

SNP Genotyping with Fluorescence Polarization Detection

Pui-Yan Kwok, HUMAN MUTATION 19:315-323 (2002)

Abstract

형광 물질이 평면의 편광빛에 의해 자극을 받게 되면, 방출되는 형광 또한 편광이 된다. 온도와 용매의 점성이 일정한 조건 하에서, 형광 편광 (Fluorescence Polarization: FP)의 정도는 형광 분자의 분자량에 비례한다. 따라서, 형광물질의 편광 정도를 모니터링함으로써, 분리나 정제 과정없이 누구나 쉽게 분자량의 유의한 변화를 측정할 수 있다. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping reaction 의 많은 과정 도중에 probe 의 크기가 바뀔 수 있기 때문에 이와 같은 assay의 측정 형태로서 형광 편광은 매우 훌륭한 측정법이다. 실제로, 형광 편광 측정법은 primer extension TaqMan[®]과 Invader[®] assays 와 함께 SNP genotyping 에 사용되기도 한다. 형광 편광 측정을 이용하게 되면, fluorescence quenching 할 필요가 없어지므로 TaqMan[®] 과 Invader[®] probe 에 대한 비용을 절감할 수 있다. 더욱이 primer extension 반응에 있어, 싸고 정제되지 않고 레이블링이 되지 않은 probe 를 이용할 수 있다. 측정값을 나타내는 기작으로써, 형광 편광 측정은 HTS 용 SNP genotyping 에 아주 적당한 방법이다.

Introduction

개체의 돌연변이나 유전자형을 효과적이면서 명백하게 밝히는 기술은 Molecular diagnostics, clinical genetic testing, population genetics, 그리고 agricultural biotechnology 분야에 응용되고 있다. Single nucleotide variation 을 대량으로 genotyping 하는 방법은 differential hybridization, primer extension, ligation, 그리고 allele-specific probe cleavage 등에 의한 대립유전자간 식별에 이용되고 있다 [Kwok, 2001]. 이러한 대립유전자 식별 메커니즘을 기본으로 하는 homogeneous assay 는 reagent가 product 로 변할 때, 수용액에서 분리나 정제과정 없이 물리적인 변화를 모니터링 함으로써 수행된다. 실제로, 형광 편광 측정은 primer extension assay [Chen et al., 1999; Hsu et al., 2001b]와 5-nuclease (TaqMan[®] assay [Latif et al., 2001], 그리고 Invader[®] assay [Hsu et al., 2001a]에 매우 적합하다는 것이 알려져 있다.

Fluorescence Polarization

형광 편광은 형광 물질이 수평면으로 편광된 빛에 의해 흥분되면, 이것은 다시 고정된 평면에 편광된 형광빛을 발산한다 [Perrin, 1926]. 분자의 형광편광 값은 분자의 회전 속도에 비례하는데, 이 회전 속도는 수용액의 점성, 절대 온도, 분자 부피, 그리고 가스 이온상수와 관련이 있다. 만일 점성과 온도가 일정하다면, 형광편광은 바로 분자 크기에 비례하는데, 이것은 분자량에 비례한다는 의미이다. 다시 말하면, 형광 분자가 크면 (높은 분자량) 형광 분자는 천천히 구르거나 회전하고, 따라서 형광편광은 보존된다. 만일 분자가 작은 경우 (낮은 분자량) 일 경우에는, 분자의 회전이 빠르고, 이것은 형광편광이 대부분 소실되어 depolarized 상태로 된다(Figure. 1). 형광 편광 현상은 protein-DNA, 그리고 protein-protein 결합의 분석에 사

