

# 基因分型技术的研究进展

陈鹏 樊春海<sup>1</sup> 贺林 师咏勇\*

(上海交通大学 Bio-X 中心, 上海 200030; <sup>1</sup> 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800)

**摘要** 单核苷酸多态性(SNP)是人类基因组中出现最频繁的一种遗传变异, 目前已知的 SNP 位点已经超过 900 万。SNP 在揭示疾病分子机制的关联研究中具有重要地位, 而高通量关联分析对 SNP 基因分型技术提出了更高的要求。本文综述了 SNP 基因分型技术的进展, 并重点介绍了纳米材料在基因分型中的应用以及由此衍生出的新的基因分型方法。

**关键词** 单核苷酸多态性; 纳米材料; 基因分型

遗传多态性包括短序列重复(short tandem repeat, STR), 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)等。严格说来, SNP 是指人群中单个碱基的变化, 在人群中出现的频率超过 1%。除极少数 SNP 之外, 大多数 SNP 只有两个等位基因, 因此分型相对容易。SNP 是人类基因组中最常出现(约 68%)的遗传变异<sup>[1]</sup>, 在人类基因组中分布广泛, 每 1 000 个碱基对就有一个<sup>[2]</sup>。大多数 SNP 发生在非编码区域, 不会改变蛋白质的功能, 不过由于分型容易并且在基因组中分布广泛, 它们已经成为基因组研究中重要的遗传标记。SNP 基因分型就是确定特定 SNP 位点的基因型的过程。

生物体演化出了复杂的通路以实现各种复杂的分子生化活动。如果 SNP 发生在这些通路上的基因中, 就可能导致疾病易感性的变化; 也可能导致个体对一定剂量药物治疗的反应各不相同, 这在临床上有时会导致治疗失败或者药物副作用, 因为对于不同的个体, 药物的效率和毒性是由药物转运和代谢酶中的变异来决定的<sup>[3]</sup>。为了找出基因与上述个体差异之间的联系, 就要对病例和正常对照进行大量的 SNP 分型和关联分析, 比较它们的基因型的差别。

在关联分析研究中需要对大量 DNA 样本中的大量 SNP 进行基因分型。于是能否同时检测更多的 SNP 或者更多的样本, 成为开发基因分型方法时的关键问题<sup>[4,5]</sup>。与此同时, 成本和精确性也是必须考虑的问题<sup>[6]</sup>。

## 1 SNP 分型技术

基因分型中使用的分子生物学方法已经经过了几十年的发展。这些方法可以大致分成两类, 直接

确定等位基因的方法和利用 DNA 序列特性间接区分等位基因的方法。下面我们列出几种典型的直接确定等位基因的 SNP 分型方法和利用 DNA 序列特性间接区分等位基因的 SNP 分型方法。

### 1.1 直接确定等位基因的方法

直接确定等位基因的方法是直接检测目标 DNA 的碱基序列。这类方法的典型代表就是 Sanger 的双脱氧末端终止测序法<sup>[7]</sup>, 曾经被用于人类基因组计划。之后, 相继开发出许多 SNP 基因分型技术, 比如微测序(minisequencing)<sup>[8]</sup>、焦磷酸测序(pyrosequencing)<sup>[9]</sup>、荧光偏振法<sup>[10]</sup>和荧光共振能量转移法<sup>[11]</sup>等等。

Sanger 测序法的原理是在普通的引物延伸反应中加入 4 种不同荧光标记的双脱氧核苷三磷酸(dideoxynucleoside triphosphate, ddNTP)。如果 ddNTP 被掺入到合成链中, 聚合酶就无法继续延伸这条链, 所以延伸产物中含有各种长度的带荧光的延伸产物(图 1A)。用电泳分离这些产物能得到目标 DNA 的序列。例如, Applied Biosystems 公司的 PRISM<sup>®</sup>3100 遗传分析仪。

微测序可以被看成是一种短链的测序, 与双脱氧末端终止法不同的是, 微测序通常只延伸 1 个碱基<sup>[8]</sup>。微测序技术可以和芯片技术结合起来, 把 3' 端紧邻分型位点的延伸引物固定在芯片表面并只加入 4 种带不同荧光的 ddNTP。延伸反应之后, 体系中其余的成分包括带荧光的 ddNTP 被洗脱, 从芯片上点的荧光类型就能确定 DNA 样品的基因型(图 1B)。Illumina 公司的 Infinium Assay 就是在微珠芯片上进行的微测序反应。

收稿日期: 2008-09-03 接受日期: 2008-12-16

\* 通讯作者。Tel: 021-62933338-8208, E-mail: shiyongyong@gmail.com

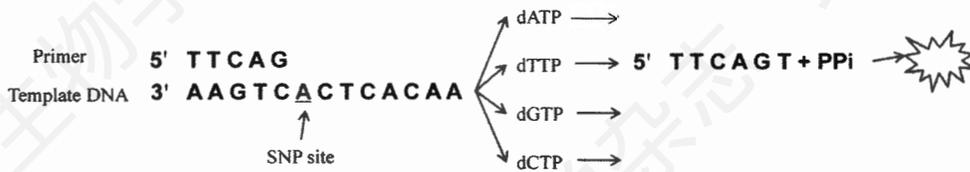
## (A) Sanger sequencing:



