

AXIMA-CFR

基质辅助激光离子化飞行时间型质谱仪

应用文集 No. 4



SNPs 解析 (Genotyping)

1. 前言
2. 原理
3. 分析实例之一 同类结合体
4. 分析实例之二 变异型结合体
5. 分析实例之三 多引物的同时鉴定

1. 前言

近年来, 解读人类全部遗传信息的基因组碱基序列的基因组计划是以国家规模推进, 到 2000 年 30 亿碱基序列(包含 A-G-C-T 四种碱基)几乎全部被解析和发表。与详细的基因组碱基序列的分析一样, SNPs 分析(Single Nucleotide Polymorphisms, 单核苷酸多态性)同样得到了广泛的重视。SNPs 是当碱基序列中只有一个碱基被其他碱基置换所造成的单个碱基所呈现出的变异·多样性的情况。据推测在每个人所具有的遗传基因中约有 30~1000 万处 SNPs。

在活体中遗传信息是由 3 个碱基为一组形成 1 个氨基酸的信息, 由特定氨基酸决定的序列构成各种各样功能的蛋白质。由于碱基序列决定组成蛋白质的氨基酸序列, 当一个碱基被置换就可能产生功能不正常的蛋白质。例如, 有人善饮酒或不能饮酒, 有些药起作用或不起作用, 由于个人体质的差异容易患某些疾病等情况。通过调查个体的 SNPs 希望探索某些疾病与个体等之间的相互关系, 针对个体的差异, 掌握正确的处方, 开展个体差异性治疗是二十一世纪的新型医疗模式。

对于容易造成高血压或癌症等疾病的 SNPs, 其应用的场合就更加清楚, 需要针对个体特定的 SNPs 中有哪些碱基是否发生置换的情况, 进行快速的诊断和治疗。这里利用 AXIMA-CFR 可对已知 SNPs 分析的 genotyping (确定碱基)应用实例。

2. 原理

图 1 为实现 SNPs 的 genotyping 的样品准备过程, 该方法称为单核苷酸延伸反应(SNuPE, Single Nucleotide Primer Extension)。由 Kuppaswamy 在 1991 年发表。

