

高通量自动化SNP检测技术研究进展

苏睿 林峻 陈鲤群* 蔡伟文*

(福州大学生物科学与工程学院, 福州 350108)

摘要 单核苷酸多态性(SNP)作为第三代分子遗传标记, 因其在遗传学、医学等领域的研究重要性而得到广泛的关注, 建立高通量自动化的SNP检测技术是十分必要的。该文简要概述了有代表性的传统SNP检测方法: 单链构象多态性和限制性片段长度多态性的原理、应用及特点。详尽概述了当今几种有代表性的高通量自动化SNP检测方法: Sanger测序法、焦磷酸测序法、MassARRAY(测序)技术、基因芯片法的原理、应用以及特点, 并对未来高通量自动化SNP检测技术做出了展望。

关键词 单核苷酸多态性; 高通量; 自动化; 检测技术

Research Progress on High-Throughput Automated SNP Detection Technology

Su Rui, Lin Jun, Chen Liqun*, Cai Weiwen*

(College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract As the third-generation molecular genetic marker, single nucleotide polymorphism (SNP) has received extensive attention due to its research importance in the fields of genetics and medicine. It is necessary to establish a high-throughput automated SNP detection technology. This paper briefly summarizes the principles, applications and characteristics of representative traditional SNP detection methods: single-strand conformation polymorphism and restriction fragment length polymorphism. A detailed overview of several representative high-throughput automated SNP detection methods: Sanger sequencing, pyrosequencing, MassARRAY (sequencing), gene chip, including their principles, applications and characteristics. Moreover, the way to the high-throughput automated genotyping in the future is briefly discussed.

Keywords single nucleotide polymorphism; high-throughput; automation; detection technology

2003年4月人类基因组计划(human genome project, HGP)宣告完成, 人类进入后基因组时代。单核苷酸多态性(SNP)作为基因组中十分重要的可遗传变异受到了科学家的广泛关注, 在很多强遗传性疾病的基因定位研究中, SNP是重点研究对象^[1]。早在2000年就有报道, 在人类基因组中要选取约 10^5 个

SNP分子遗传标记用于研究一些基因结构变化与某些疾病, 特别是癌症的相关性^[2], 如Penney等^[3]最新发表了SNP与粘液性结直肠癌的强关联性。此外, SNP在其他领域也有广泛应用, 越来越多的SNP需要被发现和检测, 如此庞大的工作量需要我们开发高通量自动化程度高的检测方法。本文在对SNP做

收稿日期: 2018-11-08 接受日期: 2019-02-19

国家自然科学基金(批准号: 31500616、31371287)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-22863805, E-mail: lqchen@fzu.edu.cn; caiww@fzu.edu.cn

Received: November 8, 2018 Accepted: February 19, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31500616, 31371287)

*Corresponding authors. Tel: +86-591-22863805, E-mail: lqchen@fzu.edu.cn; caiww@fzu.edu.cn

网络出版时间: 2019-08-12 15:08:55 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1508.030.html>

简要概述的基础上,着重介绍近年来几种有代表性的高通量自动化SNP检测技术的原理、应用以及优缺点。

1 SNP的定义及其发展

一般认为,在生物体基因组中,单个碱基突变的频率在群体中大于1%的位点通常被称为SNP^[4]。人类基因组中的SNP大约有3000 000个,SNP的存在使得DNA序列具有丰富的多态性,平均每500~1 000个碱基就会出现一个SNP^[5]。颠换、转换、缺失和插入是发生在基因组上位点突变的四种主要形式,这种突变标记具有群体遗传性,并且数量巨大,多态性丰富^[6]。广义上来说,以上四种碱基突变形式都会产生SNP,但实际上后两种突变形式几乎可以不计,前两种突变形式占绝大部分比例,并且转换突变与颠换突变之比为二比一^[7]。其中大多数转换突变发生在T碱基与C碱基之间,原因是C碱基很容易发生脱氨基形成T碱基^[8]。

1996年之前,分子标记研究主要集中在限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和短串联重复序列(short tandem repeat, STR)或称为微卫星DNA两种遗传标记。直到1996年, Lander^[9]在科学杂志上正式提及到人类基因组中的SNP,随着科学研究的深入和拓展,其被公认为第三代遗传标记。在个体化诊断治疗^[10]、临床医学^[11]、群体遗传学^[12]、法医学鉴定^[13]等研究领域中,SNP发挥着重要作用。尤其在给药用药方面,由于个体化差异,SNP的基因分型研究十分具有参考意义^[14]。

当今是大健康的时代,世界各国将精准医疗视为医疗新时代的重要战略,SNP与药物遗传学和药物基因组学密切相关^[15]。药物基因组学广义上可理解为不同个体之间对药物疗效的反应不同^[16],不同的病人在用同一种药物的时候,其治愈效果会因人而异^[17]。有研究表明,这是由于不同个体间对药物吸收、代谢、转化的基因上的差异,而基因上的这种差异主要表现为单核苷酸多态性^[18]。SNP与药物的耐受性或个体敏感性之间的内在联系是当今科学家的研究热点,阐明二者的相互关系,对于不同的个体可进行针对性的用药,也能为新药的发现提供科学依据^[19-20]。美国食品和药品管理局(FDA)近几年批准的十几种新药当中,提供基因特异性计量范围,建议病人在给药前进行基因分型,以便精准用药治疗^[21]。

2 SNP的基本特征

如上所述,SNP发展迅速、具有广泛的应用领域,这与其基本特征密不可分,因此很有必要对其特征做简要的概述。

2.1 SNP在群体中存在的普遍性

单核苷酸多态性是人类基因组中最常见的一种遗传突变形式,群体多态性的百分之九十以上都是由SNP引起的,平均每一千个碱基就会出现一个单核苷酸多态性^[22],在整个基因组中SNP总量已经达到三百多万个。很多癌症相关基因的突变都与SNP密切相关,如乳腺癌1号基因(*BARD1*)中的SNP是导致女性乳腺癌发生的重要因素之一^[23]。

2.2 SNP相关的基因变异是可以稳定遗传的

对于绝大多数遗传相关疾病的研究,SNP遗传稳定性高,突变率仅为 10^{-9} ,相比微卫星等多态性标记遗传稳定性更高^[24],因此对于SNP的研究是值得信赖的,获取的信息较为广泛和可靠^[25], Niciura等^[26]基于SNP遗传标记与绵阳优良性状的关联性,开发出一种可靠、快速、廉价的筛选优质性状绵羊的方法。

2.3 SNP可以进行大规模、快速检测

SNP是一种二态性的遗传标记,并不像四等位基因那样复杂。根据这种二等位多态性原理,在进行基因组筛查的时候,对于结果只需进行是与非的判断即可,片段的长度对分析没有影响,由此操作简便,提高筛查的效率,利于自动化^[27-28]。

