

基于磁性颗粒“在位”PCR和通用标签技术的新型高通量SNP分型方法*

李松^{1)**} 刘洪娜^{2)**} 王志飞⁴⁾ 祭美菊¹⁾ 郭雅飞¹⁾ 何农跃^{1,2)***} 戴亚斌^{1,3)}

⁽¹⁾ 东南大学生物电子学国家重点实验室, 南京 210096; ⁽²⁾ 湖南工业大学绿色包装与生物纳米技术应用重点实验室, 株洲 412008;

⁽³⁾ 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225003; ⁽⁴⁾ 东南大学化学化工学院, 南京 210096)

摘要 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)在对复杂疾病遗传易感性以及基于群体基因识别等方面的研究中起着非常重要的作用, 尤其是对复杂疾病遗传易感性的研究, 需要对大量样本进行分型. 为了满足这种要求, 亟待需要发展一种操作简单、成本较低、适于自动化和高通量的分型技术. 利用磁性颗粒“在位”固相PCR(*in situ* MPs-PCR)扩增的靶序列, 通过与野生、突变标签探针以及双色荧光(Cy3, Cy5)通用检测子杂交实现对样本的分型. 应用该方法, 对96个样本的亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因C677T位点的多态性进行了检测, 其野生型和突变型样本的正错配信号比大于4.5, 杂合型正错配信号比接近1, 分型结果与测序结果一致.

关键词 磁性颗粒, “在位”PCR, 通用标签, 单核苷酸多态性分型

学科分类号 Q52, Q819

在后基因组时代, 做为第三代遗传标志的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)已经越来越多地被用于解释个体的表型差异、不同群体和个体对疾病, 特别是对复杂疾病的易感性, 以及对各种药物的耐受性和对环境因子的反应^[1,2]. 其中, 在对于常见的复杂疾病的易感性研究中, 由于有众多基因和环境因素的参与, 有必要对来自不同种群的大量样本的多个SNP位点同时进行检测. 因此, 建立一种高通量、低成本、适于自动化检测的分型方法是非常必要的^[3].

目前常用的SNP分型方法大致可以宽泛地分为2大类: 以酶的应用为基础的分型方法和以杂交技术为基础的分型方法^[4]. 以酶的应用为基础的方法, 如单碱基延伸法(single base extension)^[5,6]、侵入法(invader)^[7]等, 由于需要比较昂贵的具有特异性的酶和较复杂的实验操作步骤, 很难满足高通量和自动化的要求. 而以杂交为基础的分型方法, 如基因芯片法^[8]、TaqMan法^[9]、分子信标法^[10](molecular beacon)等, 虽然可满足高通量分型的要求, 但这些方法大多需要为待检测的每个SNP位点设计经标记的探针, 较高的成本大大限制了它们的应用范围.

我们曾经提出的基于磁性纳米颗粒和双色荧光杂交应用的SNP分型方法^[11], 实现了对大量样本高通量、简单和快速分型. 但应用该方法时, 首先, 需要为每一个待分型的SNP位点单独设计一对昂贵的Cy3、Cy5标记的荧光探针; 其次, 实验中加入的用以捕获PCR产物的磁性颗粒, 其中有一部分捕获了未参与PCR反应的过量引物, 造成了磁性颗粒的浪费, 以上2点均增加了该方法的分型成本, 限制了该方法在对多样本, 多位点分型时的应用. 为了进一步降低分型成本, 在本实验中我们通过使用2条带有野生、突变通用标签(tag)的探针和双色荧光(Cy3、Cy5)标记的通用检测子, 来代替原方法中的等位基因特异性双色荧光探针(结构如图1b), 同时, 通过在磁性颗粒上固定单侧引物, 经

* 国家自然科学基金(60571032, 60121101, 90606027), 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02Z133), 高等学校博士学科点专项科研基金(20050286014), 江苏省科研院所社会公益研究和服务专项资金(BM2003701)和湖南省自然科学基金(2007FJ4050)资助项目.

** 共同第一作者. *** 通讯联系人.

Tel: 025-83790885, E-mail: nyhe1958@163.com

收稿日期: 2007-02-26, 接收日期: 2007-03-16

“在位”固相 PCR 直接在颗粒表面扩增出待测靶序列, 来降低磁性颗粒的用量. 本文中应用这种新方法对 96 个样本的 MTHFR 基因 C677T 位点进行了高通量分型检测, 结果与测序结果吻合.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 DNA 样本. 实验所用 96 个样本均来自长沙市中心医院, 样品为病人的抗凝外周血. 基因组 DNA 的提取采用标准的 KI 提取法.

