

trols *Xenopus* gastrulation in cooperation with 14-3-3 and aPKC [J]. *EMBO J*, 2004, 23(21): 4190-4201.

[24] Bayraktar J, Zygmunt D, Carthew RW. Par-1 kinase establishes cell polarity and functions in Notch signaling in the *Drosophila* embryo[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(4): 711-721.

[25] Cohen D, Brennwald PJ, Rodriguez-Boulan E, et al. Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(5): 717-727.

[26] Kishi M, Pan YA, Crump JG, et al. Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization[J]. *Science*, 2005, 307(5711): 929-932.

[27] Lee JH, Koh H, Kim M, et al. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase[J]. *Nature*, 2007, 447(7147): 1017-1020.

[28] Deguchi A, Miyoshi H, Kojima Y, et al. LKB1 suppresses p21-activated kinase-1 (PAK1) by phosphorylation of Thr109 in the p21-binding domain [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(24): 18283-18290.

[29] Carretero J, Shimamura T, Rikova K, et al. Integrative genomic and proteomic analyses identify targets for Lkb1- deficient metastatic lung tumors[J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(6): 547-559.

(收稿日期: 2012-11-08)

• 综 述 •

单核苷酸多态性检测方法的研究进展

李穗雯¹综述, 胡大春²审校

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650011; 2. 昆明市第一人民医院检验科, 云南昆明 650011)

关键词: 单核苷酸多态性; 高通量; 检测方法
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 12. 031 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)12-1559-03

单核苷酸多态性(SNP)是指 DNA 序列上发生的单个核苷酸碱基的变异。SNP 是人类基因组 DNA 序列中最常见的变异形式, 被认为是决定疾病易感性和药物反应的决定因素^[1]。本文就 SNP 检测技术的传统方法进行回顾并介绍几种具有代表性的高、中通量 SNP 检测技术。

1 传统方法

1.1 单链多态性技术(PCR-SSCP) 该技术是出现最早、应用较广的等位基因分型方法^[2], 其原理是单个碱基差异导致单链 DNA 构象不同, 这种构象差异可导致单链 DNA 在凝胶电泳中迁移率的改变, 使基因的多态性得以检测和鉴定。利用该方法进行 SNP 分型的主要限制来自于 DNA 片段的长度, DNA 片段越长, 单碱基差异引起构象改变造成的正常基因与突变基因之间的电泳迁移率的差别越小。PCR-SSCP 一般用于 300 bp 以内的 DNA 片段。PCR-SSCP 基因分型方法耗时较长, 操作繁琐, 对聚丙烯酰胺凝胶要求较高, 目前已经很少采用。

1.2 限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP) PCR-RFLP 是 PCR 技术与 RFLP 技术的结合, 通过 PCR 扩增目的片段, 然后选择适当的限制性内切酶, 消化 PCR 产物, 不同的基因型会得出不同的特异性长度的电泳谱带, 据此来进行 SNP 分型。PCR-RFLP 技术应用范围仅限于 SNP 位点突变引起酶切位点改变时, 不适用于所有 SNP 位点。PCR 扩增完成后, 需进行纯化才能进行限制性酶切, PCR 体系中的成分会影响酶活性, 导致酶切反应的失败。

1.3 等位基因特异性 PCR(AS-PCR) 根据 PCR 过程中要求引物与模板之间严格互补配对来实现对 SNP 的检测。利用此原理, 除一条公共引物外, 再设计两条等位基因特异性引物, 使引物的 3' 末端最后碱基与正常或异常 SNP 位点的碱基互补, 其余引物的碱基一样。通过加入的特异性引物的类型以及 PCR 扩增后电泳检测产物的有无来区分 SNP 的类型。该方法需要的仪器及试剂简单且花费较小, 但是需要两个反应得到一个 SNP 位点的分型, 同时由于两条等位基因特异性引物只有末端碱基不同, 有时候可能会出现错误的扩增, 从而产生错误的判断^[3]。