3 传统经典SNP检测方法

3.1 单链构象多态性(SSCP)

单链构象多态性的原理是:对于长度相当的单链DNA分子,即使只有一个碱基的差异,空间构象也会不同,利用琼脂糖凝胶的网孔结构,在电泳时构象不同的单链DNA分子由于迁移速率不同,表现出不同大小的条带,由此区分出单个碱基的突变^[29]。

后来SSCP与聚合酶链式反应,即PCR相结合,将待检DNA片段进行PCR扩增,使得该检测方法灵敏度有所提高。Orita等^[30]早在1989年应用PCR-SSCP方法分析DNA的多态性。Bosari等^[31]也用此方法检测出人体抑癌基因(*p53*)中的单碱基突变。尽管该方法操作简单、成本低,但其检测片段长度有一定限制,一般用于300 bp以内的片段检测^[32]。随着DNA检测片段的生长,检出率逐渐降低,而且对电

泳条件要求较高,最终也只是检测出粗略的结果,并不能对突变的具体碱基以及位置进行判断^[33-34]。

3.2 限制性片段长度多态性(RFLP)

在众多的SNP突变位点中,有相当一部分会导致限制性酶切位点发生改变,包括原有酶切位点改变或者产生新的酶切位点。当用同一种限制酶进行切割时,会产生不同长度的限制性片段,再进行电泳分离时会跑出众多大小不一的条带,呈现出多态性,据此检测出酶切位点处的SNP^[35]。

类似于PCR-SSCP,将SNP位点所在基因片段先进行PCR扩增,再对PCR产物进行酶切电泳检测,该方法被称为PCR-RFLP,其特异性和准确度相对更高。但是,该方法只能检测出位于某些限制酶酶切位点处的SNP,并不能对其他非酶切位点处的SNP进行检测^[36],而且酶切条件是影响实验的主要因素,需要探索合适的条件,发挥内切酶的最大效率。Wang等^[37]利用改进的PCR-RFLP法检测人端粒酶逆转录酶基因(*hTERT*) rs2735940位点处SNP。Sun等^[38]应用PCR-RFLP法,在75例食管鳞状细胞癌(ESCC)患者的B细胞淋巴瘤2基因(*Bcl-2*)中检测出3种SNP基因型,并分析了基因多态性与BAX蛋白过表达的关系。

以上介绍的两种传统SNP检测方法均是以凝胶电泳技术为基础,类似的检测方法还有等位基因特异性PCR(AS-PCR)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)等。传统经典的SNP检测方法虽然操作简便、设备要求不高,但具有检测过程繁琐、检测结果较慢、不适合大规模、难于实现自动化等局限性,因此其应用受到了一定的限制。近年来,越来越多的高通量自动化技术得以发展,使得SNP检测更加方便、快捷、高效。

4 现代高通量、自动化程度较高的的检测方法

4.1 Sanger测序法

Sanger测序法又被称为一代测序,即利用双脱氧链末端终止法的原理进行测序。这种测序方法最初由Sanger团队开创,并早在1977年使用该方法测定了第一个基因组序列:噬菌体*phiX174*,全长5 375个碱基^[39-40],并为此后二代测序(NGS)、三代测序(也叫单分子测序)的发展奠定了基础^[41],也是较早应用到SNP检测的一种方法。

Sanger测序法的一般过程为:将ddNTP先用放射性同位素标记好,然后按照一定的比例分别加入到4个DNA合成反应体系中,由于ddNTP的2号和3号位碳原子上双脱氧,故不含有羟基,DNA的延伸因不能合成磷酸二酯键而被终止,通过凝胶电泳和放射自显影后可以根据电泳带的位置确定待测分子的DNA序列^[42]。

Sanger测序自动化程度越来越高,且能够可靠地用于SNP分型检测。通过测序能精确定SNP位点的突变类型,尤其是那些数量较少的缺失和插入型突变基因^[43]。Alzahrani等^[44]用Sanger法直接测序甲状腺癌(TC)肿瘤组织DNA,发现了甲状腺癌基因(*EIF1AX*)内含子5/外显子6剪接位点中罕见的A113剪接位点突变。但是,Sanger测序的灵敏度也有一定限制,当靶序列突变比例过低时,可能会出现假阴性^[45]。对于临床SNP分型而言,检测通量低,绝大多数疾病往往涉及到多个基因的突变,这就使总体检测成本提高,而且实验条件要求严格,需要特殊的试剂、仪器设备以及一定的实验空间,不适用于一般实验室。

4.2 焦磷酸测序法

焦磷酸测序法是属于二代测序(NGS)的一种方法,是基于PCR扩增以及酶的级联化学反应进行荧光检测的测序方法,更适合于短序列DNA中的SNP分析^[46]。

该方法一个完整的化学反应需要:4种酶(包括DNA聚合酶、三磷酸腺苷硫酸化酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶)、2种反应底物(包括5'-磷酸硫酸、荧光素)、待测单链DNA模板以及测序引物。反应过程原理为:测序引物与待测模板退火,在每一轮测序反应中,只加入一种dNTP,在DNA聚合酶的作用下,与模板上碱基互补配对的dNTP会被加入到测序引物的3'末端,形成磷酸二酯键并释放焦磷酸分子,在三磷酸腺苷硫酸化酶的催化作用下与体系中的5'-磷酸硫酸生成ATP,ATP与荧光素又在荧光素酶的催化作用下形成氧化荧光素,产生可被检测到的荧光,再通过电子耦合器件光学系统可捕获到一个特异的检测峰,峰值的高低则和相匹配的碱基数成正比^[47]。反之,若加入的dNTP与模板不匹配,则不能发生上述一系列的酶级联反应,也就不会产生荧光和峰图。三磷酸腺苷双磷酸酶的作用是消化体系中剩余的dNTP和残留的少量ATP,便于下一轮反