1.1.2 寡核苷酸的设计. MTHFR 基因 C677T 多态位点的引物序列为: 上游引物(FR), 5' TGAAGG-AGAAGGTGTCTGCGGGA 3', 生物素标记的下游引物 (Bio-RP), 5' Biotin- (T)₁₅-AGGACGGTGCG GTGAGAGTG 3'; 等位基因特异性标签探针序列

为: 野生型标签探针 W tag probe, CGGGAGCCG ATTT(T)₁₁ GCCGTCCTGATTG, 突变型标签探针 M tag probe, CGGGAGTCGATTT(T)₁₁TCACGCTT ACGAG; 双色荧光标记的通用检测子为: 野生型, Cy3 CAATCAGGACGGC, 突变型, Cy5 CTCGTA AGCGTGA (以上序列均为 Sangon 公司合成). 所有的标签探针和荧光检测子经优化设计去除了 4 个碱基以上的发夹和回文结构, 同时, 2 个标签探针之间无交叉同源.

1.1.3 试剂与仪器. 杂交液 (Sangon 公司); Taq DNA 聚合酶 (Promega 公司); 粒径约 100 nm 的链霉亲和素包被的磁性颗粒为自制^[12, 13]; PTC 220 型 PCR 扩增仪 (MJ Research 公司); GenePix 4100A 荧光扫描仪 (Axon 公司); Nano-Plotter 型点样仪 (Gesim 公司).

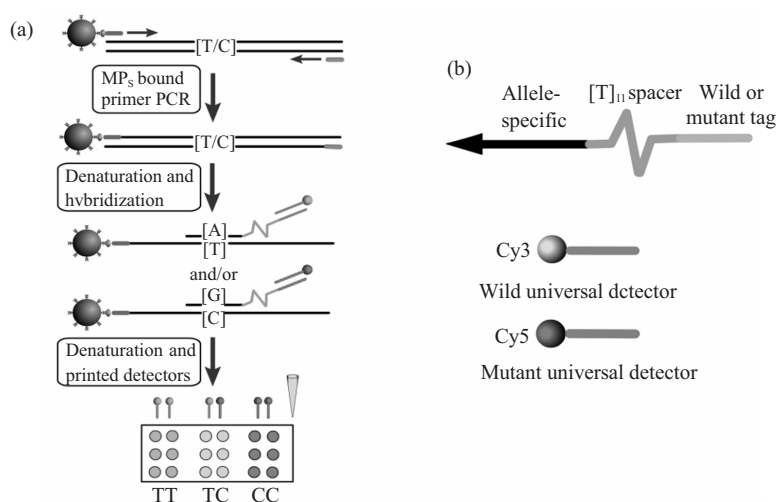


Fig. 1 Schematic of MP-PCR based genotyping method with allele-specific tag probes and dual-color universal detector hybridization

(a) Procedure of this method. (b) Structure of tag probes and universal detectors. The allele-specific region is separated from the wild or mutant tag by a polyT₁₁ linker. Wild and mutant universal detectors are perfectly matched with wild and mutant tag, respectively.

1.2 方法

1.2.1 磁性颗粒“在位”PCR 及分型原理. 基于磁性颗粒“在位”PCR 和通用标签的 SNP 分型原理如图 1a 所示. 首先, 生物素标记的下游引物 (Bio-RP) 固定到链霉亲和素包被的磁性颗粒上, 通过“在位”固相 PCR 反应扩增出含有所检测 SNP 位点的目的片段. 然后经变性、洗涤后, 固定在磁性颗粒上的 ssDNA 与野生和突变型标签探针以及双色荧光标记的通用检测子在特定温度下杂交. 其中野生型样本只与野生型标签探针杂交, 其上面所

连接的野生型标签与 Cy3 标记的通用检测子完全互补杂交, 突变型样本只与突变型标签探针杂交, 其连接的突变型标签与 Cy5 标记的通用检测子完全互补杂交, 而杂合型与 2 种标签探针均能杂交, 并与 Cy3、Cy5 标记的 2 种通用检测子杂交. 最后将杂交上的通用荧光检测子变性下来, 点样到未经任何修饰的玻片上进行扫描. 通过对荧光信号的检测区分样本的基因型.