2 高通量 SNP 检测方法

2.1 基因芯片 Affymetrix 以及 Infinium 基因芯片技术是目前高通量的基因芯片 SNP 分型技术的代表。Affymetrix Human SNP Array 6.0 基因芯片, 在一张芯片上可以分析一个样本的 906 600 个 SNP 的基因型, Infinium 技术是目前 SNP 芯片技术中通量最高的, 可达 110 万。SNP 分析百万级通量技术的出现, 使全基因组关联研究(GWAS)成为可能; GWAS 在本质上, 就是从人类全基因组范围内序列变异中, 筛选出与疾病性状相关联的 SNP。GWAS 分析基因组内的所有基因, 不再受候选基因的限制, 使众多功能不明的基因以及基因间区的 SNP 位点都为疾病的研究提供了相关线索。

2.1.1 Affymetrix Human SNP Array 6.0 Affymetrix Human SNP Array 6.0 采用原位合成法制备芯片。利用 LM-PCR 的方法进行全基因组扩增制备靶基因。提取的基因组 DNA 进行纯化后, 分别使用 Nsp I 和 Sty I 限制性内切酶处理 DNA 样品。酶切片段形成黏性末端, 在 T4 连接酶的作用下, Nsp I 接头和 Sty I 接头分别连接至 Nsp I 和 Sty I 酶切产物上, 形成正反两条链 5' 端部分序列相同的双链 DNA 片段。以 Nsp I 和 Sty I 酶切产物即片段化后基因组 DNA 为模板, 使用与 Nsp I 接头和 Sty I 接头上的碱基序列互补的一条通用引物进行单引物 PCR 扩增, 从而得到大量片段化的基因组 DNA。将 Sty I PCR 产物和 Nsp I PCR 产物混合后进行纯化洗脱, 并测定纯化度。将纯化后的 PCR 产物片段化后在末端脱氧核糖转移酶的作用下进行标记反应。将标记后的 PCR 产物变性后杂交, 杂交完成后经过洗涤、染色后, 用专业分析平台采集荧光信号进行 SNP 位点分析^[4]。

2.1.2 Infinium 技术 Infinium 技术采用的是点样法合成芯片, 芯片介质是微珠。将提取的基因组 DNA 定量, 利用 NaOH 变性后, 进行全基因组扩增, 将扩增后的产物进行随机内切酶酶切, 使 DNA 片段化。将完成片段化后的 DNA 片段经沉淀纯化, 重悬后与芯片杂交。在杂交过程中, DNA 片段与位于微珠上的特异性探针退火, 杂交后洗去未杂交和非特异性杂交的 DNA 片段, 用已捕获的 DNA 为模板, 在芯片上进行单碱基延伸反应, 延伸反应中, 经过不同荧光染料标记的 dNTP

在探针上进行单碱基延伸。将清洗处理好的芯片进行扫描,通过检测探针单碱基延伸时结合的 dNTP 的荧光信号就可以区分 SNP 的类型^[5]。

2.1.3 Affymetrix Human SNP Array 6.0 与 Infinium 技术对比 首先在探针依附的固体介质上及芯片合成的方式上, Affymetrix 6.0 采用基于石英片的原位合成法;该法可形成高密度的探针复盖,但缺点在于在基质上直接合成探针,合成过程中会有不完全的探针片段残留,从而造成杂交信号的高交叉背景。Affymetrix 6.0 的探针采用 PM-MM 的探针设计,同时针对同一个 SNP 位点,设计多组序列不相重复的探针,提高最终数据的准确性。与单一探针策略相比,PM-MM 探针的设计在检测低浓度靶序列时更加灵敏,MM 能够探测样本中的背景信号,使相对较弱的阳性信号与背景信号区别开来,这是单一探针策略难以实现的^[6]。

Infinium 技术采用基于微珠的点样法,解决了不完全探针残留造成高交叉信号背景的问题。点样法需要预先根据研究目的准备大量的探针,过程较原位合成繁琐。在 Gunderson 等的全基因组 SNP 扫描研究中,Infinium 技术所能检测的 SNP 大约只有 56%^[7],不能有效分型所有 SNP 位点。