## (B) Minisequencing:



## (C) Pyrosequencing:



## (D) FRET:

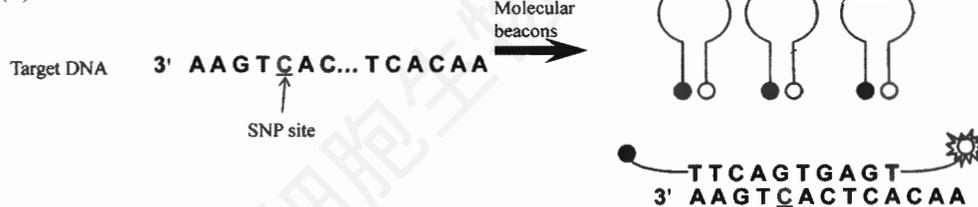


Fig.1 Direct determining SNP genotype

A: Sanger sequencing method<sup>[7]</sup>; B: minisequencing, the genotype is revealed by the fluorescent type on the chip<sup>[8]</sup>; C: Pyrosequencing, the genotype is revealed by the time that fluorescence appears<sup>[9]</sup>; D: FRET, change in the structure of molecular beacon leads to a fluorescence signal<sup>[11]</sup>. The gray underlined base represents an SNP site.

除了用荧光检测微测序反应的产物, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrum, MALDI-TOF MS)和荧光偏振(fluorescence polarization)也可以被用来检测微测序产物。MALDI-TOF MS 是一种被广泛使用的质谱分析技术, 它通过分辨荷质比来识别掺入的双脱氧核苷三磷酸(dideoxynucleoside triphosphate, ddNTP)<sup>[12]</sup>。使用质谱的优点在于不需要对 ddNTP 做任何的标记, Sequenom 公司的 MassARRAY<sup>®</sup> 系统就是这种检测方法的典型代表。荧光偏振法是在温度和溶液粘度恒定的情况下, 用分子体积变化导致的偏振荧光强度变化来标识掺入的碱基<sup>[10]</sup>。如果在微测序反应中使用荧光标记的 ddNTP, 那么掺入了一种 ddNTP 的延伸产物将产生不同于其他 ddNTP 延伸产物以及未掺入的 ddNTP 的

偏振荧光, 从而可以确定 SNP 位点的基因型。

焦磷酸测序(Pyrosequencing<sup>®</sup>)是一种用化学发光进行 SNP 分型和序列测定的方法<sup>[9]</sup>。dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 4 种核苷被一种一种地加入到引物延伸反应体系中。当加入的 dNTP 与正在延伸的模板碱基互补时, 聚合酶就会把它掺入到合成的 DNA 链中来, 并且释放一个焦磷酸分子。这个焦磷酸分子是一系列后续化学发光反应的必备材料。如果没有掺入 dNTP 就不会有光信号, 而在加入下一种 dNTP 之前, 未掺入的 dNTP 会被从反应体系中移除。因此, 观察导致发光的 dNTP 类型就能确定 SNP 的基因型(图 1C)。由于一个焦磷酸定量地对应一个掺入的 dNTP 和这种反应的单重性, 焦磷酸测序尤其适合对 DNA 文库进行定量的 SNP 分型, 而不适合高通量的 SNP 分析<sup>[13]</sup>。

当两种荧光基团靠得足够近, 并且供体荧光基团的发射光谱与受体荧光基团的激发光谱相重叠时, 就会发生荧光共振能量转移(*fluorescence resonance energy transfer, FRET*), 使受体发出更强的荧光, 否则受体不发光。分子信标(*molecular beacon*)的茎环结构可以把供体和受体荧光基团拉到一起, 从而发生 *FRET*<sup>[11]</sup>。把等位基因特异性的分子信标和目标 DNA 片段杂交并观察分子信标的 *FRET* 现象, 就能确定 SNP 的等位基因型(图 1D)。

## 1.2 利用 DNA 序列特性间接区分等位基因的方法

利用 DNA 序列特性间接区分等位基因的方法是利用一个基因的突变型和野生型等位基因在化学或者物理性质上的不同来确定基因型, 现有的方法包括等位基因特异性杂交(*allele specific hybridization, ASH*)、引物延伸(*primer extension, PE*)和连接或酶切方法等。

由于完全互补的双链 DNA 和有错配的双链 DNA 在热力学特性上有所区别, 形成的双链 DNA 稳定性不同。通常情况下, *ASH* 区分等位基因的能力由杂交探针的长度和序列、SNP 位点在探针上的位置和杂交条件决定。用等位基因特异性探针分别与 SNP 位点的扩增产物杂交, 检测杂交体系中的双链就能判定等位基因的类型(图 2A)。由于不需要酶反应, 反应温度又恒定, *ASH* 特别适合在芯片表面反应, 从而实现高通量<sup>[14]</sup>。如果使用多个不同的杂交探针来分析一个 SNP 位点, 则能提高这种方法的准确率。*Affymetrix* 的 *GeneChip*<sup>®</sup> 就是用等位基因特异性杂交实现高通量 SNP 分型的系列产品。

*DynaMetrix* 公司的动态等位基因特异性杂交技术(*dynamic allele specific hybridization, DASHTM*)通过在温度变化的过程中实时地检测探针和聚合酶链式反应(*polymerase chain reaction, PCR*)产物的杂交情况, 来准确地区分 SNP 等位基因, 是一种相对准确、低成本的 SNP 分型方法<sup>[15]</sup>。首先, 用连接生物素等方法固定 SNP 位点 PCR 产物的一条单链, 再变性 PCR 产物, 把另外一条单链洗脱并抛弃, 于是试管里就只存在 PCR 产物的一条单链。再在试管里加入对应一个等位基因的特异性寡核苷酸(*allele specific oligonucleotide, ASO*)探针和双链特异性染料 *SYBR Green I*, 在合适的条件下杂交。然后逐步加热依据荧光强度的变化测定双链的解链, 不完全互补的双链与完全互补的双链解链的温度不同, 从而把两个等位基因区分开来。目前, *DASH* 已经和芯片技术结合,

