

基于磁性颗粒微阵列与双色荧光杂交的 单核苷酸多态性分型方法研究

刘洪娜¹ 李松^{1,2} 刘丽赏² 田岚¹ 贾英英¹ 李智洋¹
邓燕^{1,2} 何农跃^{*1,2}

¹(东南大学生物电子学国家重点实验室,南京 210096)

²(湖南工业大学绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室,株洲 412008)

摘要 基于磁性颗粒微阵列与双色荧光杂交,建立了单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)分型方法。将利用不对称扩增得到的含有待检测位点生物素标记的单链 PCR 产物固定在链亲和素修饰的金磁纳米颗粒(Gold magnetic nanoparticles, GMNPs)表面;将 ssDNA-GMNPs 混合物点在底部固定有磁铁的载玻片上构建磁性颗粒微阵列,然后在基因框中与双色荧光探针杂交;杂交完全后,充分洗涤,通过扫描获得分型结果。通过优化不对称 PCR 的扩增条件,直接扩增出产量较高的单链 DNA 作为靶序列用于分型。利用本方法对 24 个样本 MTHFR 基因的 C677T 位点多态性进行了检测。实验证明,本方法步骤简单,易实现自动化操作,非常适用于分子诊断与法医鉴定。

关键词 磁性颗粒微阵列; 不对称扩增; 双色荧光杂交; 单核苷酸多态性

1 引言

对来自病人和对照组的上千乃至上万个样本的多个(SNP)位点进行分型研究时^[1],相应的检测技术应该具有高通量、自动化、低成本等特点。目前,基因芯片由于具有高通量、高灵敏和并行检测的特点^[2,3],已广泛用于发现疾病相关基因、建立疾病诊断指标和基础生物学及医学研究领域^[4,5]。

由于磁性纳米粒子具有特殊的物理化学性质和生物相容性^[6],目前已被广泛应用于核酸提取^[7~9]与核酸检测^[10~13]中。Lien 等^[12]基于磁珠的微流体平台,实现了 DNA 提取与 SNP 分型;Nakagawa 等^[13]利用功能化的磁性纳米粒子提取 DNA,通过荧光融解曲线法实现了对 ALDH2 基因 SNP 的自动化检测,但是该方法耗时,且不易实现高通量检测。本课题组也建立了一系列基于磁分离的核酸检测方法^[14,15],以磁性纳米粒子为杂交靶序列的载体,成功避免了杂交的分型技术中对靶序列纯化和浓缩而导致的费时、费力等缺陷,具有成本低、操作快速、简便、准确等优点。但是由于所使用的链亲和素修饰的磁性纳米粒子具有非常高的荧光背景,所以只能将变性的荧光探针点样到干净的载玻片上构建芯片,再进行扫描、分型,增加了操作的复杂性。同时,由于不同样本需要在不同的反应管中杂交,增加了检测成本。

本实验在磁性纳米材料表面修饰金壳,有效消除了磁性纳米颗粒的荧光背景。利用磁性颗粒微阵列与双色荧光探针杂交相结合,对 MTHFR 基因 C677T 位点的多态性进行了检测。通过在基因框中对多个样本同时杂交,显著降低了对于每个样本杂交所需 Cy3, Cy5 标记荧光探针的用量。在获得较好的分型结果的同时,进一步简化了实验步骤,拓展了适用范围,更适用于自动化分析。

2010-02-25 收稿; 2010-06-05 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 60801007, 60927001, 60971045), 863 国家高技术研究发展计划(No. 2007AA022007), 国家重点基础研究发展计划-纳米研究重大科学研究计划(Nos. 2007CB936104, 2010CB933903), 中国博士后科学基金(No. 2010471007), 国家科技重大专项“十一五”计划科研支撑平台项目(No. 2009ZX10004-311), 江苏省博士后科研资助计划(No. 1001009C), 湖南省教育厅科研基金(No. 08B018), 湖南省自然科学基金(No. 09JJ4044, 09JJ3017) 资助

* E-mail: nyhe1958@163.com

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

PTC 220 型 PCR 扩增仪(美国 MJ Research 公司); GenePix 4100A 荧光扫描仪(美国 Axon 公司); Nano-Plotter 型点样仪(德国 Gesim 公司)。

对亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因的 C677T 位点进行扩增。表 1 为寡核苷酸序列,所有引物及探针序列均由上海生工生物工程公司合成; Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase, 5U/ μ L, 上海博彩

生物科技有限公司); dNTP(宝生物工程(大连)有限公司); 基因框(Thermo Fisher 生命技术有限公司); 杂交液(Sigma-Aldrich 公司); 链亲和素(上海生物工程有限公司); $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (99.0%), $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (99.0%), NaOH, 柠檬酸钠, 乙醇(95%)均为国产分析纯试剂; $\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (上海久岳化工有限公司); 3-Mercaptopropyltriethoxysilane(MPTES, Sigma-Aldrich 公司); 链亲和素-金磁纳米颗粒(粒径约 36 nm, 自制)以 4.0 g/L 的浓度分散在 PBS 缓冲液(pH 7.4)中。

24 个样本均来自长沙市中心医院,样品为参加体检的正常汉族人的外周血,经过 EDTA 抗凝。基因组 DNA 的提取采用 QIAGEN 试剂盒提取。

2.2 实验方法

2.2.1 原理 磁性颗粒微阵列的核心是以无荧光背景的金磁纳米颗粒为核酸载体,点样到载玻片表面,构建 3D 结构生物芯片,通过外加磁场固定磁性颗粒,采用杂交的方法对颗粒上所固定的核酸进行检测。首先将不对称扩增得到的含有待检测位点生物素标记的单链 PCR 产物固定在 SA-GMNPs 表面;将 ssDNA-GMNPs 混合物点样在底部固定有磁铁的载玻片上构建磁性颗粒微阵列;然后在基因框中与等位基因特异性双色荧光探针在特定温度下杂交;杂交完全后,充分洗涤,通过扫描直接在磁性颗粒表面读取荧光信号获得其分型结果。根据双色荧光杂交技术原理,野生型样本(HoW CC)由于只与野生型探针结合,而获得较强的 Cy3 荧光(绿色荧光)信号。突变型样本(HoM TT)则获得较强的 Cy5 荧光(红色荧光)信号。杂合型样本既可获得 Cy3 荧光又可获得 Cy5 荧光,经过叠加后能显示较强的“黄色”荧光信号。

2.2.2 链亲和素-金磁纳米颗粒的制备 金磁纳米颗粒(Gold coated magnetic nanoparticles, GMNPs)的制备原理参考文献[16]并适当改进。取 1 mg 自制的金磁纳米颗粒,磁分离后弃上清液,加入 200 μ g 链亲和素,以 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)定容至 1 mL,置空气振荡器中充分反应。待反应完全后,用 0.1 mol/L PBS 缓冲液清洗 2 次,再以 4 g/L 的浓度分散于 PBS 中,待用。

2.2.3 利用不对称 PCR 扩增产生单链 DNA 的条件优化 基于文献[14, 15]的分型方法,扩增出含有待检测位点的双链 PCR 产物,再将其固定在磁性颗粒上,在 95 $^{\circ}\text{C}$ 将 dsDNA-GMNPs 变性成 ssDNA-GMNPs。此过程大大限制了该方法在一些基于物理作用制备的链亲和素-磁性颗粒上的应用。本研究优化了通过不对称扩增产生单链 DNA 的实验条件,将直接产生的单链 DNA(ssDNA)固定在磁性纳米颗粒上,构建磁性颗粒微阵列。选取样本的 C677T 位点进行 PCR 扩增及 SNP 分型。在 PCR 扩增仪上进行扩增, MTHFR 基因 C677T 多态扩增时的反应体系为 30 μ L,其中含 10 \times PCR 反应缓冲液 3 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 溶液 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.6 μ L, 两条不同比例的 PCR 引物各 1 μ L, 1.25 U Taq DNA 聚合酶(5 U/L), 基因组 DNA 80 ng, 其余用水补齐。在 PCR 扩增仪上进行如下扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。

2.2.4 磁性颗粒微阵列牢固度实验 为了检测磁性颗粒微阵列在载玻片表面固定得是否牢固,应用标记有荧光探针的金磁纳米颗粒制备磁性颗粒微阵列检测。取 100 μ g 链亲和素-金磁纳米颗粒,分别与 0.5 μ L 10 μ mol/L 标记生物素的荧光探针(5'-Biotin-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA-Cy3, 5'-Biotin-

