

# SNP Genotyping Assay

編譯：廖珮變

## 基因型鑑定有一套!

單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP) 決定著群體和個體基因序列的細微差別。了解疾病的生成發展，讓個人化醫療之所以成為可能，就是因為在這細微的變異中，透過對基因的分析，與藥物代謝相關基因的研究，找到不同患者間藥物代謝及藥效差別，達到個人化治療的效果。這也是近幾年來生醫學界倡導的轉譯醫學所要倡導的理念。過去SNP分析多使用的是聚合酶連鎖反應儀，殊不知在盤式判讀儀優異的性能之下，也能達到一樣的分析效果!

### Thermo實驗室利用盤式判讀儀 搭配FRET技術，告訴您

### ——SNP分析也能這麼做!!

#### 材料：

KASPar™ SNP Genotyping Assay (KBioscience)

#### 儀器：

##### 聚合酶連鎖反應儀

Thermo Scientific Arktik, Thermo Scientific PikoReal

##### 盤式螢光判讀儀

Thermo Scientific Varioskan Flash  
可見光、螢、冷光盤式判讀儀

Thermo Scientific Fluoroskan Ascent  
螢光盤式判讀儀

### 在此次的分析當中，有以下重點：

- 在96與384孔盤分析時，螢光盤式判讀儀都能提供相同優異的分析效能
- 盤式螢光判讀的實驗，使用PCR盤進行上方判讀或是下方判讀模式，數據都正常
- Varioskan Flash全光譜的光學模組(monochromator)擷取光源更乾淨，提供了更準確的螢光訊號
- 利用DNA增幅技術與已知的對照數據進行比對，盤式判讀儀能提供高達100%相關的最終結果
- 一般聚合酶連鎖反應儀結合Varioskan Flash的分析模式，是一套可靠、高效率的分析組合

KASPar™ Genotyping System採用了螢光能量轉移分析法(FRET based assay)，藉由預先設計的 HEX 或 FAM 螢光染劑結合兩種不同序列DNA順向引子(forward primer)，當樣品DNA進行第一次增幅的時候，單點突變的DNA會只與其中一種順向引子結合，接著，隨著增幅的次數增加，原本引子上被Quancher抑制的螢光染劑，會在增幅的過程中，與DNA產物結合，並因FRET-based primer結構被破壞而發出螢光訊號，當反應持續進行，螢光訊號即被放大(圖1)。反應結束後，根據螢光訊號可分成三組，其中，代表同型合子(homozygotes)只產生HEX或FAM螢光訊號，另一組為異型合子(heterozygotes)則會產生 FAM 與 HEX 相同強度的螢光訊號。

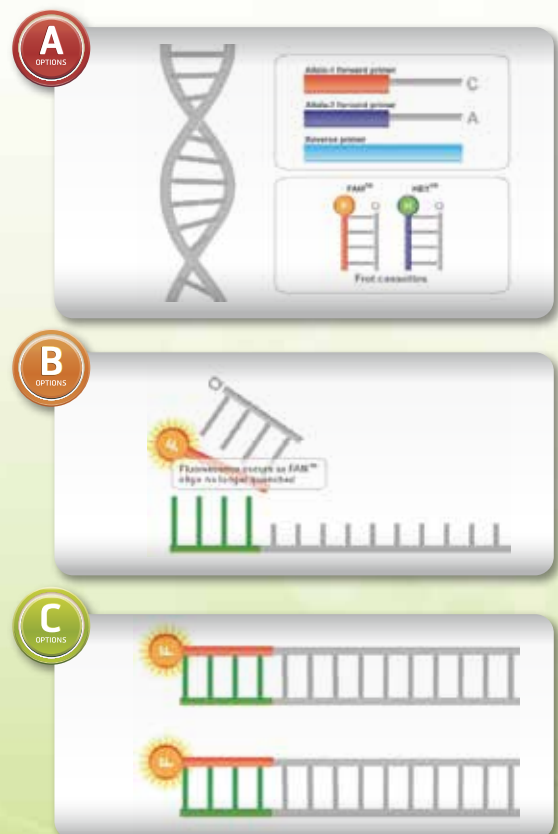


圖1. KASPar™ Genotyping System: A- 帶有HEX或FAM螢光染劑的兩種DNA引子; B- 引子與相對應的序列結合; C- 增幅並放大訊號

