

Genotyping Methods
and
Personalized Medicine

SNP

**检测技术与
个体化药物治疗**

主编 / 周国华



苏州大学出版社
Soochow University Press

Genotyping Methods
and
Personalized Medicine

SNP

**检测技术与
个体化药物治疗**

主编 / 周国华



苏州大学出版社
Soochow University Press

图书在版编目(CIP)数据

SNP 检测技术与个体化药物治疗 / 周国华主编. —
苏州: 苏州大学出版社, 2015. 2
ISBN 978-7-5672-1212-1

I. ①S… II. ①周… III. ①单核苷酸—多态现象—
检测②药物治疗 IV. ①Q7②R453

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 040281 号

内 容 简 介

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)作为一种遗传标记,具有已知性和遗传性。越来越多的研究表明,SNP 与疾病易感性、药物敏感性和不良反应相关,通过检测 SNP 标志物可预警疾病发生风险以及指导临床个体化药物治疗。本书详细介绍了 SNP 检测方法的技术原理、实验操作步骤、应用实例、技术要点、常见问题及解决方案,并对这些技术的临床应用进行了综述与展望。为了说明 SNP 在个体化药物治疗中的意义,本书还特别增加了基于 SNP 检测的个体化给药临床实践,介绍了通过 SNP 检测进行个体化给药的临床实例,同时还对有关个体化用药相关的伦理学问题进行了探讨。期望本书能够作为一本工具书,为临床药学、药理学、药物基因组学相关领域的科研人员、学生等提供参考。

SNP 检测技术与个体化药物治疗

周国华 主编

责任编辑 倪 青

苏州大学出版社出版发行

(地址: 苏州市十梓街 1 号 邮编: 215006)

苏州工业园区美柯乐制版印务有限责任公司印装

(地址: 苏州工业园区娄葑镇东兴路 7-1 号 邮编: 215021)

开本 787 mm×1 092 mm 1/16 印张 19 字数 475 千

2015 年 2 月第 1 版 2015 年 2 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5672-1212-1 定价: 40.00 元

苏州大学版图书若有印装错误,本社负责调换

苏州大学出版社营销部 电话: 0512-65225020

苏州大学出版社网址 <http://www.sudapress.com>

《SNP 检测技术与个体化药物治疗》

编 委 会

主 编：周国华

副主编：宋沁馨 汪维鹏 邹秉杰

编 者：（以姓氏笔画为序）

韦贵将 邹秉杰 宋沁馨 汪维鹏

陆 妍 陈之遥 武海萍 周国华

贾沪宁 黄 欢

主 校：徐 澍

校 对：（以姓氏笔画为序）

马雪萍 王建平 王 勇 邢晓清

刘云龙 齐谢敏 严志进 李思勤

沈元劼 林文慧 郑梦琳 项 铮

徐 澍 曹祖聪 盛 楠 董天晖

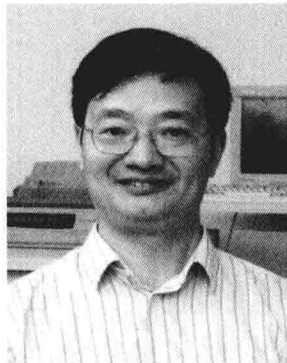
蒋宗英 童 欢

主 编 介 绍

周国华,男,1964年12月生,江苏南通人,研究员,南京军区南京总医院药理科主任,主任药师、南京大学医学院附属金陵医院教授,生命分析化学国家重点实验室教授,博士生导师(南京大学、中国药科大学、南京医科大学、第二军医大学、第三军医大学、南方医科大学)。1998年6月在清华大学获博士学位。自1999年5月起以高级访问研究员身份在日本先后留学5年。