1.2.2 PCR 扩增. MTHFR 基因 C677T 多态 PCR 扩增反应体系为 30 μ l, 其中含 10 mmol/L Tris-HCl

(pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTPs, 10 pmol 上游引物, 50 μg 连接了下游引物的磁性颗粒, 2.5 U Taq DNA 聚合酶 (Promega 公司), 基因组 DNA 100 ng. 将 PCR 反应体系加入 96 孔 PCR 板, 在 PTC 220 型扩增仪上进行如下程序: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后, 72℃ 再延伸 7 min. 反应结束后, 将磁性颗粒经灭菌双蒸水振荡、洗涤 2 次后, 均匀分散到 30 μl 双蒸水中. 经 95℃ 变性、骤冷, 将磁性颗粒利用外加磁场聚集到反应管底部, 上清液通过紫外分光光度计测定扩增出的产物浓度, 然后在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 用凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司) 观察并拍照记录. 聚集于管底的磁性颗粒备用.

1.2.3 杂交和信号检测. 将固定有 ssDNA 的磁性颗粒清洗后, 分别加入灭菌去离子水 6 μl, 杂交液 6 μl, 10 mmol/L 的野生、突变标签探针以及 Cy3、Cy5 标记的通用检测子各 1 μl, 混匀后 38℃ 杂交 1 h. 杂交后的磁性颗粒经 2 × SSC - 0.1% SDS、0.1 × SSC - 0.1% SDS 和 0.1 × SSC 在室温各振荡、清洗 3 min. 最后将磁性颗粒均匀分散于 15 μl 3 × SSC 缓冲液中, 95℃ 变性 5 min, 置于冰上骤冷, 磁分离后吸取上清液点样于未经任何处理的干净载玻片上, 快速烤干. 所有操作在避光条件下进行.

1.2.4 杂交和信号检测. 上述处理后的玻片经配有 Cy3 和 Cy5 滤色片的 4100A 扫描微阵列分析系统 (Axon, USA) 扫描、叠加以获得样品分型图像. 图像经分析软件 Genepix 6.0 分析后转化为数据. 用 Origin 7.0 图像处理软件对数据进行分析并作图.

1.2.5 DNA 测序. 对 MTHFR 基因的 C677T 多态的 3 种等位基因型 (野生型 CC、杂合型 CT、突变型 TT) 各抽取 5 份样品使用普通引物进行 PCR 扩增, 将切胶纯化后的 PCR 产物进行测序 (Takara 公司) 来验证分型结果.

2 结 果

2.1 磁性颗粒“在位”PCR

采用 1.1.2 中的引物对包含 MTHFR 基因 C677T 多态位点的靶序列进行扩增, 扩增片段长度为 213 bp. 图 2a 为扩增产物经洗涤、变性后上清液电泳结果. 可以看出, 在 1~4 泳道中均有处于同一位置清晰的电泳条带, 通过与 DNA 分子质量标准 (M) 比较, 扩增出的条带处于 213 bp 的位置, 为所需的靶序列. 实验结果表明: 当引物固定到磁

性颗粒表面进行“在位”固相 PCR 扩增时, 能够扩增出所需要的分型靶序列. 通过紫外分光光度计检测上清液中的产物浓度 (图 2b), 单链产物浓度在 70~120 mg/L 之间, 低于常规 PCR 的产物浓度 (大于 200 mg/L), 这是由于固定在磁性颗粒上的下游引物空间位阻比较大, 使得 PCR 扩增效率低于常规反应所致.

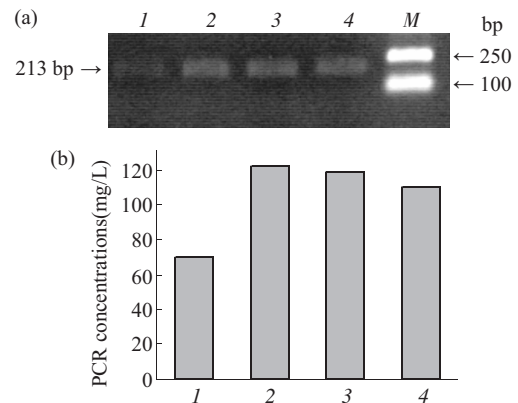


Fig. 2 Detection of PCR amplification on MPs

(a) Electrophoresis pattern of ss-PCR products using 1% agarose gel. (b) The PCR concentrations of the corresponding wells.

