元英进,高秀梅,张军平.单核苷酸多态性检测方法的新进展. *遗传*, 2005, 27(1): 123~129.
- [5] Wang D G, Fan J B, Siao C J, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris M S, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson T J, Lander E S. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, 280: 1077~1082.
- [6] 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, Bruskiewich 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, Lambie 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: 516~520.
- [7] Holland P M, Abramson R D, Watson R, Gelfand D H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7276~7280.

- [8] Howell W M, Jobs M, Gyllensten U, Brookes A J. Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 87~88.
- [9] Yagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 303~308.
- [10] Livak K J, Marmaro J, Todd J A. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genet*, 1995, 9: 341~342.
- [11] de Kok J B, Wiegerinck E T, Giesendorf B A, Swinkels D W. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB-probes). *Hum Mutat*, 2002, 19: 554~559.
- [12] Prince J A, Feuk L, Howell W M, Jobs M, Emahazion T, Blenow K, Brookes A J. Robust and accurate single nucleotide polymorphism genotyping by dynamic allele-specific hybridization (DASH): Design criteria and assay validation. *Genome Res*, 2001, 11: 152~162.
- [13] Jobs M, Howell W M, Stromqvist L, Mayr T, Brookes A J. DASH-2: Flexible, low-cost, and high-throughput SNP genotyping by dynamic allele-specific hybridization on membrane arrays. *Genome Res*, 2003, 13: 916~924.
- [14] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 303~308.
- [15] Piatek A S, Tyagi S, Pol A C, Telenti A, Miller L P, Kramer F R, Alland D. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 359~363.
- [16] Kostrikis L G, Tyagi S, Mhlanga M M, Ho D D, Kramer F R. Molecular beacons-spectral genotyping of human alleles. *Science*, 1998, 279: 1228~1229.
- [17] Tyagi S, Bratu D P, Kramer F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 49~53.
- [18] Tyagi S, Marras S A E, Kramer F R. Wavelength-shifting molecular beacons. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1191~1196.
- [19] Liu X J, Tan W H. A fiber-optic evanescent wave DNA biosensor based on novel molecular beacons. *Anal Chem*, 1999, 71: 5054~5059.
- [20] Steemers F J, Ferguson J A, Walt D R. Screening unlabeled DNA targets with randomly ordered fiber-optic gene arrays. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 91~94.
- [21] Lyamichev V, Mast A L, Hall J G, Prudent J R, Kaiser M W, Takova T, Kwiatkowski R W, Sander T J, de Arruda M, Arco D A, Neri B P, Brow M A. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 292~296.
- [22] Shi M M. Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes. *Am J Pharmacogenomics*, 2002, 2: 197~205.
- [23] Hall J G, Eis P S, Law S M, Reynaldo L P, Prudent J R, Marshall D J, Allawi H T, Mast A L, Dahlberg J E, Kwiatkowski R W, de Arruda M, Neri B P, Lyamichev V I. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 15: 8272~8277.
- [24] Fors L, Lieder K W, Vavra S H, Kwiatkowski R W. Large-scale SNP scoring from unamplified genomic DNA. *Pharmacogenomics*, 2000, 1: 219~229.
- [25] Rao K V, Stevens P W, Hall J G, Lyamichev V, Neri B P, Kelso D M. Genotyping single nucleotide polymorphisms directly from genomic DNA by invasive cleavage reaction on microspheres. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: e66.
- [26] Mein C A, Barratt B J, Dunn M G, Siegmund T, Smith A N, Esposito L, Nutland S, Stevens H E, Wilson A J, Phillips M S, Jarvis N, Law S, de Arruda M, Todd J A. Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation. *Genome Res*, 2000, 10: 330~343.
- [27] Wilkins Stevens P, Hall J G, Lyamichev V, Neri B P, Lu M, Wang L, Smith L M, Kelso D M. Analysis of single nucleotide polymorphisms with solid phase invasive cleavage reactions. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: e77.
- [28] Olivier M, Chuang L M, Chang M S, Chen Y T, Pei D, Ranade K, de Witte A, Allen J, Tran N, Curb D, Pratt R, Neefs H, de Arruda Indig M, Law S, Neri B, Wang L, Cox D R. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms using new bplex invader technology. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e53.
