

单核苷酸多态性检测分析技术

高秀丽¹, 景奉香¹, 杨剑波², 赵建龙¹

(1. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050; 2. 安徽省农业科学院, 合肥 230031)

摘要:单核苷酸多态性(SNP)作为第三代遗传标记已经广泛用于基因作图、疾病相关性分析、群体遗传学及药物研究等领域。文中系统地介绍了目前国内外主要的 SNP 检测技术,任何一种 SNP 的检测方法都可将之看成由两部分组成,即区分 SNP 位点的原理方法和数据的检测分析手段,文章对这两部分做了较详细的介绍,并对 SNP 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

中图分类号:Q524⁺.3 文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2005)01-0110-13

Detection for Single Nucleotide Polymorphisms

GAO Xiu-Li¹, JING Feng-Xiang¹, YANG Jian-Bo², ZHAO Jian-Long¹

(1. Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology Chinese Academy of Science, Shanghai 200050, China;

2. Academy of Agricultural Sciences of Anhui Province, Hefei 230031, China)

Abstract: As the third generation of genetic markers SNPs (single nucleotide polymorphisms) has been used extensively in gene mapping, disease-correlativity analysis, population genetics and drug research. Here methods for detection are reviewed. Most SNP genotyping are a combination of method for interrogating SNPs and analysis technique. It described both parts and give a outlook for detection.

Key words: single nucleotide polymorphisms; detection technology

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。它是人类可遗传的变异中最常见的一种, 占有已知多态性的 90% 以上。SNP 在人类基因组中广泛存在, 平均每 500~1000 个碱基对中就有 1 个, 估计总数可达 300 万个甚至更多^[1]。SNP 所表现的多态性只涉及到单个碱基的变异, 这种变异可由单个碱基的转换 (transition) 或颠换 (transversion) 所引起, 也可由碱基的插入或缺失所致。虽然遗传密码由 4 种碱基组成, 但 SNP 通常只是一种二等位基因 (biallelic), 或二态的遗传变异, 即在该位置上存在两种不同的碱基。

随着人类基因组测序工作的完成, 单核苷酸多

态性以其分布广泛、数量众多、易于批量检测等优点作为第三代的遗传标记显示出广阔的应用前景。这种“单核苷酸多态性”是决定人类疾病 (尤其是多基因疾病) 易感性和药物反应差异性的主要因素, 因此可以满足对疾病相关基因定位研究的需要, 尤其是对多基因遗传病高精度基因定位的要求。另外, 比较物种间 SNP 的差异也可以了解物种间的亲缘关系和进化的生物学信息。因此, 对 SNP 的筛选及其检测正成为研究者们广泛关注的焦点。本文就目前已有的 SNP 的检测技术较全面的作了介绍。

目前各种 SNP 的检测方法区别很大, 但是每种 SNP 的检测方法我们都可将之看成由两部分组成即区分 SNP 特异位点的原理方法和数据的检测分

收稿日期: 2004-03-06; 修回日期: 2004-03-31

作者简介: 高秀丽 (1976—), 女, 吉林人, 硕士, 研究方向: DNA 芯片。 Tel: 021-62511070-8708; E-mail: gxl_now@mail.sim.ac.cn

通讯作者: 赵建龙 (1969—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 生物微系统。 Tel: 021-62511070-8702; E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn

析手段。目前对 SNP 位点区分主要是通过杂交、PCR、分子构象、酶法等来实现,而信号采集手段主要是利用电泳、荧光、芯片、质谱分析等技术。大多数的 SNP 的检测方法则是这两部分之间的组合,例如在基于杂交方法区分 SNP 特异位点的方法中可以用荧光法检测^[2]也可以和芯片技术结合进行检测^[3]。下面本文就这两个部分分别进行介绍。

1 区分 SNP 位点的方法

1.1 基于杂交的方法

1.1.1 ASO

基于 ASO (Allele-specific oligonucleotide 等位基因特异核苷酸片段)杂交基础上对 SNP 进行分析,主要是依赖于短的核苷酸探针在和互补的目的片段进行杂交时完全匹配和有错配两种情况下杂交复合体稳定性的不同而将 SNP 位点检测出来。这种方法是通过设计一段短的核苷酸探针(一般 15~20 bp),其中包括了 SNP 位点,当其与样品 DNA 杂交时,由于在 20 bp 中一个碱基的差异会导致 T_m 值下降 5~7.5 度,所以通过严格控制杂交条件,就可以鉴定出样品 DNA 中是否存在 SNP^[4]。这是最简单的基于杂交原理的检测方法,而在目前的实验中为了提高杂交的严格性,能更好的区分出 SNP 位点往往采用修饰过的核苷酸探针和样品 DNA 杂交,简单的如利用 PNA (Peptide nucleic acids, 肽核酸)探针^[5],但 PNA 作探针也存在一些问题,如其可溶性差,不易参加反应,探针的长度应至少是 7 个碱基,以确保在室温下能够较好的杂交,对富含鸟嘌呤罗丹明标记的探针存在本底荧光(FP)信号高的问题^[6]。也有报道在探针内人为的插入错配碱基(3-nitropyrrole 一种碱基的类似物),用这种含有错配碱基的探针杂交时,探针和目的片段之间一个碱基的差异导致 T_m 值的下降是传统杂交的 2 倍,因此,大大提高了杂交的特异性^[7]。下面就介绍几种其他的改进方法。

1.1.2 LNA

LNAs (locked nucleic acids) 是一种合成的核酸类似物,其结构是在 RNA 分子的 2'-羟基和核糖环的 4' 碳原子间连入一个亚甲基的“桥”,由于“桥”的作用使核糖环处于更利于杂交的稳定构象,所以能以很高的亲和性和互补的 DNA、RNA 或 LNA 结合,而这种高的亲和性甚至在有一个错配碱基都会大大

降低,因此用此作为探针来检测单核苷酸多态性^[8]。

1.1.3 Molecular beacons (分子信标)^[9]

分子信标是一种新型的发卡结构的寡核苷酸探针,是在样品 PCR 过程中因和样品 DNA 杂交后而使自身荧光构象改变从而实现了对 SNP 的检测(原理见图 1)。

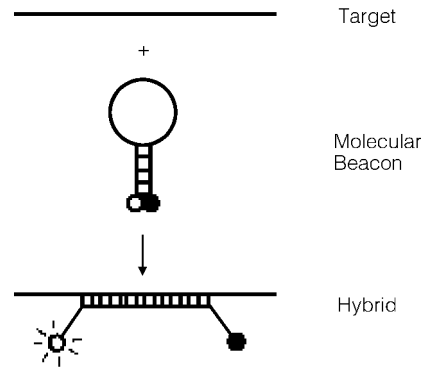


图 1 分子信标反应原理图

Fig. 1 Operation of molecular beacons

分子信标由称为“茎”(stem)和“环”(loop)的两部分构成,茎部分是由寡核苷酸探针两端互补的序列形成的,又可称之为手臂,环则是探针的中间部分,其序列和待扩增的目的片段互补并含有要检测的 SNP 位点。在手臂的两个末端分别通过共价的方式结合上一个荧光分子和一个荧光猝灭基团,这样当分子信标游离在溶液时,它以发卡结构存在,荧光分子与猝灭基团在空间距离上挨在一起,十分接近,荧光分子被猝灭,此时溶液无荧光信号。相反当分子信标和其完全互补的目的片段杂交时,其发卡结构被拉开而使荧光分子和荧光猝灭基团在空间上分开从而发射出荧光,其信号可提高 900 倍^[2]。研究表明这种发卡结构的探针在和目的片段杂交时的特异性很高,对于仅相差一个碱基的目的片段都能够区分,因此用于 SNP 位点的检测,同时我们可以对分子信标标记以不同的荧光信号,从而能够对多个样品的同时检测。