应中再加入另外一种dNTP。如此重复操作上述步骤,最后根据峰图可以准确得到待测模板的序列信息,由此实现SNP的筛查^[48]。

焦磷酸测序法在Sanger测序法的基础上显示出独特的优势,无需电泳、测序的准确性好、灵敏度高、耗时短。对于较短片段的DNA分子利于SNP分型,更可以呈现出该位点的突变碱基比例^[49]。Sukasem等^[50]开发了一种焦磷酸测序方法来检测泰国结直肠癌患者中*UGT1A1*基因多态性(包括*UGT1A1**28和*UGT1A1**6两种突变)和等位基因频率。此外,焦磷酸测序是一种易于处理的定量实时测序方法,除应用于基因分型外,还常用于DNA甲基化模式的分析。Busato等^[51]通过焦磷酸测序开发出一种基于SNP分型的等位基因特异性DNA甲基化定量分析方法,并对三种印记基因(*IGF2*、*IGF2R*和*PEG3*)甲基化进行定量分析,成功验证了该方法的可靠性。On-erici等^[52]使用焦磷酸测序检测O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶基因(*MGMT*)启动子区域甲基化模式,并分析了甲基化模式对喉癌患者存活、复发和化疗敏感性的影响。其缺点主要是应用单一,对于较长的基因序列并不适用,而且对试剂药品有一定要求,成本相对较高,需要配套的焦磷酸测序仪等实验仪器才可以进行^[53]。此外,对于突变频率低于7%的位点,检测就不是十分灵敏,重复性较低。针对此问题,东南大学等团队^[54]在传统焦磷酸测序的基础上,开发并验证了一种通过使用具有二碱加成(pyrosequencing with di-base addition, PDBA)的焦磷酸测序定量检测SNP的新方法,对位点rs6717546和rs4148324的检测结果与常规焦磷酸测序的结果一致,提高了检测灵敏度,可检测突变频率低至3%的等位基因。

4.3 MassARRAY(测序)技术

MassARRAY技术是通过单碱基引物延伸(SBE)结合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)来分析SNP,这是一种物理学、化学、生物学交叉的技术方法。在过去十几年中,基质辅助激光解吸/电离(MALDI)飞行时间(TOF)质谱(MS)被普遍认为是核酸分析的多功能工具,尤其是作为可靠的基因分型平台,可用于定性和定量SNP基因分型^[55-56]。

在国际主流的Sequenom MassARRAY系统平台中,其SNP基因分型原理是:基于不同的SNP位点,进行相应区域的特异性PCR扩增,在特异性单碱基

引物延伸后,将这些反应脱盐与二氧化硅基质上的阵列共结晶,在强激光下激发为离子进入强电场飞行,由于MALDI-TOF MS是基于质量大小分辨不同基因分型产物,离子飞行时间与离子质量成反比,因此通过检测飞行时间即可知道分子质量大小,由此分辨出哪些是SNP突变位点^[57]。

MassARRAY技术具有多种功能,可以解决多重反应(每个反应40多个独立的位点)、快速获取和解析数据、提供定量输出,其反映了多重反应测定中每个等位基因表达的产物量,并且灵敏度高,具有高通量鉴定遗传变异的潜力^[58]。Clendenen等^[59]应用此方法可对血清中微量的DNA进行SNP筛查。Jurinke等^[60]利用该技术综合遗传分析平台发现编码SNP,以此识别和分析等位基因特异性表达,建立了人肿瘤蛋白73基因(*TP73*)的等位基因特异性表达谱模型。将以上特征与用于序列注释、测定设计、数据解释和数据存储的集成软件相结合,使其在基因组学研究和分子诊断领域中被广泛应用^[61]。近期,Xiu等^[62]应用该技术建立了一种对四种人类冠状病毒(HCoV)通用的筛查方法,该方法具有较高的灵敏度,不仅可以准确地识别已知的HCoV,而且还能够为发现新的HCoV提供依据。Min等^[63]在组织和细胞学样品中,对表皮生长因子受体基因(*EGFR*)突变诊断中发现,MassARRAY检测的灵敏度85.7%,明显高于焦磷酸测序的灵敏度74.3%。但是,即使条件已经足够优化,还是会有1.96%的概率出现假阳性结果^[64],这是该技术需要进一步改进的地方,以确保结果的准确性和可信赖性。

4.4 基因芯片法

基因芯片(gene chip),又叫做DNA芯片、DNA微阵列(DNA microarray),发展至今已有二十多年的历史,具有十分广泛的应用,是当今基础和应用基因组学研究的常规工具^[65]。

基因芯片的原理是基于碱基互补配对原则的核苷酸序列杂交,针对不同的检测对象或检测目的,将设计合成好的核酸探针用特殊的方法高密度地覆盖在经过处理的固相载体(如玻片等)上,待测样本经过荧光染料标记(一般用Cy3和Cy5标记)与探针在适宜条件下杂交,然后通过芯片扫描仪,即激光共聚焦扫描来检测荧光信号,并对强弱进行判断,再利用专门的软件将荧光信号强度转化为数据信息,然后用计算机算法编程对数据进行分析^[66]。

基因芯片的应用已经涵盖了疾病诊断^[67]、环境保护^[68]、司法鉴定^[69]、食品安全检测^[70]等各个不同的领域。Han等^[71]使用芯片技术对24例耳聋患者的遗传性听力损失基因(*GJB2*)进行突变位点筛查,共检出7例突变,阳性率为29.17%,表明遗传性听力损失基因芯片技术可以快速、高通量检测听力损失相关的突变位点,满足临床耳聋基因检测的需要。Chen等^[72]通过功能基因阵列分析了气候、土壤类型和植被类型对土壤微生物群落多样性的影响,为环境微生物研究提供了重要参考依据。Quaak等^[73]设计了包括863个特异探针的微阵列芯片,对来自人体不同部位(包括手、足、口腔和粪便等)的175个样品进行微生物细胞分型,鉴定微生物种群,并以此作为法医案件的证据。Ranjbar等^[74]设计和构建了一种DNA微阵列芯片,可快速检测鉴定在食物和水中传播的大肠杆菌、志贺氏菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、布鲁氏菌等10种病原菌,检测快速、结果准确。

在SNP的检测应用上,基因芯片的优势在于快速、高通量,每一块芯片上可规则排列着成千上万个探针,只需通过一次杂交就可以实现对众多SNP位点的筛查,所需检测起始样本量少,可用计算机实现自动化SNP分析,显著提高了检测效率^[75]。Watanabe等^[76]利用基因芯片检测*ABO*血型基因的SNP,将*ABO*基因用PCR扩增、染料标记,然后与芯片上的特异性DNA探针序列杂交,扫描荧光信号,进行*ABO*基因中的SNP检测,并证实该方法适用于*ABO*基因分型和物种鉴定的同时分析,可应用于各种法医样品。

当前国际上比较知名的SNP检测芯片有三种,分别为: Illumina SNP检测芯片、Affymetrix SNP检测(分型)芯片以及Agilent CGH芯片(可用于检测SNP)。以下对三种SNP芯片分别进行介绍。