表 1 寡核苷酸序列

Table 1 Oligonucleotide sequence

Name	Type	Sequence 5'-3'
C677T-F	Primer	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA
Biotin-C677T-R	Biotin-labeled primer	Biotin-(T) ₁₅ AGGACGGTCCGGTGAGACTG
C677T-CC	Cy3 labeled probes	Cy3-CGGGAGCCGATTT
C677T-TT	Cy5 labeled probes	Cy5-CGGGAGTCGATTT

TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGA-Cy5) 室温反应 15 min。磁性颗粒使用 ddH₂O 洗涤两次后,重新悬浮于 5 μL ddH₂O,将 0.05 μL 固定有 ss-DNA 的 SA-GMNPs 混合物点样在底部固定有磁铁的载玻片上,快速烘干后扫描检测载玻片上所固定磁性颗粒的荧光强度。再将磁性颗粒阵列背面粘附上永磁体,磁性颗粒微阵列分别以 3 × SSC 和 ddH₂O 缓慢振荡清洗各 2 次,每次 3 min。将磁性纳米颗粒点阵列在 100 °C 快速烘干后,取下载玻片另一面的磁体,进行扫描。

2.2.5 杂交与分型 等位基因检测所用的双色荧光标记检测探针如表 1 所示,所检测的 SNP 位点设计在探针序列的中间位置。经过野生、突变模拟靶序列分别与双色荧光探针在不同温度下杂交的扫描结果,确定对于 MTHFR 基因的 C677T 位点的最佳杂交温度为 38 °C^[13]。将直接扩增的单链 PCR 产物固定在链亲和素金磁颗粒表面,构建磁性颗粒微阵列。在基因框中加入 10 μmol/L 荧光标记的 677CC 和 677TT 探针各 6.5 μL,杂交液 22 μL 和灭菌去离子水 30 μL,混匀后在 38 °C 下杂交 1 h。杂交后的磁性纳米颗粒以 3 × SSC 和 ddH₂O 缓慢振荡清洗各 3 次。最后,将表面杂交上荧光探针的磁性纳米颗粒点阵列在 100 °C 快速烘干后,取下载玻片另一面的磁体,扫描并获取基因型。

2.2.6 图像扫描与数据处理 经上述处理后的载玻片经配有 Cy3 和 Cy5 滤色片的 4100A 扫描微阵列分析系统(Axon, USA)扫描。Cy3 荧光染料的激发波长为 550 nm,发射波长为 570 nm; Cy5 荧光染料的激发波长为 649 nm,发射波长为 670 nm。分别使用 Cy3 和 Cy5 激光光源扫描芯片,将扫描得到的两张图像叠加以获得样品分型图像。叠加图像通过 Genepix 6.0 生物芯片软件分析,芯片上每个样本各点样点的荧光强度值取扣除背景的平均值,用 Origin 7.0 图像处理软件对数据进行分析并作图。

3 结果与讨论

3.1 SNP 分型结果的判定标准 SNP 分型结果的质量标准,包括分型信号强度的有效性范围、3 种基因型检测信号的各自取值范围等。分型结果的评价与良好的质量控制是该方法实用化的重要前提。在此分型标准上,以信号强度因子 $I = \log(\text{Signal}_{\text{Cy3} + \text{Cy5}})$ 和基因分型因子 $G = \text{Signal}_{\text{Cy3}} / \text{Signal}_{\text{Cy3} + \text{Cy5}}$ 来确定样本的分型结果。

通过对大量样本的分型结果分析可知,当样本的相对荧光信号强度值之和大于 1000,即 $I > 3$ 时,样本的分型信号在强度上有意义,即 I 值有意义;否则,定义信号强度太低,认定信号结果无意义。而在基因型的区分上,理论上野生型样本的 $G \approx 1$,突变型 $G \approx 0$,而杂合型样本的 $G \approx 0.5$ 。根据已经验证的大量样本的分型结果,确定野生、突变和杂合 3 种基因型的有效范围(图 1),即: $G < 0.2$ 为突变型(HoM); $0.35 < G < 0.65$ 为杂合型(He); $G > 0.8$ 为野生型(HoW)。对于分型结果接近有效域界限的样本进行测序验证,以判断分型结果是否准确。结果显示,本分型结果判定方法是有效、可行的。根据实验确定的 I 和 G 值,建立了标准的分型结果评价标准和质量控制方法。