由于分子信标是在样品 PCR 过程中的退火时期和目的片段特异性杂交,释放荧光,某一循环或循环后的荧光量取决于那时形成的特异的 PCR 产物,因此也用于 PCR 产物产量的实时检测。

1.1.4 Scorpion primer

Scorpion primer 也是一种对 PCR 产物进行检测的方法,其特殊的分子结构决定其是一种单分子

内的杂交机制,和普通的双分子间的杂交机制相比,这种蝎状探针的分子内杂交具有更快速、有效的特点。和 Molecular beacons 相比,Scorpions 更具优越性尤其在少循环 PCR 中^[10]。

Scorpion primer 是由发卡结构(hairpin loop)的探针部分通过一段称为 PCR stopper(or PCR blocker)的寡核苷酸和 PCR 引物的 5' 端相连构成。探针部分的结构和 Molecular beacons 类似,由互补序列构成的“茎”和包含 SNP 位点且和待检测目的片

段互补的“环”构成,荧光分子和猝灭基团分结合在茎的末端,而 PCR stopper 的作用是在 PCR 过程中阻止对探针部分的扩增,避免发卡状结构在无待检测片段时通过扩增被打开而产生错误的荧光信号。在对样品进行检测时以 Scorpion primer 作为 PCR 扩增的引物,当其以样品 DNA 作为模板延伸后,Scorpion primer 中的的探针部分就可以和同一条 DNA 链上的互补部分杂交,而导致自身构象的改变释放出荧光信号(原理见图 2)。

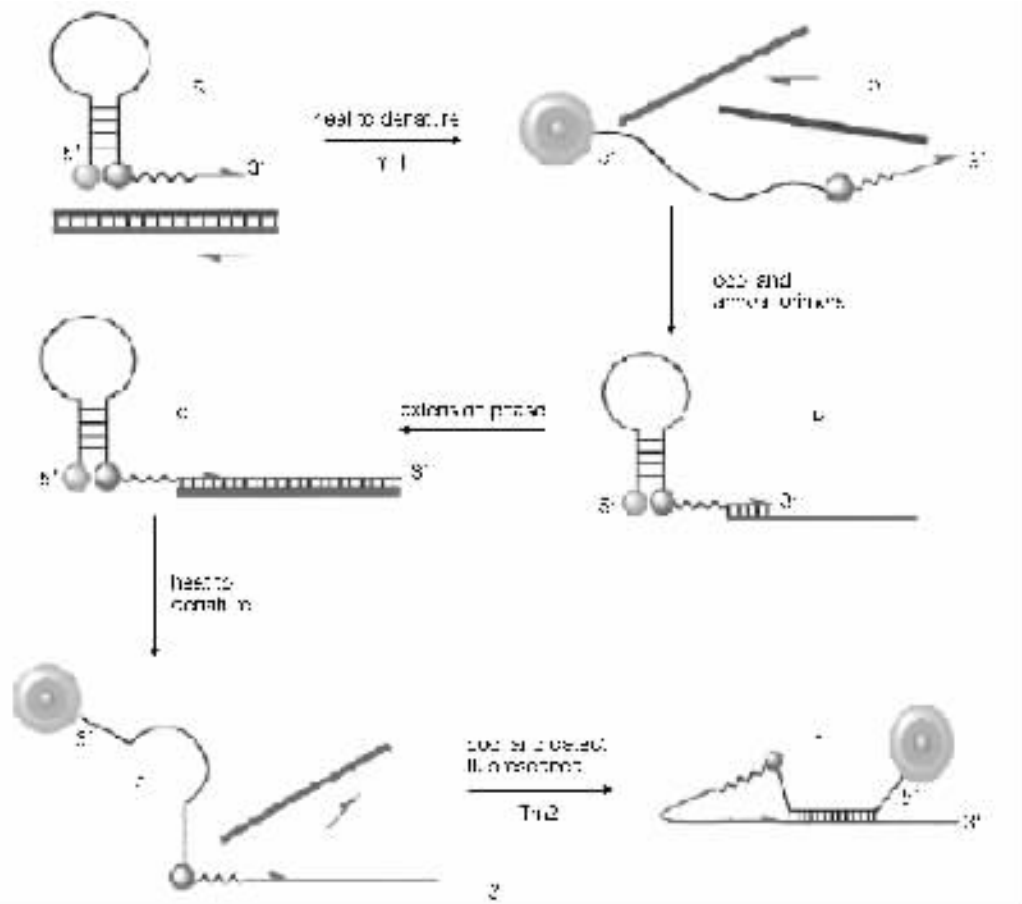


图 2 Scorpion 探针反应机制

Fig.2 Scorpion probing mechanism

在此基础上,现已有报道用双蝎状引物(duplex scorpion primers)检测 SNP^[11]。这种引物的结构使荧光分子和猝灭基团在引物和其互补部分杂交后空间上分隔开更远的距离,因此大大提高了荧光信号的强度且稳定性好。

1.1.5 DASH(dynamic allele-specific hybridization 动态等位基因特异杂交)

DASH 是利用热动力学实现了在 DNA 变性的

同时进行检测^[12],不需要额外的酶反应和探针标记等步骤,因此成本较低。和 ASO 杂交一样,DASH 也是通过等位特异性寡核苷酸探针和含 SNP 位点的靶片段的杂交而实现对变异位点的检测。但不同的是,ASO 是固定在一个温度来实现探针和靶片段的杂交,而 DASH 则是在动态的加热过程中实现对杂交双链状态的实时监测,因此比 ASO 能更精确检测探针和靶片段的杂交^[13]。

DASH 的机理非常简单,首先对样品 DNA 进行 PCR 扩增,产生一段 45~65 bp 长的含有 SNP 位点的 PCR 产物,并且扩增产用的一条引物 5' 端标记有生物素,这样有生物素标记的产物被通过链亲和素包埋的微孔滴定板所固定,生物素标记的那条链连在板上,而另一条互补链被碱溶液(NaOH)洗去,这样就获得样品的单链 DNA 片段。低温下和等位特异性寡核苷酸探针杂交,形成双链 DNA 区域,双链特异性的荧光染料插入到该区。插入染料的荧光强度与双链 DNA(探针-靶 DNA)的量有关。然后不断给样品加热升温并实时检测荧光信号,由于有错配存在的双链的热稳定性较无错配情况下差,因此在先达到解链温度而造成荧光信号的迅速降低,这样我们通过记录荧光信号迅速降低时所对应的温度就可以判定样品中 SNP 位点的碱基种类。

1.2 基于酶或 PCR 的方法

这类方法是目前 SNP 检测中最常用的一类方法,和杂交基础上检测方法相比增加了一步酶催化反应,因此提高了检测的忠实和可靠性。且因为其操作简单,成本低而被广泛的应用。现已有很多种酶用于这类方法中,如 DNA 聚合酶、DNA 连接酶、核酸酶等。

1.2.1 ARMS

ARMS (amplification refractory mutation system 扩增抗拒突变系统)^[14],又称等位基因特异性 PCR (PCR amplification of specific alleles, PA-SA)^[15]、ASA (allele-specific amplification)。此类方法是根据 PCR 过程中要求引物和模板间的严格互补配对来实现对 SNP 位点的检测,是基于以下两点:(1)错配出现在引物中部时致使稳定性降低,在严格杂交条件下将不能退火;(2)错配出现在引物 3' 端时,引物将不能延伸。因此针对不同等位基因设计平行引物,上游引物的 3' 端和多态性位点互补,这样只有和引物完全互补的序列才能得到扩增,不同的等位基因依赖于所使用的不同引物分别得以扩增。产生的 PCR 产物可以通过凝胶电泳或是实时的荧光测定来实现对其的分析。