2.1.4 GoldenGate 技术 GoldenGate 技术的原理是针对每个 SNP 设计 2 条等位基因特异性引物和 1 条共同引物,这 3 条引物都带有与不同通用引物配对的序列,共同引物还包含于微珠上的探针互补结合的特异性标志序列。将 3 条引物与少量的基因组 DNA 杂交,用 3 条通用引物(其中与等位基因特异性引物互补的通用引物标记不同的荧光素,与共同引物通用序列互补的用生物素标记)进行 PCR 扩增后,去除产物中由共同引物扩增的链,荧光标记的单链和芯片进行杂交,检测荧光信号类型得到 SNP 分型结果。相对于 Infinium 的全基因组关联研究,GoldenGate 多用于候选基因的关联分析。在施锦绣等^[8]研究中,利用 GoldenGate 技术平台,选取与脑部神经发育和主要神经生化通路相关的 112 个基因中的 1 536 个标签 SNP,检测 1 019 份来自于 265 个自闭症核心家系中的 DNA 样本,发现 7 号染色体上存在疾病易感基因。

2.2 Taqman 探针技术 Taqman 探针技术是杂交技术与荧光检测技术的结合,每检测一个 SNP 位点需要一条探针,通过检测 PCR 过程中及 PCR 后产生的荧光信号来区分 SNP 的类型;该技术没有单独扩增的步骤,也没有中间处理过程。Taqman 探针技术比较灵活,可以根据要检测的 SNP 位点及检测的样本数设计实验。其局限性在于只可以检测已知的 SNP 位点而不能发现未知的 SNP 位点;其次由于 PCR 扩增与 TaqMan 探针酶切是同步进行的,随着多重水平的增加,会导致非特异性信号增多,影响结果的准确性^[9-10]。

2.3 SNPstream 技术 SNPstream 技术是单碱基引物延伸技术与标签微阵列芯片相结合的一种中高通量的 SNP 分型技术。标签微阵列是在玻璃芯片板底预先合成单链寡核苷酸链(标签),单碱基延伸的引物在 5' 端带有一段与相应标签互补的序列,玻璃芯片板上每个点带有一个不同的标签,将单碱基延伸的产物与芯片杂交,杂交完成后,扫描其荧光标记,即可得到 SNP 分型结果^[11-12]。SNPstream 技术分型的准确率高,操作简便,重复性好。费丽君等^[13]对包含 152 个 SNP 的近万样品检测中,总体分型准确率高达 98%。另外,在对不同 SNP 位点的同一种基因型进行分析时,可以使用相同的微阵列芯片。但是,其对 DNA 的纯度和浓度要求较高,有些模板普通 PCR 能很好扩增,SNPstream 可能会失败。

2.4 Mass ARRAY 技术 Mass ARRAY 技术是单碱基延伸技术与质谱技术的结合,先通过 PCR 扩增目标序列,然后加入

SNP 序列特异延伸引物,在 SNP 位点上延伸 1 个碱基。将制备的样品与芯片基质共结晶后,在质谱仪的真空管经强激光激发为单电荷离子,电场中离子飞行时间与离子质量呈反比,通过检测核酸分子在真空管中的飞行时间而获得样品分析物的精确分子量,从而检测出 SNP 位点信息^[14]。Mass ARRAY 技术平台,一张芯片可进行 384 个样本高达 40 重的反应,准确性好,灵敏度高^[15]。该技术最大的缺陷在于检测样品的制备,以及质谱仪对分析样品的纯度要求非常高,且 PCR 反应后样品的处理过程比其他基因分型方法更为复杂。

2.5 分子倒置探针 分子倒置探针是基于锁式 PCR 技术发展起来的一种高通量检测已知 SNP 位点及发现未知 SNP 位点的技术^[16]。分子倒置探针的基本结构为:一条线性的核苷酸引物两端与 SNP 位点旁的区域互补,该引物内部含有一对对所有探针都通用的引物,一个标记探针,及两个酶切位点。反应时,每管加入一种 dNTP,如果加入碱基与 SNP 位点互补,在 DNA 连接酶的作用下,整条探针形成一个闭合环状结构,不能互补的探针依旧为线性结构,用核酸外切酶将线性探针除去,然后将产物进行酶切,环状结构变为线性结构,加入与通用引物互补的引物序列,进行 PCR 扩增。将扩增后的产物进行第二次酶切,将酶切后的产物与基因芯片杂交,得到 SNP 分型。通过加入针对不同位点的特异性探针,分子倒置探针技术可以在同一反应体系内完成高达 10 000 重的 SNP 检测^[17]。分子倒置探针技术需要的 DNA 量较少,对 DNA 模板的质量要求不高,同时 SNP 的分型更准确,干扰更少^[18]。