2.2 样品的分型结果

本实验并行扩增了 96 个样本的 C677T 靶序列, 并通过与标签探针和双色荧光通用检测子杂交分析了其基因型. 根据分型原理, 野生型样本将获得一个较强的 Cy3 荧光 (绿色荧光) 信号, 突变型样本则获得一个较强的 Cy5 荧光 (红色荧光) 信号, 杂合型样本既可获得 Cy3 荧光又可获得 Cy5 荧光, 经过叠加后能显示一个较强的“黄色”荧光. 图 3a 是 96 个样本的相对荧光信号扫描图, 显然, 根据扫描结果可以非常简单直观地区分出样本在 MTHFR 基因 C677T 位点的 3 种基因型.

图 3b 显示了具有代表性的 12 个样品的相对荧光信号强度值. 可以看到, 图 3a 中呈“绿色”的 5 个样本 (2、4、5、7、12) 有较强的 Cy3 荧光信号, 其荧光强度在 3 932.50 和 12 525.75 之间, 并且, 其对应的 Cy5 荧光强度在 523.25 和 2 611.50 之间, Cy3/Cy5 的比值介于 4.57 和 7.97 之间. 这些结果表明, 来自这 5 个样品的靶序列与野生型标签探针相匹配, 然后与 Cy3 标记的荧光通用检测子杂交, 为 677CC 野生型. 显示“红色”的 3 个样本 (1、8、11) 为 677TT 突变型, 它们的靶序列与突变型标签探针相匹配, 然后与 Cy5 标记的荧光通用检测子

杂交, 其对应的 Cy5 荧光强度远高于 Cy3, Cy5/Cy3 的比值介于 4.61 和 4.87 之间. 样品 3、6、9 和 10 同时得到了较强的 Cy3 和 Cy5 荧光信号, 说明这些样本均能与 2 种标签探针相结合, 再与 2 种荧光通用检测子杂交, Cy3/Cy5 的比值介于 1.023 和 1.23 之间, 因此可以判断这些样品为杂合

型. 从图 3 中可以看到, 不同的样品具有不同的荧光强度值, 这主要是由于在进行“在位”PCR 扩增时, 来自于不同样品扩增出的产物浓度不同 (图 2). 但是这种浓度不同并不会影响分型结果的荧光信号正错配比, 同样也不会影响样品的分型结果.

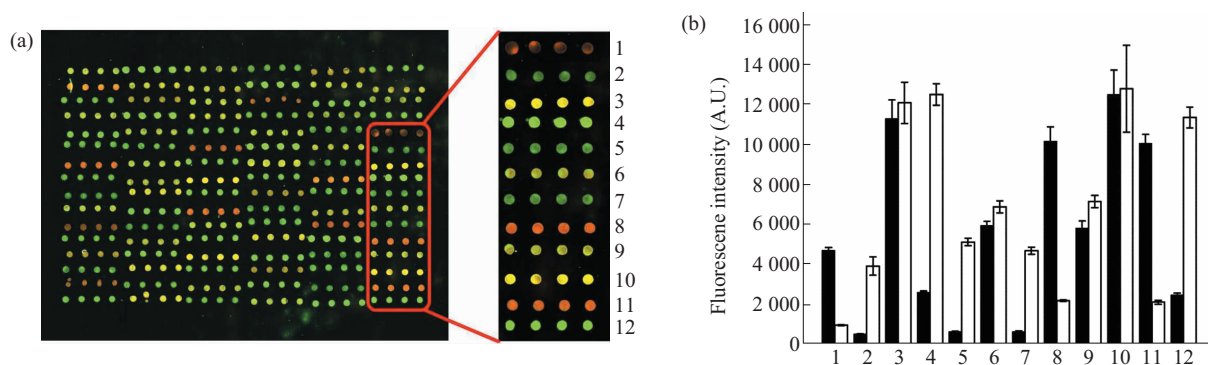


Fig. 3 Microarray results from 96 different samples assayed for the C677T locus of the MTHFR gene

(a) Each sample was spotted four replicates in a row. The plot of (b) is fluorescence intensities for twelve representative samples (1~12) selected in (a). ■: Cy5; □: Cy3.

