

·技术与方法·

一种简易 SNP 检测方法的建立*

包 晗 赵锦荣 汪 钦 郭晏海 刘永兰 雷小英 梁 平 孙建斌 颜 真[△]

(第四军医大学药学院药物基因组学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:建立一种快速、简单的 SNP(Single Nucleotide Polymorphisms)检测方法。方法:设计带生物素标记的扩增引物对检测用具有单碱基差异的野生型和突变型靶序列分别进行扩增,然后通过紫外交联的方式将相应检测靶序列的探针固定在硝酸纤维素膜上,借助 Taq 酶完成膜上单引物延伸,从而对探针捕获的靶序列进行延伸固定在膜上,最后使用生物素-亲和素酶联显色(ABS-ELISA)反应肉眼观察结果。结果:阳性和阴性对照探针显示正常。野生型探针和突变型探针能够分别特异性结合靶序列,并通过生物素和亲和素显色系统放大为一种肉眼可判断结果的检测形式。结论:建立了一种基于硝酸纤维素膜载体上进行核酸扩增的 SNP 检测方法。

关键词 硝酸纤维素膜;核酸扩增;SNP;生物素-亲和素酶联显色

中图分类号:R446.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)10-1969-03

A Simplified Method of SNP Analysis*

BAO Han, ZHAO Jin-rong, WANG Qin, GUO Yan-hai, LIU Yong-lan, LEI Xiao-ying, LIANG Ping, SUN Jian-bin, YAN Zhen[△]

(Department of pharmacogenomics, School of pharmacy, The fourth military medical university, Xi'an 710032)

ABSTRACT Objective: To build a fast and simple method of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) analysis. **Methods:** The wild-type and mutant DNA sequences were amplified with single base pair mismatch by biotin labeled primers. Probes were crosslinked onto nitrocellulose membrane by UV irradiation. Complementary target with biotin labeled sequence can be extend and fixed after combined with probes on membrane by Taq DNA polymerase enzyme. After ABS-ELISA coloration, results were observed directly. **Results:** Normal working system was showed by the negative and positive blots. Wild-type and mutant probe can distinguish single base pair mismatch. And the coloration result can be judged directly. **Conclusion:** A method for detecting SNPs with nucleic acid amplification based on nitrocellulose membrane was established.

Key words: Nitrocellulose membrane; Nucleic acid amplification; SNP; ABS-ELISA

Chinese Library Classification(CLC): R446.6 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)10-1969-03

前言

SNP(Single Nucleotide Polymorphisms),即单核苷酸多态性,是指在基因组上单个核苷酸的变异,并且形成遗传标记。SNP所具有的遗传特性,不仅仅与遗传病的产生,同时对癌症发生、个体耐药性产生等都具有相关性。因此,SNP检测对某些疾病的早期快速诊断、个体化用药、基因分型具有重要的导向意义^[1-3]。

目前检测 SNP 的方法有很多。如核酸序列分析、DNA 分子杂交、引物延伸、等位基因特异的寡核苷酸连接反应、侧翼探针切割反应以及基于这些方法的变通技术等^[4-7]。但是这些方法均面临的问题就是除引物、探针等设计复杂外,同时需要具备昂贵的荧光检测仪器或其他大型仪器,难以普及和应用。本实验拟参考国内外反向斑点杂交实验、液态芯片技术原理,在核酸扩增技术的基础上对其进行有机结合,以 HBV(hepatitis B

virus)基因序列为模式序列,分析筛选出 1 个 SNP 测试位点,通过对靶序列的特异性捕获测试,建立了一种基于硝酸纤维素膜载体上进行核酸扩增的 SNP 检测方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

乙肝患者血清来自西安交通大学第一附属医院检验科,AP-SA(链酶亲和素-碱性磷酸酯酶)试剂盒和碱性磷酸酶显色试剂盒购自碧云天公司,Taq 酶购自欣百诺公司,pMD-18T 载体购自 Takara 公司,PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工,NC 膜(硝酸纤维素膜)购自 Millipore 公司。

