

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00219

多重等位基因特异性扩增——微流控芯片电泳法同时测定多个单核苷酸多态性位点

汪维鹏^{1,2}, 周国华^{1,3}

1. 华东医学生物技术研究所, 南京 210002;
2. 苏州大学药学院药物分析教研室, 苏州 215123;
3. 南京大学医学院, 南京 210093

摘要: 文章以微流控芯片电泳为检测平台, 建立了一种基于 DNA 适配器连接介导的多重等位基因特异性扩增同时测定多个单核苷酸多态性(SNP)位点的方法。以白细胞介素 1 β (*IL1B*)基因中的 7 个 SNP 位点(794C>T、1274C>T、2143T>C、2766T>del、3298G>A、5200G>A 和 5277C>T)为检测对象, 通过 PCR 预扩增得一段含该 7 个待测 SNP 位点的长片段; 用限制性内切酶 *Mbo* 将其消化成短片段, 再与 DNA 适配器(adapter)相连; 以连接产物为模板, 在两管中分别用 7 条等位基因特异性引物和一条公用引物进行 7 重等位基因特异性扩增; 最后用微流控芯片电泳法分离等位基因特异性扩增产物, 根据两管扩增产物的芯片电泳图谱中扩增片段的大小判断 SNP 的类型。采用本法成功测定了 48 名健康中国人的 *IL1B* 基因上的 7 个 SNP 位点, 与聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)和测序法测定结果完全一致。本法结果准确, 可用于同时测定多个 SNP 位点; 以微流控芯片电泳作为检测平台, 分析速度快, 样品需要量少; 借助于自制筛分凝胶和重复使用芯片, 使得 SNP 分析成本大大降低。

关键词: 单核苷酸多态性; 等位基因特异性扩增; 微流控芯片电泳; 白细胞介素 1 β 基因

Microchip electrophoresis coupled with multiplex allele-specific amplification for typing multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) simultaneously

WANG Wei-Peng^{1,2}, ZHOU Guo-Hua^{1,3}

1. Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnology, Nanjing 210002, China;
2. School of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China;
3. Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: A new method of DNA adapter ligation-mediated allele-specific amplification (ALM-ASA) was developed for typing multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the platform of microchip electrophoresis. Using seven SNPs of 794C>T, 1274C>T, 2143T>C, 2766T>del, 3298G>A, 5200G>A, and 5277C>T in the interleukin 1B (*IL1B*) gene as a target object, a long DNA fragment containing the seven SNPs of interest was pre-amplified to enhance the specificity. The

收稿日期: 2008-05-14; 修回日期: 2008-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30270368)资助

作者简介: 汪维鹏(1980-), 男, 博士, 研究方向: 分子遗传学。Tel/Fax: 0512-65880028; E-mail: wangweipeng@suda.edu.cn

通讯作者: 周国华(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 025-84514223, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

pre-amplified DNA fragment was digested by a restriction endonuclease to form sticky ends; and then the adapter was ligated to either end of the digested fragment. Using the adapter-ligated fragments as templates, a 7-plex allele-specific amplification was performed by 7 allele-specific primers and a universal primer in one tube. The allele-specific products amplified were separated by chip electrophoresis and the types of SNPs were easily discriminated by the product sizes. The seven SNPs in *IL1B* gene in 48 healthy Chinese were successfully typed by microchip electrophoresis and the results coincided with those by PCR-restriction fragment length polymorphism and sequencing method. The method established was accurate and can be used to type multiple SNPs simultaneously. In combination with microchip electrophoresis for readout, ALM-ASA assay can be used for fast SNP detection with a small amount of sample. Using self-prepared gel matrix and reused chips for analysis, the SNP can be typed at an ultra low cost.