4.4.1 Illumina SNP检测芯片 Illumina的芯片本身由玻璃基片和微珠两部分组成。经过光蚀刻处理的玻璃基片,其表面蚀刻出一定数量的微米级、排列整齐的小孔,然后按照统计学的方法在玻片表面均匀分散与小孔的大小相匹配的微珠,使得每一个小孔正好容纳一个微珠。这种微珠表面经过特殊的处理,表面偶联了同一种DNA序列的几十万个拷贝,这种DNA序列长度为73个碱基,分为两个部分:靠近微珠一端包含23个碱基的Address序列,作用是标识微珠;远离微珠表面包含50个碱基的Probe序

列,作用是与目标DNA进行互补杂交。Address序列与Probe序列是一个整体,他们相互识别,也就是说可以根据Address序列确定每一个微珠上所对应的Probe序列^[77]。

根据要检测的SNP位点不同会有两种不同的探针设计方式。一种设计是在与目标DNA进行杂交的时候探针序列的3'末端紧挨着SNP的位点,这样在进行延伸的时候,会根据SNP突变位点处的具体碱基,按照互补配原则进行延伸。另一种设计是与目标DNA进行杂交的时候探针3'末端的碱基刚好覆盖在SNP位点,并且要设计两种探针以便区别杂合和纯合。如果SNP位点是G和C,那么探针3'末端也设计成G和C。

Illumina芯片检测的最终结果判断是根据扫描到的2种荧光的颜色:红色和绿色。以第一种探针设计方式为例,说明检测原理。如果要检测一个基因序列上G转换为A的SNP突变位点,首先,根据碱基互补配对原则,设计一个3'末端的碱基紧挨着这个SNP位点的探针。在一定的杂交条件下,设计的特定探针与被检测的DNA片段特异性地杂交。然后,加入四种带标记的ddNTPs和DNA聚合酶。其中ddATP、ddTTP两种核苷酸是用二硝基苯(DNP)来进行标记的,ddCTP、ddGTP两种核苷酸是用生物素来标记的。在DNA聚合酶的作用下,体系中被DNP或生物素标记的双脱氧核苷酸被加到探针3'末端,并与SNP位点处碱基互补配对。然后再利用绿色荧光标记的链霉亲和素和红色荧光标记的抗DNP的抗体,可分别与生物素和DNP特异性结合的性质,使得用生物素标记的ddCTP、ddGTP显出绿色,用DNP标记的ddATP、ddTTP显示出红色。

在第一步荧光标记完成后,如果直接杂交,结果用于扫描,荧光信号会比较弱,不利于结果的判定。因此需要将这种荧光信号进一步级联放大。同样是基于抗原抗体特异性结合的原理,向体系中加入生物素标记的抗链霉亲和素的抗体和DNP标记的抗异种抗体Fc端的抗体,这样在扫描仪下会得到较强的荧光信号强度,对于结果的判定也比较容易:若扫描出的红光与绿光的光强度差不多,则可判断此SNP位点是A和G的杂合子;若绿光强度明显大于红光强度,则可判断此SNP位点是G的纯合子。若红光强度明显大于绿光强度,则可判断这个SNP位点是A的纯合子^[78-81]。

Illumina SNP检测芯片主要针对于欧洲人群(如HumanOmni2.5-8), 其主要优势有3点: (1)一定程度上可以用于临床检验, 通量高, 单次可以检测几十到几百万个SNP位点。(2)可信度高, 具有高达99.9%的准确度。(3)检测费用相对低廉, 一个检测样本, 90万位点的芯片大概需要1 000~2 000人民币^[82]。现已有外显子组SNP检测芯片, 可以在癌症细胞中进行基因组范围的等位基因表达检测^[83]。Park等^[84]使用覆盖有超过240 000个SNP位点的Illumina Human Exome BeadChips芯片, 鉴定了脂多糖(LPS)刺激后肝癌细胞中等位基因的表达, 揭示了肝癌细胞中等位基因表达的潜在调控机制。

4.4.2 Affymetrix SNP检测(分型)芯片 Affymetrix的芯片也是通过光蚀刻技术制备的, 但与Illumina的光蚀刻技术略有不同。基片是一张被称为“Wafer”的大玻璃片, 光蚀刻的主要原理是利用固定在基片上的保护基团对紫外光敏感的特性, 一旦受到紫外光的照射, 保护基团就会与基片上相连的羟基发生脱离, 使得羟基暴露在基片表面。当被光照到的区域失去了保护基团, 然后加入要连的碱基就会通过与玻璃基片上的羟基通过化学键结合。实际操作还需要有不同的光罩, 覆盖玻片的不同区域, 玻片上有很多透明的与不透明的小方格, 当紫外光照射时, 透明的小方格可以透过紫外光, 不透明的则反之, 在透过紫外光的区域因保护基团脱离, 故可加入想要的碱基。如此反复, 就可以将玻片上不同区域覆盖你想要的DNA链, 即探针^[85-86]。

一般地, 用于检测SNP的芯片上有两种探针: 一种叫捕获探针, 长度为30个碱基, 设计为与SNP位点相邻, 作用是“捕获”目标DNA序列到芯片上。另一种探针叫显色探针, 共分为A、G、C、T四组, 每组有9个碱基, 3'末端的第一个碱基是特异的, 为A或G或C或T, 从第二个碱基到第九个碱基都是简并的, 5'端带有可以被染成红色(C和G碱基)或绿色(A和T碱基)的标签, 作用是负责SNP芯片的显色。

实验过程一共分两轮杂交, 一步连接。第一轮杂交只加入捕获探针, 使得目标DNA序列被捕捉到芯片上。第二轮杂交就是加入显色探针, 杂交到目标序列上。当捕获探针与显色探针都杂交到目标DNA序列上时, 通过特异的连接酶进行连接, 需要指出的是: 这种连接只有当探针序列与目标序列完全匹配时才会发生, 由此只有与目标DNA序列完全

匹配的显色探针才会被连接到捕获探针上去。后面再用荧光染料进行染色, 然后用芯片扫描仪扫描, 根据检测的突变位点不同, 产生可能的荧光显色: 单纯的红色或者单纯的绿色或者红色和绿色相当, 据此检测SNP的类型^[87-90]。

Affymetrix SNP检测(分型)芯片同样是检测通量很高, 主要针对于亚洲和非洲人群(如Axiom Genome-Wide ASI和Axiom Genome-Wide Human PanAFR)。但是, 由于其主要检测原理是荧光颜色和信号强弱差异化, 检测过程要比Illumina的芯片稍复杂些, 成本相对较高^[91]。目前, Axiom Genome-Wide CHB1和Axiom Genome-Wide CHB2是两种比较常用的、针对中国人的SNP分型芯片, 可覆盖130万个SNP位点。Kao等^[92]使用到CHB1芯片在189名双相障碍亚型II患者和1 773名对照样本中进行全基因组关联分析, 鉴定II型双相情感障碍的易感基因。Park等^[93]使用Axiom Exome 319芯片对450个胃癌病例和1 134个对照进行基因组扫描, 发现前列腺干细胞抗原基因(*PSCA*)中的rs2976394 SNP位点与韩国人群的胃癌易感性相关。