本人专业特长为药物基因组学、分子诊断新方法、单细胞分析、基因测序等,目前担任解放军全军药物分析与药物代谢专业委员会主任委员、南京军区药理学会主任委员、江苏省药物基因组专业委员会主任委员,另外还任江苏省细胞与发育生物学会副理事长、江苏省临床药理专业委员会和江苏省医学会临床药专业委员会副主任委员、中国药理学会药物基因组专业委员会委员等学术职务,也是江苏省药物基因组专业委员会的发起者。

本人在SCI期刊上发表论文近70篇;获教育部科技进步一等奖1项,省部级二等奖成果5项、美国发明专利3项、中国发明专利16项、国家新药证书4项;共承担国家、军队和其他省部级科研课题20余项,其中国家863计划重大课题1项(课题组副组长)、国家重点基础研究发展计划(973计划)课题1项(为子课题组长)、国家科技重大专项3项(2项为课题首席负责人)、国家自然科学基金课题5项(4项为主持);为江苏省青年科技奖获得者、江苏省有突出贡献中青年专家、江苏省医学重点人才、南京军区“334”工程领军人才、江苏省“科教兴卫”工程领军人才。





为了更好地推广个体化给药理念,保证用药安全,提高药物疗效,南京大学生命分析化学国家重点实验室教授、南京军区南京总医院药理科周国华主任组织相关专家编写了《SNP检测技术与个体化药物治疗》一书,用于普及个体化给药知识,指导常规实验室开展规范的基因多态性检测工作。本书以 SNP 检测技术为重点阐述对象,系统介绍了 SNP 检测的技术原理、实验步骤、应用实例、技术要点、常见问题及解决方案,并对这些技术的临床应用进行了综述与展望。为了阐述 SNP 在个体化药物治疗中的意义,本书还专门增加了基于 SNP 检测的个体化给药临床实践,介绍了通过 SNP 检测进行个体化给药的临床实例,同时还对有关个体化用药相关的伦理学问题进行了深入探讨。本书以图文并茂的形式阐述了 SNP 检测的原理、方法及操作注意事项,以问答的形式解释了 SNP 检测过程中的难点和盲点,以示例的形式描述了多个临床一线药物个体化给药的临床实践。本书融入了编者多年的 SNP 检测经验,其中个体化给药的临床实践是本书的一大特色,对临床开展基因导向的个体化给药具有重要的指导意义。本书力求简明扼要,注重解决临床科研工作中遇到的实际问题。因此,本书可供有一定理论基础而实践经验尚不足的临床药学科研人员使用,也可作为医药院校临床药学、药理学等相关专业的教学参考书。

本书的编写得到了南京军区南京总医院药理科相关专家的指导和帮助,在此表示衷心的感谢。由于时间和水平有限,书中疏漏和不妥之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

编者
2014 年 7 月



上篇·基因多态性检测技术

第一章 四引物 ARMS-PCR 技术	3
第一节 概 述	3
第二节 技术方法	3
第二章 基于实时荧光定量 PCR 的 SNP 检测技术	16
第一节 概 述	16
第二节 TaqMan 探针技术	16
第三节 分子信标探针技术	24
第四节 高分辨率溶解曲线	38
第三章 连接酶检测技术	52
第一节 概 述	52
第二节 技术方法	52
第四章 滚环扩增技术	62
第一节 概 述	62
第二节 技术方法	62
第五章 多重连接依赖性扩增技术	76
第一节 概 述	76
第二节 多重连接依赖性探针扩增技术	76
第三节 多重连接依赖性基因组扩增技术	84
第六章 核酸侵入技术	93
第一节 概 述	93