Keywords: single nucleotide polymorphism; allele-specific amplification; microchip electrophoresis; interleukin 1B gene

SNP 是决定人类疾病易感性^[1]和药物反应差异性^[2]的主要因素; 具有数量庞大、易于批量检测、分布广和遗传稳定等特点; 作为第三代遗传标记, 显示出了广阔的应用前景。它对群体遗传学、制药业、癌症及遗传性疾病发生机制研究、法医学甚至进化的研究都将产生不可估量的影响。因此, 在后基因组计划中, 尤其是国际人类基因组单体型图计划(HapMap)的启动, 使得单核苷酸多态性(SNP)的分析检测成为各国政府重点投资和关注的项目之一。由于 SNP 的数量极其庞大, 发展一种高通量、快速和低成本的方法十分必要。目前报道的 SNP 检测方法有很多^[3,4], 可分为两个部分: 获取待测产物和检测分析。其中获取待测产物的途径主要基于引物延伸反应^[5]、内切酶酶切反应^[6]、连接酶酶连反应^[7]、或者杂交^[8]等; 检测平台包括电泳^[5]、荧光检测器^[8]和质谱仪^[9]等。我们建立了一种基于 DNA 适配器连接介导的等位基因特异性扩增法(Adapter ligation-mediated allele-specific amplification, 简称 ALM-ASA 法)^[5]用于同时测定多个 SNP 位点。该方法包括 PCR 预扩增、限制性内切酶消化、连接酶连接反应、等位基因特异性扩增、以及凝胶电泳或者微流控芯片电泳分离检测等位基因特异性扩增产物这 5 个步骤, 具有准确、快速和检测成本低等优点。常规凝胶电泳操作繁琐、耗时长, 且检测通量受到限制。近年来, 以毛细管电泳为核心技术、以芯片为操作平台的微流控芯片电泳技术迅速崛起, 并成为分析化学的主流技术之一。很多商品化的芯片分析仪及其检测试剂盒纷纷面世, 如 Agilent 公司的 Agilent 2100 Bioanalyzer。但是, 商品化仪器和配套

试剂盒都非常昂贵, 使其在中小型实验室的应用受到限制。本文以 *IL1B* 基因中的 7 个 SNP 位点(794C>T、1274C>T、2143T>C、2766T>del、3298G>A、5200G>A 和 5277C>T)为检测对象, 以 Agilent 2100 Bioanalyzer 为检测平台, 通过重复使用芯片和采用自行配制的分离介质代替 DNA1000 试剂盒中的分离凝胶进行 DNA 样品的分离检测, 建立一种 ALM-ASA 法同时测定多个 SNP 位点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器

*LA Taq*TM DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Mbo*、T4 DNA 连接酶和 *φX174-Hae* digest DNA marker(TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.); dNTPs(Promega, Madison, USA); 引物(Invitrogen Inc., Shanghai, PAGE 级); 琼脂糖(OXOID Ltd., Hampshire, England); Tris 碱和溴化乙锭(EB)均为上海 Sangon 生物公司产品; HPMC-50(Aldrich, Milwaukee, WI, USA); To-pro-3 荧光染料(Molecular Probes, Eugene, OR, USA); 盐酸、醋酸、硼酸和 EDTA(分析纯, 南京化学试剂一厂)。

Gene Spec 型微量基因光谱测定仪(Naka Instruments, Co., Ltd., Tokyo, Japan); PTC-225 型 PCR 仪(MJ Research, Inc., Massachusetts, USA); POWER PAC1000 型电泳仪(Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); GeneGenius 凝胶成像系统(SYNGENE, Co., Ltd., Cambridge, UK); Agilent 2100 BioAnalyzer 及

DNA1000 检测试剂盒(Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany)。

1.1.2 DNA 样品

取 48 名健康受试者的 EDTA 抗凝全血 1 mL, 按改进的酚/氯仿抽提法提取 DNA, 用 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA)50 μ L 溶解, 并用微量基因光谱测定仪测定其纯度和浓度, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 方法