3.2 磁性颗粒微阵列牢固度实验

磁性颗粒能够通过磁场作用牢固地固定在载玻片表面,而在杂交或洗涤过程脱落,是构建磁性颗粒微阵列的技术基础。将捕获有荧光探针的金磁颗粒固定在载玻片上,通过观察洗涤前后荧光强度的变化确定磁性颗粒微阵列的牢固度。图 2A 为洗涤前后颗粒微阵列的扫描图,洗涤前后各个点样点无明显变化。而图 2B 显示,洗涤后各点荧光强度略有下降,信号下降幅度不超过 8%。此结果表明,金磁颗粒能够比较牢固地固定在载玻片表面,在洗涤过程中不会脱离,因此利用磁性颗粒微阵列进行核酸检测的方法是可行的。

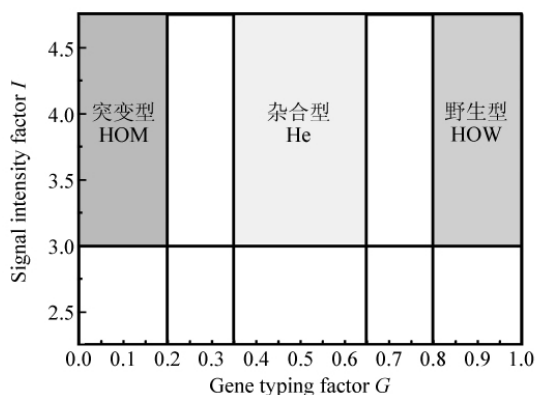


图 1 SNP 分型结果的质量检测标准

Fig. 1 Quality detection standard of single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping results

3.3 不对称扩增

3.3.1 引物比例对扩增单链 DNA 的影响 在优化不对称扩增单链产物的过程中,根据双链 PCR 产物扩增条件,首先固定生物素标记下游引物的加入量,通过选择上游引物加入量来优化引物比例。即将 10 $\mu\text{mol/L}$ 生物素标记的下游引物的量固定为 1 μL ,上游引物浓度分别为 10, 5, 2.5, 1 和 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 。图 3 为对 MTHFR 基因 C677T 位点已确定基因型的野生型样本根据不同的条件进行不对称 PCR 扩增,直接将产生的单链 PCR 产物构建磁性颗粒微阵列,完成杂交后的扫描结果。从图 3b 可见,当上游引物浓度与生物素标记的下游引物的浓度比为 1:1 时,杂交后的扫描信号强度很弱,接近于背景值。随着两者浓度比的增大,信号逐渐增强,当两者的浓度比为 1:4 时,信号最强,该样本的 Cy3 的相对荧光信号强度值为 8249.23, Cy5 的相对荧光强度为 894.36, 正错配信号比为 9.22。实验表明,单链 PCR 产物扩增时的最佳条件为:限制性引物与非限制性引物(即上游引物浓度与生物素标记的下游引物)浓度的比为 1:4。