實際使用 96-well PCR微孔盤進行 KASPar assay分析，使用的是Arktik Thermal Cycler與 PikoReal real-time PCR分析儀。當DNA增幅完成後，使用Fluoroskan Ascent與 Varioskan Flash 盤式判讀儀測量了FAM / HEX的螢光訊號比值(圖2)。根據比值，可分成三組數據，其中兩組為HEX、FAM 代表同型合子 (homozygotes) 只產生 HEX或 FAM 螢光訊號，另一組為異型合子 (heterozygotes)產生FAM與HEX相同強度的螢光訊號。螢光染劑6-ROX則是用來做為標準化(Normalization)的依據。

從圖3的結果來看，使用96 well PCR盤，所收集的訊號，不論是在上方或是下方判讀的數據上，都與盤式判讀儀的結果(圖2)有相近的趨勢。

使用Varioskan Flash去驗證Arktik Thermal Cycler (圖3) 與PikoReal real-time PCR (圖4)分析儀所得的結果，發現到兩組數據與已知結果比較下，準確性都能達到100%，樣品皆可正確的被分類到所屬群組。若使用了ROX進行標準化，將更有效降低數據間的變異性。

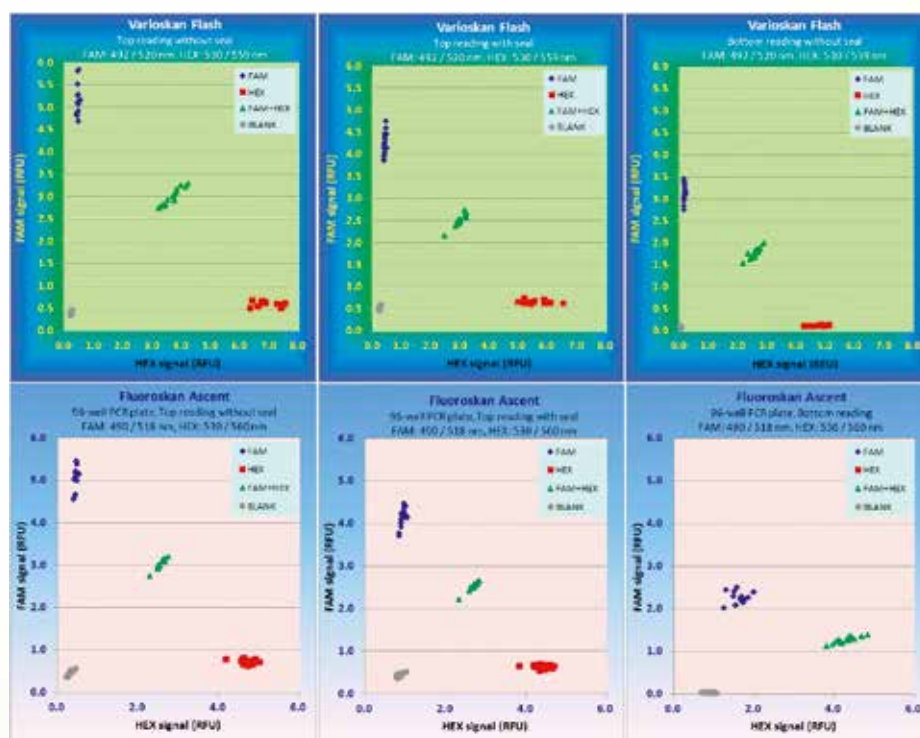


圖2. 在Varioskan Flash與Fluoroskan Ascent盤式判讀儀，根據測得的FAM / HEX 螢光訊號，分析同型合子、異型合子的分佈族群。(判讀儀上、下方判讀結果)