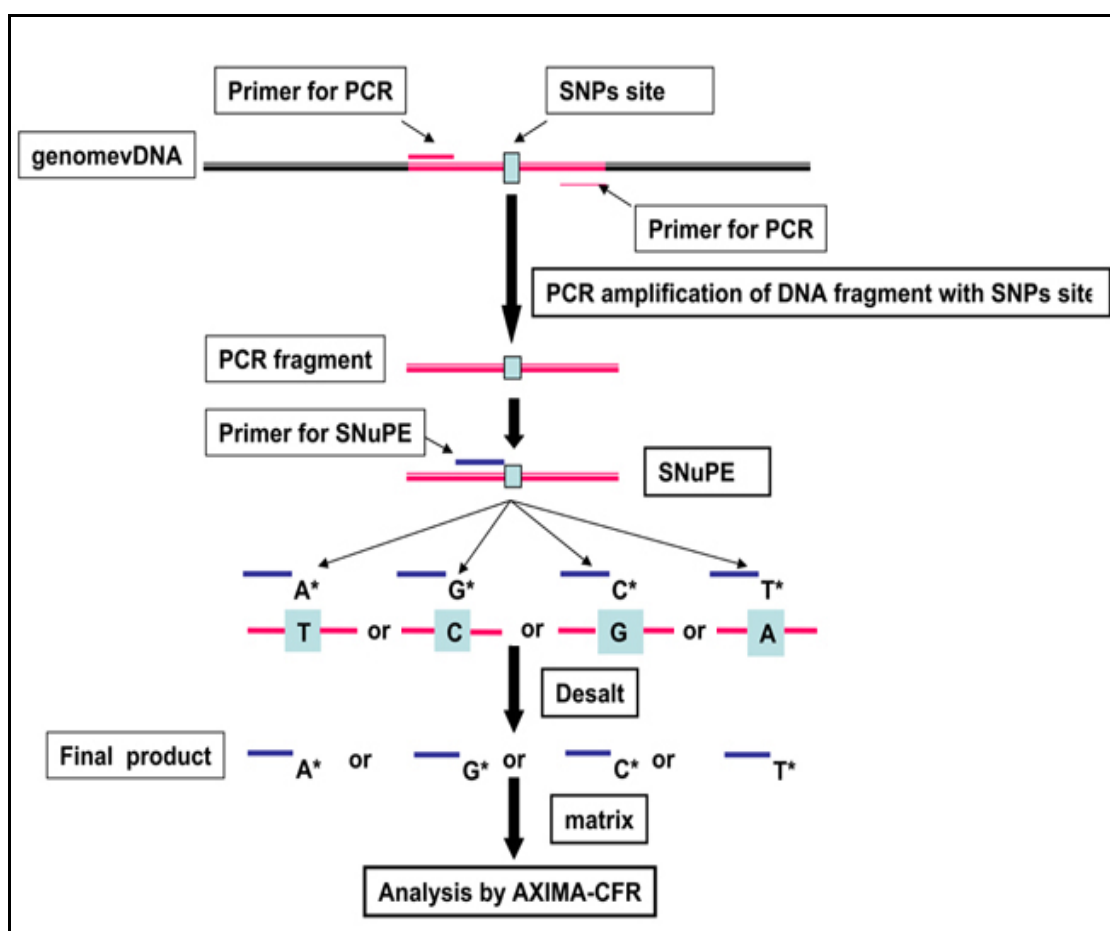


图 1: 单核苷酸延伸反应(SNuPE)流程图

采用 PCR 方法扩增含有 SNPs 部位的 DNA 片段

针对第 一步的 PCR 产物，作为 SNPs 部位延长一个核苷酸的引物

进行 SNUPE 单核苷酸延伸反应

将酶(Thermo Sequenase™ DNA, 0.3unit/μL)、基质(12.5pmol/μL)、SNUPE 用引物(1pmol/μL)以及第 一步获得的 PCR 产物(1pmol/μL)混合，进行热循环反应。

在基质中使用 ddNTP(di-deoxynucleotidetriphosphosphate)，加入了 ddNTP 的 DNA 链就不再延伸了。

PCR 反应条件：95 30 秒 → 50 30 秒 → 70 4 分 (25 循环)

在反应进行脱盐纯化

脱盐纯化步骤，可使用 ZipTip™ (纯化柱，Millipore)或色谱柱纯化以及不含钠盐的乙醇沉淀法进行。

在 AXIMA-CFR 的样品板上，混合样品和基质后进行分析

3. 分析实例之一 --- hemozygotes (同类结合体)

作为模型(标准)样品选用 ras Mutant Set c-Ha-ras codon 12 (Takara)，基质采用 0.7M 3-hydroxypiclic acid (3-HPA)的 50%乙腈 0.07M ammonium citrate 的饱和溶液，在分析之前采用 ZipTip™ (纯化柱，Millipore)进行脱盐。分析时采用 AXIMA-CFR 的 Reflectron 方式检测负离子。图 2 表示了对各样品的分析实例。这里所使用 SNUPE 用引物长度为 18mer。获得由各样品从引物只延伸一个碱基最终生成物的质谱图。在表 1 显示出各 ddNPT 的理论分子量。参见图 2 中根据 SNUPE 反应生成物与引物的分子量差容易地确认 SNPs 部位的碱基序列。