同建立在杂交基础上的检测方法一样,为提高检测的特异性,近年来在此基础上不断有新的改进。

1.2.1.1 Allele-Specific PCR-ET (Allele-Specific PCR with Universal Energy-Transfer-Labeled primer)

这是一种新的高通量、自动化的 SNP 检测的方

法^[16],对每个 SNP 位点的检测只需一次 PCR 反应,且不需 PCR 后的样品处理过程,在一个管子就能完成检测的全过程,在检测手段上只需一种报告试剂就可实现对于多个 SNP 位点的平行检测,且不需昂贵的实时检测设备,是等位特异性基因 PCR 和通用 ET (Energy-Transfer) 标记引物的结合。

在这类 PCR 反应体系中检测一个 SNP 位点共需 5 个引物,两个加尾的等位基因特异性引物、一个反向引物和两个通用的 ET 标记的引物。这两个不同的加尾的等位基因特异性引物用来检测每个 SNP 位点,其 3' 末端碱基分别互补于 SNP 的两个等位基因,5' 端连有两个 21 碱基长的不同的尾结构,设计时注意不能和要检测靶片段互补。通用引物的结构和分子信标的结构类似,5' 端是含有荧光和猝灭基团的发卡结构,3' 端是 21 个碱基长的“尾”结构,其序列分别对应于等位特异性引物。两个通用引物分别标记有绿色 (fluorescein, 荧光素) 和红色 (sulforhodamine) 染料,这样检测时一种类型的纯合子产生红色荧光,而另一种类型的纯合子产生绿色荧光而杂合子两种荧光信号都有。

具体反应包括以下几步循环:1) 以等位特异性引物进行扩增,产生 5' 端含有尾结构的片段;2) 反向引物扩增合成尾的互补片段;3) 标记的通用引物以第 2 个循环的产物为模板产生 5' 端含有通用引物的片段;4) 以前一步反应的产物为模板合成其互补链,这步反应使 ET 标记的通用引物 5' 端的发卡结构打开,而释放出红或绿色的荧光信号(原理见图 3)。

1.2.1.2 Bi-PASA (Bidirectional PCR amplification of specific alleles, 双向等位基因特异性 PCR)

双向等位基因特异性 PCR 是在 ARMS 基础上发展起来的基于 PCR 基础上检测 SNP 的一种方法。对等位基因特异性 PCR 来说,在一次 PCR 反应中只能检测 SNP 的一个等位基因,而不能实现对 SNP 的两个等位基因同时检测,为实现这个目的人们曾提出了多重等位基因特异性 PCR (PCR amplification of multiple specific alleles PAMSA)^[17],在一个反应中加入 3 条引物而产生两个等位基因 PCR 产物,因产物片段长度的不同而通过凝胶电泳来区分。但仍有很多问题,如等位特异性引物的扩增效率不同,PCR 反应的条件很难确定。因此人们提出了双向等位基因特异性 PCR 的方法,在一次的 PCR

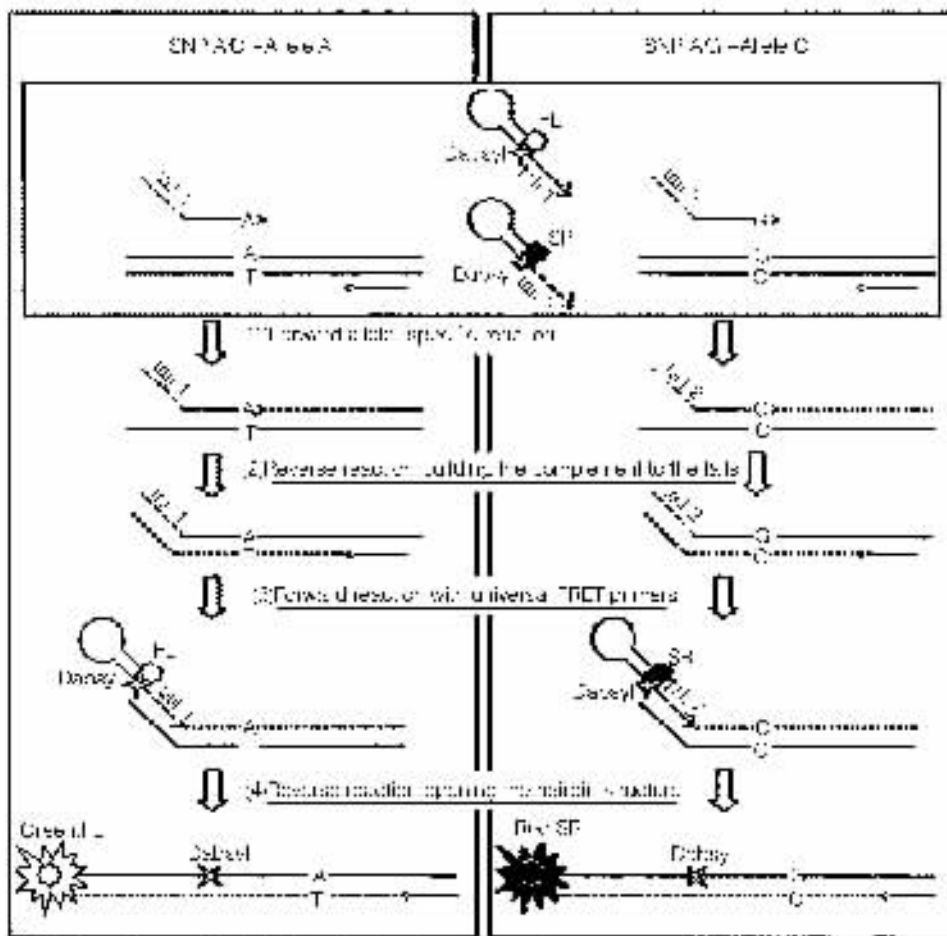


图3 A/G SNP 位点检测步骤原理图

FL: 荧光素; SR: 硫罗丹明。

Fig. 3 Assay scheme of the reaction steps for A/G SNP are shown

FL: Fluorescein; SR: Sulforhodamine.

反应中区分出纯合子和杂合子^[18]。在 Bi-PASA 中, 两个等位基因特异性 PCR 反应以相对的方向进行扩增。在反应中共有 4 个引物, 两个外测引物(P 和 Q)和两个内侧等位特异性引物(A 和 B), 这样在杂合子中一共会扩增出 3 个片段, 含一个等位基因的片段 AQ、含第二个等位基因的片段 PB 和以两个外测引物扩增出的片段 PQ。在纯合子中会扩增出两个片段 PQ 和 AQ, 或者是 PQ 和 PB。然后用简单的凝胶电泳就可实现对产物的分析。而为了提高这种方法的特异性 Shu Ye 等提出了 Tetra-primer ARMS-PCR 的方法, 即在两个内侧等位特性引物的 3' 端-2 位置人为的引入错配碱基^[19], 并且和 MADGE (microplate array diagonal gel electrophoresis) 技术结合, 实现了对 SNP 位点的高通量的

检测。

1.2.2 Taqman 法^[20]

这种方法也称为核酸外切酶法(5'-nuclease assay), 是在 PCR 过程中实现等位特异性杂交, 而不需以往等位特异性杂交中样品 PCR 后分离及洗涤等步骤。该技术的基本原理是利用 Taq 酶的 5' 核酸外切酶活性, 在这个 PCR 反应中除了两个传统的 PCR 引物 P1、P2 外, 还有第三个引物 P3 即等位特异性 Taqman 探针, 含有待检测的 SNP 位点, 特异结合在 P1 结合位点的下游。P3 探针的 5' 端和 3' 端分别标有荧光基团和猝灭基团, 因 P3 的 3' 端被猝灭基团封阻而不能以自身为引物进行扩增。在 PCR 反应中, Taq 酶以 P1 为引物合成新的 DNA 链, 随着反应的进行 Taq 酶接触到 P3 并激发其 5'