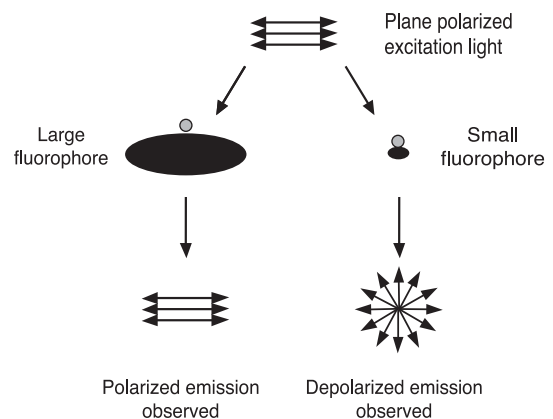


Figure 1. Fluorescence polarization (FP). The FP of a molecule is proportional to the molecule's rotational relaxation time, which is a function of the solvent viscosity, absolute temperature, and molecular volume. If the viscosity and temperature are held constant, FP is directly proportional to the molecular volume, which is directly proportional to the molecular weight. If the fluorescent molecule is large, it tumbles more slowly in space and FP is preserved. If the molecule is small, it tumbles faster and depolarized emission is observed.

용되고 있고 [Checovich et al., 1995; Heyduk et al., 1996], strand displacement amplification 에 의한 DNA 측정[Walker and Linn, 1996; Walker et al., 1996], 그리고, hybridization 에 의한 genotyping [Gibson et al., 1997] 등에 이용되고 있다. 현재 많은 형광 편광 면역측정법 (FPIA)이 상업적으로 이용되고 있는 상태이며, 이것들은 주로 therapeutics, metabolites, 그리고 drugs of abuse 분야에 일상적으로 이용되고 있다. 게다가 형광편광 측정은 수많은 연구 측정에 기본이 되는데, 특히 ligand-receptor binding 에 매우 유용하다[Checovich et al., 1995].

형광편광은 수직과 수평으로 측정되는 형광의 비율로써 나타낼 수 있으므로 형광 강도와는 무관하다. 이것은 예전에 사용되어 온 다른 형광 측정법에 비해 여러가지 장점을 가지고 있다. 형광편광의 정도는 레벨이 떨어지기 전 즉, 10,000 Dalton 까지는 어느정도 직선으로 증가한다. 형광분자를 갖고 있는 뉴클레오타이드는 약 1,000 Dalton의 무게를 가지고, 25-30 베이스의 형광 올리고뉴클레오타이드는 10,000 Dalton의 무게를 가지므로, 형광편광은 이러한 크기의 형광 probe를 필요로 하는 assay에 매우 적합한 측정방법이다. 총 편광값은 수용액의 모든 물질들로부터 방출되는 파장들의 합을 의미한다. 예를 들어, primer extension 에 있어, 형광물질이 낮은 분자량의 뉴클레오타이드에 붙고, 이것이 대립적인 위치에 probe oligomer 에 삽입된다면, 편광은 다음과 같은 공식으로 표현된다.

$$P = P_{max}[\text{ddNTP}]_b + P_{min}([\text{ddNTP}]_i - [\text{ddNTP}]_b),$$

여기서, P_{max} 는 SNP probe에 삽입된 dye-labeled ddNTP를 의미하고, P_{min} 는 삽입되지 않은 dye-labeled ddNTP의 편광을 의미하며, $[\text{ddNTP}]_i$ 는 dye-labeled ddNTP의 최초 농도, 그리고 $[\text{ddNTP}]_b$ 는 삽입된 dye-labeled ddNTP의 농도를 의미한다. Taqman[®] 또는 Invader[®] assay 에 있어, 큰 형광 probe (high FP)는 mono-, di-, 또는 tri-nucleotides 같이 작은 형광으로 분해되고, 편광은 위와 유사한 다음과 같은 공식으로 묘사된다.

$$P = P_{max}([\text{probel}]_i - [\text{probel}]_c) + P_{min}[\text{probel}]_c,$$

여기서, P_{max} 는 변하지 않은 dye-labeled probe의 편광을 의미하고, P_{min} 는 쪼개진 probe의 편광을, $[\text{probel}]_i$ 는 dye-labeled probe의 최초 농도, 그리고 $[\text{probel}]_c$ 는 쪼개진 probe의 농도를 의미한다. 신호 전달에 가장 큰 변화는 최초 형광 시약이 현저하게 다른 크기의 최종 산물로 100% 전환된다는 것이다. 그러므로, 실험 디자인에 있어 중요한 점은 반응에 이용되는 dye-labeled reagents의 최초 농도를 최소한으로 유지하여 반응이 완전하게 끝날 수 있게 하는 것이다.