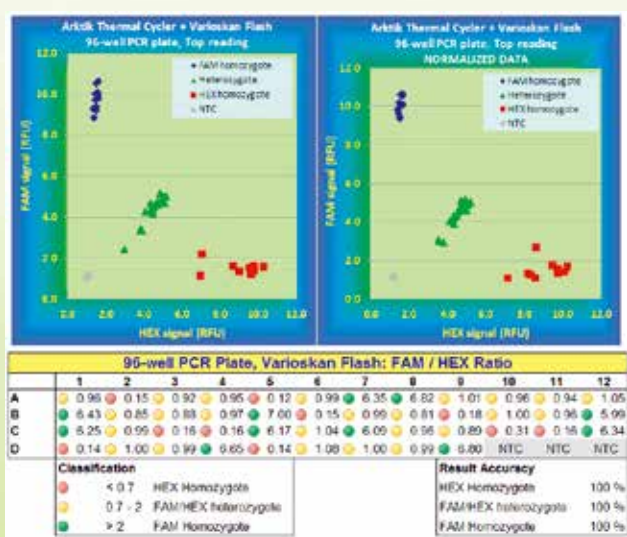


圖3. 使用Varioskan Flash去驗證Arktik Thermal Cycler 在96 well PCR盤反應之下，所收集的訊號，不論是在上方或是下方判讀的數據上，都有相近的趨勢。

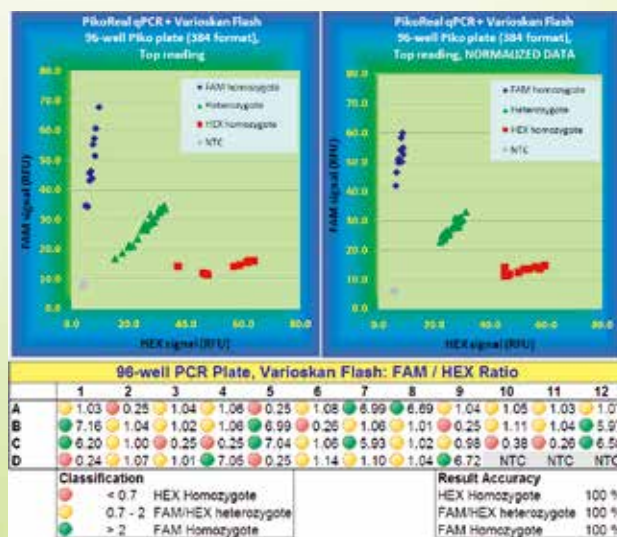


圖4. 使用Varioskan Flash驗證PikoReal real-time PCR分析儀所得的結果。兩組數據與已知結果比較下，準確性都能達到100%，樣品可正確的分類到所屬群組。

Varioskan Flash 優異的頻寬設計與四組全光譜光學模組(monochromator)，解決了螢光染劑在激發光與發散光波長之間的最後判讀數據的干擾，如HEX染劑相當窄的螢光波長範圍，約20nm，是濾鏡式的螢光儀較不易克服的，但 Varioskan Flash 卻能有效的將迷光(stray light) 排除，讓分析螢光數值更易判斷。

單一核苷酸多型性SNP是DNA序列中單一鹼基對的變異，通常會應用在尋找致病基因、藥物基因學或新藥開發等等。搭配螢光能量轉移分析法(FRET)的幫助下，研究者可輕易的在不使用PCR、電泳膠方式進行，利用96-384孔盤式判讀儀的功能(如Varioskan Flash可見光、螢、冷光盤式判讀儀)，即可加快大量檢體的篩選進度。



### Reference:

1. Thermo scientific Application Note: Validation of KASPar™ Dual FRET Based SNP Genotyping Assay
2. <http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/how-does-kasp-work/>



**Thermo**  
S C I E N T I F I C

**Varioskan Flash**

**現正熱銷中**