→3'外切酶活性,使 P3 从 5'端开始降解,最后 DNA 链得以延伸而 P3 探针上的荧光基团和猝灭基团由于不再在一个分子上了,荧光基团释放荧光信号。荧光信号的强弱与 PCR 产物的数量成比例。

这种检测方法的优点是闭管进行,因而减少了 PCR 污染的风险,但探针标记的成本较高,且因其采用荧光猝灭及双末端标记技术,猝灭难以彻底,本底较高。

1.2.3 引物延伸法(primer extension)

这是依赖 DNA 聚合酶来分辨碱基多态性位点的一类方法,其特异性比建立在等位特异性杂交的方法要高^[21]。这类方法有多种名称^[22]如单核苷酸引物延伸(single nucleotide primer extension, SnuPE)、引物指导的核苷酸合成(primer-guided nucleotide incorporation)、TDI(template-directed dye-terminator incorporation),其中 Minisequencing(微测序)是这类方法最常用的一种称呼。Minisequencing 反应首先扩增出含有 SNP 位点的一段 DNA,然后进行 Minisequencing 反应,加入一检测引物,其 3'末端碱基紧挨于多态性碱基,在 DNA 聚合酶及标记的 ddNTP 的存在下进行一个碱基的延伸反应,延伸的这个碱基就是多态性碱基。Minisequencing 反应前必须对 PCR 产物进行纯化以去除其中含有的 PCR 引物及 dNTP,因为 PCR 引物会和延伸引物竞争产生多个扩增片段,而多余的 dNTP 会使延伸反应延伸多个碱基。关于引物延伸产物检测,已经报道了许多方法,如放射性同位素标记法,发光检测法、凝胶为基础的荧光检测法和质谱分析法、变性高压液相色谱法等。

目前 Minisequencing 的反应形式已经从液相发展到固相。液相反应形式^[23],是利用凝胶电泳来对 Minisequencing 反应前 PCR 产物进行的纯化,在溶液中进行 Minisequencing 反应,然后再通过凝胶电泳对 Minisequencing 引物进行分离,在这类方法中放射性同位素³²P 或³³P 被作为检测基团,因 Minisequencing 引物在标有³²P 或³³P 的 ddNTP 的存在下延伸,凝胶电泳后就能通过放射自显影术而直接被观察到,也可用来进行定量的分析。这类方法的优点是可以不同长度的 Minisequencing 引物在一个反应中对多个 SNP 位点进行检测,但相应的也带来需多步处理分离的繁琐,如凝胶回收 PCR 产物等。而固相反应(solid-phase minisequencing)的形

式就避免了这种繁琐的操作步骤而被大范围的使用,将其中的一种反应物固定在固相的支持物上,通过对固相支持物的洗脱而实现对不同产物的分离,操作简单方便易于自动化的分析。在固相 minisequencing 反应中往往通过生物素-亲和素间的反应来实现固定的目的,利用生物素标记的一条引物使 PCR 产物带上生物素,再通过亲和素或链霉亲和素包被的微量滴定板^[24]或磁性微粒^[25]、微球^[26]对 PCR 产物捕获,再通过碱或加热方式使 PCR 双链变性,洗去未标记的互补链后就可以进行 minisequencing 反应了。和上述的将 PCR 产物固定在固相支持物上不同还可将 Minisequencing 引物固定,将引物固定在杂交膜或微量滴定板上进行 minisequencing 反应。近年来发展了以阵列为基础的 minisequencing 反应(arrayed primer extension, APEX),是以近年来新发展起来的生物芯片(DNA chip)为固相支持物的微型化检测手段,多条引物可以通过其 5'端被共价结合在小的玻璃载体上^[27],可以有效的对每个样品的多个 SNP 位点进行检测,具有十分广阔的应用前景。

和 minisequencing 反应机理类似还有一种方法称为 Pyrosequencing^[28],其是利用发光计作为检测设备,反应中要用到 DNA 聚合酶、APT 硫酸化酶(ATP sulfurylase)、荧光素酶(luciferase)和腺苷三磷酸双磷酸酶(apyrase)。DNA 聚合酶在一种 dNTP 的存在下进行引物延伸反应,而引物的成功延伸将伴随焦磷酸的释放,焦磷酸在荧光素酶的存在下能引一种发化学发光反应,通过发光计的实时监测来达到检测的目的。

1.2.4 连接酶连接反应(oligonucleotide ligation assay, OLA 或 ligase chain reaction LCR)

DNA 连接酶对特异杂交到靶 DNA 片段上的两个相邻的寡核苷酸片段进行连接反应时,对连接位点处的碱基互补配对要求很高,特别是对 3'端,只有和靶 DNA 片段完全互补的情况下才能发生连接反应^[29]。利用 DNA 连接酶的这个反应特性和 PCR 技术相结合就可以实现对 SNP 位点的检测。现在已发展了若干种改进的 LCR,如 Gap-LCR 等^[30],以下介绍两种:

1.2.4.1 CCR(combined chain reaction,联合链式反应)^[31]

这是一种利用 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶两种

酶进行 DNA 扩增反应的检测方法(图 4), 和以 PCR 为基础的检测方法不同其是依赖于引物 5' 端和模板间的错配来区分碱基多态性, CCR 反应分为 4 步: 1) DNA 模板的变性; 2) 引物和单链模板间的退火; 3) DNA 聚合酶(无 5' - 3' 外切酶活性) 催化引物延伸 4) 延伸引物的 3' 端和下游引物 5' 端间的连接。反应中设计两套引物, 两个外侧引物和两个内侧检测引物, 两个内侧检测引物的 5' 端都对应于多态性碱基位点, 如果检测引物的 5' 端和模板间没有完全匹配的话, 延伸的外侧引物就不能和检测引物连接起来, 因而不能形成全长的片段, 从而实现对 SNP 位点的检测。和 LCR 相比, CCR 的第一个优点是快速简单, 仅需 DNA 的分离、CCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测产物几步, 第二 CCR 产生的产物片段大, 分子量较高, 通过 EB 染色的琼脂糖凝胶电泳就可实现对产物的检测而不需引物标记、聚丙烯酰胺凝胶电泳或放射自显影等繁琐技术。

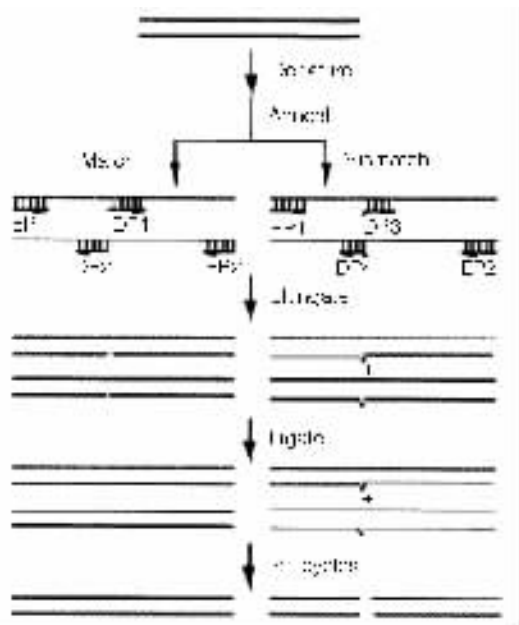


图 4 CCR 反应示意图

Fig. 4 Assay scheme of CCR

1.2.4.2 L-RCA (ligation-rolling circle amplification, 连接-滚环扩增反应) [32]

这种方法通过对挂锁探针(开口的环状探针, padlock probe)的连接来区分碱基多态性位点, 然后利用滚环扩增对信号放大实现检测。和其他一些检测方法不同其不需预扩增, 能直接对基因组 DNA 检测, 这种方法可以达到从 1 ng 的基因组 DNA 中实