1.2 模板制备

首先将交通大学第一附属医院提供的乙肝患者血清用酚氯仿法提取 HBV 全基因组 DNA,通过比对 HBV DNA 的 B、C

* 基金项目:国家“十一五”重大传染病专项(2009ZX10004-311),国家重点基础研究发展规划(973)项目(2010CB933900);
西安市科技计划(SF09027)

作者简介:包晗(1986-),硕士研究生,研究方向:药物基因组学,电话:13992846626

[△]通讯作者:颜真 E-mail: yanzhen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-01-17 接受日期:2011-02-12)

基因型的标准序列 (D00329, AF100309, AB033554, X04615, AB014381, M12906), 设计通用扩增引物, 上游引物 5'-CTGC-TGGTGGCTCCAGTT-3', 下游引物 Biotin-5'-GCACTAGTAA-ACTGAGCCA-3', 预计扩增片段大小为 630bp。将 PCR 产物送交公司进行测序, 使用纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化。

1.3 SNP 探针及对照探针设计

根据 PCR 产物测序结果, 设计并人工合成了野生型探针: 5'-polyT (10)polyC(10)-GCATAGCAGCAGGATGCAGA-3', 突变型探针: 5'-polyT (10)polyC(10)-GCATAGCAGCAGGAT-GAAGA-3' (下划线碱基为 SNP 位点), 探针延伸序列长度为 20nt, 检测区域长度为 20nt, 探针全长 40nt。阳性对照序列 Biotin-5'-polyT (10)polyC(10)-ACAGCACTAAGGCAAGCTAT-TCTG-3', 阴性对照探针: 5'-polyT (10)polyC(10)-ACAGCAC-TAAGGCAAGCTATTCTG-3', 探针 Tm 值设计为 57.43℃, 探针长度为 24nt, 阳性和阴性对照序列属于扩增区域外序列, 不与靶序列互补, 若阳性对照正常显色说明系统正常, 若阴性对照不显色, 说明其序列不会造成非特异结合。

1.4 杂交膜的制备

将 NC 膜于 2XSSC 溶液中浸泡 30min, 37℃ 烘干 2h。再将各人工合成的探针 (10μM) 1μl 均匀排布点在处理过的 NC 膜上, 裁减至 4mm×6mm 大小, 80℃ 烘干 30min, 取出后于 254nm 紫外光灯下光照 6min。使用前将该膜浸入 2%BSA 液 37℃ 封闭 15min。

1.5 杂交

对扩增产物进行热变性处理 95℃ 水浴 5min, 然后冰上放置 3min, 再将变性后的扩增产物 10μl, PCR 反应液 (欣百诺公司, TagMixMaster) 20μl, ddH₂O 10μl 放入干净的 PCR 反应管中混匀, 将制备好的杂交膜放入, 进行固相核酸扩增反应; 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 循环 5 次, 最后 72℃ 延伸 3min。

1.6 洗脱与显色

固相 PCR 反应完成后, 将杂交膜取出, 放入洗脱液 A (100mmol/L pH=7.5 的 Tris-Cl, 300mmol/L NaCl 和 4mmol/L Mg₂Cl₂) 中离心洗脱 (转速为 30rpm, 洗脱 1min), 碱性磷酸酯酶标记的亲合素反应液 (购自碧云天公司, 碱性磷酸酯酶标记 Streptavidin) 覆盖后, 37℃ 条件下孵育 10min, 洗脱液 A 再次洗脱 (转速 30rpm, 洗脱 1min), 洗脱液 B (100mmol/L pH=9.5 的 Tris-Cl, 300mmol/L NaCl 和 4mmol/L Mg₂Cl₂) 中, 再离心洗脱 (转速 30rpm, 洗脱 1min); 清水冲洗, 显色液 (碧云天公司, BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒) 覆盖, 看到斑点后, 即用清水中止反应。

2 结果

2.1 目标片段克隆与检测位点序列分析

将 PCR 扩增获得的 630bp 乙肝病毒基因组 DNA 片段纯化之后克隆入 pMD-18T 载体, 将重组质粒送交上海生工测序, 结果显示全片段 DNA 序列正确, 对探针结合区域进行分析, 成功获得序列正确的野生型和突变型靶序列 (图 1)。