1.2.1 PCR 预扩增

采用 PCR 预扩增一段包含 7 个待测 SNP 位点(794C>T、1274C>T、2143T>C、2766T>del、3298G>A、5200G>A 和 5277C>T)的长度为 4 610 bp 的片段。5 μ L PCR 反应体系中含有引物 5'-ACCCTGCATACC GTATGTTCTCTGC-3' 和 5'-GTACAGGTGCATCGT GCACATAAGC-3' 各 0.4 μ mol/L, dNTP 0.4 mmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, 0.25 U LA *Taq* DNA 聚合酶及 10~20 ng DNA 模板。在 PCR 扩增仪上进行 PCR 扩增。热循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后以 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 扩增 15 个循环; 最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 使反应完全。反应完成后, 取 3 μ L 反应产物在 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳(1 \times TAE 电泳缓冲液, 15 V/cm 恒压电泳 5 min), 凝胶成像系统拍摄电泳图谱。

1.2.2 酶切与酶连反应

在 PCR 预扩增反应管中(PCR 产物约为 2 μ L)加入 1 U *Mbo* 内切酶, 反应缓冲液(10 倍)0.5 μ L,

加水至 5 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温反应 15 min。将反应液在 70 $^{\circ}$ C 保温 15 min, 使内切酶失活。在酶切液中加入 DNA 适配器 25 pmol, 反应缓冲液(10 倍)2.5 μ L, T4 DNA 连接酶 1 U, 加水至 25 μ L, 16 $^{\circ}$ C 水浴中保温反应 15 min 后取出 4 $^{\circ}$ C 保存。DNA 适配器由 5'-CCCCACTTCTTGTCTCTCATCAGGCGC ATCACTCG-3' 和 5'-pGATCCGAGTGATGCGCTAA G-3' 复性形成, 其中黑体部分序列与公用引物(Pu)序列相同, 下划线部分为互补的 12 个碱基。

1.2.3 多重等位基因特异性扩增

10 μ L 反应体系中含特异性引物混合物(野生型引物混合物或突变型引物混合物, 见表 1)共 20 pmol, 10 pmol 公用引物 Pu(5'-CCCCACTTCTTGTCTCTCAT-3'), 反应缓冲液(10 倍)1.0 μ L, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶及 2.0 μ L 酶连产物, 其中 dNTP 和 MgCl₂ 的浓度分别为 0.2 mmol/L 和 1.5 mmol/L。热循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 扩增 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 使反应完全。

1.6 微流控芯片电泳

采用 Agilent 2100 BioAnalyzer 分离检测多重等位基因特异性扩增产物, 借助于芯片适配器将分离介质从凝胶池压入芯片微通道内, 分离介质为 3.0% HPMC-50 的 1 \times TBE 溶液, 其中含 1 μ mol/L To-pro-3; 在样品废液池和缓冲液废液池中分别加入 9 μ L 分离介质, 在每个样品池中加入 5 μ L 1 \times TBE 和 1 μ L 扩增产物, 在 Ladder 池中加入 5 μ L 分离介质和 1 μ L ϕ X174-*Hae* digest DNA marker(5 ng/ μ L); 然后按

表 1 SNP 和等位基因特异引物

SNP ¹⁾	SNP ID	引物名	引物序列(5'-3') ²⁾	T _m ($^{\circ}$ C) ³⁾	产物长度	浓度
794C>T	rs16944	794C (T)	TGCAATTGACAGAGAGCTgCC(T)	55.6(55.6)	1005	0.111
1274C>T	rs1143627	1274C (T)	CTACTTCTGCTTTTGAAAGCC(T)	53.7(51.7)	525	0.111
2143T>C	rs1143629	2143T (C)	AGGCAAATGGGGAGAAAAcAT(C)	55.6(57.6)	164	0.444
2766T>del	rs3917354	2766T (d)	TTCCTACTATGAAATGGGcAA(C)	51.7(53.7)	576(575)	0.888
3298G>A	rs3917356	3298G (A)	CCAGAGAAAAGTGGCTGCaTC(T)	57.6(57.6)	268	0.222
5200G>A	rs1143633	5200G (A)	GCAGGCCTCGTGAGGCGaTGC(T)	65.4(63.4)	357	0.185
5277C>T	rs1143634	5277C (T)	GCCTCGTTATCCCATGTGaCG(A)	59.5(57.6)	434	0.037