THE FP-TDI ASSAY

형광 편광을 이용한 측정법, 즉 FP-TDI (template-directed dye-terminator incorporation) assay [Chen et al., 1999]는 primer extension assay (일명 minisequencing 또는 single base extension assay [Syvanen, 1994]이라 불리는데)를 개선한 측정법이다. Primer extension assay는 현재 dideoxy chain terminating DNA sequencing 프로토콜 (polymorphic site로부터 타겟 DNA의 upstream에 결합하는 SNP-specific

sequencing primer에 3'의 염기 하나를 즉시 확인하도록 고안된)을 사용하여 SNP를 측정하는데 가장 널리 이용되는 방법이다. DNA polymerase와 정확한 dideoxyribonucleoside triphosphate (ddNTP)가 있을 때, primer는 특정한 하나의 염기에 의해 확장된다. 어떤 ddNTP가 삽입되었는지를 알기 위해서, 타겟 DNA의 대립유전자로 추리할 수 있다. 이러한 genotyping 방법은 여러 다양한 형태로 이용되고 있으며, 높은 민감도와 특이성이 입증되고 있다 [Nikiforov et al., 1994; Syvanen, 1998].

FP-TDI assay에 있어서, allele-specific dye terminator는 레이블링 되지 않은 SNP-specific primer에 삽입된다. 타겟 DNA 분자의 genotype은 형광 편광을 알기 위해 terminator의 dye를 흥분시키기만 하면 측정할 수 있다(Figure. 2) [Chen et al., 1999]. FP-TDI assay는 동일한 용기 (a black 96- or 384-well microtiter plate)에서 4단계로 수행할 수 있다. 첫째, genomic DNA를 PCR로 증폭하여 primer extension 반응에 필요한 template를 만들어야 한다. 둘째, PCR primer와 dNTPs 잉여

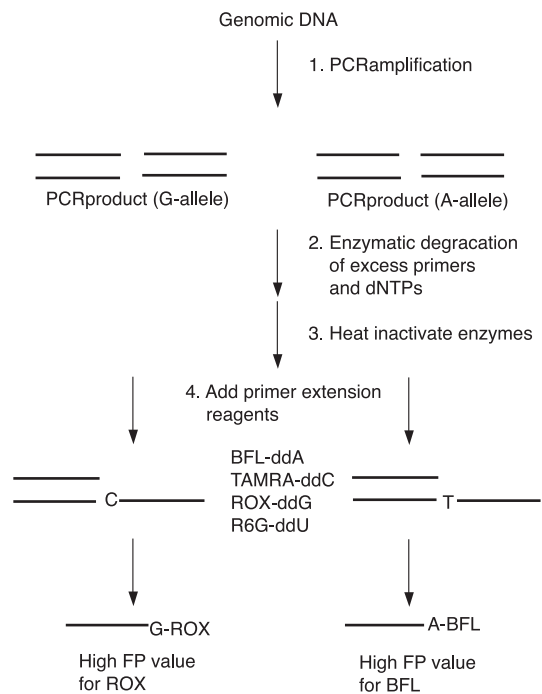


Figure 2. Scheme for FP-TDI Assay.

분은 primer extension 단계에 방해가 주지 않도록 효소적인 방법으로 제거해야 한다. 셋째, PCR clean-up 단계에 사용된 exonuclease I과 shrimp alkaline phosphatase를 heat-inactive 시켜야 한다. 넷째, DNA polymerase, SNP-specific primer, 그리고 dye-terminators가 들어있는 primer extension reaction "master mix"를 thermal cycling 반응물에 첨가한다. 마지막으로 plate reader를 이용하여 반응물의 형광 편광을 분석한다[Chen et al., 1999]. 초기에 PCR이 수행된 후에는, 어떤 분리나 정제없이 오직 두 단계의 시약첨가만이 요

직신 DNA 실험기법

구될 뿐이다.