2.4 分型结果的验证

为了验证分型结果, 将 15 份样本的 PCR 产物纯化后直接进行测序验证. 图 4 显示了 3 份具有代表性的 DNA 样本 (3 份样本经检测分别为 MTHFR 基因 C677T 多态性位点的 CC 野生型、CT 杂合型、TT 突变型) PCR 纯化产物的直接测序结果. 15 份样本的测序结果与分型结果一致.

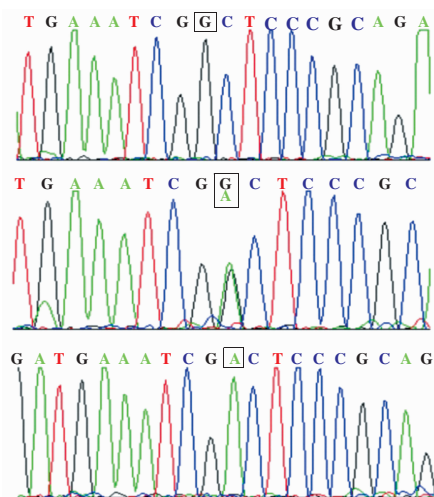


Fig. 4 The sequencing results of purified PCR products from 3 different samples

Marked square indicated the C677T SNP site in MTHFR gene. They were wild type (single peak for G), heterozygous type (double peaks for G/A), and mutant type (single peak for A), respectively.

3 讨 论

目前, 随着 SNP 应用研究的不断深入, 建立高通量、低成本、准确、易于自动化的基因分型技术是进行大量人群筛查、大量样本统计和基因功能分析的关键. 近年来, 国际上报道的诸多 SNP 分型方法中, 生物芯片技术作为一种可靠的和高通量检测工具, 被广泛地应用于大量样本的 SNP 分型研究^[14,15], 但此类方法在应用中往往需要对待检测的靶序列进行纯化和浓缩, 使得实验步骤变得比较繁琐和耗时. 我们曾经提出基于磁性纳米颗粒与双色荧光探针杂交的 SNP 分型方法^[1], 该方法避免了对靶序列的纯化和浓缩, 成功实现了对大量样本简单、快速和高通量的分型, 且整个实验步骤易于实现自动化. 但每检测一个 SNP 位点均需要设计一对昂贵的双色荧光探针, 且反应所需要的磁性纳米颗粒的量较大, 还不能满足后基因组时代对大量样本 SNP 分型时的低成本需求. 因此, 在本文研究的新方法中, 我们通过设计一端分别连接通用野生和突变标签的野生和突变特异性检测探针 (图 1b), 将 96 个样本直接在磁性颗粒表面进行“在位”固相 PCR 后, 扩增出的靶序列与标签检测探针、通用荧光检测子在经过优化的温度下 (38℃) 杂交, 最终得到了直观、准确的分型结果, 且正错配信号比值

高(大于4.5),这就证明,用等位基因特异性标签探针和荧光通用检测子代替双色荧光特异性探针进行杂交分型是可行的.该方法与我们发表过的分型方法相比,对不同的SNP位点分型时,只有非标记的特异性标签探针是不同的,而使用昂贵的荧光探针是相同的.将一侧引物固定在磁性颗粒表面,通过“在位”固相PCR扩增待分型靶序列,避免了原方法中磁性颗粒对未反应引物的无效吸附,在获得较好的分型结果的同时,每个反应磁性颗粒的用量从与80 μg 降至50 μg .与原方法相比,新方法在保持其实验简便性的同时,大大降低了进行多样本、多位点的SNP分型成本.同时,该方法利用磁性颗粒分散性好、易于实现自动化操作等优点,实现了在96孔或者384孔反应板中样本的高通量制备,并且利用芯片技术实现了对大量样本基因型的高通量“读出”.这几个基本特征说明本方法大大满足了当前SNP研究中对多样本多位点的高通量、低成本、自动化分型的要求^[6].