1) SNP 位点的位置以 *IL1B* 基因序列(GenBank 登录号为 AY137079)的第一个碱基开始计算;

2) 3 端的黑体大写字母为等位基因特异性碱基; 小写字母为错配碱基;

3) 括号内为突变型特异性引物的 T_m 值。

照标准操作规程进行。电泳结束后,立即用芯片适配器将芯片通道内的筛分介质压出,约需 5 min 时间;然后在凝胶池中加入 10 μL 超滤蒸馏水($\phi 0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤),用芯片适配器将蒸馏水从芯片通道内压出,约需 2.5 min 时间;检查每个液池里是否有气泡产生,如果都有则说明通道没有堵塞;如此反复冲洗 10 次;晾干备用。

2 结果与讨论

2.1 微流控芯片电泳分离 DNA marker

Agilent 2100 Bioanalyzer 可用于 DNA、RNA 和蛋白质的定性定量分析。其配套的用于常规 PCR 产物分析的试剂盒为 DNA1000 试剂盒,包括芯片、分离凝胶、荧光染料、DNA 1000 Ladder (25/50/100/150/200/300/400/500/700/850/1 000 bp)和 DNA 1000 Markers (15/1 500 bp)。该试剂盒价格昂贵。为了降低检测成本,我们用超滤蒸馏水多次冲洗芯片通道,使芯片能重复使用。采用 DNA 1000 试剂盒配套的凝胶作为筛分介质,分别在新芯片和回收芯片上对 $\phi\text{X174-Hae}$ digest DNA marker (5 ng/ μL)进行分离,

结果如图 1b 和图 1c 所示。图中 11 个 DNA 片段均得到很好分离;与新芯片相比,回收芯片具有相同的分离效率。但用回收芯片进行分离检测时,出现了一些尖锐的杂峰,可能是由通道内壁产生的气泡所导致。这种杂峰形状与样品峰形状明显不同,所以可以清楚的将其分辨出。然而,如果杂峰与样品峰重叠时,将会干扰样品峰的判断。如果出现这种情况,需要重新进行检测。多次重复使用芯片分离检测结果表明,芯片重复使用次数少于 10 次时,出现杂峰的几率小于 5%,而且分离效果保持一致。由于 ALM-ASA 法是根据扩增产物中特异性扩增 DNA 片段的长度大小来判断 SNP 的基因型,所以只需比较电泳图谱中相对位置处是否出现特异性扩增 DNA 片段的峰。本研究中根据在回收芯片上分离检测获得的电泳图谱可以准确获得 SNP 的基因型。

2.2 芯片电泳分离介质浓度的优化

Agilent 2100 Bioanalyzer 是基于激光诱导荧光原理进行信号检测的,其激发光波长为 635 nm。我们选择 To-pro-3 作为荧光染料加入筛分介质,其浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$;选择 HPMC-50 的 1 \times TBE 溶液作为