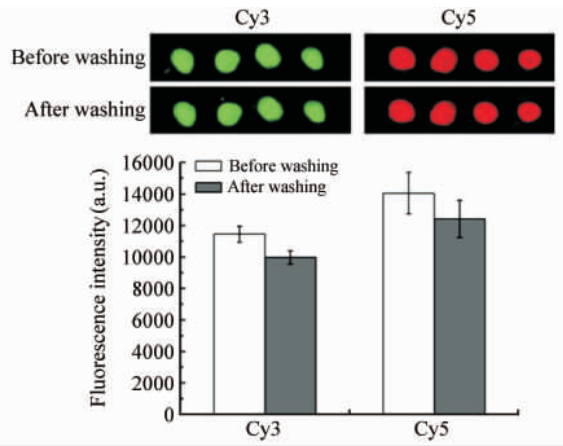


图 2 磁性颗粒微阵列的牢固性

Fig. 2 Immobility assay of magnetic bead array

A. Fluorescence images before and after washing;

B. Relative fluorescence intensities before and after washing.

的最佳条件为:限制性引物与非限制性引物(即上游引物浓度与生物素标记的下游引物)浓度的比为 1:4。

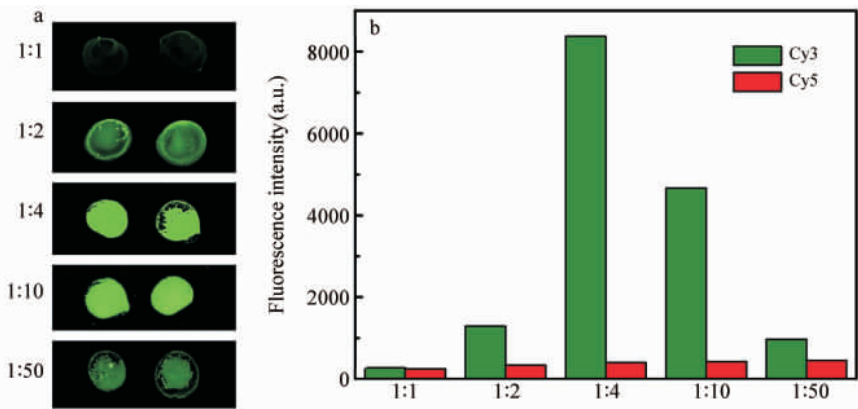


图 3 引物比例对野生型样本扩增单链 DNA 后进行分型的影响

Fig. 3 Effect of primer proportion on SNP genotyping after asymmetry PCR

3.3.2 引物浓度对扩增单链 DNA 的影响 不对称 PCR 扩增中,影响单链 PCR 产物产量的各种因素中,除引物比例,引物的浓度也是一个重要因素。引物浓度太低,单链产物的产量过低不能满足分型要求;引物浓度过高,则会增加反应成本,同时还可能抑制 PCR 扩增。由于扩增后利用链亲和素-金磁纳米颗粒对 PCR 产物进行捕获时,过多生物素标记的引物会影响金磁纳米颗粒对生物素标记的 PCR 产物的捕获效率,因此在追求高的检测信号并同时均衡成本的情况下,比较了 10 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物组合,2.5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物组合。将两组浓度组合扩增后的单链 DNA 直接用于杂交分型,扫描结果如图 4 所示。来自每个样本的信号重复点样 4 次,通过对 5 个样本进行分型比较发现,使用高浓度引物时能够获得更高强的杂交信号($S_1 \sim S_5$),比低浓度引物所获得杂交信号($S'_1 \sim S'_5$)高 50% 以上。根据条件优化的结果,在扩增单链 PCR 产物时,上下游引物浓度最终分别选择为 10 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.4 SNP 分型

利用基于磁性颗粒微阵列和双色荧光杂交的 SNP 分型方法,对来自 24 个不同样本的 C677T 位点的多态性进行了检测。图 5A 是 C677T 位点 24 个样本的分型结果的荧光信号扫描图,每个样本重复点样 2 次,分型结果显示出很好的信号重复性。根据扫描结果可以非常简单、直观地区分出样本的 3 种基因型。图 5B 是根据这 24 个样本的相对荧光强度值计算其信号强度因子 I 与基因分型因子 G 所得的分型结果散点图,根据 SNP 分型结果判定标准,各个分型样本的 $I > 3$,因此 24 个样本的分型信号在强度

上有意义。对于 C677T 位点, 24 个样本中, 13 个样本扫描结果为绿色; 3 个样本呈红色; 8 个样本呈黄色。扫描结果为“绿色”信号的样本的 $G > 0.8$, 表明来自这 13 个样本的 PCR 产物仅与 Cy3 标记的 677CC 野生纯合型探针杂交, 为 677CC 野生纯合型; 3 个呈“红色”信号的样本的 $G < 0.2$, 表明来自这 3 个样本的 PCR 产物仅与 Cy5 标记的 677TT 突变纯合型探针杂交, 为 677TT 突变型。8 个样本呈“黄色”信号, 其 $G = 0.35 \sim 0.65$, 说明该样本不仅能与 Cy3 标记的 677CC 野生型探针杂交, 还能与 Cy5 标记 677TT 的突变型探针杂交, 经过颜色“叠加”, 最终显示为“黄色”的 677CT 杂合型。