第二节 技术方法	93
第七章 单链构象多态性(SSCP)分析 SNP	108
第一节 概 述	108
第二节 凝胶电泳法	109
第三节 变性高效液相色谱(DHPLC)法	116
第四节 毛细管电泳和芯片电泳法	123
第八章 生物质谱技术	133
第一节 概 述	133
第二节 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱	133
第三节 电喷雾-四级杆/飞行时间质谱	142
第九章 基于纳米颗粒的 SNP 检测方法	150
第一节 概 述	150
第二节 基于纳米金的 SNP 检测方法	151
第三节 基于量子点的突变检测方法	164
第四节 基于纳米颗粒可视化试纸条技术的 SNP 检测方法	172
第十章 基因芯片技术	190
第一节 概 述	190
第二节 技术方法	190
第十一章 微测序技术	208
第一节 概 述	208
第二节 液相微测序技术	209
第三节 固相微测序技术	218
第十二章 基于生物发光技术的焦测序检测法	235
第一节 概 述	235
第二节 技术方法	235
第十三章 新一代测序技术	247
第一节 概 述	247
第二节 Roche 454 测序技术	247
第三节 Illumina Solexa 测序技术	252

第四节	Applied Biosystems SOLiD 测序技术	258
-----	-------------------------------------	-----

下篇·个体化药物治疗临床实践

第十四章	单核苷酸多态性(SNP)与个体化用药	269
第一节	概 述	269
第二节	SNP 的含义	269
第三节	SNP 检测技术的发展	270
第四节	SNP 对医药科学研究的作用和意义	270
第十五章	基因导向个体化用药的伦理学思考	274
第一节	概 述	274
第二节	基因导向个体化用药的伦理问题	274
第三节	基因导向个体化用药的伦理对策	277
第十六章	基因导向的个体化用药临床实践	280
第一节	概 述	280
第二节	个体化用药的发展历程、基本概念及其与循证医学的区别	281
第三节	基因多态性标志物与个体化药物治疗临床实践	283
缩略词表		292

上 篇

基因多态性检测技术



第一章

四引物 ARMS-PCR 技术

第一节 概 述

扩增抗拒突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)^[1]是一种快速检测单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)的方法,但此方法的实验条件要求较高,须严格控制,否则易出现假阳性。在此基础上,将 ARMS 技术与四引物聚合酶链式反应(PCR)扩增技术^[2]相结合,发展了四引物扩增抗拒突变系统 PCR 技术(tetra-primer ARMS-PCR,简称四引物 ARMS-PCR 技术)用于检测 SNP^[3]。该方法只需一步 PCR 反应和常规电泳技术即可检测 SNP 的三种基因型,不仅操作简便、快速,而且费用低廉,较适合于中小型实验室用于 SNP 检测。

第二节 技术方法

一、方法原理

四引物 ARMS-PCR 技术是一种利用引物 3'末端碱基互补性来控制引物延伸的技术,其检测原理(如图 1-1 所示)是:针对一个 SNP 位点设计一对延伸方向相反的内引物(IP1 和 IP2),使其 3'末端碱基正好位于 SNP 位点处,并分别与 SNP 位点的两种碱基互补;另外设计一对延伸方向相对的外引物(OP1 和 OP2),使其扩增序列包括待测 SNP 位点。为了使扩增产物能被电泳分离,两条外引物离待测 SNP 位点的距离差异应该足够大。用这四条引物在一个 PCR 反应中进行扩增。两条外引物的扩增不受 SNP 位点的影响,所以各种基因型样本均能发生扩增。对于内引物,只有当其 3'末端碱基与 SNP 位点碱基互补时才能发生延伸反应。所以,纯合子样本的扩增反应中,只有一条内引物能与 DNA 模板完全互补,其产物中共有两条扩增 DNA 片段;而杂合子样本的扩增反应中,两条内引物均能与 DNA 模板完全互补,其产物中共有三条扩增 DNA 片段。最后,采用电泳技术分离检测扩增产物,并根据扩增产物的大小和有无来判断 SNP 的类型。每种样本的电泳图中均有外引物 OP1 和 OP2 的扩增产物 L,该条带可以作为内参考,显示 PCR 反应成功与否。SNP 基因型主要根据等位基因特异性扩增产物的大小来判断。如果仅出现代表○等位基因的扩增产物 M,则为○○纯合子;如果仅出现代表●等位基因的扩增产物 S,则为●●纯合子;如果 S 和 M 同时出现,则为○●杂合子。