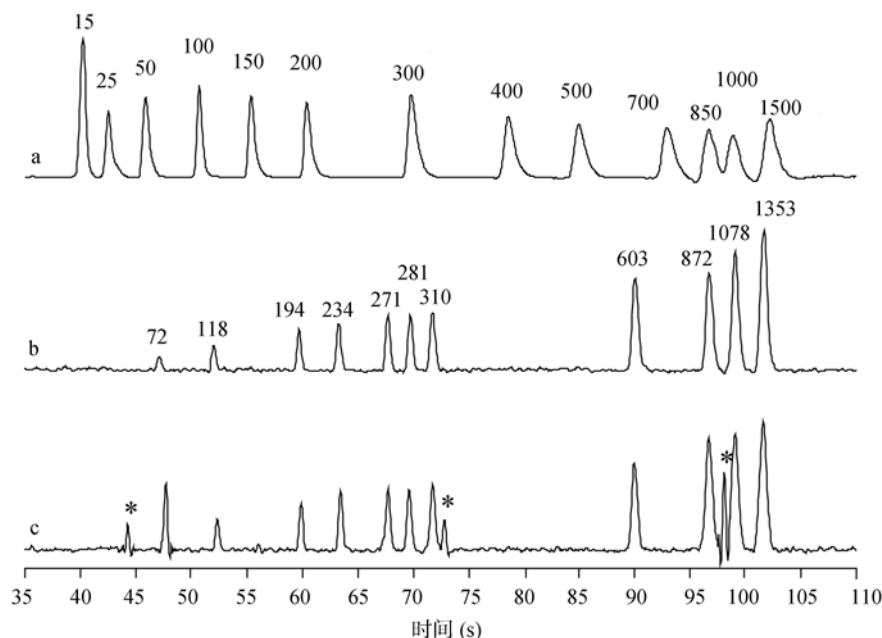


图 1 DNA marker 的芯片电泳图

筛分介质为 DNA 1000 试剂盒配套凝胶。a: DNA 1000 Ladder 在新芯片上的分离结果; b 和 c: 分别为 $\phi\text{X174-HaeIII}$ digest DNA marker 在新芯片和回收芯片上的分离结果。峰上方数字表示峰所对应的片段长度;“*”表示杂峰。

筛分介质分离 ϕ X174-*Hae* digest DNA marker, 并对 HPMC-50 的浓度进行了优化, 结果如图 2 所示。由于 Agilent 2100 Bioanalyzer 的分离程序是固定的, 包括进样电压和时间、分离电压和时间, 而且是从分离 35 s 之后开始检测荧光信号的, 当采用 1.0% 或 1.5% HPMC-50(1×TBE) 作为筛分介质对 ϕ X174-*Hae* digest DNA marker 进行分离时, 分别检测到 6 和 9 个信号峰, 电泳速度较快的短片段 DNA 未能被检测到, 而且 271 bp 和 281 bp 两条 DNA 片段未能得到分离; 采用 2.0% HPMC-50(1×TBE) 作为筛分介质时能检测到 11 个信号峰, 但 271 bp 和 281 bp 两条 DNA 片段未能实现分离; 当采用 3.0% HPMC-50(1×TBE) 作为筛分介质时, 11 个 DNA 片段得到完全分离。该结果表明含 1 μ mol/L To-pro-3 的 3.0% HPMC-50 的 1×TBE 溶液作为分离介质, 在 Agilent 2100 Bioanalyzer 设定的 DNA 1000 分离条件下可以进行常规 PCR 扩增产物的分离检测。

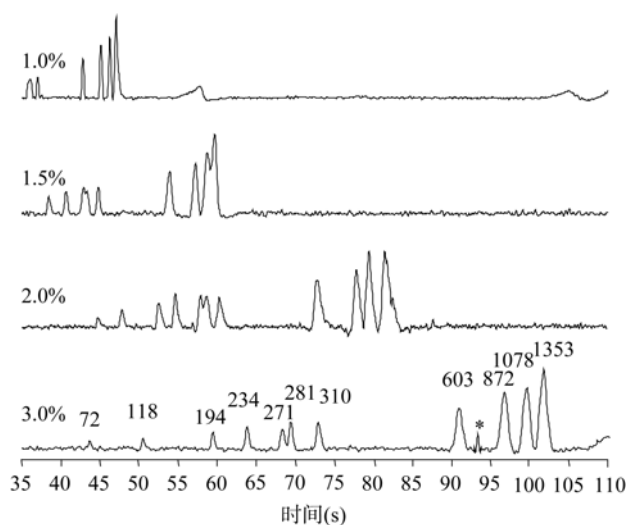


图2 在回收芯片上分离检测 ϕ X174-*Hae*III digest DNA marker 的芯片电泳图
筛分介质中 HPMC-50 的浓度分别为 1.0%、1.5%、2.0% 和 3.0%。峰上方数字表示峰所对应的片段长度; “*” 表示杂峰。