由于某些靠物理吸附制备的链亲和素金磁颗粒在高温条件下的稳定性很差, 无法满足后续实验中高温变性的要求。而目前的商业化自动工作站中加热模块的设计, 由于绝大部分没有热盖的设计, 温控很难达到 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的高温, 这都使得双链 PCR 变性成单链产物这一步骤成为了推广该方法的瓶颈。本研究利用不对称 PCR 直接扩增单链 DNA, 并且通过优化

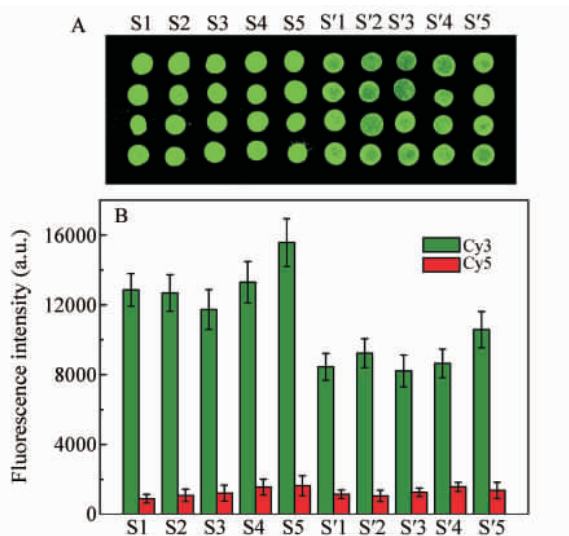


图 4 引物浓度对野生型样本扩增单链 DNA 后进行分型的影响

Fig. 4 Effect of primer concentration on SNP genotyping of five samples after asymmetry PCR

A. Preparation of scanning results; B. Comparison of relative fluorescence intensities.

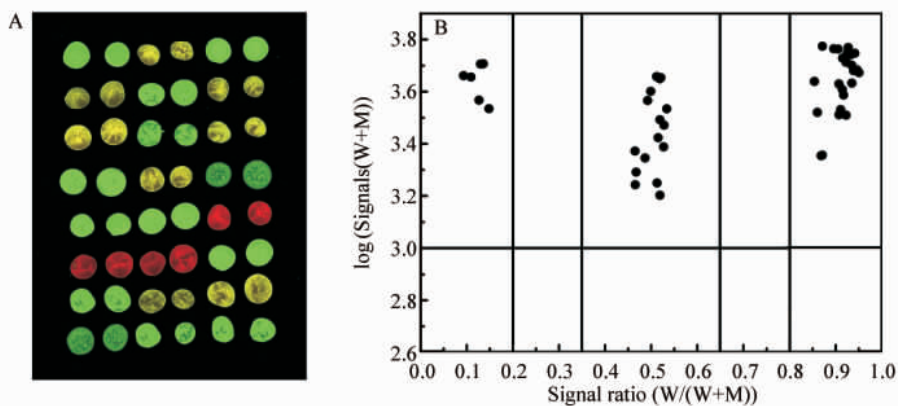


图 5 基于磁性颗粒微阵列与双色荧光杂交的 C677T 位点 24 个样本分型结果

Fig. 5 Results of SNP detection of 24 samples based on bead array and dual-color hybridization assayed for C677T locus. (A) Fluorescence images of microarray; (B) All spots were measured for Cy3 and Cy5 fluorescence intensities to generate a scatter plot

PCR 产物的引物比例和浓度得到了理想的分型结果。由于避免了热变性的步骤, 使得本方法能够适用于大多数商业化链亲和素金磁颗粒与自动化工作站平台, 扩展了本方法的应用范围。