2.6 焦磷酸测序 焦磷酸测序的基本原理是引物与 PCR 扩增的单链模板杂交,在 DNA 聚合酶、三磷酸核苷酸化酶、荧光素酶和三磷酸核苷双磷酸酶 4 种酶的协同作用下,依次加入 4 种不同的脱氧核糖核苷酸,当加入 dNTP 与模板互补时,在 DNA 聚合酶的作用下发生延伸反应,dNTP 的焦磷酸基团被释放出来。在三磷酸核苷酸化酶催化下,焦磷酸基团与 5'-磷酸化硫酸腺苷反应生成等量的 ATP。在荧光素酶的催化下,ATP 与荧光素反应发光。根据加入的 dNTP 类型和测得荧光信号强度就可实时记录模板 DNA 的核苷酸序列^[19]。与桑格测序相比,焦磷酸测序在进行 DNA 序列分析时不需要电泳及荧光标记,可以直接测定引物后面的碱基序列,结果准确。高通量测序仪器的出现,使该技术具有高自动化,快速,易于标准化操作的优点。

3 其他方法

3.1 Tm-shift primers 根据 AS-PCR 引物的原理设计引物,引物 5' 端碱基对延伸反应的影响不大,即使不完全匹配延伸反应也可进行。在两条等位基因特异性引物的 5' 端加上长度不同的 GC 尾,使两条引物形成不同的 Tm 值。在 PCR 体系中加入核酸染料 SYBR,进行实时荧光 PCR 熔解曲线分析。因为引物 GC 含量不一样,故形成的熔解曲线不一样;同时纯合子形成单峰熔解曲线,杂合子为双峰熔解曲线,据此判断 SNP 的类型。Wang 等^[20]用 Tm-shift primers 的方法,扩增成功率大于 83%,分型准确性大于 99.9%。

3.2 变温 PCR 技术(TSP) TSP 技术是在单个反应管中发生 2 次扩增,实现基于 PCR 的 SNP 分型。TSP 使用 2 组引物进行扩增。在第 1 阶段,1 对位点特异性的引物富集靶序列;在第 2 阶段,1 对巢式引物只扩增包含分析位点的 DNA 片段。由于 2 组引物的退火温度存在很大差异,从而实现引物在不同反应阶段的结合。该技术通过富集靶序列,降低分析中不同浓度和质量 DNA 对包含 SNP 位点片段扩增的影响,同时减少优化单个反应的需要,从而使 TSP 技术在 SNP 分型方面具有很高的灵敏度及特异性。Tabone 等^[21]用 TSP 技术扩增出

100~300 bp 的片段,之后用电泳及高分辨率溶解曲线(HRM)的方法成功检测 SNP 位点,并通过盲法试验,证明 TSP 技术基因分型具有高度准确性。

4 小 结

SNP 研究是人类基因组研究的热点,在相关遗传性疾病,新药研发,个体化治疗,法医学,临床检验及分子诊断等方面有重要的应用价值。检测 SNP 需要高通量、简便、高准确度的方法。基于传统方法原理,与生物化学、工程学、分析软件的新发现、新进展相结合改进、研发新方法,实现更快,更准,更简的 SNP 检测是未来的发展方向。