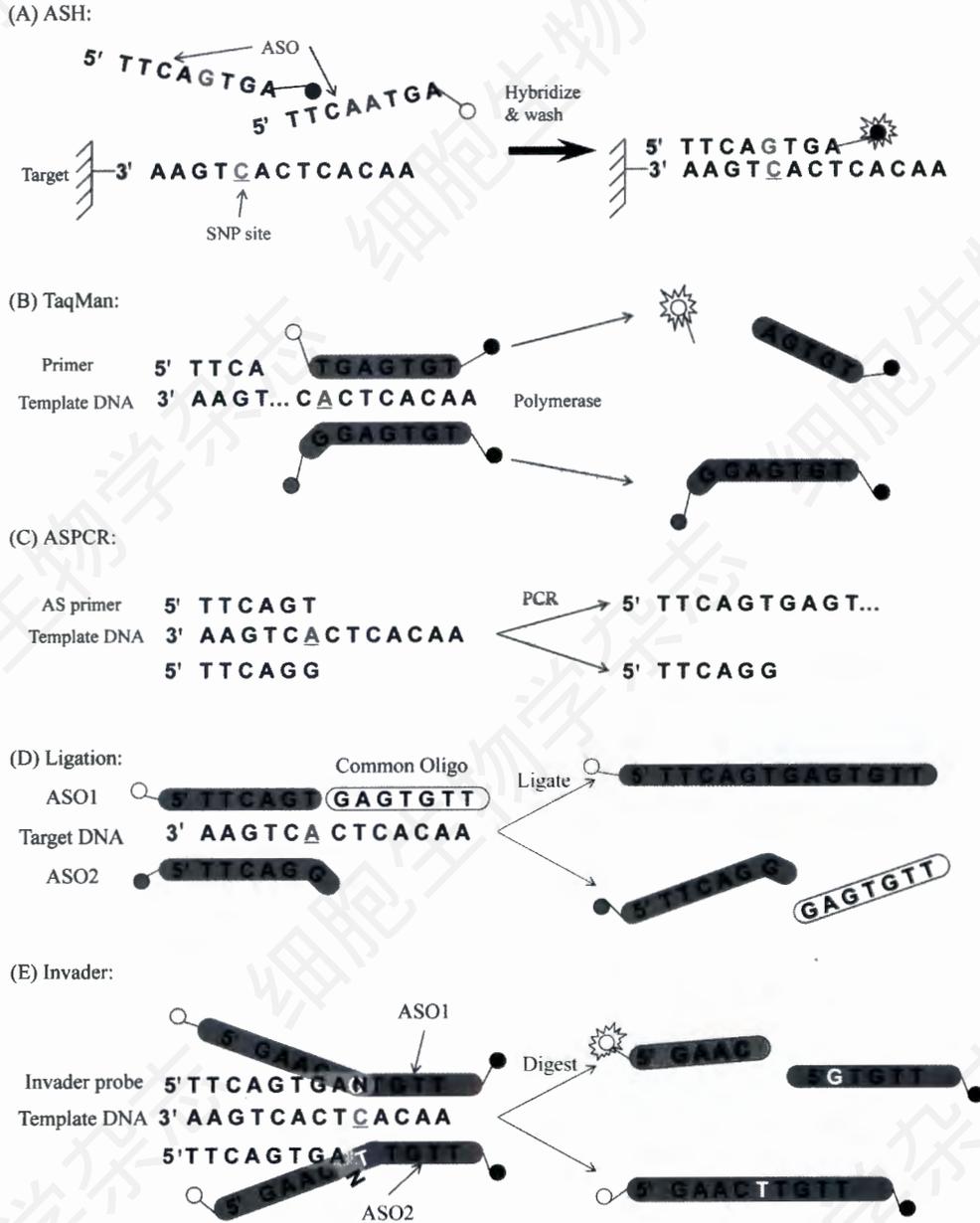
实现了高通量的 SNP 基因分型。

*TaqMan*<sup>®</sup> 基因分型技术利用 DNA 聚合酶的 5'→3' 外切活性, 在 PCR 延伸过程中, 降解完全互补的 *ASO* 探针<sup>[16]</sup>。聚合酶只会外切与模板完全互补的探针, 而探针的两端分别标记了荧光基团和淬灭基团, 它们在受到激发时不显荧光。当被外切后, 荧光基团和淬灭基团分离, 从而被激发出荧光(图 2B)。*TaqMan*<sup>®</sup> 技术采用不同的荧光基团分别标记两种 *ASO* 探针, 可以在单管反应中检出样本的基因型。*TaqMan*<sup>®</sup> 技术的优势在于仅使用一个反应而且操作简单, 可以在 *Applied Biosystems* 公司的 *Prism*<sup>®</sup> 7900HT 荧光定量 PCR 仪上进行并读取荧光信号。

等位基因特异性 PCR (*allele specific PCR, ASPCR*)把 PCR 扩增和 *ASH* 结合在一起, 把扩增目标 DNA 片段的步骤和区分等位基因整合成一步。分别用两条 3' 末端碱基等位基因特异性的正向引物, 和一条通用的反向引物, 直接以基因组为模板扩增目标片段。只有 3' 端与模板完全互补的引物才能保证聚合酶延伸的效率(图 2C)。而基因型可以通过比较两管反应的 PCR 产物量来确定。如果在两条特异性引物 5' 端标记了不同的荧光基团, *ASPCR* 就能用单管反应得到基因型<sup>[17]</sup>。