2.3 七重等位基因特异性扩增法的建立

等位基因特异性引物的延伸特异性决定了 SNP 检测结果的准确性, 所以首先需要对每条等位基因特异性引物的特异性进行考察。为了同时考察每对特异性引物的延伸特异性, 选择基因型为野生型纯合子或突变型纯合子的基因组 DNA 作为模板, 分别

用一条特异性引物和公用引物进行单重等位基因特异性扩增。如果一条等位基因特异性引物的扩增产物在电泳图上表现为一条长度正确的特异性扩增条带且无杂带, 则说明该引物的特异性很好。有的等位基因频率很低, 当检测样本数较少时, 找不到突变型纯合子的基因组 DNA 模板。为此采用文献报道的方法制备了“仿制”模板^[10], 即用突变型特异性引物和公用引物在低复性温度下进行扩增, 产物用于研究野生型特异性引物的延伸特异性。对 7 对等位基因特异性引物分别进行单重等位基因特异性扩增, 结果表明各条特异性引物的扩增效率和特异性都很好; 然后将 7 条野生型特异性引物和 7 条突变型特异性引物分别等量混合后与公用引物进行七重 PCR 扩增, 结果出现不均衡扩增; 根据各扩增条带的亮度, 通过调整特异性引物的浓度, 得到了各条特异性条带亮度相近的 7 重特异性扩增结果, 如图 3 所示。通过比较图谱中 W 和 M 很容易得到正确的基因型。

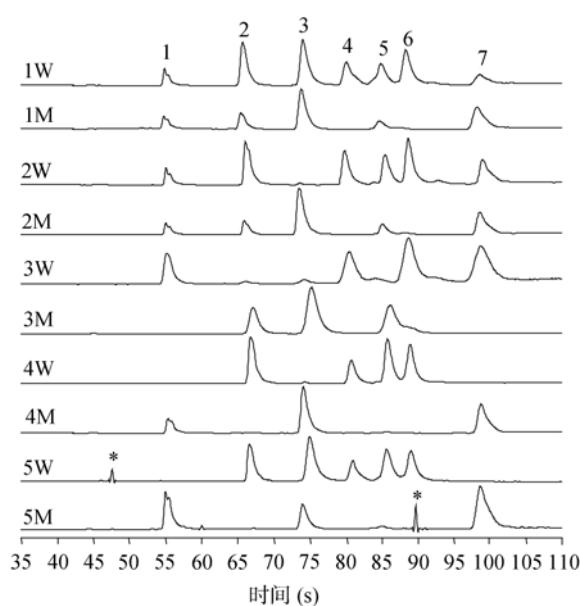


图3 5个典型基因组 DNA 样本的芯片电泳图

图谱 W 和 M 分别表示各样本的野生型和突变型测定结果; 峰 1~7 所对应的 SNP 位点分别 2143T>C、3298G>A、5200G>A、5277C>T、1274C>T、2766T>del 和 794C>T; “*” 表示杂峰。

2.4 样本测定

采用建立的 7 重 ALM-ASA 法测定了 48 名健康中国人的 *IL1B* 基因中的 7 个 SNP 位点, 即 794C>T、1274C>T、2143T>C、2766T>del、3298G>A、5200G>A

和 5277C>T。其中 5 个典型样本的测定结果如图 3 所示, 通过比较同一样本在图谱 W(wild-type)和图谱 M(mutant)中的出峰情况, 可以快速判断等位基因的类型。*IL1B* 基因中的 7 个 SNP 位点的基因型和突变型等位基因频率分布见表 2, 与 HapMap 报道的

这 7 个 SNP 位点在中国人群中的频率一致 (<http://www.hapmap.org/index.html.en>)。为了验证方法的准确性, 随机选出 15 个样本, 采用 PCR-RFLP 法和测序技术进行检测。结果表明, ALM-ASA 法测定结果与 PCR-RFLP 法和测序法测定结果完全一致。