现对 SNP 的检测[33], 并且通过合适缓冲液的选择可以实现同管反应和检测, 因而是一种低成本的高通量检测方法。这里用的挂锁探针比一般性杂交用的探针要长的多, 其 5' 端和 3' 端各有 10 个左右的碱基分别和靶 DNA 片段互补, 且 3' 末端正对应于 SNP 位点的多态性碱基, 这样在其和模板靶 DNA 杂交后就形成了开口的环状探针, 在 DNA 连接酶的作用下, 只有 3' 末端和 SNP 位点互补的探针才能被连接成环, 环化了的挂锁探针就可用标记的引物进行滚环扩增, 对检测样品的量起了扩大作用而提高了检测的灵敏度。

1.2.5 RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性)

限制性内切酶是一类识别 DNA 特异位点(通常 4~6 bp), 并在特异位点进行切割的酶类。酶切位点的特异性意味着对特定 DNA 等位基因的完全消化会产生同样的片段序列。而碱基的替换或插入、缺失可以产生或消除一个特定酶切位点, 从而改变酶切割后产生片段的大小和数目。这些酶切片带型的不同称为限制性片段长度多态性。如果 SNP 产生和消除了某个限制性内切酶位点, 则可以通过对 PCR 产物进行酶切、电泳加以检测。用 RFLP 检测 SNP 位点具有一定准确性, 方法简便、快速, 可以进行大量样本的分析。但实际中大约一半的 SNP 位点并不改变限制性酶切位点, 可以通过设计包含酶切位点的错配引物来克服[34], 但错配的引物在 PCR 扩增时可能会产生一定的困难。近年来报道用 MADGE (microtiter array diagonal gel electrophoresis technique) 技术来对限制性酶切后的片段电泳分离, 实现了对 SNP 位点的高通量检测[35]。

1.2.6 Invader assay [36]

1999 年, 由 Third Wave Technologies 公司研究人员发明(原理见图 5), 是利用一种外切酶 FEN (flap endonuclease) 的特异性对 SNP 位点进行识别。反应中需两种探针, 插入探针(invader probe, upstream oligonucleotide)和信号探针(signal probe, downstream oligonucleotide), 两个探针均和靶 DNA 模板互补杂交, 并且信号探针的 5' 端和插入探针的 3' 端产生至少一个碱基的重叠, 从而产生一个两叉状的插入复合物(invasive complex)结构, 其能被特异性的外切酶 FEN 所切割, 将信号探针的 5' 端重叠部分切除, 5' 端的切除常和荧光信号的改变相连作

为检测的手段,或者也可以用质普分析来检测。在对 SNP 位点进行检测时,设计上游寡核苷酸和下游信号探针在多态性位点处产生一个碱基的重叠,在此位点出现的错配将大大降低 FEN 的切割速率,只能达到正确配对时的 1/300,从而实现对 SNP 的高效检出。

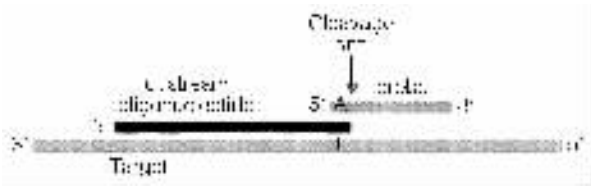


图 5 Invader assay 检测示意图

Fig.5 Assay scheme of invader assay

invader assay 方法检测 SNP 时,只有两个探针与模板完全配对后才可以形成插入复合物的结构,因此其检测结果比简单杂交的准确性好,且 FEN 的酶切特异性非常高,酶切产物是均一的寡核苷酸,易与其他杂质成分区分,检测无需电泳,另外在检测前不用进行 PCR 扩增,消除了 PCR 引入突变导致假阳性的因素,所以具有广泛的应用前景。

固相插入切除法(solid phase invasive cleavage assay)是 invader assay 的一种改进,实现了对多个 SNP 位点的平行分析,是在 96 微孔板上进行酶切反应,可以从 ng 级的基因组 DNA 中实现对每个 SNP 的检测^[37]。近年来人们在 DNA 芯片上进行 invader

assay,是一种更有效的高通量分析 SNP 的方法^[38],是将信号探针固定于芯片上,上游插入探针可以在液相中加入也可以固定于芯片上,特别是高密度 DNA 芯片的产生,得以实现 500 000 个 SNP 位点的一步检测。

1.2.7 UCAN

这是 2001 年 5 月日本 Kyoto 等发明的一种检测 SNP 的方法(原理见图 6),在无需 PCR 仪等其他设备下一个小时内就能完成对 SNP 的检测。这种方法用插入一段 RNA 的 DNA 作为聚合酶反应的引物(DNA-RNA-DNA;DRD primer),且引物的 3' 末端被化学基团封阻,此反应中除 DNA 聚合酶外还用到 RNase H。在进行 SNP 检测时,若靶 DNA 和引物中的 RNA 部分完全匹配,RNase H 消化引物 RNA 部分而去除了封阻的 3' 末端,使 DNA 聚合酶的延伸反应得以进行。与此相反若靶 DNA 和引物中的 RNA 部分有错配碱基出现时,RNase H 就不能切除 RNA 部分,引物封阻的 3' 端阻碍了聚合酶的延伸反应,这样根据延伸反应的进行与否就可实现对 SNP 的检测。Kyoto 等人已用这种方法实现了对 c-Ki-ras(一种人类的癌基因)和 CYP2C19(P450 家族成员)中 SNP 的检测。这种 UCAN 方法能在一小时内从 10 ng 的基因组 DNA 中实现对 SNP 的检测,是一种有效、经济的检测方法,能在今后的药物基因组学(pharmacogenomics)中得到进一步的应用。