DNA 连接酶能催化 DNA 链中磷酸二酯键的形成, 但如果待连接的两个末端存在错配, 则连接效率会非常低。利用这一特性, 设计一对 *ASO*, 使它们的 3' 末端碱基分别对应 SNP 的两个等位基因。再设计一个通用寡核苷酸(*common oligonucleotide*), 使它的 5' 末端紧邻 SNP 位点。把它分别和两个 *ASO* 混合, 并与目标单链 DNA (*ssDNA*) 杂交, 连接。如果 *ASO* 的 3' 末端与模板 DNA 互补, 则 DNA 连接酶就能把它跟通用寡核苷酸连接起来。否则, 就无法连接。通过比较连接产物的长度或者荧光信号的类型就能准确的区分 SNP 的两个等位基因(图 2D)。这种方法被称作寡核苷酸连接检验(*oligonucleotide ligation assay, OLA*), 它具有高通量和低成本的特点, 尤其适合于需要检验大量 SNP 的应用<sup>[18]</sup>。*Applied Biosystems* 公司的 *SNPlex*<sup>™</sup> 在 *OLA* 反应之后进行 PCR, 再用毛细管电泳检测产物, 实现了多重 SNP 分型。

限制性内切酶被用于检测 *RFLP*, 就是序列变化导致酶识别位点的出现或者消失。如果一个 SNP 正好处在一个限制性酶识别位点内, 并且 SNP 的两个等位基因一个使得识别位点出现, 另一个使得识别位点消失, 则这个 SNP 就可以用限制性酶切片段长度的变化来确定<sup>[19]</sup>。用相应的限制性内切酶消化 SNP 所在



**Fig.2 Methods of allele discrimination**

A: allele specific hybridization, only the completely complimentary probe forms a double strand with the target DNA [14]; B: TaqMan, different fluorescence is detected when the allele specific probes were degraded according to sample genotype [16]; C: allele specific PCR, only the complimentary primer could be extended efficiently [17]; D: ligation method, complimentary ASO is ligated to a common oligonucleotide that could be detected by length or fluorescence [18]; E: invader assay, complimentary oligonucleotide (ASO1) and invader probe form an overlap which can be recognized and digested by a structure specific endonuclease. The result can be detected by FRET [20]. The gray underlined base represents an SNP site.

区域的PCR产物,根据酶切产物的电泳条带就能确定基因型。RFLP在SNP基因分型中的应用受到酶识别位点序列的限制,不适合大规模关联分析。

Invader检验是另一种用酶切方法分型SNP的方法,与RFLP相比,它利用结构特异性的酶切,不受酶识别位点序列的限制[20]。Invader用3条探针来进行SNP分型,两条是等位基因特异性探针,它们的SNP

位点互补并且有一个5'端的尾巴。另一条是Invader探针,它的3'端与SNP位点错配。当它们与DNA模板杂交,如果等位基因特异性探针与SNP位点互补,则Invader探针的3'末端碱基会与等位基因特异性探针对应SNP位点的碱基重叠,这个结构会被结构特异性核酸内切酶识别并切掉等位基因特异性探针5'端的尾巴。反之,Invader探针与等位基因特异性探针

不形成重叠,就不会发生剪切(图 2E)。这个剪切动作可以用荧光共振能量转移检测。如果把 5' 端的尾巴设计成另一个反应的 Invader 探针,就能形成放大效应,从而省去 PCR 扩增步骤。

使用变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)观察 DNA 在部分变性或者完全变性环境中的迁移率变化,也可以确定样本基因型是杂合子还是纯合子。SNP 位点的 PCR 扩增片段被部分变性,形成同源双链和异源双链。如果样本是纯合子,同源双链和异源双链就都是完全互补的双链 DNA。而如果是杂合子的情况,异源双链就会带有一个错配,这样的双链 DNA 在通过层析柱时与完全互补的同源双链有不同的停留时间。因此用 DHPLC 可以快速的区分杂合子和纯合子<sup>[21]</sup>。由于停留时间同样依赖于核酸序列,在完全变性条件下, DHPLC 也可以在一个层析柱里分析多个单碱基延伸反应的产物,由此可以提高分型的通量。

## 2 纳米材料在基因分型中的应用

除了上面提到的基因分型方法,人们一直在寻找更好的方法。纳米技术的出现改变了人们对于一些常见材料的认识。当把在宏观尺度上呈现惰性的材料缩小到纳米尺度时,这些材料就会表现出活跃的物理化学性质,甚至可以被用作催化剂<sup>[22]</sup>。虽然大部

分应用了纳米技术的分型技术仍然处于探索阶段,但是加入了纳米材料的生物化学反应表现出的特性却是非常诱人的。例如,加入了纳米金粒子的普通 PCR 具有更高的特异性和效率<sup>[23]</sup>。

### 2.1 纳米颗粒

Au、Ag 和 Fe 的纳米粒子可以和 DNA 聚合酶以及 ssDNA 相互作用<sup>[24]</sup>。尽管过量纳米粒子对聚合酶有抑制作用,适量纳米金粒子(Au nanoparticle, AuNP)还是可以使得 PCR 反应的指数扩增期更早出现<sup>[23]</sup>。