4.4.3 Agilent基因芯片 Agilent基因芯片的基片是一张玻璃片, 其芯片制作过程是基于打印的原理, 将带保护基团的A、G、C、T四种碱基底物的小液滴按照设计的探针序列顺序, 依次层叠地喷到玻片特定的位置上, 经过脱保护基团、偶联、氧化三个步骤得到延长的DNA探针。具体实验过程是: 先将第一个碱基喷到玻璃片上, 再将第二个碱基喷到玻璃片上, 使二者发生偶联作用。接下来是将亚磷酸基团加氧化成磷酸基团, DMT保护基团就会从第二个碱基5'位羟基上掉下来。这样, 5'位羟基上没有其他基团占据, 可以进行下一步的延伸反应。如此反复, 得到想要的相应长度的DNA探针。这种合成技术效率非常高, 可达到99%以上。

Agilent CGH芯片用于检测SNP时主要通过酶切、杂交两步。用*Alu I*和*Rsa I*两种限制性内切酶对基因组DNA进行酶切, 由于酶切位点的不同, 将其片段化, 根据杂交过程中基因组DNA不同长度的片段与探针杂交的吸附力不同, 会扫描出不同的荧光强度, 因此可以检测不同位点的SNP^[94-98]。

Agilent的芯片用于检测SNP所覆盖的位点不如上述两种芯片多, 并且对酶切条件有较高的要求, 结果的准确性与特异性相对较低, 但检测效率高, 因

为该芯片是用Cy3与Cy5进行标记,与用生物素标记相比省略了再染色的步骤,杂交后可直接用于扫描。Agilent SurePrint G3 Human CGH Microarray和Agilent SurePrint G3 Human High Resolution Microarray是两种应用较多的分析SNP和拷贝数变异的芯片^[99-100]。Wiszniewska等^[101]应用Agilent技术定制设计了高分辨率寡核苷酸阵列,其覆盖有1 860个基因的外显子靶向序列和60 000个SNP的靶向探针,将SNP探针和外显子靶向阵列组合到一张芯片中,为临床提供全面有用的遗传筛选信息。

4 展望

传统经典的SNP检测方法由于自身的局限性已经很少被应用,高通量自动化的SNP检测技术已经取得了一定进展,各种SNP检测技术的优缺点对比分析详见表1。除以上叙述的几种代表性高通量自动化检测方法外,还有变性高效液相色谱(DHPLC)、

高分辨率熔解曲线(HEM)等高通量自动化检测方法,对于不同的实验环境,都有各自的检测适用范围。一个完善的SNP检测方法应有一定的综合优势,包括:检测原理要清晰严谨;通量大,具有一定的自动化规模;检测准确性高、特异性好;操作简便快速、检测成本低、耗时短;不仅能够检测出已知的SNP位点,还能够为发现新的SNP位点提供可能。目前,国内外的SNP检测方法中,还没有哪一种方法完全符合上述要求。比较而言,基因芯片法是相对较为理想的一种方法,尽管还存在着诸如探针设计特异性、背景干扰等一些不足,但其在检测SNP方面具有独特优势,伴随着相关技术的结合和方法的改进,已经使得基因芯片法越来越完善。Sedighi等^[102]利用金纳米颗粒(AuNP)辅助基因芯片检测基因组DNA样本中的SNP,提高了检测灵敏度。Saka等^[103]开发一种新的算法,解决了Affymetrix GeneChip数据分析的三个问题:去除非特异性探针;根据最新的

表1 各种SNP检测技术对比分析

Table 1 Comparative analysis of various SNP detection techniques

| 方法 Methods | 优点 Advantages | 缺点 Disadvantages |
|--|--|--|
| PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) | Simple operation, low cost, suitable for most laboratories | There is a limit on the length of detection segments, generally less than 300 bp, which is not conducive to automation |
| PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) | Simple operation, high specificity and accuracy, suitable for most laboratories | Only can detect some SNP which located at certain restriction sites, not conducive to high throughput and automation |
| Sanger sequencing (dideoxynucleotide chain termination method) | The SNP site mutation type can be precisely located and the information obtained is relatively comprehensive | Special equipment and experimental space are required, which is costly and is not suitable for general clinical applications |
| Pyrosequencing | It is suitable for short-sequence mutation detection, and can display the proportion of mutant base without electrophoresis in a short period of time with high accuracy and sensitivity | Special reagent instruments are required, which are generally less sensitive and less reproducible for detection of mutation sites lower than 7% |
| MassARRAY | It can be used for quantitative and qualitative SNP genotyping through multiple reactions. It is more sensitive than pyrosequencing | The test sample needs to be purified, and there is a certain probability that a false positive will occur |
| Illumina SNP genotyping | Mainly for European people, with high throughput detection flux and accuracy, relatively low cost and can be used for clinical testing | High requirement for probe design, and there is also subtle nonspecific |
| Affymetrix SNP chip | Mainly for Asian and African people, with high detection flux and high sensitivity | The detection process is relatively complicated, the cost is relatively high, and the background interference has a large impact |
| Agilent gene chip | High efficiency, and the SNP probe can be combined with the exon targeting sequence to detect the genetic information more efficiently | The detection flux is relatively low, the detection conditions are strict, and the accuracy needs to be improved |
| DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) | High detection specificity and high degree of automation | The detection flux is lower than that of gene chip, and the reagents and the environment are strict. Only the presence or absence of the SNP can be detected, and the specific mutated base cannot be judged |

基因组知识更新探针目标图谱; 将探针进行分组。

综上, 相信随着相关技术的不断革新, 包括生物化学与分子生物学、生物信息学、以及其他交叉学科的飞速发展, SNP的检测和分析技术一定会不断完善, 能够真正广泛实现个体化诊断治疗, 大规模应用到临床检验, 为人类的健康事业服务。

参考文献 (References)