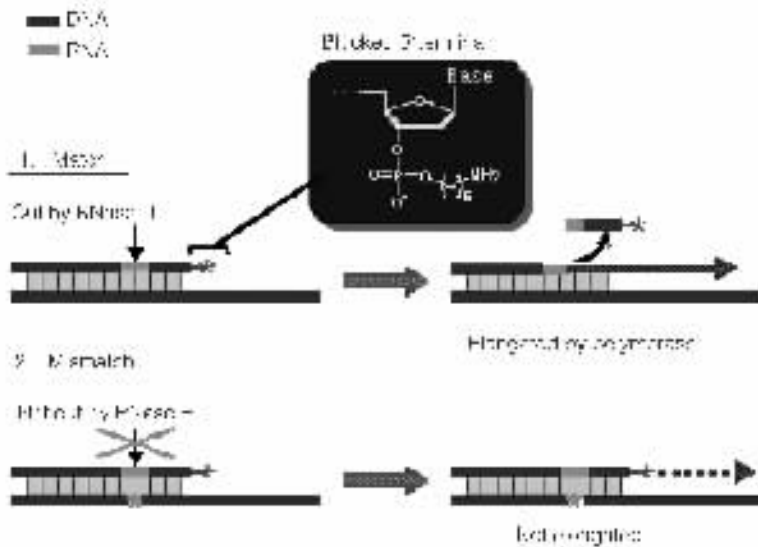


图 6 UCAN 原理示意图

Fig.6 Schematic representaion of UCAN

1.3 以构象为基础的方法

这类方法是基于 SNP 位点引入 DNA 分子后引起其构象的改变或 T_m 值的不同,从而表现在电泳迁移率的不同,而将突变体检测出来。

单链构象多态性(single-strand conformational poly-morphism, SSCP)可检测单个碱基的改变,在不同系统中突变检出率达 70%~90%以上,是一种高效、方便的 SNP 检测方法^[39]。在非变性的条件下,单链 DNA 具有一定的折叠结构,这种折叠结构是由它的核苷酸序列决定的。SSCP 的灵敏性就是依赖于 SNP 对折叠的影响和折叠如何影响目的序列的电泳迁移率。其策略是,将 PCR 扩增的待检片段与去离子甲酰胺混合,接着 95℃ 变性解链,再骤冷到冰中,然后通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel-electrophoresis, TGGE)^[40]是利用不同构象的分子具有不同的变性温度(T_m)来进行分离的。在正常情况下, DNA 分子呈双链结构状态,随着温度的升高, DNA 双链构象发生改变,当温度升高到一定温度时就开始解链,由完整的双链变为分叉双链,最后 DNA 双链完全解开变为单链 DNA。这种分子构象的改变影响了其电泳迁移率, DNA 双链的打开直接导致迁移率下降,这样 DNA 片段可以通过在聚丙烯酰胺凝胶电泳中设置温度梯度来进行分离。在 SNP 检测中,因为一个碱基的改变引起在不同温度下 DNA 双链的解链行为不同,即一个碱基的突变可以使 DNA 片段的迁移率不同,从而达到在温度梯度电泳中分离的效果。和此方法类似,变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)^[41]是依靠变性剂使 T_m 值不同的分子分离,其原理为:双链 DNA 在变性梯度凝胶(变性剂浓度从小到大)的泳动过程中,其解链的速度和程度与其序列密切相关;在恰当的条件下,只要有一个碱基对的差异即可相互分开。

在 SSCP 和 DGGE 基础上发展起来的 DHPLC(denaturing high performance liquid chromatography, 变性高效液相色谱检测),是一种新的高通量筛选 DNA 序列多态性的技术^[42],其原理是用离子对反向高效液相色谱法分离并检测异源双链。具有半自动化、快速、检出率高、适合大片段等优点,且不需配制凝胶。样品在变性条件下,泳动于 55℃ 左右的

特殊吸收剂中,只需电泳 6 min 即可完成 50~700 bp 基因片段的分离, SNP 的有无最终表现为色谱峰的峰形或数目的差异。

1.4 直接测序的方法

对于一些比较小、外显子相对较少的基因的 SNP 检测可直接测序,其检测效率可以达到 100%,其主要流程是:PCR 扩增目的片段→纯化、回收→4 种荧光标记(ddNTP)测序反应→过柱去除多余的荧光和引物→测序仪上电泳并用测序软件分析。

2 检测分析技术

检测分析技术发展到现在主要有凝胶电泳、荧光检测、DNA 芯片(DNA chip, oligonucleotide microarray)和质谱检测等。

2.1 凝胶分析技术

建立在凝胶基础上的检测分析方法是一种成本低廉的检测方法,板电泳形式已经被用于很多种 SNP 的检测中,如 MASDA 是杂交法和凝胶检测的结合^[43],凝胶检测和引物延伸法的结合^[25],但具有制胶过程繁琐费力的缺点。近年来用毛细管电泳代替传统的琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳,因其柱细可减小电流,使热量的产生减少,同时又扩大了散热面积,减小了柱径向温度梯度,所以分离效率高,省时、省力,能在 20 min 之内分离长至数千的碱基片段,还可以同时处理多个样品,常和 SSCP、DGGE 等技术结合使用。另外一种实用高效的电泳分离技术是 MADGE(microtiter array diagonal gel electrophoresis),对 ARMS 或 RFLP^[35]产生的等位特异性产物进行快速有效的分离。

2.2 荧光检测技术

荧光检测是目前多数 SNP 检测方法中所采用的分析技术,具有自动化程度高、方便的特点,且能进行实时监测,虽然所需设备成本较高,仍被广泛的应用。例如在基于杂交方法区分 SNP 特异位点的方法中可以用荧光法检测^[2],另外基于 Taqman 方法^[20]、引物延伸^[44],区分 SNP 位点时都可以用荧光法检测。但在这些检测系统中相应的也存在一些缺陷,如读取数据前未反应的荧光试剂必须去除,一般在检测反应前需 PCR 的预扩增来准备反应所需的模板,寡核苷酸探针需固定在一些固相的表面上。

目前荧光分析技术主要是基于两种分析原理,一种是荧光共振能量转移(Fluorescence reso-

nance energy transfer, FRET) 另一种是荧光偏振 (Fluorescence polarization, FP)。荧光共振能量迁移的原理是:当两个荧光基团靠近时,高能量荧光基团会将受激发产生的能量转移到相邻的低能量荧光基团上,即荧光基团被猝灭基团所猝灭,而无荧光信号的产生。而当这两个基团间在空间上分开时则产生荧光信号。基于这种原理的荧光分析技术已经用于分子信标^[10]、scorpion primer^[11]、Taqman 法^[20]、Invader assay^[36]等中。与此不同荧光偏振的原理是^[45]:当荧光分子被一束平行的偏振光激发时,也会发射出偏振的荧光,而发出偏振光的程度与荧光分子的旋转速度成比例,由于大的分子的旋转速度慢偏振的发射光被检测到,而小的荧光分子由于旋转速度快而不能检测到偏振荧光。荧光偏振的检测方法也用于引物延伸、Taqman 法、Invader assay 等方法中,因其不需使用猝灭基团而大大降低了成本,并且在引物延伸检测法中探针不需标记、纯化而被广泛用于 SNP 的检测中。

2.3 DNA 芯片

DNA 芯片 (microarray, DNA chip) 技术是近 10 年左右才发展起来的一种高新技术,简单的说是面积不大的基片表面 (玻璃片或硅片) 上有序地点阵排列了一系列固定于一位置的寡核苷酸探针。在 1 cm² 的固相表面上可以固定 10 000 个寡核苷酸探针分子,由于该技术可以将大量的探针同时固定于支持物上,所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析,从而解决了传统核酸印迹杂交技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、效率低等问题,使人们更快速准确地获取样品中的生物信息,是一种新兴的高通量、微型化和自动化的检测手段。DNA 芯片常与等位特异性杂交和酶法两种区分原理结合起来对 SNP 进行检测。

杂交型芯片是利用等位特异性杂交来对 SNP 位点进行区分^[46]。将等位基因特异性寡核苷酸 (ASO) 共价固定于玻璃载片上,用荧光素标记的引物对基因组 DNA 扩增,然后将产生的荧光素标记 DNA 链与微阵列杂交,用计算机控制的高分辨荧光扫描仪可获得结合于芯片上的目的基因的荧光信号,通过计算机处理即可给出目的基因 SNP 位点的信息。

电促核酸杂交芯片 (电子芯片)^[47,48] 也是利用等位特异性杂交来对 SNP 位点进行区分。但与其

不同的是这种芯片不是用化学的方法将探针固定在芯片上,其为带有阳电荷的硅芯片、芯片经热氧化,制成 1 mm × 1 mm 的阵列、每个阵列含多个微电极,在每个电极上通过氧化硅沉积和蚀刻制备出样品池。将连接链亲和素的琼脂糖覆盖在电极上,在电场作用下生物素标记的探针即可结合在特定电极上。在电子芯片上杂交过程的完成也是电场的作用下完成的,样品 DNA 在电场的作用下以极快的速度移往测试点,电促杂交,反应加速,在数分钟内可完成全过程。杂交结束后,改变电场方向,并配合升温,使异常体结合不稳定,用负电荷将异常结合物排走,从而保留了正确的杂交体,因而大大提高了检测的精确度。具有杂交速度快,可大大缩短分析时间的特点,但制备复杂、成本高是其不足。