表 2 基因型和等位基因频率分布

SNP	<i>n</i> (基因型频率, %)			突变型等位基因频率	
	野生型纯合子	杂合子	突变型纯合子	HapMap (<i>n</i> =45)	本课题(<i>n</i> =48)
794C>T	15 (31.2)	19 (39.6)	14 (29.2)	47.7	49.0
1274C>T	12 (25.0)	22 (45.8)	14 (29.2)	53.3	52.1
2143T>C	14 (29.2)	22 (45.8)	12 (25.0)	48.0	47.9
2766T>del	47 (97.9)	1 (2.1)	0 (0)	—	1.0
3298G>A	10 (20.8)	24 (50.0)	14 (29.2)	51.1	54.2
5200G>A	10 (20.8)	26 (54.2)	12 (25.0)	53.3	52.1
5277C>T	46 (95.8)	2 (4.2)	0 (0)	2.2	2.1

3 结 论

本文成功建立了基于 DNA 适配器连接介导的多重等位基因特异性扩增法, 并用于七重 SNP 的快速测定。由于采用 *n*+1 条引物进行 *n* 重等位基因特异性扩增, 极大减少了多重 PCR 扩增中出现的引物相互作用等问题, 具有很好的特异性。以商品化的 Agilent 2100 Bioanalyzer 作为检测平台, 具有样品用量少, 分辨率高, 分析速度快和自动化程度高等优点。此外, 通过清洗使用过的芯片, 可以重复利用回收芯片进行 DNA 分离检测, 而且分离效率并不降低; 每块芯片可重复使用至少 10 次。该方法可以用于同时检测多个 SNP, 不需对芯片通道进行任何修饰, 也不需对 PCR 产物进行纯化处理, 只需采用含荧光染料 To-pro-3 的 3.0% HPMC-50 的 1×TBE 溶液作为筛分介质就能取得满意的分离效果, 使得检测成本大大降低。以 Agilent 2100 Bioanalyzer 为检测平台, ALM-ASA 法可用于大规模 SNP 的快速测定。

参考文献(References):

- [1] Brown PO, Hartwell L. Genomics and human disease - variations on variation. *Nat Genet*, 1998, 18(2): 91–93. [\[DOI\]](#)
- [2] Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 1999, 286(5439): 487–491. [\[DOI\]](#)
- [3] 汪维鹏, 倪坤仪, 周国华. 单核苷酸多态性检测方法的
- 研究进展. *遗传*, 2006, 28(1): 117–126.
- [4] Wang L, Luhm R, Lei M. SNP and mutation analysis. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 593: 105–116. [\[DOI\]](#)
- [5] Wang WP, Ni KY, Zhou GH. Multiplex single nucleotide polymorphism genotyping by adapter ligation-mediated allele-specific amplification. *Anal Biochem*, 2006, 355(2): 240–248. [\[DOI\]](#)
- [6] Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc*, 2007, 2(11): 2857–2864. [\[DOI\]](#)
- [7] Li Y, Wark AW, Lee HJ, Corn RM. Single-nucleotide polymorphism genotyping by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging measurements of surface ligation reactions. *Anal Chem*, 2006, 78(9): 3158–3164. [\[DOI\]](#)
- [8] Jackson EM, Shaikh TH, Gururangan S, Jones MC, Malkin D, Nikkel SM, Zuppan CW, Wainwright LM, Zhang F, Biegel JA. High-density single nucleotide polymorphism array analysis in patients with germline deletions of 22q11.2 and malignant rhabdoid tumor. *Hum Genet*, 2007, 122(2): 117–127. [\[DOI\]](#)
- [9] Birikh KR, Korshun VA, Bernad PL, Malakhov AD, Milner N, Khan S, Southern EM, Shchepinov MS. Novel mass tags for single nucleotide polymorphism detection. *Anal Chem*, 2008, 80(7): 2342–2350. [\[DOI\]](#)
- [10] Roberts R, Joyce P, Kennedy MA. Rapid and comprehensive determination of cytochrome P450 CYP2D6 poor metabolizer genotypes by multiplex polymerase chain reaction. *Hum Mutat*, 2000, 16(1): 77–85. [\[DOI\]](#)