- 1 Liu HM, Rao N, Yang D, Yang L, Li Y, Ou F. A novel method for identifying SNP disease association based on maximal information coefficient. *Genet Mol Res* 2014; 13(4): 10863-77.
- 2 Lai E. Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. *Genome Res* 2001; 11(6): 927-9.
- 3 Penney ME, Parfrey PS, Savas S, Yilmaz YE. Associations of single nucleotide polymorphisms with mucinous colorectal cancer: genome-wide common variant and gene-based rare variant analyses. *Biomark Res* 2018; 6: 17.
- 4 Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, *et al*. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280(5366): 1077-82.
- 5 Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2001; 2(12): 930-42.
- 6 Vignal A, Milan D, Sancristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 2002; 34(3): 275-305.
- 7 Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, Kunde DA, Ball MJ, Robertson LK, *et al*. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene* 2012; 501(2): 89-103.
- 8 张小波, 何慧, 吴潇, 朱连龙, 唐雪明. 基于SNP标记的肉类溯源技术. 肉类研究(Zhang Xiaobo, He Hui, Wu Xiao, Zhu Lianlong, Tang Xueming. *Meat Research*) 2011(05): 40-5.
- 9 Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 1996; 274(5287): 536-39.
- 10 蒋刘, 戴朴, 韩东一. 单核苷酸多态性在人类基因组学发展中的应用. 中华耳科学杂志(Jiang Yi, Dai Pu, Han Dongyi. *Chinese Journal of Otology*) 2017(02): 239-44.
- 11 Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002; 47(11): 561-6.
- 12 Barendse W, Harrison BE, Bunch RJ, Thomas MB, Turner LB. Genome wide signatures of positive selection: the comparison of independent samples and the identification of regions associated to traits. *BMC Genomics* 2009; 10: 178.
- 13 Cho S, Yu HJ, Han J, Kim Y, Lee J, Lee SD. Forensic application of SNP-based resequencing array for individual identification. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13: 45-52.
- 14 Katara P. Single nucleotide polymorphism and its dynamics for pharmacogenomics. *Interdiscip Sci* 2014; 6(2): 85-92.
- 15 Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics* 2010; 4(4): 278-81.
- 16 Baskys A. Application of pharmacogenetics in clinical practice: problems and solutions. *J Neural Transm (Vienna)* 2018; 126(1): 109-13.
- 17 Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 538-49.
- 18 Matimba A, Li F, Livshits A, Cartwright CS, Scully S, Fridley BL, *et al*. Thiopurine pharmacogenomics: association of SNPs with clinical response and functional validation of candidate genes. *Pharmacogenomics* 2014; 15(4): 433-47.
- 19 Kamitsuji S, Matsuda T, Nishimura K, Endo S, Wada C, Watanabe K, *et al*. Japan PGx data science consortium database: SNPs and HLA genotype data from 2994 Japanese healthy individuals for pharmacogenomics studies. *J Hum Genet* 2015; 60(6): 319-26.
- 20 Zgheib NK, Akra-Ismail M, Aridi C, Mahfouz R, Abboud MR, Solh H, *et al*. Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics* 2014; 24(8): 387-96.
- 21 Wang L, McLeod HL, Weinshilboum R M. Genomics and drug response. *N Engl J Med* 2011; 364(12): 1144-53.
- 22 Rocha D, Gut I, Jeffreys AJ, Kwok PY, Brookes AJ, Chanock SJ. Seventh international meeting on single nucleotide polymorphism and complex genome analysis: 'ever bigger scans and an increasingly variable genome'. *Hum Genet* 2006; 119(4): 451-6.
- 23 Alonso J. Role for a Bard1 SNP in breast cancer susceptibility. *EJIFCC* 2005; 16(3): 89-90.
- 24 Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H, Oya T, *et al*. A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nat Genet* 2005; 37(6): 607-12.
- 25 丁佩剑, 金秀菊, 孙宝信. 人类单核苷酸多态性研究进展. 临床和实验医学杂志(Ding Peijian, Jin Xiuju, Sun Baoxin. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*) 2016(12): 1235-8.
- 26 Niciura S, Cruvinel GG, Moraes CV, Bressani FA, Malagó Junior W, Benavides MV, *et al*. PCR-based genotyping of SNP markers in sheep. *Mol Biol Rep* 2018; (45): 651-6.
- 27 Marian AJ. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res* 2012; 159(2): 64-79.
- 28 Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(4): 967-73.
- 29 Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1987; 155: 501-27.
- 30 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(8): 2766-70.
- 31 Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Graziani D, Borsani G, Loda M, *et al*. Detection of p53 mutations by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) gel electrophoresis. A comparative study of radioactive and nonradioactive silver-stained SSCP analysis. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4(4): 249-55.
- 32 李穗雯, 胡大春. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展. 国际