AuNP 不仅能应用在 PCR 反应中,用比色的方法也可以实现 SNP 基因分型。AuNP 的粒径能显著影响纳米金胶体的颜色<sup>[25]</sup>。而且,当金纳米粒子带负电的表面被盐离子中和,斥力的消失会导致金纳米粒子团聚,金纳米粒子的粒径增大<sup>[26]</sup>。根据团聚的程度,纳米金胶体可以呈现出从红到灰的颜色。金纳米粒子表面吸附的单链 DNA 可以防止它们聚集在一起<sup>[27]</sup>。然而,双链 DNA (double strand DNA, dsDNA) 较难吸附在金纳米粒子表面。通过控制等位基因特异性杂交条件,错配探针无法和目标 DNA 形成双链。于是杂交溶液在混入纳米金胶体和盐溶液后呈现红色。另一方面,互补探针和目标形成了完整的双链,杂交溶液混合了纳米金和盐溶液之后就呈现蓝色(图 3)<sup>[28]</sup>。因为杂交和检测是分开的,纳米金和盐离子对探针和目标 DNA 的影响就很小了,从而可

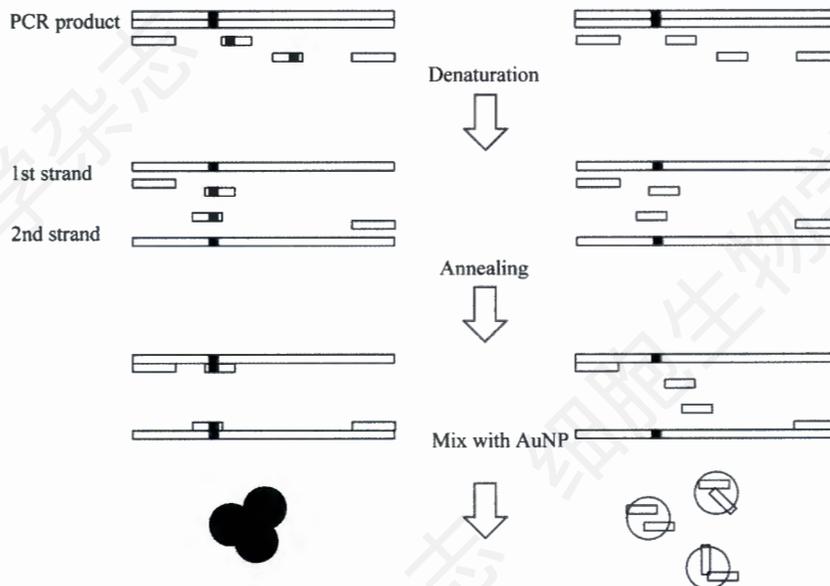


Fig.3 Genotyping by Au nanoparticle<sup>[28]</sup>

Post-PCR solution is mixed with allele specific probes and denatured by heating. After annealing, remain primer and complimentary probes forms double strands with PCR product. The solution makes gold colloid turn blue (left). While the mismatch probe is still single strand which can prevent AuNP from aggregation in ion solution, so the colloid remains red (right). The genotyping can be determined by the color of solution.

以控制杂交条件使得单个碱基的错配都无法形成双链。这种比色的检测方法快速、简单而且灵敏,不需要标记 DNA。不过,每个反应只能检测一个 SNP 使这种方法的通量受到限制。

还有一种比色法也可以用来区分单个碱基的错配。把两条探针单链 DNA 分别共价连接到 AuNP 表面。而后,携带探针的 AuNP 和目标 DNA 杂交。形成互补双链的探针和目标 DNA 将把两个纳米金粒子拉到足够近的距离,发生团聚,从而改变溶液的颜色<sup>[29]</sup>。错配探针和目标的杂交溶液将保持红色。这个检验方法相比于前面那种基于比色的方法的优点是只需要一步反应,同时也具有灵敏性和易操作性。目前为止,上述的这两种比色法都还没有成熟的商业产品。

金纳米粒子也可以被用做高效的 DNA 标记。不同粒径的纳米金粒子具有不同的光谱吸收率。当被标记到 SNP 探针末端,在芯片上的一个点上发生的探针和目标 DNA 的杂交事件可以用纳米金粒子的团聚导致的光吸收率变化来反映<sup>[30]</sup>。这种标记本身就可以检测纳摩级(1 纳摩 =  $10^{-9}$  摩尔)的目标 DNA。而且,光吸收率的变化还可以用银染来放大,也就是把银原子还原到纳米金粒子的表面<sup>[31]</sup>。将带纳米金粒子的探针和目标 DNA 杂交过夜并经过银染放大,50 飞摩(1 飞摩 =  $10^{-15}$  摩尔)的目标 DNA 也可以被检测到<sup>[32]</sup>。由于具有更低的检出限,金纳米粒子标记可以替代在芯片实验中使用的荧光标记,如 Cy3。而且,这种检验所需的荧光扫描仪和点样仪都有成熟的商业产品。

## 2.2 磁珠

在丢失转动灵活性之后,由超顺磁的铁纳米粒子组成的磁珠会在它的悬浊液中形成沉淀。人们利用这种特性来检测特定序列的目标 DNA。如果磁珠由固定在它表面的寡核苷酸相互连接,形成一个刚性的网络结构,那么这个结构的转动灵活性就要远远低于单个的磁珠。设计两条分别与目标 DNA 的前半段和后半段互补的寡核苷酸,把它们分别固定在磁珠上。这两种磁珠与一条连接寡核苷酸杂交几个小时后,试管中就出现了肉眼可见的棕色沉淀物(图 4)<sup>[33]</sup>。这个简单并且容易检测的手段可以用于 SNP 基因分型,用 SNP 位点 PCR 产物的一条单链作为连接寡核苷酸,控制杂交条件使得单个碱基的错配不能形成双链,于是通过观察是否出现沉淀就能判断 SNP 的基因型。借助于现代的精密仪器,单分子的杂交也能用这个方法检测。然而,这种检测手段还需要被进一步的优化,来开发出可靠的分型产品。