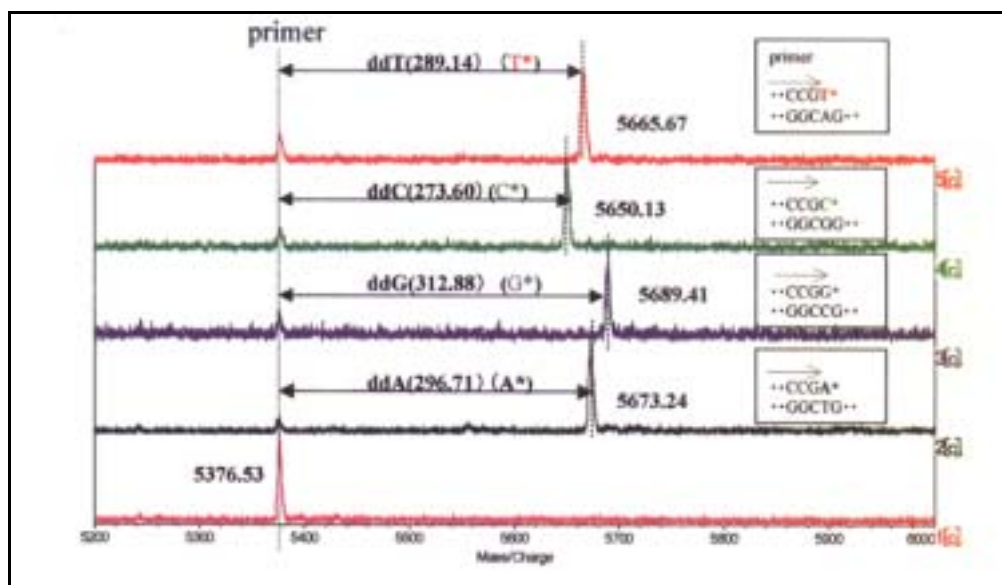


图 2：同类结合体的 SNUPE 分析实例

表 1：ddNTP 的理论分子量

	理论分子量
dd A	297.2
dd G	313.2
dd C	273.2
dd T	288.2

4. 分析实例之二 --- hemozygotes (变异性结合体)

在进行 genotyping 的 SNPs 部位，会发生作为模板(铸型)遗传因子有变异型结合体的情况，如分析实例如图 3 所示。样品及基质采用同分析实例(1)相同的物质。分析时也需要进行脱盐操作，采用 AXIMA-CFR 的 Reflectron 方式检测负离子。

使用的 SNUPE 用引物长度是 24mer(MW: 7231.45)，如果样品是变异型结合体会得到多个最终产物。通过 SNUPE 最终产物与引物分子量的差可以确定 SNPs 部位的碱基序列。从表 1 上可以看出，最小分子量之差是 ddT 和 ddA(约 9Da)，容易判断。这样即使样品是变异型结合体也可以进行 SNPs 的 genotyping。