- 检验医学杂志(Li Huiwen, Hu Dachun. *International Journal of Laboratory Medicine*) 2013(12): 1559-61.
- 33 欧阳建华, 黄建安. PCR-SSCP技术的研究进展. *上海畜牧兽医通讯*(Ou Yang Jianhua, Huang Jianan. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*) 2002; (04): 10-1.
- 34 Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1991; 1(1): 34-8.
- 35 Konieczny A, Ausubel FM. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 1993; 4(2): 403-10.
- 36 许家磊, 王宇, 后猛, 李强. SNP检测方法的研究进展. *分子植物育种*(Xu Jianlei, Wang Yu, Hou Meng, Li Qiang, *Molecular Plant Breeding*) 2015; (02): 475-82.
- 37 Wang S, Ding M, Duan X, Wang T, Feng X, Wang P, *et al.* Detection of the single nucleotide polymorphism at position rs2735940 in the human telomerase reverse transcriptase gene by the introduction of a new restriction enzyme site for the PCR-RFLP assay. *Ann Clin Lab Sci* 2017; 47(5): 546-50.
- 38 Sun L, Wei L, Wei L, Li D. Correlation between Bax gene polymorphisms and esophagus cancer. *Oncol Lett* 2018; 16(6): 7097-101.
- 39 Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977; 265(5596): 687-95.
- 40 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12): 5463-7.
- 41 Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the basics of NGS: From mechanism to variant calling. *Curr Genet Med Rep* 2015; 3(4): 158-65.
- 42 郝甜甜, 李强飞, 李国治, 陈禹翰, 邓卫东. 测序技术的研究进展. *畜牧与饲料科学*(Hao Tiantian, Li Qiangfei, Li Guozhi, Chen Yuhan, Deng Weidong. *Animal Husbandry and Feed Science*) 2014; (03): 78-81.
- 43 Peoc'h K, Pruvot S, Gourmel C, dit Sollier CB, Drouet L. A new VKORC1 mutation leading to an isolated resistance to fluindione. *Br J Haematol* 2009; 145(6): 841-3.
- 44 Alzahrani AS, Murugan AK, Qasem E, Alswailem MM, AlGhamdi B, Moria Y *et al.* Absence of EIF1AX, PPM1D, and CHEK2 mutations reported in Thyroid Cancer Genome Atlas (TCGA) in a large series of thyroid cancer. *Endocrine* 2019; 63(1): 94-100.
- 45 张微, 冯琳琳, 平昭. 单核苷酸多态性检测技术研究进展. *生物技术通讯*(Zhang Wei, Feng Linlin, Ping Zhao. *Letters in Biotechnology*) 2016(06): 879-83.
- 46 Amoako KK, Thomas MC, Janzen TW, Goji N. Rapid SNP detection and genotyping of bacterial pathogens by pyrosequencing. *Methods Mol Biol* 2017; 1492: 203-20.
- 47 Kumar S, Banks TW, Cloutier S. SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. *Int J Plant Genomics* 2012; 2012: 831460.
- 48 Kwok CT, Hitchins MP. Allele quantification pyrosequencing(R) at designated SNP sites to detect allelic expression imbalance and loss-of-heterozygosity. *Methods Mol Biol* 2015; 1315: 153-171.
- 49 毛慧慧, 罗光华. 常见单核苷酸多态性分析方法的原理和应用简析. *临床检验杂志*(Mao Huihui, Luo Guanghua. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*) 2016(11): 858-60.
- 50 Sukasem C, Atasilp C, Chansriwong P, Chamnanphon M, Puangpetch A, Sirachainan E. Development of pyrosequencing method for detection of UGT1A1 polymorphisms in thai colorectal cancers. *J Clin Lab Anal* 2016; 30(1): 84-9.
- 51 Busato F, Tost J. SNP-based quantification of allele-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing(R). *Methods Mol Biol* 2015; 1315: 291-313.
- 52 Onerci CO, Tezel GG, Hosal AS, Cengiz M, Gullu IH, Hayran M. Detection of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter region methylation pattern using pyrosequencing and the effect of methylation pattern on survival, recurrence, and chemotherapy sensitivity in patients with laryngeal cancer. *Pathol Res Pract* 2016; 212(5): 456-62.
- 53 Ambroise J, Butoescu V, Robert A, Tombal B, Gala JL. Multiplex pyrosequencing assay using AdvISER-MH-PYRO algorithm: a case for rapid and cost-effective genotyping analysis of prostate cancer risk-associated SNPs. *BMC Med Genet* 2015; 16:42.
- 54 Pu D, Pan R, Liu W, Xiao P. Quantitative analysis of single-nucleotide polymorphisms by pyrosequencing with di-base addition. *Electrophoresis* 2017; 38(6): 876-85.
- 55 Jurinke C, Oeth P, van den Boom D. MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Mol Biotechnol* 2004; 26(2): 147-64.
- 56 Sauer S, Reinhardt R, Lehrach H, Gut IG. Single-nucleotide polymorphisms: analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2006; 1(4): 1761-71.
- 57 Trembizki E, Smith H, Lahra M M, Chen M, Donovan B, Fairley CK *et al.* High-throughput informative single nucleotide polymorphism-based typing of neisseria gonorrhoeae using the sequenom MassARRAY iPLEX platform. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(6): 1526-32.
- 58 Oeth P, Del MG, Marnellos G, Shi T, van den Boom D. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY). *Methods Mol Biol* 2009; 578: 30743.
- 59 Clendenen T V, Rendleman J, Ge W, Koenig KL, Wirgin I, Currie D, *et al.* Genotyping of single nucleotide polymorphisms in DNA isolated from serum using sequenom MassARRAY technology. *PLoS One* 2015; 10(8): e135943.
- 60 Jurinke C, Denissenko M F, Oeth P, Ehrich M, van den Boom D, Cantor CR. A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutat Res* 2005; 573(1/2): 83-95.
- 61 Fleitas T, Ibarrola-Villava M, Ribas G, Cervantes A. MassARRAY determination of somatic oncogenic mutations in solid tumors: Moving forward to personalized medicine. *Cancer Treat Rev* 2016; 49: 57-64.
- 62 Xiu L, Zhang C, Wu Z, Peng J. Establishment and application of a universal coronavirus screening method using MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol* 2017; 8: 1510.
- 63 Min KW, Kim WS, Jang S J, Choi YD, Chang S, Jung SH, *et al.* MassARRAY, pyrosequencing, and PNA clamping for EGFR mutation detection in lung cancer tissue and cytological samples: a multicenter study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142(10): 2209-16.

