

应用 FP-TDI 技术进行高通量单核苷酸多态分型*

罗春清^{1,2)}** 邓立彬¹⁾** 周 珺¹⁾ 林 伟¹⁾ 曾长青¹⁾***

(¹⁾中国科学院基因组学研究所暨北京华大基因研究中心, 北京 101300;

(²⁾中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要 FP-TDI (fluorescence polarization template-directed dye-terminator incorporation) 是一种操作简单、实验投入少、适于高通量反应的单核苷酸多态等位基因分型技术. 使用两种评价分型图像质量的数值指标, 可以有效地对分型结果进行评价, 使该技术得到了改进. 在此基础上优化了实验条件, 并应用该技术, 对人类基因组 3 号染色体上随机选取的 337 个单核苷酸多态性位点进行了高通量分型, 反应的一次成功率达到 59.94%.

关键词 单核苷酸多态, FP-TDI, 基因分型

学科分类号 Q53

单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphism, SNP) 被认为是人类复杂性疾病^[1,2]、药物反应以及人群进化研究^[3]的理想遗传标记, 是目前功能基因组学的研究热点. Kruglyak 等^[4]估计, 人群中频率大于 1% 的 SNP 位点大约有 1 100 万个. 对 SNP 位点进行准确、自动、高通量的分型是当今迫切需要解决的问题.

目前发展中的 SNP 分型方法主要基于杂交 (hybridization)^[5,6]、引物延伸 (primer extension)^[7]、引物连接 (ligation)^[8] 和酶切 (invasive cleavage)^[9] 等 4 种原理, 迄今没有一种技术可以成为 SNP 分型技术的标准.

荧光偏振结合模板指导的染料掺入 (FP-TDI)^[7,10] 是一种引物单碱基延伸 (single-base extension, SBE) SNP 分型技术, 具有操作简单, 实验投入少等优点, 目前已成功地应用于基因诊断领域^[11,12]. 本次实验对该技术进行了优化, 并将其应用于高通量的 SNP 分型.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 DNA 样品: 96 份分型样品, 包括 90 份个体基因组 DNA, 5 个阳性重复, 1 个阴性对照, 购自美国 Coriell 医学研究所 (Coriell Institute for Medical Research).

1.1.2 试剂和仪器: 核酸外切酶 (*Exo I*)、虾碱性磷酸酶 (shrimp alkaline phosphatase, SAP)、Terminator Mix 和 Acyclopol 突变聚合酶购自 PerkinElmer 公司, Taq DNA 聚合酶 (Takara 公

司), 引物 (IDT 公司); Envision™ 荧光偏振检测仪 (PerkinElmer 公司), H2OBIT 水浴 PCR 仪 (Abgene 公司).

1.2 方法

1.2.1 FP-TDI 原理: 先 PCR 扩增包含 SNP 位点的 DNA 片段 (长约 100 bp), 然后在紧靠 SNP 位点的上游设计一个引物 (SNPprimer), 以扩增产物为模板进行引物单碱基延伸反应. 实验选用的荧光染料能在平面偏振光的激发下发射出偏振荧光. SBE 反应后, 与 SNPprimer 结合的荧光分子体积增大, 自旋减慢, 荧光偏振强度增加, 通过检测荧光偏振的这种改变可推导出 SBE 反应结合的 ddNTP 类型, 即 SNP 位点的基因型.

1.2.2 PCR 扩增: PCR 扩增以得到包含 SNP 位点的 100 bp 左右的 DNA 片段. PCR 扩增体系为 11 μ l, 包含 Taq 0.2 U, 4 种 dNTP (Promega 公司) 各 0.1 mmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, 正反向引物各 1 μ mol/L, Genomic DNA 3 ng; PCR 循环参数为 95℃ 2 min; 95℃ 20 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s (45 循环); 72℃ 10 min.

1.2.3 剩余 dNTP 和引物的消化: 扩增反应完成后, 采用 SAP 酶对剩余的 dNTP 进行去磷酸化, *Exo I* 降解剩余的引物, 11 μ l 扩增产物加入 5 μ l

*“十五”国家重大科技专项 (2002BA711A09) 和中国科学院知识创新工程重大项目 (KSCX2-SW-207).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-80481146, Fax: 010-80498676

E-mail: czeng@genomics.org.cn

收稿日期: 2004-02-17, 接受日期: 2004-03-28

的酶液, 37℃ 1 h, 85℃ 灭活 20 min.