- [29] Syvanen A C, Aaltosetala K, Harju L, Kontula K, Soderlund H. A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics*, 1990, 8: 684~692.
- [30] Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 1998, 281: 363~365.
- [31] Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, Peltonen L, Syvanen A C. Minisequencing: A specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res*, 1997, 7: 606~614.
- [32] Chen X, Zehnbauer B, Gnirke A, Kwok P Y. Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 10756~10761.
- [33] Hirschhorn J N, Sklar P, Lindblad-Toh K, Lim Y M, Ruiz-Gutierrez M, Bolck S, Langhorst B, Schaffner S, Winchester E, Lander E S. SBE-TAGS: An array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 12164~12169.
- [34] Fan J B, Chen X, Halushka M K, Berno A, Huang X, Ryder T, Lipshutz R J, Lockhart D J, Chakravarti A. Parallel genotyping of human SNP using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res*, 2000, 10: 853~860.
- [35] ZHOU Guo-Hua, GU Zhuo-Liang, ZHANG Jie-Bing. P53 gene mutation detection by bioluminescence assay. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2002, 37(1): 41~45.
- 周国华, 古卓良, 章杰兵. 生物发光分析法检测 P53 基因上的

- 突变点. *药学报*, 2002, 37(1): 41~45.
- [36] Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res*, 2000, 10: 1249~1258.
- [37] Pourmand N, Elahi E, Davis R W, Ronaghi M. Multiplex pyrosequencing. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e31.
- [38] Ahmadian A, Gharizadeh B, O'Meara D, Odeberg J, Lundeberg J. Genotyping by apyrase-mediated allele-specific extension. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: e121.
- [39] O'Meara D, Ahmadian A, Odeberg J, Lundeberg J. SNP typing by apyrase-mediated allele-specific primer extension on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e75.
- [40] 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: 155~163.
- [41] Zhou G H, Kamahori M, Okano K, Chuan G, Harada K, Kambara H. Quantitative detection of single nucleotide polymorphisms for a pooled sample by a bioluminometric assay coupled with modified primer extension reactions (BAMPER). *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: e93.
- [42] Landegren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*, 1988, 241: 1077~1080.
- [43] Eggerding F A. A one-step coupled amplification and oligonucleotide ligation procedure for multiplex genetic typing. *Genome Res*, 1995, 4: 337~345.
- [44] Chen X, Livak K J, Kwok P Y. A homogeneous, ligase-mediated DNA diagnostic test. *Genome Res*, 1998, 5: 549~556.
- [45] Pickering J, Bamford A, Godbole V, Briggs J, Scozzafava G, Roe P, Wheeler C, Ghouze F, Cuss S. Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e60.
- [46] Lizardi P M, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas D C, Ward D C. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*, 1998, 19: 225~232.
- [47] Baner J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landegren U. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 5073~5078.
- [48] Qi X, Bakht S, Devos K M. L-RCA (ligation-rolling circle amplification): a general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNP). *Nucleic Acids Res*, 2001, 22: e116.
- [49] Nallur G, Luo C, Fang L, Cooley S, Dave V, Lambert J, Kulkarni K, Kingsmore S, Lasken R, Schweitzer B. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: e118.
- [50] Chen X, Levine L, Kwok P Y. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis. *Genome Res*, 1999, 9: 492~498.
- [51] Hsu T M, Chen X, Duan S, Miller R D, Kwok P Y. A universal SNP genotyping assay with fluorescence polarization detection. *Biotechniques*, 2001, 31: 560~570.
- [52] Hsu T M, Law S M, Duan S, Neri B P, Kwok P Y. Genotyping single nucleotide polymorphisms by the invader assay with dual-color fluorescence polarization detection. *Clin Chem*, 2001, 47: 1373~1377.
- [53] Latif S, Bauer-Sardina I, Ranade K, Livak K J, Kwok P Y. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis II: 5'-nuclease assay. *Genome Res*, 2001, 11: 436~440.
- [54] Nurmi J, Ylikoski A, Soukka T, Karp M, Lovgren T. A new label technology for the detection of specific polymerase chain reaction products in a closed tube. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: e28.