2.2 目标片段的核酸扩增

对 HBV 检测片段的 PCR 扩增退火温度设定在 57℃, 延伸时间为 40s。通过对凝胶电泳确认产物片段大小为 630bp (图 2)。

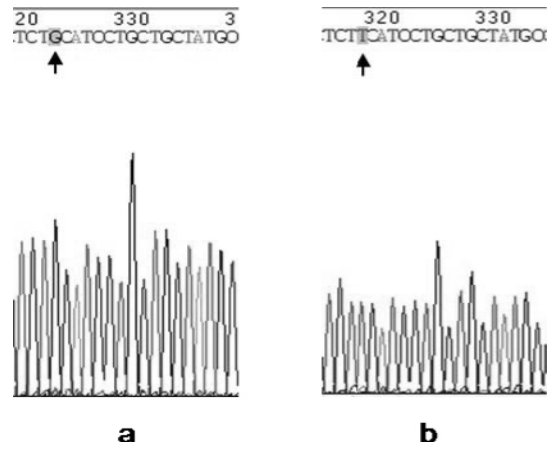


图 1 目标片段序列图谱: A 为野生型靶序列, 箭头所示为 SNP 位点; B 为突变型靶序列, 箭头所示为 SNP 位点。

Fig.1 Target fragment sequence map: A is wild-type target sequence. Arrow point out the SNP; B is mutant target sequence. Arrow point out the SNP

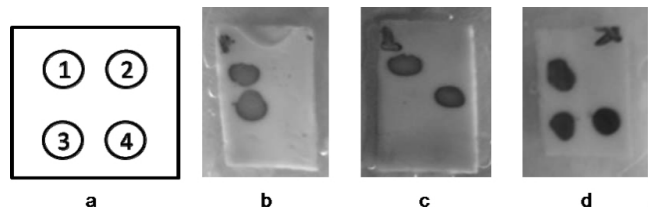


图 2 纯化 PCR 产物电泳结果: 1 泳道为 DL2000 Marker, 2 泳道为野生型 PCR 纯化产物, 3 泳道突变型 PCR 纯化产物

Fig.2 Electroosmosis result of purified PCR fragment. First lane is DL2000 Marker. Second lane is wild-type PCR purified fragment. Third lane is mutant purified fragment

2.3 SNP 特异性核酸固相扩增与显色

具体探针点样模式如图 3A, 经过核酸杂交温度、非特异结合洗脱和显色条件等优化, 获得良好的杂交显色结果如图 3。其中阳性对照和阴性对照显色正常, 说明反应系统正常, 野生型和突变型探针能够分别特异性捕获其靶序列, 两种探针对于混合靶序列模仿的 SNP 杂合子状态能够特异捕获显色。

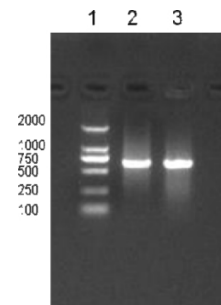


图 3 SNP 特异性核酸固相扩增与显色: A①为阳性对照, ②为阴性对照, ③为野生型探针, ④为突变型探针; B 为野生型探针捕获野生型靶序列杂交测试结果; C 为突变型探针捕获突变型靶序列杂交测试结果; D 为野生型和突变型探针捕获混合靶序列杂交测试结果

Fig.3 SNP specific amplification and coloration based on solid phase: A① is positive control; ② is negative control; ③ is wild-type probe; ④ is mutant probe. B show the result of wild-type probe captured wild-type target sequence. C show the result of mutant probe captured mutant target sequence. D show the result of mixed wild-type and mutant probe captured mixed target sequence.