1.2.4 SBE 反应: 20 μl SBE 反应体系包含 SNPprimer 2 μmol/L, 消化产物 8 μl, Terminator Mix 0.75 μl, Acyclopil 0.05 μl, 延伸参数为 95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 55℃ 30 s (15 循环).

1.2.5 荧光偏振检测及 SNP 分型: 延伸产物 1600RPM, 20℃ 离心 3 min, 检测 TAMRA (tetramethylrhodamine, 四甲基若丹明) 和 R110 (rhodamine 110, 若丹明 110) 的荧光偏振强度, 并用 SNP 分型软件 SNPscoring (PerkinElmer) 分型.

2 结 果

2.1 SNP 分型结果

选取 SNP 位点 rs1447153 (Forward primer: TGTACTTAAAAGGCATCATCTTT, Reverse primer: GCCAAAGTAAGTCACATAGTCAA, SNPprimer: AACACTTTATGCAT TTTCAGTAAGTTAAG), Terminator Mix 选用 A/G 型 (ddATP 用 TAMRA 标记, ddGTP 用 R110 标记), 对 96 个样品进行 FP-TDI 分型, 其中 A/A 纯合子具有较高的 TAMRA 偏振强度, 聚集于图像的左上方, G/G 纯合子具有较高的 R110 偏振强度, 聚集于图像的右下方, 杂合子聚集于中间位置 (图 1). 分型图像中样品的聚集程度越高, 分型的可靠性越高.

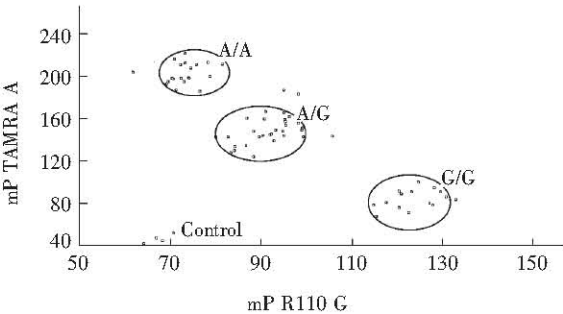


Fig. 1 Result picture produced by FP-TDI (rs1447153, A/G)

为了对实验结果进行比较和优化, 设计了两个数字化指标对 FP-TDI 分型图像质量进行评估. 将同一基因型聚集区作为一个组, 用组间距离和平均值 (d) 表示它们的聚集程度, 并用三个组间距离平均值的和 (D) 表示所有样品聚集程度, 同时用另一公式进行 SNP 分型质量评分:

$$d = \sum_i \sqrt{(P_{Ti} - \overline{P}_T)^2 + (P_{Ri} - \overline{P}_R)^2} / n;$$

$$D = \sum_{k=1}^3 d_k;$$
$$E = \frac{\sum_i \sqrt{(P_{Ti} - \overline{P}_T)^2 + (P_{Ri} - \overline{P}_R)^2} / n - D}{\sum_i \sqrt{(P_{Ti} - \overline{P}_T)^2 + (P_{Ri} - \overline{P}_R)^2} / n}$$

$\overline{P}_T$ 和 $\overline{P}_R$ 分别表示组内样品的 TAMRA 和 R110 的平均偏振光强度, P_{Ti} 和 P_{Ri} 分别表示组内第 i 个样品的 TAMRA 和 R110 偏振光强度; $\overline{P}_R$ 和 $\overline{P}_T$ 分别表示所有样品 R110 和 TAMRA 的平均偏振光强度, P_{Ti} 和 P_{Ri} 分别表示第 i 个样品的 TAMRA 和 R110 的偏振光强度.

当 D 值越小时, 样品聚类越紧密, 同时 E 值越大, 分型质量可靠性越高, 当 E 值小于 0.6 时, SNP 分型不可信.

2.2 FP-TDI 延伸体系优化

为探讨 SNP 分型质量的变化规律, 优化 FP-TDI 延伸反应体系, 选取 SNP 位点 rs1447153 (引物信息同上), 调节延伸反应体系中模板 DNA、SNPprimer 及 Terminator Mix 的浓度, 并试验不同延伸反应循环数.

