

[研究简报]

# 连接反应介导的等位基因特异性扩增-微流控芯片电泳法同时检测多个 SNP 位点

汪维鹏<sup>1,2</sup>, 倪坤仪<sup>2</sup>, 周国华<sup>1,2</sup>

(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)

关键词 ALM-ASA; 微流控芯片电泳; SNP; CYP2D6

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)10-1856-03

通常, 一个基因上有多个双等位基因 SNP 位点与蛋白功能相关, 为了同时测定这些 SNP 位点, 已建立了多种基于多重 PCR 扩增的方法<sup>[1,2]</sup>. 这些技术优化过程繁琐, 不宜作为普通实验室的通用方法. 我们建立了一种基于适配器连接介导的等位基因特异性扩增的多重 SNP 测定方法 (Adapter Ligation-mediated Allele-specific Amplification, 简称 ALM-ASA 法), 即通过  $n+1$  条引物进行  $n$  重 PCR 扩增, 与我们自行设计和研制的体积小、操作简便且成本低的微流控分析系统相结合, 简化了测定步骤和优化过程, 提高了检测通量, 降低了检测成本, 不需特殊仪器即可实现. 由于细胞色素 P<sub>450</sub>2D6 (CYP2D6) 是体内最重要的肝药酶之一, 参与 30 多种常用药物代谢, 是药物基因组学的主要研究基因之一<sup>[3]</sup>, 本文以 CYP2D6 基因中的 6 个 SNP 位点为测定对象, 开展多个 SNP 位点同时测定的方法学研究.

## 1 实验部分

1.1 DNA 样品的制备 分别取 20 名健康受试者的 EDTA 抗凝全血 1 mL, 按改进的酚/氯仿提取法提取 DNA, 用 50  $\mu$ L TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0, 1 mmol/L EDTA) 溶解, 并用 Gene Spec III 型微量基因光谱测定仪 (Naka Instruments, 日本) 测定其纯度和浓度, 于 4  $^{\circ}$ C 保存.

1.2 PCR 预扩增 采用 PCR 预扩增一段包含 6 个待测 SNP 位点的长度为 3 119 bp 的片段. 25  $\mu$ L PCR 反应体系中含有引物 5'-TCAACACAGCAGGTTCACTCACAGCA-3' 和 5'-CTGCACATCCGGATGTAG-GATC-3' 各 0.6  $\mu$ mol/L, 0.5 mmol/L dNTP 和 3.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa) 及 10 ~ 100 ng 模板 DNA. 在 PTC-225 型 PCR 扩增仪 (MJ Research, USA) 上进行 PCR 扩增. 热循环参数如下: 于 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 70  $^{\circ}$ C 延伸 3.2 min, 扩增 35 个循环; 于 70  $^{\circ}$ C 延伸 7 min 使反应完全. 取 3  $\mu$ L 反应产物在质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 GeneGenius 凝胶成像系统 (Syngene, UK) 拍摄电泳图谱.

1.3 酶切与酶连反应 在 10  $\mu$ L 体系中加入 1  $\mu$ L PCR 预扩增产物和 10 U *Mbo* I 内切酶 (TaKaRa), 在 37  $^{\circ}$ C 水浴中保温反应 2 h. 将反应液在 70  $^{\circ}$ C 保温 15 min, 使内切酶失活. 加入 50 U T4 DNA 连接酶 (TaKaRa) 和 DNA 适配器 (5'-CCCCACTTCTTGTTCCTCATCAGGCGCATCACTCG-3' 和 5'-GATCCGAGT-GATGCGCTAAG-3' 各 50 pmol 的退火产物), 于 16  $^{\circ}$ C 水浴中保温反应 2 h 后取出, 于 4  $^{\circ}$ C 保存.

1.4 SNP 位点特异性多重 PCR 扩增 在 10  $\mu$ L 反应体系中共含特异性引物混合物 (野生型或突变型) 20 pmol (表 1), 10 pmol 通用引物 Pu (5'-CCCCACTTCTTGTTCCTCAT-3'), 1.0  $\mu$ L 反应缓冲液 (10 倍), 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Taq DNA 聚合酶及 0.5  $\mu$ L 酶连产物. 热循环条件如下: 于 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 20 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 扩增 30 个循环; 于 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min 使反应完全.

收稿日期: 2006-01-10.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 30270368) 资助.