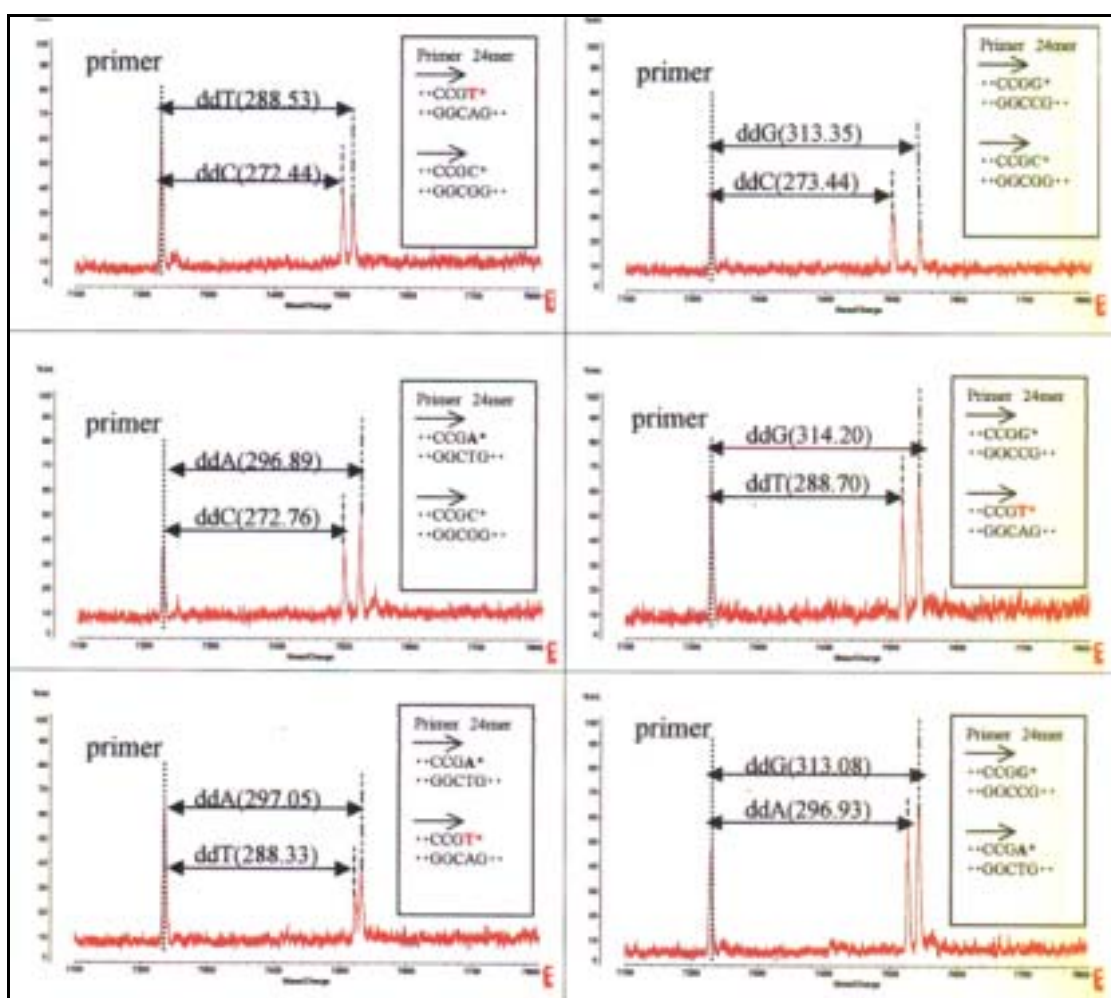
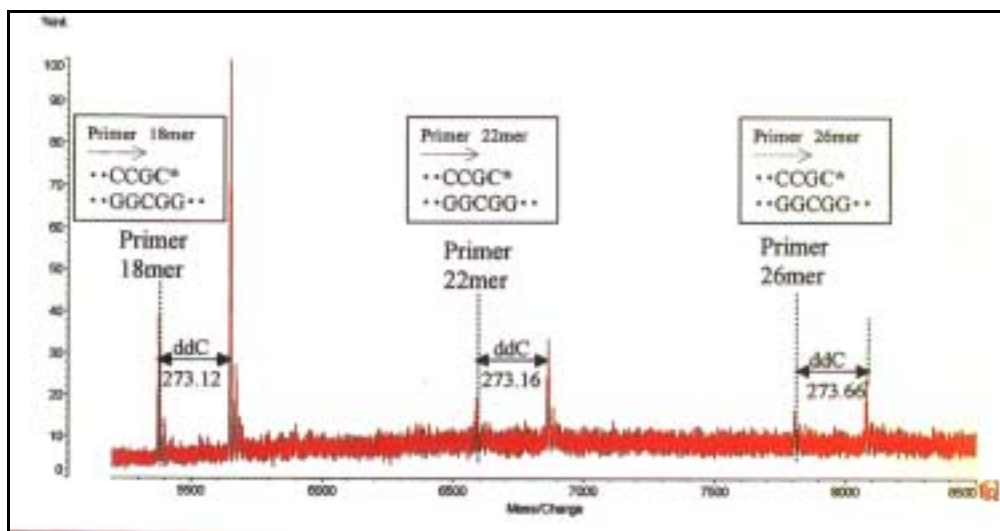


图 3：同类结合体的 SNUPE 分析举例

5. 分析实例之三 --- multiplex primer (多个引物同时鉴定)

在确认流感病毒的类型时，由于在某些 SNPs 附近存在其它的 SNPs，会出现需要同时进行多个 SNPs 的 genotyping 的情况，需要对多个不同长度的引物同时进行 SNuPE，以及分析和 genotyping。在图 4 中显示了分析的实例。将 3 种不同长度引物(18mer, 22mer, 26mer)混合，同时进行 SNuPE，可获得由各引物只延长一个碱基的反应生成物的质谱图。进而得到由 SNuPE 最终生成物与引物的分子量之差，从而非常容易地确定 SNPs 部位的碱基序列。



而且，在图 5 显示了样品为变异型结合体时的分析实例，得到从各引物生成的 SNuPE 反应生成物的质谱图。将获得的目的质谱图扩大后，根据各自质谱图可以得到多个信息，其反应生成物与引物的分子量之差，可对变异型结合体多个部位同时进行多个 genotyping。