结果表明: 图形质量对延伸体系中 SNPprimer、Terminator Mix 及模板 DNA 的浓度均较敏感, 增加 SNPprimer、Terminator Mix 用量可使分型点聚集更加紧密, D 值降低, E 值增加 (表 1).

标准体系中模板 DNA 的最适用量为 10 ng, 用量的增加或降低均能导致分型点弥散, D 值增大、 E 值降低, 使 SNP 分型的“窗口”变小 (图 2). 另外不同的延伸反应循环数对分型效果也会产生影响, 当模板 DNA 浓度、SNPprimer 浓度较大时, 较少的循环数可以取得较好的分型效果, 增加循环数会使分型效果变差, 反之则延伸反应循环数应当适当加大.

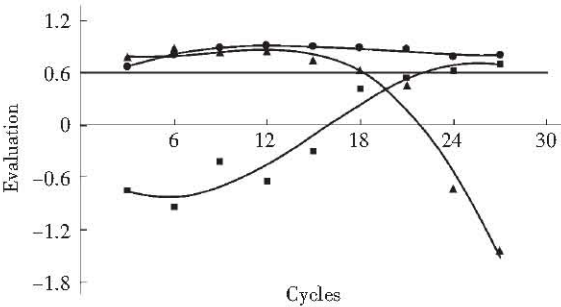


Fig. 2 The relationship between different template content and SNP genotyping accuracy

▲—▲: 30 ng; ●—●: 10 ng; ■—■: 3 ng.

Table 1 Sum of distance within group of different reaction systems

Cycles	System1	System2	System3	System4 ¹⁾	System5 ¹⁾	System6 ¹⁾	System7 ¹⁾
0	299.5	191.4	270.7	158.8	263.8	205.5	662.8
3	233.2	205.8	129.4	209.5	236.6	102.3	392.8
6	284.4	222.2	175.9	188.4	500.0	91.67	304.5
9	204.1	261.4	240.6	368.9	669.2	192.5	368.9
12	173.0	226.5	167.4	146.3	1 120.0	199.3	245.2
15	184.5	205.2	97.23	172.1	945.3	146.5	281.4
18	182.3	184.3	141.1	187.9	595.8	167.1	330.3
21	221.2	163.2	211.4	251.6	516.3	159.3	258.6
24	266.2	221.2	138.5	782.1	501.8	189.9	391.6
27	254.1	191.9	344.9	1 808.0	396.5	157.5	314.9
30	226.6	174.9	1 127.0	1 829.0	519.0	143.5	287.1
Mean	229.9	204.4	276.7	554.8	569.6	159.6	348.9

System1: DNA template 10 ng, SNPprimer 2 μmol/L, Terminator Mix 0.8 μl, System2: DNA template 10 ng, SNPprimer 5 μmol/L, Terminator Mix 0.8 μl, System3: DNA template 10 ng, SNPprimer 0.2 μmol/L, Terminator Mix 0.8 μl, System4: DNA template 30 ng, SNPprimer 2 μmol/L, Terminator Mix 0.8 μl, System5: DNA template 3 ng, SNPprimer 2 μmol/L, Terminator Mix 0.8 μl, System6: DNA template 10 ng, SNPprimer 2 μmol/L, Terminator Mix 1.0 μl, System7: DNA template 10 ng, SNPprimer 2 μmol/L, Terminator Mix 0.4 μl. ¹⁾ Difference was regarded as significant, *P* < 0.01.

2.3 高通量 SNP 分型

按体系6对随机选取的3号染色体上337个SNP位点进行SNP分型. 其中202个SNP位点一次分型成功, 一次成功率为59.94% (表2).

本次实验SNPprimer长度在16~34 bp左右, 发现FP-TDI分型成功率与SNPprimer的分子质量呈正相关 (相关系数为0.9638), 当SNPprimer相对分子质量在9 000左右时, 成功率接近80% (表2).