- [55] Mhlanga M M, Malmberg L. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods*, 2001, 25: 463~471.
- [56] Rudi K, Holck A L. Real-time closed tube single nucleotide polymorphism (SNP) quantification in pooled samples by quencher extension (QEXT). *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: e117.
- [57] Xiao M, Kwok P Y. DNA analysis by fluorescence quenching detection. *Genome Res*, 2003, 13: 932~939.
- [58] Cho R J, Mindrinos M, Richards D R, Sapolsky R J, Anderson M, Drenkard E, Dewdney J, Reuber T L, Stammers M, Federpiel N, Theologis A, Yang W H, Hubbell E, Au M, Chung E Y, Lashkari D, Lemieux B, Dean C, Lipshutz R J, Ausubel F M, Davis R W, Oefner P J. Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genet*, 1999, 23: 203~207.
- [59] Sosnowski R G, Tu E, Butler W F, O'Connell J P, Heller M J. Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1119~1123.
- [60] Edman C F, Raymond D E, Wu D J, Tu E, Sosnowski R G, Butler W F, Nerenberg M, Heller M J. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4907~4914.
- [61] Kohara Y, Noda H, Okano K, Kambara H. DNA probes on beads arrayed in a capillary, 'Bead-array', exhibited high hybridization performance. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e87.
- [62] 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: e43.
- [63] Armstrong B, Stewart M, Mazumder A. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry*, 2000, 40: 102~108.
- [64] Taylor J D, Briley D, Nguyen Q, Long K, Iannone M A, Li M S.

- Ye F, Afshari A, Lai E, Wagner M, Chen J, Weiner M P. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *Biotechniques*, 2001, 30: 661~669.
- [65] Iannone M A, Taylor J D, Chen J, Li M S, Rivers P, Slentz-Kesler K A, Weiner M P. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry*, 2000, 39: 131~140.
- [66] Shapero M H, Leuther K K, Nguyen A, Scott M, Jones K W. SNP genotyping by multiplexed solid-phase amplification and fluorescent minisequencing. *Genome Res*, 2001, 11: 1926~1934.
- [67] Walt D R. Bead-based fiber-optic arrays. *Science*, 2000, 287: 451~452.
- [68] Ross P, Hall L, Smirnov I, Haff L. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 1347~1351.
- [69] Stoerker J, Mayo J D, Tetzlaff C N, Sarracino D A, Schwöpe I, Richert C. Rapid genotyping by MALDI-monitored nuclease selection from probe libraries. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1213~1216.
- [70] Bray M S, Boerwinkle E, Doris P A. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. *Hum Mutat*, 2001, 17: 296~304.
- [71] Haff L, Smirnov I. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res*, 1997, 7: 378~388.
- [72] Ross P, Hall L, Smirnov I, Haff L. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 1347~1351.
- [73] Braun A, Little D P, Koster H. Detecting CFTR gene mutations by using primer oligo base extension and mass spectrometry. *Clin Chem*, 1997, 43: 1151~1158.
- [74] Tang K, Fu D J, Julien D, Braun A, Cantor C R, Koster H. Chip-based genotyping by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10016~10020.
- [75] Nelson M R, Marnellos G, Kammerer S, Hoyal C R, Shi M M, Cantor C R, Braun A. Large-scale validation of single nucleotide polymorphisms in gene regions. *Genome Res*, 2004, 14: 1664~1668.
- [76] Ross P L, Lee K, Belgrader P. Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*, 1997, 69: 4197~4202.
- [77] Ye S, Liang X, Yamamoto Y, Komiyama M. Detection of single nucleotide polymorphisms by the combination of nuclease S1 and PNA. *Nucleic Acids Res*, 2002, Suppl 235~236.
- [78] Griffin T J, Hall J G, Prudent J R, Smith L M. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 6301~6306.
- [79] Tsuneyoshi T, Ishikawa K, Koga Y, Naito Y, Baba S, Terunuma H, Arakawa R, Prockop D J. Mass spectrometric gene diagnosis of one-base substitution from polymerase chain reaction amplified human DNA. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, 11: 719~722.