利用酶的特异性来区分多态性位点,其特异性要比等位特异性杂交高的多,在其和 DNA 芯片的连用中已经报道的有 Minisequencing^[27,49] 和 Invader assay^[38] 等,前文已述,此不再详述。

利用 DNA 芯片对 SNP 位点进行检测,基因组 DNA 因其复杂性和低浓度而不能直接作为检测的对象,因此必须对基因组 DNA 进行预扩增,小于 200 bp 长度的 PCR 产物会有较好的杂交效果。为满足 DNA 芯片的高平行性分析要求常用多重 PCR 来对基因组扩增,但多重 PCR 的条件较难控制,且对 PCR 产物小的扩增具有倾向性。

2.4 质谱检测技术

质谱技术的基本原理是样品分子离子化后,根据不同离子间的荷质比 (m/e) 的差异来分离并确定分子量。基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 在 SNP 的检测中已得到应用。引物延伸法结合 MALDI-TOF-MS^[50] 是利用质谱技术检测 SNP 中常用的一种形式,和一般性的引物延伸反应相比,其在引物的 5' 端引入生物素,使延伸的产物能被固相结合从而达到纯化的目的。利用质谱分析一个样品只需几秒钟,一天可以分析数千个样品,具有快速、准确、自动化程度高和高通量等特点,但主要的问题是需对分析样品进行纯化后才能检测。最近提出的 GOOD Assay^[51] 对此进行了改进,通过化学修饰省去了纯化的步骤而大大节约了检测的成本。

3 结束语

SNP 研究是目前人类基因组研究的一个热

点^[52],其应用范围将更加宽广,对群体遗传学、制药业、法医学、癌症及遗传性疾病甚至进化的研究都将产生不可估量的影响。而近期 SNPs 研究的目標是人类全部编码区的 SNPs 开发及制作高密度的 SNPs 图^[53]。目前,不仅在人类染色体上,而且在其他生物的基因组上也已建立了 SNP 图谱。美国、西欧及日本等国的政府、科研机构及部分私人公司正斥巨资研究开发 SNP 图谱,使得储存在公共数据库里的 SNP 数量正在已几何级数迅速增长。人们也可以很方便的通过互联网查阅有关 SNP 的信息。

目前,SNP 的测定方法已经比较成熟,已有一些商业化的检测试剂盒的出现,如 AcycloPrime™-FP(PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA)、Snapshot™ (Applied Biosystems)、READIT™ (Promega Corporation)等。SNP 应用范围的日益广泛将要求 SNP 的检测朝向快速、经济、小型化、自动化、高通量的方向发展。在分离方法上,GE 的引入使 SNP 的分析更加快速、高效且更易于自动化;用质谱仪检测切割反应产生的小信号分子,以及用固定的“挂锁探针”和“滚环扩增”可以直接从基因组 DNA 进行 SNP 分型,有望最终消除对 PCR 的需求。而 DNA 芯片技术的出现为发展 SNP 的检测技术提供了更有效的手段,满足了 SNP 检测求。美国的 Affymetrix 公司开发出 BRCA1(乳癌基因 1 号)芯片、p53 芯片等,Research Genetics 公司开发了集成 1 500 个 SNP 的 DNA 芯片,涵盖了人类基因组全部 24 条染色体,检测时只需 0.5 μg 的 DNA 样品就可以进行 1 次全基因扫描。

总之,作为第三代遗传标记,随着技术的发展,SNP 的应用潜力将会不断的发掘和体现。

参考文献(References):

- [1] Brookes A J. The essence of SNPs. *Gene*, 1999, 234: 177 ~ 186.
- [2] Tyagi S, Bratu D P, Kramer F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 49 ~ 53.
- [3] Janet A, Nila A, Xiyin Chen. New Developments in high-throughput resequencing and variation detection using high density microarrays. *Human Mutation*, 2002, 19: 402 ~ 409.
- [4] Wallace R B, J Shaffer, R F Murphy, J Bonner, T Hirose, K Itakura. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phiX174 DNA: The effect of single base pair mismatch. *Nucl Acids Res*, 1979, 6: 3543 ~ 3557.
- [5] Nikiforov T T, Jeong S. Detection of hybrid formation between peptide nucleic acids and DNA by fluorescence polarization in the presence of polylysine. *Anal Biochem*, 1999, 275: 248 ~ 253.
- [6] Simeonov A, Nikiforov T T. Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic(PNA) probes and fluorescence polarization detection. *Nucl Acids Res*, 2002, 30: 17e91.
- [7] Guo Z, Liu Q, Smith L M. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms by artificial mismatch hybridization. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 331 ~ 335.
- [8] Simeonov A, Nikiforov T T. Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic (PNA) probes and fluorescence polarization detection. *Nucl Acids Res*, 2002, 30: 17e91.
- [9] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol*, 1996, 14: 303 ~ 308.
- [10] Thelwell N, Millington S, Solinas A. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 19.
- [11] Antonio Solinas, Lynda J Brown, Catherine McKeen, John M Mellor, Jamie Nicol, Nicky Thelwell, Tom Brown. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 20e96.
- [12] W M Howell, M Jobs, U Gyllensten, A J Brookes. Dynamic allele-specific hybridization. *Nature Biotechnology*, 1997, 17: 87 ~ 88.
- [13] J A Prince, A J Brookes. Towards high-throughput genotyping of SNPs by dynamic allele-specific hybridization. *Expert Rev Mol Diagn*, 2001, 1(3): 89 ~ 95.
- [14] C R Newton, A Graham, L E Heptinstall, S J Powell, C Summers, N Kalsheker, J C Smith, A F Markham. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system(ARMS). *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 2503 ~ 2516.
- [15] Sommer S S, A R Groszbach, C D K Bottema. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *BioTechniques*, 1992, 12: 82 ~ 87.
- [16] Myakishev M V, Khripin Y, Hu S, Hamer D H. High-Throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res*, 2001, 11: 163 ~ 169.
- [17] Dutton C, S S Sommer. Simultaneous detection of multiple single-base alleles at a polymorphic site. *BioTechniques*, 1991, 11: 700 ~ 702.
- [18] Qiang Liu, Erik C Thorland, John A Heit, Steve S Sommer. Overlapping PCR for Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles: A Rapid One-Tube Method for Simultaneously Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. *Genome Res*, 1997, 7: 389 ~ 398.
- [19] Shu Ye, Sahar Dhillon, Xiayi Ke, Andrew R Collins, Ian N M