参考文献

- [1] Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2007, 9: 289-320.
- [2] Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Methods Enzymol, 1987, 155: 501-527.
- [3] Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, et al. Allele-specific PCR in SNP genotyping[J]. Methods Mol Biol, 2009, 578: 415-424.
- [4] 马芬, 吴凤霞, 李宁, 等. 应用 Affymetrix 全基因组芯片检测染色体 7q36 区域的 DNA 拷贝数突变[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(3): 336-339.
- [5] Gunderson KL. Whole-genome genotyping on bead arrays[J]. Methods Mol Biol, 2009, 529: 197-213.
- [6] Schinke-Braun M, Couget JA. Expression profiling using affymetrix genechip probe arrays[J]. Methods Mol Biol, 2007, 366: 13-40.
- [7] Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, et al. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology[J]. Nat Genet, 2005, 37(5): 549-554.
- [8] 施锦绣, 王莹, 黄薇. 基因组分型技术的发展和应[J]. 中国科学: C 辑, 2008, 38(10): 900-906.
- [9] Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping[J]. Methods Mol Biol, 2009, 578: 245-254.
- [10] Shen GQ, Abdullah KG, Wang QK. The TaqMan method for SNP genotyping[J]. Methods Mol Biol, 2009, 578: 293-306.

• 综 述 •

高敏心肌肌钙蛋白的临床研究进展

李萌辉¹综述, 胡志东²审校

(1. 天津医科大学附属肿瘤医院预防医学中心, 天津 300060; 2. 天津医科大学总医院检验科, 天津 300052)

关键词: 高敏心肌肌钙蛋白; 心肌肌钙蛋白 T; 心肌肌钙蛋白 I; 心血管事件

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 12. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)12-1561-02

急性冠状动脉综合征(ACS)包括 ST 段抬高心肌梗死(STEMI)、非 ST 段抬高心肌梗死(NSTEMI)和不稳定型心绞痛(UA)^[1]。临床心肌坏死标志物的应用经历了从天冬氨酸氨基转移酶(AST)到乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、心肌肌酸激酶同工酶(CK-MB)、直到心肌肌钙蛋白(cTn)的发展过程。但由于临床常规使用的 cTn 检测方法的分析性能大多未能达到 AMI 诊断指南中对方法学的要求,目前还不能满足临床诊断的需要^[2]。随着商品化高敏心肌肌钙蛋白(hs-cTn)检测方法使得心肌损伤早期诊断的特异度和灵敏度进一步提高^[3-4]。目前,国内外针对 hs-cTn 的临床研究已不少见,本文

- [11] Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, et al. SNPstream UHT; ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery[J]. Biotechniques, 2002(Suppl): S70-72.
- [12] Luo C, Deng L, Zeng C. High throughput SNP genotyping with two mini-sequencing assays [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2004, 36(6): 379-384.
- [13] 费丽娟, 季林丹, 张莉娜, 等. SNPstream 基因分型技术在医学遗传学研究中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(1): 9-12.
- [14] Oeth P, del Mistro G, Marnellos G, et al. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY) [J]. Methods Mol Biol, 2009, 578: 307-343.
- [15] Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform [J]. Curr Protoc Hum Genet, 2009, 2(2): 2-12.
- [16] Hardenbol P, Banér J, Jain M, et al. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6): 673-678.
- [17] Hardenbol P, Yu F, Belmont J, et al. Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping; over 10 000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay[J]. Genome Res, 2005, 15(2): 269-275.
- [18] Ji H, Welch K. Molecular inversion probe assay for allelic quantitation[J]. Methods Mol Biol, 2009, 556: 67-87.
- [19] Royo JL, Hidalgo M, Ruiz A. Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping[J]. Nat Protoc, 2007, 2(7): 1734-1739.
- [20] Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, et al. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers[J]. Biotechniques, 2005, 39(6): 885-893.
- [21] Tabone T, Mather DE, Hayden MJ. Temperature switch PCR (TSP); Robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs[J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 580.

(收稿日期: 2013-01-01)

对其进行总结报道。

1 hs-cTn 的临床研究背景

2012 年最新的欧洲心脏病协会(ESC)专家共识重点描述 cTn 在 AMI 诊断中的价值;不但将 cTn 检测值高于健康人群第 99 百分位值并要求检测方法不精密度(CV)≤10%作为 AMI 诊断指标之一,同时还将 cTn 在基线基础上升高 20%作为诊断 AMI 的另一个指标,并将其与患者临床表现、心电图变化及心肌显像等指标联合,在 AMI 诊断中发挥重要作用^[5-6]。最新一代的 hs-cTn 检测方法满足了早期诊断 AMI 的临床需要,可为患者及时提供有效的治疗、改善预后、降低病死率和病