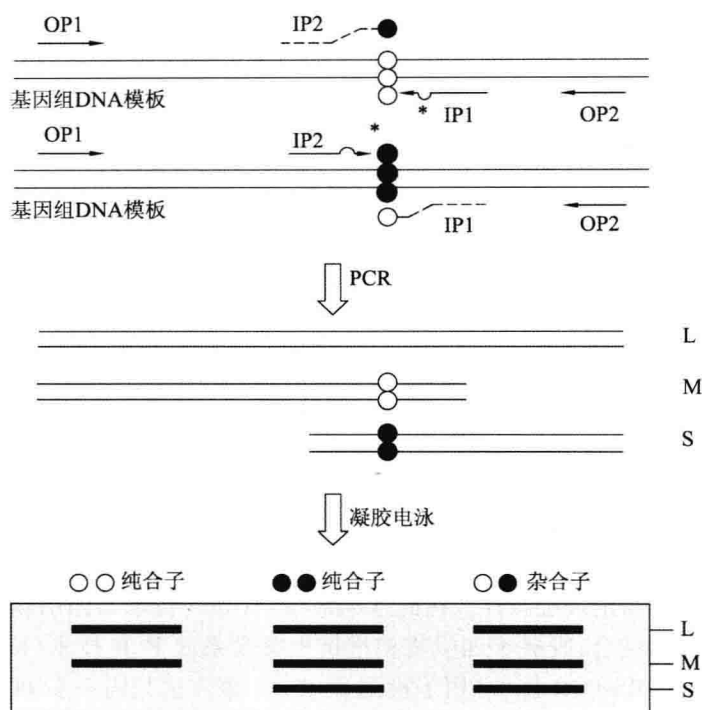


图 1-1 四引物 ARMS-PCR 技术的原理

○和●分别表示两种等位基因;OP1 和 OP2 表示外引物;IP1 和 IP2 表示内引物,分别代表○和●等位基因;*表示错配碱基;L、M、S 分别表示外引物扩增产物、○等位基因特异性扩增产物、●等位基因特异性扩增产物。

为了提高扩增的特异性,Ahmadian 等^[4,5]发展了三磷酸腺苷双磷酸酶介导的等位基因特异性延伸(aprased-mediated allele-specific primer extension,AMASE)技术。即在 DNA 聚合酶的作用下,完全互补的引物的延伸反应快于不完全互补的引物;当加入三磷酸腺苷双磷酸酶后,完全互补的引物快速发生延伸反应,而 3'末端不互补的引物即使发生延伸反应,其速度也很慢,在发生延伸反应之前 dNTP 就被三磷酸腺苷双磷酸酶降解了,从而抑制了非特异性延伸反应的发生,提高了延伸特异性和检测正确性。后来,他们在等位基因特异性 PCR 反应中加入蛋白酶^[6,7],使得 3'末端不互补的引物在发生延伸反应之前聚合酶就被蛋白酶降解,从而有效地抑制了非特异性扩增的发生。采用双向磷酸化激活聚合等位基因特异性扩增技术(bidirectional pyrophosphorolysis activated polymerization allele-specific amplification, Bi-PAP-A)也能提高特异性和检测灵敏度。

二、实验操作

四引物 ARMS-PCR 技术检测 SNP 一般通过五个操作步骤完成,即 SNP 位点及基因序列查找、DNA 样品制备及质量分析、引物设计、PCR 扩增、产物检测和结果判断,其操作流程如图 1-2 所示。