## 2.3 纳米碳管

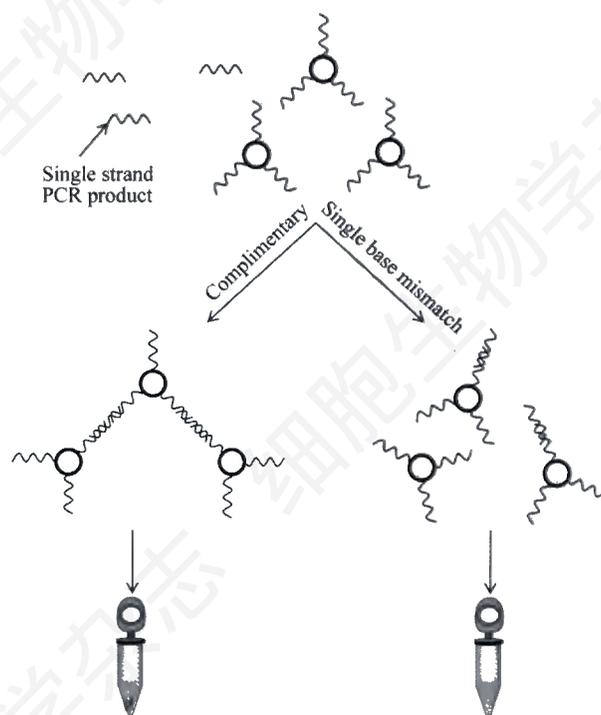


Fig.4 Genotyping by magnetic beads<sup>[33]</sup>

Allele specific probes are attached to magnetic beads. After annealing with single strand SNP PCR product, complimentary PCR product links beads to form a rigid structure. This structure will rapidly precipitate from the suspension. So the genotype could be easily determined.

纳米碳管(carbon nanotube, CNT)被广泛应用于微电子、药物输送和显微成像。在生物化学领域,也有单臂纳米碳管增强 PCR 反应效率的报道<sup>[34]</sup>。研究者推断纳米碳管表面可以吸附 DNA 聚合酶和 DNA, 增加 PCR 反应发生的几率。

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)检测原子间的相互作用力观察 DNA 分子。普通 AFM 的解析力受到所用针尖的限制,不足以用于观察 DNA 分子。借助于纳米碳管针尖的帮助,得到了解析力达到几个纳米的精细 DNA 图像<sup>[35]</sup>。一个基于 AFM 的基因分型和单倍型分型方法已经被开发出来<sup>[36]</sup>。在等位基因特异性探针上标记荧光素 IRD800 或者生物素,与基因组 DNA 杂交,再偶联链霉素。在带纳米碳管针尖的 AFM 下观察经过杂交的基因组 DNA。由于链霉素和荧光素 IRD800 的平均直径分别是 1.7 nm 和 0.7 nm,在 AFM 的图像里,它们可以被清楚地分辨出来(图 5)。单个位点的基因型就可以由图像上标记的大小来决定。而染色单体上多个位点的单倍型也可以通过使用多种探针以及它们的相对位置来得到。由于 AFM 价格不菲,同时分型的通量受到扫描

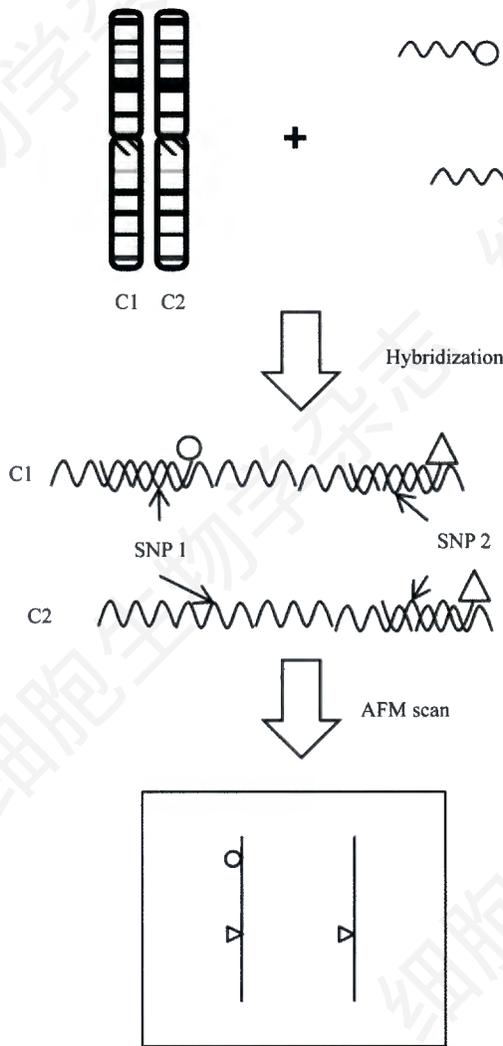


Fig.5 Genotyping by AFM [36]

The probes targeting different SNP sites are labeled with molecules of different diameters. The probes are hybridized to genome DNA. After wash, the molecules are scanned by AFM. Whether there exists a label indicates the genotype at each SNP site. The haplotype can be inferred by the sequence of labels on a chromosome.