Table 2 FP-TDI success rates of different SNPprimers

Molecular mass	Length/bp	Samples	Success	Success rate
/u				/%
4 000	16	5	1	20.00
5 000	17~20	55	22	40.00
6 000	20~23	86	46	53.49
7 000	23~26	97	64	65.98
8 000	26~29	54	36	66.67
9 000	30~32	29	24	82.76
10 000	33	11	9	81.82
Total	—	337	202	59.94

3 讨 论

FP-TDI技术中两种荧光标记ddNTP的不平衡反应将导致“错配 (misincorporation)”, 使分型图像发生“漂移”, 图形质量下降, 影响SNP的分型结果. Kwok^[13]认为“错配”是造成FP-TDI分型失败的主要原因之一. 本次实验选用的两种荧光标记R110和TAMRA在实验中其反应速率并不平衡, 其中R110反应较快, 可迅速达到反应平衡 (图3, 数据未列出), 之后, TAMRA的继续反应可产生“错配”. 同时, 当SBE反应循环数适当减少或体系中Terminator Mix用量适当过量时, “错配”现象可被有效防止, 但FP-TDI技术所检测的体系荧光偏振强度是结合和未结合的ddNTP荧光偏振强度总和^[14], 增加Terminator Mix的用量将增强荧光偏振的本底值, Chen等^[10]认为在FP-TDI反应中应尽量减少用量, 使绝大多数的Terminator Mix参与反应, 所以在高通量SNP分型以前, 优化并确定体系中的Terminator Mix用量, 并将反应的循环数控制在15~20次是避免“错配”, 获得理想SNP分型效果的较好方法 (图3).

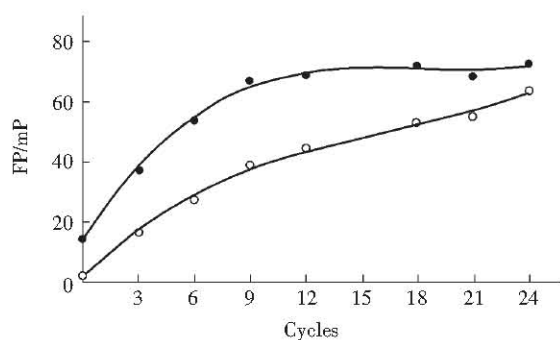


Fig. 3 FP Changes of R110 and TAMRA

●—●: R110; ○—○: TAMRA.

实验中发现 D 值与 E 值可以有效地评价图像质量, 当图像过于弥散 (smear, 图 4) 时, D 值增大、 E 值变小; 当 E 值小于 0.6 时, 难以获得正确的 SNP 分型结果. 体系中模板 DNA 浓度是影响图像质量的最主要因素, 模板浓度在 10 ng 左右时可取得较为理想的分型结果 (E 值保持在 0.7 以上), 浓度大于 30 ng 或小于 3 ng 时 D 值增大、 E 值变小, 且波动较大影响分型质量. 因而进行 FP-TDI 分型应尽量使用精确的分液设备, 提高体系内各组分的加样精度, 同时在延伸反应前最好对 PCR 产物定量.

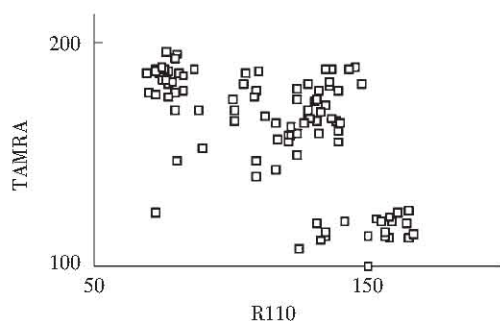


Fig. 4 Smear

激发光偏振强度的增大与引物分子的体积 (碱基数, 分子质量) 密切相关. Hsu 等^[14]报道: 当 SNP primer 长度大于 24 bp 时, 结合和未结合的 ddNTP 荧光偏振将由于分子质量的差异得到理想的区分; Kwok^[13]则认为, 在反应后荧光分子的相对分子质量应在 10 000 左右才能取得理想的 SNP 分型结果. 在本次实验中, SNP primer 长度 (分子质量) 同 SNP 分型成功率呈明显相关, 印证了以上观点, 表明当相对分子质量达到 9 000 左右,

FP-PDI 分型一次成功率可接近 80%. 因此在应用 FP-TDI 技术时应适当增加 SNP primer 的长度. 不过, 当引物的长度过大时在成本提高的同时, 引物的构象也会更加复杂, 因而将引物长度控制在 25 ~ 30 bp 较为合适.

虽然 FP-TDI 技术对 SNP primer 的设计以及 SBE 反应体系配比有特殊的要求, 但本次实验优化了 SBE 反应, 使用两种指标对分型结果进行评价, 377 个 SNP 位点在标准化条件下得到了理想的分型结果.