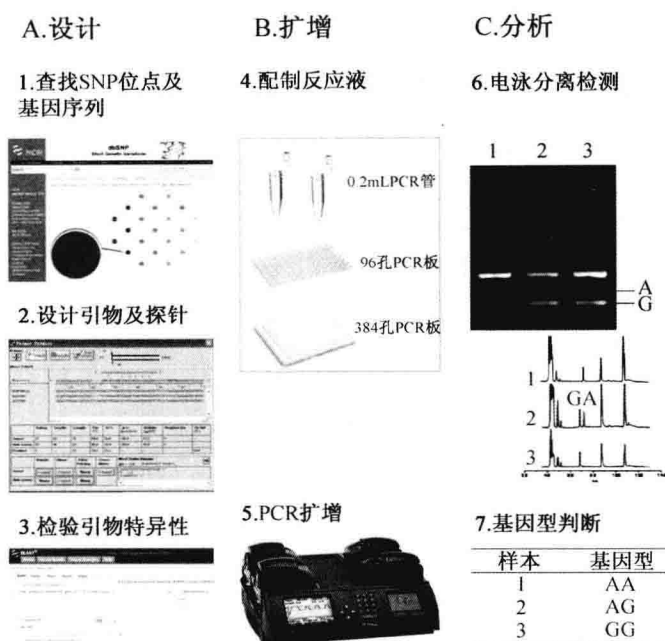


图 1-2 四引物 ARMS-PCR 技术检测 SNP 的流程图

(一) SNP 及基因序列查找

1. SNP 表示方式

对 SNP 位置进行定位主要基于三种序列,即 DNA、mRNA(cDNA)和氨基酸,见表 1-1。

表 1-1 *ABCA1* 基因中 rs2066714 位点及基因序列的表示方式

序列	序列登录号	SNP 表示方式
DNA	NG_007981.1	NG_007981.1:g.108684A>G
mRNA(cDNA)	NM_005502.2	NM_005502.2:c.2649A>G
氨基酸	NP_005493.2	NP_005493.2:p.Ile883Met

(1) 基于 DNA 序列

基于 DNA 序列对 SNP 位点进行定位的方式通常是以某一基因序列的第一个碱基开始计算,但由于来自不同数据库的同一基因有不同的登录号,如 *ABCA1* 基因序列登录号有 NG_007981.1(RefSeqGene)、NC_000009.11(GRCh37.p2)、AC_000052.1(Celera)和 AC_000141.1(HuRef)等,而且每一登录号对应基因序列的起始碱基都可能不同,这使得这种表示方法不能完全确定 SNP 的位置。因此,这种表示方式必须同时指出基因序列的登录号。

(2) 基于 mRNA(cDNA)序列

基于 mRNA(cDNA)序列对 SNP 位置进行定位通常是以起始密码子 ATG 的 A 为第 1 位碱基开始计算,这种表示方式也会受到基因序列中存在的插入、缺失或短链重复多态性的影响,所以也应该同时指出基因序列的登录号。但是,这种方式无法对启动子区和内含子中的 SNP 进行定位。由于 mRNA(cDNA)序列比 DNA 序列简短,所以这种表示方法也常被使用。

(3) 基于氨基酸序列

基于氨基酸序列对 SNP 位置进行定位通常是以第 1 个氨基酸开始计算,这种表示方式不仅较为简单,而且能直接反映出 SNP 引起氨基酸的改变,但由于会受到剪接异构体等序列变化的影响,所以也应该同时指出序列的登录号。而且,由于每个氨基酸对应一个密码子,即 3 个碱基,所以这种方式无法对 SNP 位置进行精确定位。

无论哪一种表示方式,都应该同时指出序列的登录号或者每个 SNP 唯一的 rs 号。虽然 rs 号是唯一的,但不能显示碱基的变化,因此我们统一采用 HGVS 的命名方式,以 DNA 序列第一个碱基开始计算的方式进行定位,并结合基因序列登录号表示 SNP,或者以 rs 号表示。