速度的制约, 所以目前这种方法还不能用于大规模 SNP 分型。

#### 2.4 量子点

在现代生物学中, 使用了大量有机染料。随着技术的进步, 需要更多的灵活性和更多种类的颜色来满足多重 SNP 分型的需要。现在有了量子点(quantum dot), 它可以很好的适应这个角色[37]。量子点是由几百个原子组成的半导体纳米晶体, 它们在激光的激发下可以发出多种波长的光。与有机染料相比, 量子点具有高亮、稳定和由颗粒大小决定的光谱可调的优点[38]。

可以把发射光的波长不重叠的量子点组合起来,

呈现各种颜色的荧光, 就像使用调色板。这种特性可以被用来制造在多重基因分型中使用的生物分子条形码, 或者说是纳米条形码[39]。通常这些量子点被组合在一个微珠里, 微珠发出的荧光可用流式细胞仪来测量[40]。当带有 Cy5 荧光的基因组扩增产物与分别结合了对应多个 SNP 位点的等位基因特异性探针的纳米条形码珠子杂交后, 选择合适的杂交条件, 使有一个错配的探针不能与扩增产物杂交, 此时观察所有带有 Cy5 荧光的珠子的颜色就能得出多个位点的 SNP 基因型(图 6)。Invitrogen 公司的 Qdot® 是量子点的一个商业产品。

### 3 小结与展望

相比于其他遗传标记, SNP 具有分布广泛、频率高和两等位基因等优势。平均来看, SNP 在人类基因组中至少每一千个碱基对就会出现一个。那么对于一个长度达到几百万碱基对的基因来说就有很

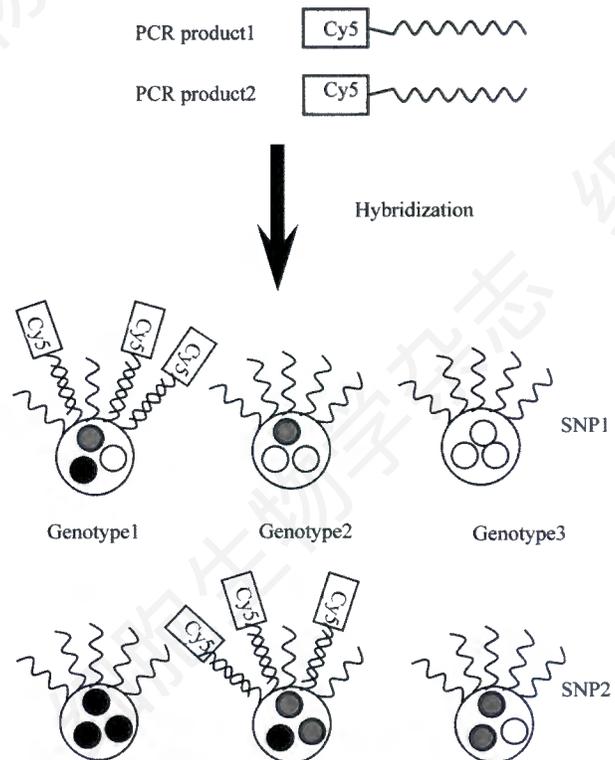


Fig.6 Genotyping by quantum dots [40]

In this example, a quantum dot bead is made up of 3 kinds of quantum dots with different color. PCR products from different SNP sites are labeled by Cy5 dye. They are hybridized to the quantum dot beads with allele specific probes. The genotype is revealed by the color of bead with Cy5 dye. Because multiple colors can distinguished clearly, multiple SNPs can be typed in a single tube.

多的 SNP 可供研究,而实际上,SNP 对蛋白质的功能和表达水平有着显著的贡献。

SNP 被大量的作为研究基因组的分子标记,而这些研究能否获得令人满意的结果受到一些技术方面因素的制约,如精确性、成本和通量。通过改进检验方法设计、提升检测灵敏度和增强酶的能力,人们提出了一些方法来解决这些问题。焦磷酸测序、DASH 和基因芯片降低了 SNP 基因分型的成本和时间,使大样本的关联分析从中受益。

PCR 仍然是缩短时间和降低成本的主要障碍,因为大多数方法都依赖它来得到足够多的 DNA 分子。而纳米材料的应用有机会使检测的灵敏度大大增加,例如用银染放大纳米金信号就降低了对目标 DNA 浓度的要求,而 AFM 甚至可以对单个分子分型。虽然基于纳米技术的 SNP 基因分型还只是处于探索阶段,我们仍可以期待在不久的将来,纳米技术与生物技术的结合将会带来具有更好性能的 SNP 基因分型技术。