FP-TDI 技术操作简单、廉价、准确、不需要大型贵重仪器, 相对于目前其他 SNP 分型方法而言, 该技术还具有引物容易设计, 反应产物不需要纯化等优点^[6,15], 更适用于高通量的 SNP 分型.

参 考 文 献

- 1 Brain W K, Matthew F, Reyna F, *et al.* Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30** (15): 3295 ~ 3311
- 2 Erlich H A, Gelfand D, Sninsky J J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 1991, **252** (5013): 1643 ~ 1651
- 3 Miki Y, Swensen J, Shattuch D, *et al.* A strong candidate for the breast cancer and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994, **266** (5182): 66 ~ 71
- 4 Kruglyak L, Nickerson D A. Variation is the spice of life. *Nat Genet*, 2001, **27** (3): 234 ~ 236
- 5 Hacia J G, Brody L C, Chee M S, *et al.* Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Genet*, 1996, **14** (4): 441 ~ 447
- 6 曾朝阳, 熊 炜, 沈守荣, 等. 利用动态等位基因特异性杂交技术进行单核苷酸多态高通量分型. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (5): 806 ~ 810
Zeng Z Y, Xiong W, Shen S R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 806 ~ 810
- 7 Syvanen A C. From gels to chips: 'minisequencing' primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat*, 1999, **13** (1): 1 ~ 10
- 8 Housby J N, Southern E M. Fidelity of DNA ligation: a novel experimental approach based on the polymerisation of libraries of oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (18): 4259 ~ 4266
- 9 Lyamichov V I, Kaiser M W, Lyamichova N E, *et al.* Experimental and theoretical analysis of the invasive signal amplification reaction. *Biochemistry*, 2000, **39** (31): 9523 ~ 9532
- 10 Chen X, Levine L, Kwok P Y. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis. *Genome Res*, 1999, **9** (4): 492 ~ 498
- 11 Gao Y E, Zhang J, Wu J, *et al.* Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissues with fluorescence polarization. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, **35** (11): 1029 ~ 1034
- 12 Bradley D F, Timothy G B, Sean M G, *et al.* Template directed dye-terminator incorporation with fluorescence polarization detection for analysis of single nucleotide polymorphisms implicated in sepsis.

- J Mol Diagn. 2002, 4 (4): 209 ~ 215
- 13 Kwok P Y. SNP genotyping with fluorescence polarization detection. Hum Mutat, 2002, 19 (4): 315 ~ 323
- 14 Hsu T M, Chen X, Duan S, *et al.* Universal SNP genotyping assay with fluorescence polarization detection. Biotechniques, 2001, 31 (3): 560 ~ 562
- 15 熊 炜, 曾朝阳, 肖炳燚, 等. 一个新硝基还原酶基因 NOR1 编码区单核苷酸多态及与鼻咽癌的关联分析. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30 (3): 401 ~ 405
- Xiong W, Zeng Z Y, Xiao B Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, 30 (3): 401 ~ 405

High Throughput SNP Genotyping With FP-TDI *

LUO Chun-Qing^{1,2) **}, DENG Li-Bin^{1,2) **}, ZHOU Jun¹⁾, LIN Wei¹⁾, ZENG Chang-Qing^{1) ***}

(¹⁾Beijing Genomics Institute, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China;

(²⁾The Institute of Genetic and Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Fluorescence polarization template-directed dye-terminator incorporation (FP-TDI) is a simple, cheap and high throughput SNP (single nucleotide polymorphism) genotyping technology, but the quality of genotyping pictures cannot be evaluated, thus the reaction condition is very difficult to optimize. A numeric standard which can efficiently evaluate the SNP scoring picture was introduced, based on this standard, the reaction system was optimized. Using this method, randomly selected 337 SNP locus of human chromosome 3 were applied to high throughput SNP genotyping, the first time success rate reached 59.94%.

Key words single nucleotide polymorphism (SNP), FP-TDI, genotyping, optimization

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2002BA711A09) and The Knowledge Innovation Program (KIP), Important Project of The Chinese Academy of Science: Studies on hepatitis B variations and host accessibility (KSCX-SW-207).

** These authors contribute equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-10-80481146, Fax: 86-10-80498676, E-mail: czeng@genomics.org.cn

Received: February 17, 2004 Accepted: March 28, 2004