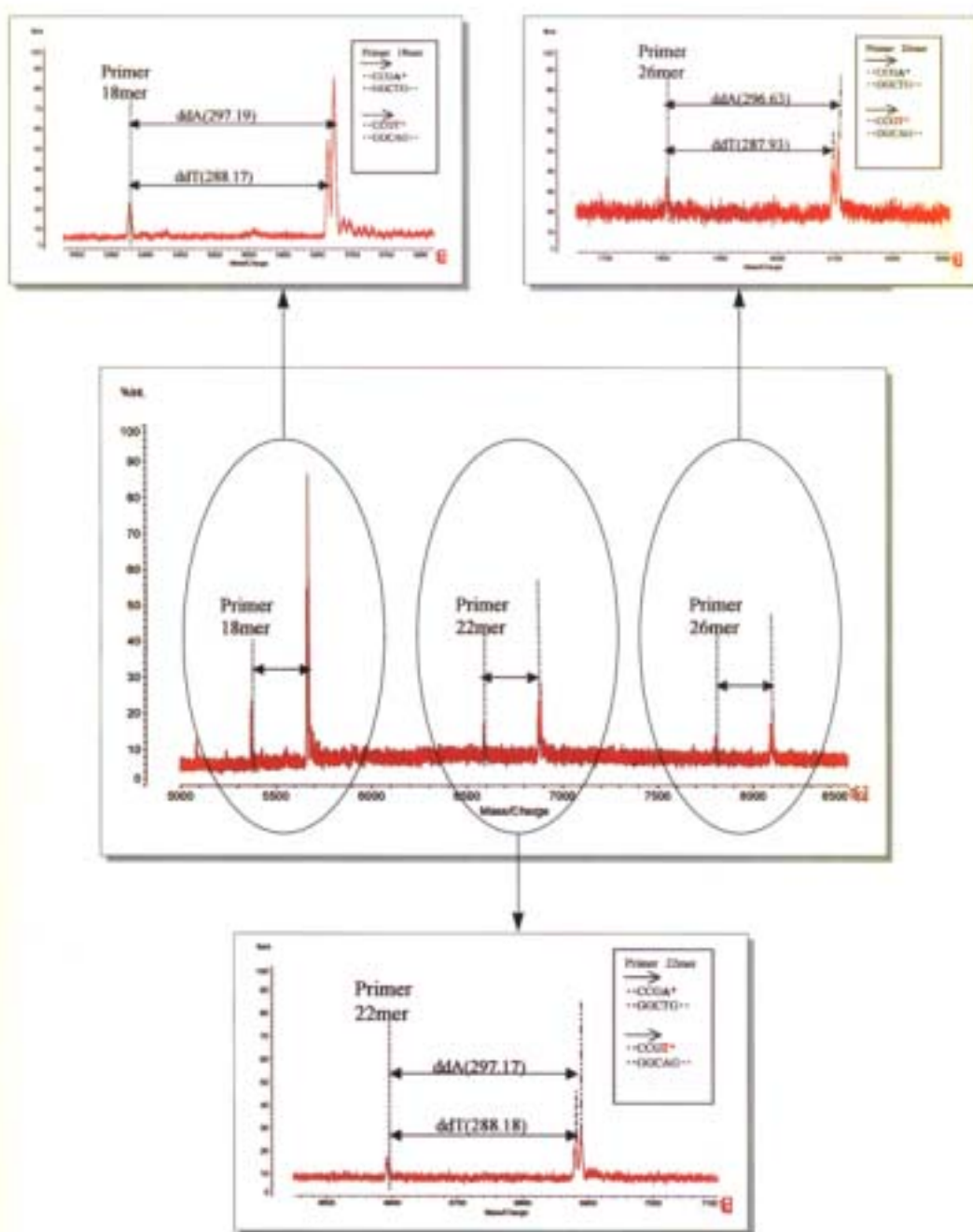


図5 複数のプライマーを用いたヘテロ結合体の SNUPE 分析例

图 5：多个引物的同类结合体的 SNUPE 分析实例

参考文献：

(1) Mohan N Kuppuswamy, et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 88, 1143-1147(1991)