- 64 Svidnicki MC, Silva-Costa SM, Ramos PZ, dos Santos NZ, Martins FT, Castilho AM, *et al.* Screening of genetic alterations related to non-syndromic hearing loss using MassARRAY iPLEX(R) technology. *BMC Med Genet* 2015; 16: 85.
- 65 Schneider AK, Niemeyer CM. DNA surface technology: From gene sensors to integrated systems for life and materials sciences. *Angew Chem Int Ed Engl* 2018; 57(52): 16959-67.
- 66 Shi XC, Liu XQ, Xie XL, Xu YC, Zhao ZX. Gene chip array for differentiation of mycobacterial species and detection of drug resistance. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125(18): 3292-7.
- 67 Marzancola MG, Sedighi A, Li PC. DNA microarray-based diagnostics. *Methods Mol Biol* 2016; 1368: 161-78.
- 68 Bartosiewicz M, Penn S, Buckpitt A. Applications of gene arrays in environmental toxicology: fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo(a)pyrene, and trichloroethylene. *Environ Health Perspect* 2001; 109(1): 71-4.
- 69 李莉, 李荣宇, 李成涛, 柳燕, 林源, 阙庭志等. 31个SNP位点多重PCR扩增和芯片分型技术的建立及其法医学应用. *法医学杂志*(Li Li, Li Rongyu, Li Chengtao, Liu Yan, Lin Yuan, Que Tingzhi, *et al.* *Journal of Forensic Medicine*) 2005(02): 90-5.
- 70 Keramas G, Bang DD, Lund M, Madsen M, Rasmussen SE, Bunkenborg H, *et al.* Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter spp.* *Mol Cell Probes* 2003; 17(4): 187-96.
- 71 Han GY, Xu Z, Li Q S, Shen HY, Zhang W, Liang J. Detection of hereditary hearing loss gene by DNA microarray. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(16): 3538-42.
- 72 Chen F, Tan M, Yang Y, Ma J, Zhang S, Li G. The diversity changes of soil microbial communities stimulated by climate, soil type and vegetation type analyzed via a functional gene array. *World J Microbiol Biotechnol* 2015; 31(11): 1755-63.
- 73 Quaak F, van Duijn T, Hoogenboom J, Kloosterman AD, Kuiper I. Human-associated microbial populations as evidence in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet* 2018; 36: 176-85.
- 74 Ranjbar R, Behzadi P, Najafi A, Roudi R. DNA microarray for rapid detection and identification of food and water borne bacteria: from dry to wet lab. *Open Microbiol J* 2017; 11: 330-8.
- 75 Rajagopalan RM, Fujimura JH. Variations on a chip: Technologies of difference in human genetics research. *J Hist Biol* 2018; 51(4): 841-73.
- 76 Watanabe K, Ikegaya H, Hirayama K, Motani H, Iwase H, Kaneko H, *et al.* A novel method for ABO genotyping using a DNA chip. *J Forensic Sci* 2011; 56 Suppl 1: S183-7.
- 77 谈成, 边成, 杨达, 李宁, 吴珍芳, 胡晓湘. 基因组选择技术在农业动物育种中的应用. *遗传*(Tan Cheng, Bian Cheng, Yang Da, Li Ning, Wu Zhenfang, Hu Xiaoxiang. *Hereditas*) 2017(11): 1033-45.
- 78 Israr M, Rosenthal D, Frejo-Navarro L, DeVoti J, Meyers C, Bonagura VR. Microarray analysis of human keratinocytes from different anatomic sites reveals site-specific immune signaling and responses to human papillomavirus type 16 transfection. *Mol Med* 2018; 24(1): 23.
- 79 Zadel M, Maver A, Kovanda A, Peterlin B. DNA methylation profiles in whole blood of huntington's disease patients. *Front Neurol* 2018; 9:655.
- 80 Vona B, Hofrichter M, Schroder J, Shehata-Dieler W, Nanda I, Haaf T. Hereditary hearing loss SNP-microarray pilot study. *BMC Res Notes* 2018; 11(1): 391.
- 81 Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, *et al.* Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the illumina Infinium human methylation450 microarray. *Epigenetics* 2013; 8(2): 203-9.
- 82 Ha NT, Freytag S, Bickeboeller H. Coverage and efficiency in current SNP chips. *Eur J Hum Genet* 2014; 22(9): 1124-30.
- 83 Lee RD, Song MY, Lee JK. Large-scale profiling and identification of potential regulatory mechanisms for allelic gene expression in colorectal cancer cells. *Gene* 2013; 512(1): 16-22.
- 84 Park YM, Cheong HS, Lee JK. Genome-wide detection of allelic gene expression in hepatocellular carcinoma cells using a human exome SNP chip. *Gene* 2014; 551(2): 236-42.
- 85 Zahir FR, Marra MA. Use of affymetrix arrays in the diagnosis of gene copy-number variation. *Curr Protoc Hum Genet* 2015; 85:8-13.
- 86 Li M, Wen Y, Fu W. A single-array-based method for detecting copy number variants using affymetrix high density SNP arrays and its application to breast cancer. *Cancer Inform* 2014; 13(Suppl 4): 95-103.
- 87 Quigley D. Equalizer reduces SNP bias in affymetrix microarrays. *BMC Bioinformatics* 2015; 16: 238.
- 88 Hernandez-Ferrer C, Quintela GI, Danielski K, Carracedo Á, Pérez-Jurado LA, González JR. affy2sv: an R package to preprocess affymetrix cytoScan HD and 750K arrays for SNP, CNV, inversion and mosaicism calling. *BMC Bioinformatics* 2015; 16: 167.
- 89 Kim JM, Santure AW, Barton HJ, Quinn JL, Cole EF, Visser ME, *et al.* A high-density SNP chip for genotyping great tit (*Parus major*) populations and its application to studying the genetic architecture of exploration behaviour. *Mol Ecol Resour* 2018; 18(4): 877-91.
- 90 Deryusheva IV, Tsyganov M, Garbukov EY, Ibragimova MK, Kzhyshevskaya JG, Slonimskaya E, *et al.* Genome-wide association study of loss of heterozygosity and metastasis-free survival in breast cancer patients. *Exp Oncol* 2017; 39(2): 145-50.
- 91 Bernardini L, Alesi V, Loddo S, Novelli A, Bottillo I, Battaglia A, *et al.* High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain?. *Eur J Hum Genet* 2010; 18(2): 178-85.
- 92 Kao CF, Chen HW, Chen HC, Yang JH, Huang MC, Chiu YH *et al.* Identification of susceptible loci and enriched pathways for bipolar II disorder using genome-wide association studies. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016; 19(12). pii: pyw064.
- 93 Park B, Yang S, Lee J, Woo HD, Choi IJ, Kim YW *et al.* Genome-wide association of genetic variation in the PSCA gene with gastric cancer susceptibility in a Korean population. *Cancer Res Treat* 2019; 51(2): 748-57
- 94 Li Z, Peng L, Han S, Huang Z, Shi F, Cai Z, *et al.* [Screening molecular markers in early breast cancer of the same pathological types but with different prognoses using Agilent gene chip]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2013; 33(10): 1483-8.
- 95 Hu Y, Li B, Wen L, He K. Study on the anti-endotoxin effect of sinomenine using an agilent genome array. *QJM* 2018; 111(3): 171-8.
- 96 Haraksingh RR, Abyzov A, Urban AE. Comprehensive performance comparison of high-resolution array platforms for ge-

- nome-wide Copy Number Variation (CNV) analysis in humans. *BMC Genomics* 2017; 18(1): 321.
- 97 Asan, Xu Y, Jiang H, Tyler-Smith C, Xue Y, Jiang T, *et al.* Comprehensive comparison of three commercial human whole-exome capture platforms. *Genome Biol* 2011; 12(9): R95.
- 98 Villacis RA, Miranda PM, Gomy I, Santos EM, Carraro DM, Achatz MI, *et al.* Contribution of rare germline copy number variations and common susceptibility loci in Lynch syndrome patients negative for mutations in the mismatch repair genes. *Int J Cancer* 2016; 138(8): 1928-35.
- 99 Liu L, Wang HD, Cui CY, Wu D, Li T, Fan TB *et al.* Application of array-comparative genomic hybridization in tetralogy of Fallot. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(49): e5552.
- 100 Elliott A M, Elliott K A, Kammesheidt A. High resolution array-CGH characterization of human stem cells using a stem cell focused microarray. *Mol Biotechnol* 2010; 46(3): 234-42.
- 101 Wiszniewska J, Bi W, Shaw C, Stankiewicz P, Kang SH, Pursley AN *et al.* Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. *Eur J Hum Genet* 2014; 22(1): 79-87.
- 102 Sedighi A, Li PC. High-throughput DNA array for SNP detection of KRAS gene using a centrifugal microfluidic device. *Methods Mol Biol* 2016; 1368: 133-41.
- 103 Saka E, Harrison BJ, West K, Petruska JC, Rouchka EC. Framework for reanalysis of publicly available affymetrix(R) geneChip(R) data sets based on functional regions of interest. *BMC Genomics* 2017; 18(Suppl 10): 875.

中国细胞生物学学报