参 考 文 献

- 1 Brokes A J. The essence of SNPs. *Gene*, 1999, **234** (2): 177~186
- 2 刘万清, 贺林. SNP——为人类基因组描绘新的蓝图. *遗传*, 1998, **20** (6): 38~40
Liu W Q, He L. *Hereditas*, 1998, **20** (6): 38~40
- 3 Jenkins S, Gibson N. High-throughput SNP genotyping. *Comparative and Functional Genomics*, 2002, **3** (11): 57~66
- 4 Takatsu K, Yokomaku T, Kurata S. *et al.* A FRET-based analysis of SNPs without fluorescent probes. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32** (19): e156
- 5 Hirschhorn J N, Sklar P, Lindblad-Toh K, *et al.* SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (22): 12164~12169
- 6 罗春清, 邓立彬, 周珺, 等. 应用FP-TDI技术进行高通量单核苷酸多态分型. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (8): 731~735
Luo C Q, Deng L B, Zhou J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (8): 731~735
- 7 Olivier M, Chuang L M, Chang M S, *et al.* High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms using new biplex invader technology. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30** (12): e53
- 8 Schena M, Heller R A, Theriault T P, *et al.* Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnology*, 1998, **16** (7): 301~306
- 9 Holloway J W, Beghe B, Turner S, *et al.* Comparison of three methods for single nucleotide polymorphism typing for DNA bank studies: sequence-specific oligonucleotide probe hybridization, TaqMan liquid phase hybridization, and microplate array diagonal gel electrophoresis (MADGE). *Human Mutation*, 1999, **14** (4): 340~347
- 10 Tyagi S, Bratu D P, Kramer F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology*, 1998, **16** (1): 49~53
- 11 Li S, Liu H N, Wang Z F, *et al.* Magnetic Particles-based High-Throughput Genotyping Method with Dual-Color Fluorescence Hybridization. *Analytic Biochemistry*, 2006, **359**: 277~279
- 12 Wang Z F, Guo H S, Yu Y L, *et al.* Synthesis and characterization of novel magnetic carrier with its composition of Fe_3O_4 /carbon using hydrothermal reaction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2006, **302** (2): 397~404
- 13 Wang Z F, Xiao P F, Shen B, *et al.* Synthesis of palladium-coated magnetic nanoparticle and its application in Heck reaction. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, **276** (1-3): 116~121
- 14 Kwok P Y. High-throughput genotyping assay approach. *Pharmacogenomics*, 2000, **1** (1): 95~100
- 15 Ranade K, Chang M S, Ting C T, *et al.* High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res*, 2001, **11** (7): 1262~1288
- 16 Fan J B, Chee M S, Gunderson K L. Highly parallel genomic assays. *Nature Reviews Genetics*, 2006, **7** (8): 633~644

A Novel *In situ* Magnetic Particle PCR Based High-throughput Genotyping Method Using Universal Tags*

LI Song^{1)**}, LIU Hong-Na^{2)**}, WANG Zhi-Fei⁴⁾, JI Mei-Ju¹⁾, GUO Ya-Fei¹⁾, HE Nong-Yue^{1,2)***}, DAI Ya-Bin^{1,3)}

¹⁾State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096, China;

²⁾Key Laboratory of Green Packaging and Application of Biological Nanotechnology of Hunan Province, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412008, China;

³⁾Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003, China;

⁴⁾School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China)

Abstract Researches for susceptibility of complex diseases need large-scale SNPs genotyping across many individuals. It leads to a requirement for a simple, cost effective, automatic and high-throughput genotyping method. Herein, a novel high-throughput SNP genotyping method using magnetic particles (MPs) *in situ* PCR and universal tags was described. PCR products were directly amplified by MPs *in situ* PCR and interrogated by hybridization with wild and mutant tagged probes and a pair of dual-color (Cy3, Cy5) universal detectors to determine SNP, and then genotype of each sample can be simultaneously identified by scanning the microarray printed with the denatured detectors on an unmodified clean glass slide. Moreover, a pair of given dual-color universal detectors can be applied to any SNP loci by hybridization with allele specific tag probes. In this study, this new method have been applied to the analyze the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism in 96 different samples. The fluorescent ratios (match/mismatch signal) of homozygous samples were over 4.5, whereas heterozygous samples had ratios near to 1.0. The genotyping results were additionally validated by sequencing. By using universal tags and *in situ* magnetic particle PCR, this simple and cost-effective approach can be widely used in high-throughput SNP genotyping.

Key words magnetic particles, *in situ* PCR, universal tags, SNP genotyping

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (60571032, 60121101, 30600736, 90606027), the Hi-Tech Research and Development Program of China(2006AA02Z133), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20050286014), The Jiangsu Public Interests Research Project (BM2003701) and Natural Science Foundation of Hunan Province (2007FJ4050).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-25-83790885, E-mail: nyhe1958@163.com

Received: February 26, 2007 Accepted: March 16, 2007