2. SNP 及基因序列查找

查找 SNP 的方式有很多,须根据已知信息和研究目的确定采用哪种方法进行查找。

(1) 查找某一基因中启动子、外显子或内含子中的 SNP

查找过程如图 1-3 所示。首先,打开 NCBI 网站(www.pubmed.com),将 **search** 项选择为 **SNP**,在查找内容中输入 **基因名**;点击 **Limits**,在“Organism”中选择种属,在“Function Class”中选择功能分类,如 **coding nonsynonymous** 等(图 1-3A)。点击 **go** 进行查找,获得所有符合搜索条件的 **rs** 号(图 1-3B)。在查找结果中点击 **rs 号**,即可获得所需 SNP 相关信息,包括 SNP 名称、上下游基因序列、对氨基酸的影响,以及各种组织测得的基因型频率等(图 1-3C)。

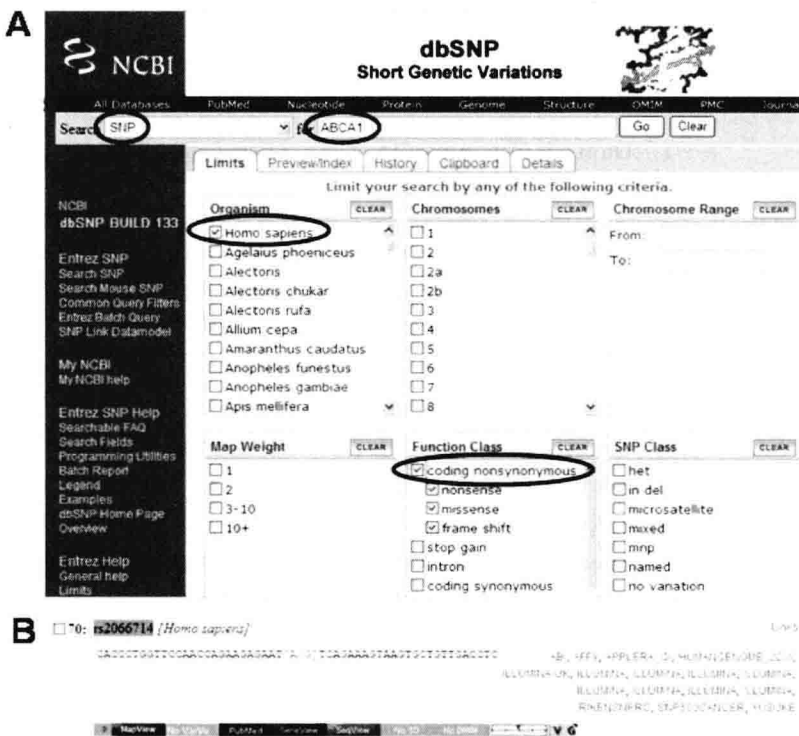




图 1-3 SNP 查找过程

A. 输入基因名及设定条件;B. 搜寻结果;C. 目标 SNP 的相关信息,从上向下依次为名称、位置及氨基酸变异、基因序列、基因型频率

(2) 根据文献中提供的 ref SNP ID 号进行查找

打开 NCBI 网站(www. pubmed. com);将 **search** 项选择为 **SNP**。在查找内容中输入 **rs** 号,点击 **go** 进行查找。在查找结果中点击 **rs 号**,即可获得所需 SNP 信息及基因序列。

(二) DNA 样品制备及质量分析

基因组 DNA 的来源包括动物组织(冰冻组织和石蜡包埋组织)、细胞和外周血、微生物和植物等,不同来源的基因组 DNA 的提取方法有所不同;不同种类或同一种类的不同组织因其细胞结构及所含的成分不同,分离方法也有差异。在提取某种特殊组织的 DNA 时必须参照文献和经验建立相应的提取方法,以获得可用的 DNA 大分子。目前常用于提取基因组 DNA 的方法有酚-氯仿法、盐析法、胍盐酸法、Chelex100 法和商品化试剂盒等。

提取的 DNA 样品采用紫外分光光度法于 260 nm 波长处测定其浓度;测定 A_{260}/A_{280} 比值,应大于 1.9,表明其纯度合格;采用琼脂糖凝胶电泳法分离检测 DNA 是否断裂成小片段和样品是否混有 RNA 杂质。