References

- 1 Fan J B, Chee M S, Gunderson K L. *Nat. Rev. Genet.* , 2006 , 7(8) : 632 ~ 644
- 2 Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvänen A C. *Genome Res.* , 2000 , 10(7) : 1031 ~ 1042
- 3 ZHANG Xiao-Yan(张晓燕), ZUO Ming-Xue(左明雪), ZHANG Zhan-Jun(张占军), WANG Zhong(王忠), LI Yao(李瑶). *China Biotechnology(中国生物工程杂志)* , 2005 , 25(11) : 52 ~ 56
- 4 Schena M, Heller R A, Theriault T P, Konrad K, Lachenmeier E, Davis R W. *Trends Biotechnology* , 1998 , 16(7) : 301 ~ 306
- 5 Dieh F, Beckmann B, Kellner N, Hauser N C, Diehl S, Hoheisel J D. *Nucleic Acids Res.* , 2002 , 30(16) : e79

- 6 WANG Feng-Hua(王凤华), LIU Jun(刘俊), TONG Chun-Yi(童春义), WANG Qi-Ming(汪启明), TANG Dong-Ying(唐冬英), YI Long(易龙), WANG Ling-Ling(王玲玲), LIU Xuan-Ming(刘选明). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2010**, 38(5): 617 ~ 621
- 7 Saiyed Z M, Bochiwal C, Gorasia H, Telang S D, Ramchand C N. *Analytic Biochemistry*, **2006**, 356(2): 306 ~ 308
- 8 ZHANG Zhi-Chao(张志超), YUAN Cui(袁翠), WAN Qian-Hong(万谦宏). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(1): 31 ~ 36
- 9 LIU Ya-Ling(柳亚玲), JIA Li(贾丽), XING Da(邢达). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(8): 1225 ~ 1232
- 10 Zhou H J, Xing D, Zhu D B, Zhou X M. *Talanta*, **2009**, 78(4-5): 1253 ~ 1258
- 11 Yoshino T, Tanaka T, Takeyama H, Matsunaga T. *Biosensors and Bioelectronics*, **2003**, 18(5-6): 661 ~ 666
- 12 Lien K Y, Liu C J, Lin Y C, Kuo P L, Lee G B. *Microfluid Nanofluid*, **2009**, 6(4): 539 ~ 555
- 13 Nakagawa T, Hashimoto R, Maruyama K, Tanaka T, Takeyama H, Matsunaga T. *Biotechnol. Bioeng.*, **2006**, 94(5): 862 ~ 868
- 14 Li S, Liu H N, Wang Z F, Hou P, Guo Y F, He Q G, He N Y. *Anal. Biochem.*, **2006**, 359(2): 277 ~ 279
- 15 Liu H N, Li S, Wang Z F, Ji M J, Nie L B, He N Y. *Journal of Biotechnology*, **2007**, 131(3): 217 ~ 222
- 16 Takuya K, Satoshi S, Yoshiteru M, Yohei O, Takashi N, Kenji O, Takao A Y. *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293(1): 106 ~ 110

Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Based on Magnetic Bead Array and Dual-color Hybridization

LIU Hong-Na¹, LI Song^{1,2}, LIU Li-Shang², TIAN Lan¹, JIA Ying-Ying¹, LI Zhi-Yang²,
DENG Yan^{1,2}, HE Nong-Yue^{*1,2}

¹(State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096)

²(Hunan Key Laboratory of Green Packaging and Application of Biological Nanotechnology,
Hunan University of Technology, Zhuzhou 412008)

Abstract An approach to fabricate magnetic bead array using gold coated magnetic nanoparticles was developed. Single strand DNAs (ssDNA) obtained using asymmetry PCR were captured on gold coated magnetic nanoparticles (SA-GMNPs) modified with streptavidin. The GMNPs-ssDNA mixtures were spotted onto a clean glass slide adhered with a magnet to fabricate a bead array, and then interrogated by hybridization with a pair of dual-color probes to determine single nucleotide polymorphism (SNP). The genotype of each sample can be simultaneously identified on the surface of GMNPs by scanning the microarray. The amplification factors were optimized to obtain ssDNA directly by use of polymerase chain reaction (PCR). In this method, the genotyping results were obtained from 24 different samples analyzed for C677T loci. The method described here is simple and easily to be automated, which is suitable for molecular diagnostics and forensic analysis.

Keywords Magnetic bead array; Asymmetry polymerase chain reaction; Dual-color hybridization; Single nucleotide polymorphism type

(Received 25 February 2010; accepted 5 June 2010)