联系人简介: 周国华 (1964 年出生), 男, 博士, 研究员, 主要从事遗传分析研究. E-mail: zhoughua@tsinghua.org.cn

**Table 1** Details of allele-specific primers used for typing six SNPs in the CYP2D6 gene<sup>a</sup>

SNP code	SNP	Primer sequence (5'→3') <sup>b</sup>	$t_m/^\circ\text{C}$	Amplicon size/ bp	Primer conc. / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
SNP-1	100C > T	CGCTGGGCTGCACGCT <b>CC</b> (T)	66.6(64.5)	704	0.1
SNP-2	1707T > del	AAGAAGTCGCTGGAGC <b>CT</b> (G)	59.9(62.3)	247(246)	0.2
SNP-3	1758G > T	GCCTFCGCCAACC <b>ACTgCG</b> (T)	64.5(62.3)	196	0.9
SNP-4	2470T > C	TGTCCCGTCCTCCTG <b>gAT</b> (C)	62.3(64.5)	515	0.2
SNP-5	2549A > del	GAGCTGCTAACTGAGC <b>CA</b> (G)	60.2(62.3)	436(435)	0.2
SNP-6	2613AGA > del	TTCCTGGCAGAGATGG <b>GA</b> (G)	62.5(62.3)	371(368)	0.4

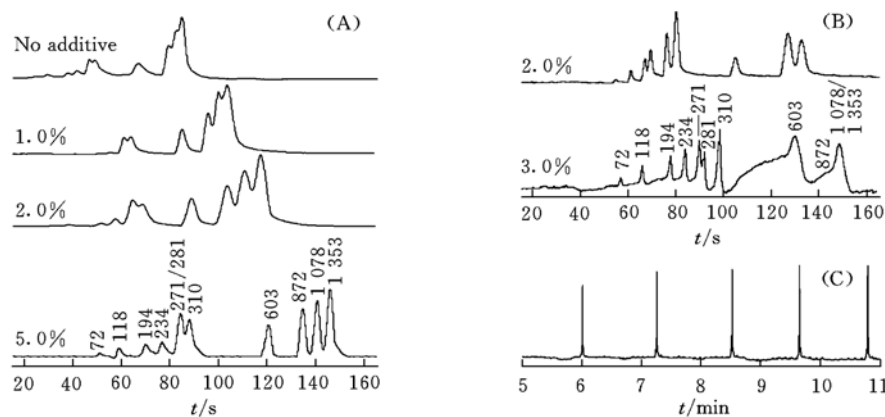
a. The letter or number in the brackets corresponds to the mutant-specific primer; b. the capital letters (in bold) represent the base specific to the SNP type, and the lowercases represent the artificially mismatched base.

1.5 芯片电泳系统 以生物倒置显微镜作为操作平台; LHR-925 型 He-Ne 激光器 (Melles Griot 公司) 发出的激光经窄带滤光片 [(632.7 ± 8.7) nm, 沈阳汇博光学技术有限公司] 除去杂波波长光后, 以 45° 角斜入射至芯片通道; 待测样品被激发产生的荧光通过物镜 (40/0.60) 汇聚后, 经截止滤光片 (RG665, Andover, USA) 过滤杂光, 由光电倍增管 (R928 型, 北京滨松光子技术有限公司) 接收单色荧光光子产生电信号, 再经色谱数据工作站 (N2000 型, 浙江大学智能信息工程研究所) 转换为峰信号。

1.6 芯片电泳条件 向热压法自制 PMMA 芯片微通道内注入含质量分数为 1.0% 的 HPMC-50 (Aldrich, USA)、5.0% 的甘油和 1  $\mu\text{mol/L}$  To-pro-3 (Molecular Probes, USA) 的分离介质; 在样品池中加入 1  $\mu\text{L}$  PCR 产物和 4  $\mu\text{L}$  水; 400 V/cm 电场强度进样 5 s; 200 V/cm 电场强度分离检测。

## 2 结果与讨论

2.1 微流控芯片电泳检测系统的性能考察 采用质量分数为 1.0%~3.0% 的 HPMC-50 (1 × TBE, 1  $\mu\text{mol/L}$  To-pro-3) 作为筛分介质对 5 ng/ $\mu\text{L}$   $\phi\text{X174}$  Hae III digest DNA marker (TaKaRa) 进行芯片电泳分离分析。结果表明, HPMC-50 的浓度越高, 越有利于短片段的分离。当 HPMC-50 的质量分数为 2.0% 时, 6 个小于 310 bp 的片段得到有效分离; HPMC-50 的质量分数为 3.0% 时, 7 个小于 310 bp 的片段得到分离, 271 bp 与 281 bp 的两个片段得到部分分离 [图 1(B)]。但是, 只通过改变 HPMC-50 的质量分数不能实现对宽长度范围的 DNA 片段的同时分离。我们在质量分数为 1.0% 的 HPMC-50 中加入不同浓度的甘油作为筛分介质, 当甘油质量分数为 5.0% 时, 有 10 个片段 (除 271 bp 与 281 bp 外) 得到分离 [图 1(A)]。以 PCR 产物 (247 bp) 为检测对象, 单次加样后通过切换进样电压与分离电压进行多次连续进样, 主峰保留时间的 RSD 小于 1.0% [图 1(C)]; 在同一块芯片上 6 次加样后测定主峰保留时间的 RSD 为 2.1%; 6 块不同芯片上测定主峰保留时间的 RSD 小于 5.0%。将 PCR 产物稀释 100 倍 (约 0.1 ng/ $\mu\text{L}$ ) 的信噪比大于 3。每块芯片可重复使用 20 余次。

**Fig. 1** Inspection of CE-chip device

(A) Separation of  $\phi\text{X174}$  Hae III digest using 1.0% HPMC-50 without or with certain amount of glycerol; (B) the mass fraction of the polymer are 2.0% and 3.0%, respectively; (C) consecutive injections and separations of PCR product by voltage switching using 1.0% HPMC-50 with 5.0% glycerol. Numbers on electropherograms correspond to the size of DNA fragments in bp. The applied field strength was 200 V/cm.