(三) 引物设计及特异性检验

1. 外引物设计

外引物设计有三条基本原则:引物与模板的序列要紧密互补,引物与引物之间避免形成稳定的二聚体或发夹结构,引物不能在模板的非目的位点引发 DNA 聚合反应(即错配)。具体实现这三条基本原则需要考虑诸多因素,如引物长度、产物长度、序列 T_m 值、引物与模板形成双链的内部稳定性(用 ΔG 值反映)、形成引物二聚体及发夹结构的能值、在错配位点的引发效率、引物及产物的 GC 含量等。设计时应注意如下要点:

(1) 引物的长度一般为 15 ~ 30 bp,常用的是 18 ~ 27 bp,但不应大于 38 bp,因为过长会导致其延伸温度大于 74 °C,不适于 *Taq* DNA 聚合酶进行反应。

(2) 引物序列在模板内应当没有相似性较高,尤其是 3'端相似性较高的序列,否则容易导致错配。引物 3'端出现 3 个以上的连续碱基,如 GGG 或 CCC,也会使错误引发概率增加。

(3) 引物 3'末端碱基对 *Taq* 酶的 DNA 合成效率有较大的影响。不同的末端碱基在错配位置导致不同的扩增效率,末端碱基 A 的错配效率明显高于其他 3 个碱基,因此应当避免在引物的 3'末端使用碱基 A。另外,引物二聚体或发夹结构也可能导致 PCR 反应失败。5'端序列对 PCR 影响不太大,因此常用来引进修饰位点或标记物。

(4) 引物序列的 GC 含量一般为 40% ~ 60%,过高或过低都不利于引发反应。上下游引物的 GC 含量不能相差太大。

(5) 引物所对应模板位置序列的 T_m 值在 72 °C 左右可使复性条件最佳。 T_m 值的计算有多种方法,如按公式 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ 。在 Oligo 软件中使用的是最邻近法。

(6) ΔG 值是指 DNA 双链形成所需的自由能,该值反映了双链结构内部碱基对的相对稳定性。应当选用 3'端 ΔG 值较低(绝对值不超过 9)而 5'端和中间 ΔG 值相对较高的引物。引物的 3'端的 ΔG 值过高容易在错配位点形成双链结构并引发 DNA 聚合反应。

(7) 引物二聚体及发夹结构的能值过高(超过 4.5 kcal/mol)易导致产生引物二聚体,并且降低引物有效浓度而使 PCR 反应不能正常进行。

(8) 两条外引物与 SNP 位点的距离差应足够大,以保证内外引物配对扩增产物(等位基因特异性扩增产物)能被电泳完全分离。距离差的最低值可近似等于两条等位基因特异性扩增产物长度平均值乘以电泳分离介质的分辨率。如对于分辨率为 10% 的凝胶,如果一条等位基因特异性扩增产物长度为 300 bp,则另一条等位基因特异性扩增产物长度应大于 331 bp,或者小于 271 bp。

值得一提的是,各种模板的引物设计难度不一。有的模板本身条件比较困难,例如 GC 含量偏高或偏低,导致找不到各种指标都十分合适的引物;在用作 SNP 检测时,因为 SNP 位点固定而使得产物序列相对固定,引物设计的选择自由度较低。在这种情况下,只能退而求其次,尽量满足基本条件。

通常,可以采用 Primer Premier 5 或 Oligo 6 等软件设计引物。软件的引物设计功能主要体现在两个方面:首先是引物分析评价功能,该功能只有少数商业版软件能够做到,其中以 Oligo 6 最优秀;其次是引物的自动搜索功能,各种软件在这方面的侧重点不同,因此自动搜索的结果也不尽相同,以 Primer Premier 最强且方便使用,Oligo 6 其次。其他软件如 Vector NTISuit、Dnasis、Omiga 和 Dnastar 都带有引物自动搜索功能,但搜索结果不是十分理想。要想得到效果很好的引物,在自动搜索的基础上还要辅以人工分析。最佳搭配是以 Primer