#### 参考文献(References)

- [1] Weber JL, David D, Heil J, *et al.* Human diallelic insertion/deletion polymorphisms, *Am J Hum Genet*, 2002, 71(4): 854-862
- [2] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, *et al.* A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature*, 2001, 409(6822): 928-933
- [3] Wang Z, Moutl J. SNPs, protein structure, and disease, *Hum Mutat*, 2001, 17(4): 263-270
- [4] Jenkins S, Gibson N. High-throughput SNP genotyping, *Comp Funct Genomics*, 2002, 3(1): 57-66
- [5] Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms, *Nat Rev Genet*, 2001, 2(12): 930-942
- [6] Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, *et al.* Genotyping errors: causes, consequences and solutions, *Nat Rev Genet*, 2005, 6(11): 847-859
- [7] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(12): 5463-5467
- [8] Ho-Pun-Cheung A, Abaibou H, Cleuziat P, *et al.* Detection of single-nucleotide polymorphisms in cancer-related genes by minisequencing on a microelectronic DNA chip, *Methods Mol Biol*, 2007, 381: 267-278
- [9] Royo JL, Hidalgo M, Ruiz A. Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping, *Nature Protoc*, 2007, 2(7): 1734-1739
- [10] Chen X, Levine L, Kwok PY. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis, *Genome Res*, 1999, 9(5): 492-498
- [11] Terrell KA, Rasmussen TA, Trygg C, *et al.* Molecular beacon genotyping for globoid cell leukodystrophy from hair roots in the twitcher mouse and rhesus macaque, *J Neurosci Methods*, 2007, 163(1): 60-66
- [12] Van Den Boom D, Ehrlich M. Discovery and identification of sequence polymorphisms and mutations with MALDI-TOF MS, *Methods Mol Biol*, 2007, 366: 287-306
- [13] Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future, *Clin Chim Acta*, 2006, 363(1-2): 83-94
- [14] Matsuzaki H, Dong S, Loi H, *et al.* Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays, *Nat Methods*, 2004, 1(2): 109-111
- [15] Howell WM, Jobs M, Gyllensten U, *et al.* Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms, *Nat Biotechnol*, 1999, 17(1): 87-88
- [16] Morita A, Nakayama T, Doba N, *et al.* Genotyping of triallelic SNPs using TaqMan® PCR, *Mol Cell Probes*, 2007, 21(3): 171-176
- [17] Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, *et al.* High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers, *Genome Res*, 2001, 11(1): 163-169
- [18] De La Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, *et al.* Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan® SNP genotyping assays and the SNPlex® genotyping system, *Mutat Res*, 2005, 573(1-2): 111-135
- [19] Toorchi M, Tahvildarzadeh A, Shoja J, *et al.* Molecular characterization of CSN3 alleles in Sarabi and Holstein using PCR-RFLP, *Biotechnology*, 2006, 5(4): 495-500
- [20] Nomura S, Kondo M, Nagano M, *et al.* Development of a novel nano-Invader DNA chip system, *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(5): 787-795
- [21] Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review, *Hum Mutat*, 2001, 17(6): 439-474
- [22] Ueda A, Haruta M. Nitric oxide reduction with hydrogen, carbon monoxide, and hydrocarbons over gold catalysts, *Gold Bull*, 1999, 32(1): 3-11
- [23] Li M, Lin YC, Wu CC, *et al.* Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticles, *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(21): e184.1-e184.10
- [24] Mi LJ, Zhu HP, Zhang XD, *et al.* Mechanism of the interaction between Au nanoparticles and polymerase in nanoparticle PCR, *Chin Sci Bull*, 2007, 52(17): 2345-2349
- [25] Link S, El-Sayed MA. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals, *Annu Rev Phys Chem*, 2003, 54: 331-366
- [26] Link S, El-Sayed MA. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals, *Int Rev Phys Chem*, 2000, 19(3): 409-453
- [27] Li H, Rothberg LJ. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction, *J Am Chem Soc*, 2004, 126(35): 10958-10961
- [28] Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(39): 14036-14039
- [29] Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, *et al.* One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes, *J Am Chem Soc*, 1998, 120(9): 1959-1964
- [30] Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. Scanometric DNA array

- detection with nanoparticle probes, *Science*, 2000, 289(5485): 1757-1760
- [31] Li Y, Wark AW, Lee HJ, *et al.* Single-nucleotide polymorphism genotyping by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging measurements of surface ligation reactions, *Anal Chem*, 2006, 78(9): 3158-3164
- [32] Storhoff JJ, Marla SS, Bao P, *et al.* Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system, *Biosensors Bioelectron*, 2004, 19(8): 875-883
- [33] Josephson L, Manuel Perez J, Weissleder R. Magnetic nanosensors for the detection of oligonucleotide sequences, *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40(17): 3204-3206
- [34] Cui D, Tian F, Kong Y, *et al.* Effects of single-walled carbon nanotubes on the polymerase chain reaction, *Nanotechnology*, 2004, 15(1): 154-157
- [35] Stevens RM, Nguyen CV, Meyyappan M. Carbon nanotube scanning probe for imaging in aqueous environment, *IEEE Trans NanoBioscience*, 2004, 3(1): 56-60
- [36] Woolley AT, Guillemette C, Li Cheung C, *et al.* Direct haplotyping of kilobase-size DNA using carbon nanotube probes, *Nat Biotechnol*, 2000, 18(7): 760-763
- [37] Alivisatos AP. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots, *Science*, 1996, 271(5251): 933-937
- [38] Ma Q, Wang C, Su X. Synthesis and application of quantum dot-tagged fluorescent microbeads, *J Nanosci Nanotechnol*, 2008, 8(3): 1138-1149
- [39] Ruan W, Eastman PS, Chen FF. Nanobarcodes check out genes, *Biophotonics Int*, 2006, 13(9): 34-39
- [40] Xu H, Sha MY, Wong EY, *et al.* Multiplexed SNP genotyping using the Qbead™ system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay, *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(8): e43.1-e43.10

## Research Progress in Genotyping Technology

Peng Chen, Chun-Hai Fan<sup>1</sup>, Lin He, Yong-Yong Shi\*

(Bio-X Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; <sup>1</sup>Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Science, Shanghai 201800, China)

**Abstract** Single nucleotide polymorphism (SNP) is the most frequently occurring genetic variation, with the number exceeding 9 million. SNPs play an important role in association studies. At the same time, association studies with large sample require accurate, rapid and cost-efficient SNP genotyping methods. We reviewed the methods in SNP genotyping, and put the emphasis on the application of nanomaterials in genotyping.

**Key words** single nucleotide polymorphism; nanomaterials; genotyping

Received: September 3, 2008 Accepted: December 16, 2008

\*Corresponding author. Tel: 86-21-62933338-8208, E-mail: shiyongyong@gmail.com