2.2 芯片电泳测定基因型 本方法包括 PCR 预扩增、酶切酶连反应、等位基因特异性扩增反应和

微流控芯片电泳分离检测 4 个步骤. 芯片电泳分离多重 PCR 扩增产物的典型结果见图 2. 图 2 谱线 *a* 中出现 6 个特异性峰, 谱线 *b* 中出现特异性峰 2, 6 和 7. 所以位点 SNP-1 ~ SNP-6 的基因型分别为 CT, TT, GT, TC, AA 和 AGA/AGA. 本方法在待测 SNP 位点的上下游同时引入一个人工设计的 DNA 适配器, 所有等位基因特异性引物都与同一条通用引物 Pu 配对扩增, 所以当用 *n* 条等位基因特异性引物进行 *n* 重 PCR 扩增时只需 *n* + 1 条引物, 这就在增加通量的同时大大减少了引物数量, 简化了扩增, 提高了特异性. 由于 DNA 适配器为“Y”型结构, 只有特异性引物发生扩增反应后, 才会产生与 Pu 互补的模板, 提高扩增特异性. 采用预扩增和在 3' 端倒数第 3 个碱基处引入一个错配碱基的方法可提高 ALM-ASA 特异性. 如果将本法与 PCR 芯片技术相结合<sup>[4]</sup>, 分析时间将大大减少, 但成本提高.

2.3 实际样品的测定 采用建立的新方法测定了 20 个健康中国人 CYP2D6 基因的 6 个 SNP 位点, 其中 100C > T, 1758G > T 和 2470T > C 在中国人群中的突变频率较高, 分别为 67.5%, 25.0% 和 30.0%; 另外 3 个 SNP 位点未发现突变类型. 为验证本法的准确性, 用 PCR-RFLP 法同时测定了上述 20 个不同基因组 DNA, 结果与本法测定结果完全一致.

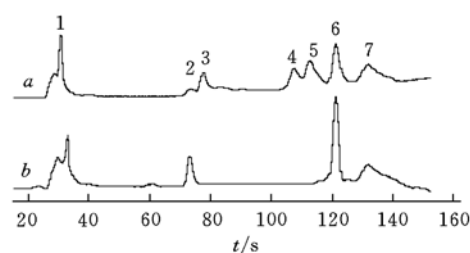


Fig. 2 The typical typing results of 6 SNPs

*a* and *b* mean amplicons specific to wild-type and mutant, respectively. Peaks 1—7 correspond to primer-dimer, amplicons of SNP-3, 2, 6, 5, 4 and 1, respectively.

### 参 考 文 献

- [1] Roberts R., Joyce P., Kennedy M. A. . Hum. Mutat. [J], 2000, **16**(1): 77—85
- [2] Jacob R. M., Johnstone E. C., Neville M. J. *et al.* . Clin. Chem. [J], 2004, **50**(8): 1372—1377
- [3] Ji L., Pan S., Marti-Jaun J. *et al.* . Clin. Chem. [J], 2002, **48**: 983—988
- [4] YAO Li-Ying(姚李英), QI Heng(祁恒), CHEN Tao(陈涛) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(3): 428—431

## Simultaneous Detection of Multiplex SNPs by Adapter-ligation Mediated Allele-specific Amplification( ALM-ASA) on CE-chip Electrophoresis Device

WANG Wei-Peng<sup>1,2</sup>, NI Kun-Yi<sup>2</sup>, ZHOU Guo-Hua<sup>1,2\*</sup>

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

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

**Abstract** To detect multiplex single nucleotide polymorphisms(SNPs) simultaneously, a new method was established by combining ALM-ASA with microfabricated CE-chip. Taking the CYP2D6 gene as an example, six SNPs, 100C > T(P34S), 1707T > del(frameshift), 1758G > T(stop codon), 2470T > C, 2549A > del(frameshift) and 2613AGA > del(K281del), were typed by four steps consisting of preamplification, digestion and ligation, allele-specific amplification, and amplicon separation by chip-CE. The genotyping results of 20 different genome samples by 6-plexed ALM-ASA were completely consistent with those obtained by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis(PCR-RFLP), indicating that the multiplex approach established in this study was accurate and inexpensive. As the small reagent consumption by CE-chip device, a low cost for SNP typing was achieved together with the multiplex PCR technology proposed in this report. Neither modification of microchip channels nor clean-up process of PCR products was required; this greatly shortens the whole time for SNP typing.

**Keywords** ALM-ASA; Microchip electrophoresis; SNP; CYP2D6

(Ed.: A, G)