- Day. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29; 17e88.
- [20] Livak K J Allelic. discrimination using fluorogenic probes and the 5'-nuclease assay. *Genet Anal*, 1999, 14(5~6); 143.
- [21] Landegren U, Nilsson M. Reading bits of genetic information ; Mthods for single-nucleotide polymorphism analysie. *Genome Res*, 1998, 8; 769~776.
- [22] Syvanen A C. From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation*, 1999, 13; 1~10.
- [23] Krook I M Stratton, SO'Rahilly. Rapid and simultaneous detection of multiple mutations by pooled and multiplex single nucleotide primer extension: application to the study of insulin-responsive glucose transporter and insulin receptor mutations in non-insulin-dependent diabetes. *Hum Mol Genet*, 1992, 1; 391~395.
- [24] Syvanen A C, E Ikonen, T Manninen, M Bengstrom, H Soderlund, P Aula, L Peltonen. Convenient and quantitative detection of the frequency of a mutant allele using solid-phase minisequencing application to aspartylglucosaminuria in finland. *Genomics*, 1992a, 12; 590~595.
- [25] T Pastinen, J Partanen, A C Syvanen. Multiplex, fluoresceint solid-phase minisequencing for efficient screening of DNA sequence variation. *Clin Chem*, 1996, 42; 1391~1397.
- [26] Chen J, M A Iannone, M S Li, J D Taylor, P Rivers, A J Nelson, K A Slentz-Kesler, A Roses, M P Weiner. A microsphere-based assay for multiplex single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Res*, 2000, 10; 549~557.
- [27] 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.
- [28] Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson A C, Sterky F, Nyren P, Uhlen M, Lundeberg J. Single-Nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem*, 2000, 280; 103~110.
- [29] Landegren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*, 1988, 241; 1077~1080.
- [30] Osiowy C. Sensitive Detection of HBsAg Mutants by a Gap Ligase Chain Reaction Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(7) ; 2566~2571.
- [31] W Bi, P J Stambrook. CCR: a rapid and simple approach for mutation detection. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(14) ; 2949~2951.
- [32] Qi X, Bakht S, Devos K M, Gale M D, Osbourn A. L-RCA (ligation-rolling circle amplification) : a general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms(SNPs). *Nucleic Acids Res*, 2001, 29 ; 22e116.
- [33] Faruqi A F, Hosono S, Driscoll M D, Dean F B, Alsmadi O, Bandaru R, Kumar G, Grimwade B, Zong Q, Sun Z, Du Y, Kingsmore S, Knott T, Lasken R S. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms with rolling circle amplification. *Genomics*, 2001, 2; 4.
- [34] Cohen J B, A D Levinson. A point mutation in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-ras oncogene. *Nature*, 1988, 334; 119~124.
- [35] Day I N M, S E Humphries. Electrophoresis for genotyping: Microtiter array diagonal gel electrophoresis on horizontal polyacrylamide gels, hydrolink, or agarose. *Anal Biochem*, 1994, 222; 389~395.
- [36] Lyamichev V, Mast A L, Hall J G. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotides probes. *Nat Biotechnol*, 1999, 17; 292~296.
- [37] Wilkins Stevens Priscilla, Hall Jeff G, Lyamichev Victor, Neri Bruce P, Lu Manchun, Wang Liman, Smith Lloyd M, Kelso David M. Analysis of single nucleotide polymorphisms with solid phase invasive cleavage reaction. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29; 16e77.
- [38] Lu M, Shortreed M R, Hall J G. A surface invasive cleavage assay for highly parallel SNP analysis. *Human Mut*, 2002, 19 ; 416~422.
- [39] RUAN Qing-Guo, LU Chun-Ye. Review of gene mutation array. *Foreign Medical Sciences(Section of Genetics)*, 1998, 21(5) ; 225~231.
- 阮庆国, 陆春叶. 基因突变分析技术综述. 国外医学遗传学分册, 1998, 21(5); 225~231.
- [40] CHEN Han-Kui, FENG Xin. Temperature gradient gelelectrophoresis (TGGE) technology and its application. *Progress in Biochemisty and Biophysics*, 1999, 26(3) ; 297~299.
- 陈汉奎, 冯 忻. 温度梯度凝胶电泳技术及应用. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(3); 297~299.
- [41] LU Li-Hua, ZHANG Jia-Xun, ZHU Yi-Chuan. Denaturing gradient gelelectrophoresis system used in mutations detecting. *Letters in Biotechnology*, 2001, 12 (3) ; 208~210.
- 陆利华, 张家洵, 朱一川. 变性梯度凝胶电泳装置及其在 DNA 突变检测中的初步应用. 生物技术通讯, 2001, 12 (3) ; 208~210.
- [42] LIAO Lin-Chuan, MENG Hai-Ying, HOU Yi-Ping, ZHANG Si-Zhong, YAN You-Yi, SU Zhi-Guang, LI Ying-Bi, WU Jin, ZHANG Ji. Analysis of temperature-modulated high-performance liquid chromatography as a tool for detection of single nucleotide polymorphism. *Chin J Med Genet*, 2000, 17(3) ; 204~207.
- 廖林川, 孟海英, 侯一平, 张思仲, 颜有仪, 苏智广, 李英碧, 吴瑾, 张 霁. 用温度调控高效液相色谱探索基因组单核苷酸多态性的方法研究. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(3); 204~207.
- [43] A P Shuber, L A Michalowsky, G S Nass, J Skoletsky, L M Hire, S K Kotsopoulos, M F Phipps, D M Barberio, K W Klinger. High throughput parallel analysis of hundreds of patient samples for more than 100 mutations in multiple disease genes.

Hum Mol Gene, 1997, 6:337~347.

- [44] Chen X, Levine L, Kwok P Y. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic analysis. *Genome Res*, 1999, 9:492~498.
- [45] Kwok P Y. SNP genotyping with fluorescence polarization detection. *Hum Muta*, 2002, 19:315~323.
- [46] Warrington J A, Shah N A, Chen X, Janis M, Liu C, Kondapalli S, Reyes V, Savage M P, Zhang Z, Watts R, DeGuzman M, Berno A, Snyder J, Baid J. New developments in high-throughput resequencing and variation detection using high density microarrays. *Hum Muta*, 2002, 19:402~409.
- [47] 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*, 1997, 94:1119~1123.
- [48] Patrick N Gilles, David J Wu, Charles B Foster, Patrick J Dillon, Stephen J Chanock. Single nucleotide polymorphic discrimination by an electric dot blot assay on semiconductor microchips. *Nature Biotechnology*, 1999, 17:365~370.
- [49] Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvanen A C. A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Res*, 2000, 10:1031~1042.
- [50] Bray M S, Boerwinkle E, Doris P A. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. *Hum Muta*, 2001, 17:296~304.
- [51] Sascha Sauer, David H Gelfand, Francis Boussicault, Keith Bauer, Fred Reichert, Ivo G Gut. Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30:5e22.
- [52] LIU Wan-Qing, HE Lin. SNP—Tracing new blueprint for human genome. *Hereditas* (Beijing), 1998, 20(6):38~40.
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.
- [53] 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 human genome. *Science*, 1998, 280:1077~1082.

“2005 年生物技术前沿与发展专题研讨会”即将召开

“2005 年生物技术前沿与发展专题研讨会”与“2005 年中国国际科学仪器及实验室装备展览会 (CISILE 2005)”同期召开,展会集中展示生物技术、分析测试、实验室技术领域的先进技术与仪器设备,预计参展厂商达五百多家,是我国生物技术及相关领域重要的专业盛会和成果交易平台。会议期间将组织参观 CISILE 2005。

一、会议时间:2005 年 3 月 10~11 日,报到时间:2005 年 3 月 9 日

二、会议地点:北京展览馆报告厅(北京市西直门外大街 135 号)

三、主办单位:中国生物工程杂志社

四、会议主要议题

1、基因表达和分离纯化技术

2、DNA 重组及转基因技术

3、蛋白质工程技术

4、细胞和原生质融合技术

5、酶和细胞固定化技术

五、联系方式

通讯地址:北京市中关村北四环西路 33 号中国生物工程杂志社,邮编:100080

联系电话:010-82624544,82686611-6631 传真:010-82624544

Email:biotech@mail.las.ac.cn 联系人:寿景依,张宏翔

6、动植物细胞大规模培养技术

7、动物胚胎工程技术

8、现代微生物发酵技术

9、现代生物反应工程

10、现代生物分离工程技术