3 讨论

SNP 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,估计其总数可达 300 万个甚至更多。近年来研究证实人体许多表型差异、对药物或疾病的易感性等等都可能与 SNP 有关^[1-6]。

目前常用的 SNP 分析方法如构象检测的单链构象多态性检测、温度梯度凝胶电泳等、以及测序的方法如直接测序和焦磷酸测序,另外还有荧光检测和 DNA 芯片检测等各种方法,均面存在设计复杂、普及性差、周期长、设备昂贵的问题。本研究将反向斑点杂交技术、固相 PCR 技术、引物延伸法、酶联显色有机的法结合在一起,做到以 HBV 基因的为靶序列的分辨率达到 1 个碱基的检测^[8-20]。

本研究发现 Taq 酶对于探针序列 3' 末端单碱基差异识别程度很差,考虑到 Taq 酶在链上延伸时二级结构的变化,本研究对设计的探针所检测的位点进行了一定的位置上的测试,同时提高了固相载体上扩增温度,最后发现将检测位点设置在 3' 末端第三个至第五个碱基并适当提高膜上扩增延伸温度时,可以达到一个碱基差异的区分。该方法能够做到 630bp 长度靶序列的稳定、特异性捕获。参考其他方法的检测范围,如液态芯片建议检测范围为 300bp 以内,焦磷酸测序建议靶序列长度在 200bp 之内等,本方法具有更强更广的检测范围。另外,同基因芯片检测、测序分析等方法相比,此方法不需要依赖大型昂贵的检测设备,如测序仪、荧光扫描仪等。在成本上非常低廉,易于在普通实验室和医院内普及。并且同其他方法的操作周期上比较,该方法检测阶段的操作只需要 20 分钟左右,较所有方法而言周期最短。综上所述,我们所建立的这种 SNP 检测方法具有特异、敏感、廉价、快速、普及等优点。本方法还在进一步改良,预计不仅能够做到 SNP 检测,同时也能做到多位点检测。

参考文献(References)

[1] Lander ES. The new genomics: global views of biology[J]. Science, 1996, 274: 536-539

[2] Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, et al. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach [J]. Am J Hum Genet 1996; 58: 1347-1363

[3] El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer[J]. Nature, 2000, 404, 398-402

[4] Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. Am J Hum Genet 2001; 68: 978-989

[5] Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome[J]. Science, 1998, 280: 1077-1082

[6] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphism[J]. Nature, 2001, 409: 928-933

[7] Sun SH, Yang SL. Single nucleotide polymorphism and complex diseases[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(2): 117-119

[8] Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes [J]. Science, 2001, 291: 489-492

[9] Sokolov BP. Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(12): 3671

[10] Yeon JE. Technique for the early detection of drug resistant HBV DNA during antiviral therapy[J]. Intervirology, 2008, 51(1): 7-10

[11] Keffe EB, Dieterich DT, Pawlotsky JM, et al. Chronic hepatitis B: preventing, detecting and managing viral resistance[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008, 6(3): 268-274

[12] Sasaki T, Tahira T, Suzuki A, et al. Precise estimation of allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms by a quantitative SSCP analysis of pooled DNA[J]. Am. J. Hum. Genet. 2001, 68: 214-218

[13] Lieven S, Carolin VG, Sija DG, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 702-707

[14] Osiowy C, Villeneuve JP, Heathcote EJ, et al. Detection of rtN236T and rtA181 V/T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil in samples from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line probe assay (version 2)[J]. J Clin Microbiol, 2006; 44(6): 1994-1997

[15] Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3729-3724

[16] Ellis, T. P., Humphrey, K. E., Smith, M. J., et al. Chemical cleavage of mismatch: a new look at an established method recent developments[J]. Human Mutat, 1998, 11: 345-353

[17] Hayashi, K. and Yandell, D. W. How sensitive is PCR-SSCP? [J]. Human Mutation, 1993, 2: 338-346

[18] Altshuler, D., Pollara, V. J., Cowles, C. R., et al. An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing[J]. Nature, 2000, 407: 513-516

[19] Buetow, K. H., Edmonson, M., MacDonald, et al. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. 2001, 98: 581-584

[20] Hacia, JG, Sun B, Hunt N, et al. Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays[J]. Genome Res, 1998, 8: 1245-1258

[21] Bentley DR, Balasubramanian S. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry[J]. Nature, 2008, 456(7218): 53-59