우리는 최근에, SNPs 를 수행하는 일반적인 조건을 수행할 수 있도록 네 가지의 서로 다른 파장대의 dye-terminator 를 이용하는 최적화된 FP-TDI assay 를 발표하였다. 이러한 4-dye-ddNTP 혼합물은 ROXddGTP, Bodipy-Fluorescein-ddATP, TAMRA-ddCTP, 그리고 R6G-ddUTP 로 구성되어 있다. 규격화된 프로토콜대로 수행했을 때, 샘플의 형광 편광값이 marker 의 70% 이상에 대해, 최적화없이도 서로 다른 4 개의 그룹으로 나타났다. Figure 3이 그 대표적인 측정 결과를 보여주고 있다. 예상했던대로, DNA가 없는 negative control 은 낮

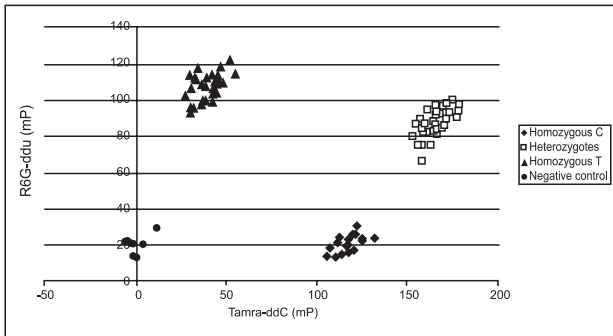


Figure 3. FP analysis of primer extension assay results. The homozygous C samples have high FP values for TAMRA but low FP values for R6G and occupy the lower right corner of the plot. The homozygous T samples have high FP values for R6G but low FP values for TAMRA and occupy the upper left corner of the plot. The heterozygotes are found in the upper right corner and have high FP values for both dyes. The negative controls are found near the origin, with low FP values for both dyes.

은 형광편광값을 나타내면서 플랏의 원점 쪽에 가까운 곳에 위치하였다. 이것은 작은 dye-terminator 가 수용액에 여전히 존재한다는 것을 의미한다.

Homogeneous C individuals에 대해, TAMRA-ddC 의 형광편광값은 높은 반면, R6G-ddU 값은 낮았다. 이것은 TAMRA-ddC terminator 가 TDI primer 에 현저하게 삽입된 반면, R6G-ddU 은 삽입이 적었음을 의미한다. 반대로, homozygous T individuals 에 대해 TAMRA-ddC 의 형광편광값은 낮고 R6G-ddU 의 편광값은 높았다. Heterozygous individuals 에 대해서는, TAMRA-ddC 와 R6G-ddU 의 형광편광값이 모두 높았는데, 이는 양쪽 dye-terminators 모두 삽입이 많이 되었기 때문이다 [Hsu et al., 2001b].

초기에 측정의 30% 정도가 실패한 것은 대부분 분자량의 감소 때문이었는데, 이것은 밀집한 제 3의 구조와 적당한 terminator 가 사용되더라도 dye-terminators 가 잘못 삽입되었기 때문이다. 이러한 측정들은 FP reaction mixture를 다시 측정하기 전에 에탄올과 글리세롤이 포함된 reading buffer 와 *E. coli* single stranded DNA binding protein (SSB) 을 첨가하거나, primer extension reaction 의 사이클수를 감소시킴으로써 개선시킬 수 있다. 전자의 방법은 실패한 반응 중 약 2/3를 복구하였고 (전체 성공률을 90%까지 증대시킴), 형광물질에 분

자량을 더하는 동안 extended SNP-specific primer를 묶음으로써 큰 분자량을 얻을 수 있게 하였다. 후자의 방법은 정확한 terminator 가 반응에 완전히 소모되지 않도록 함으로써, 실패한 측정의 나머지 1/3을 복구하였다. 따라서, 최소한의 적정화로 모든 SNPs 는 FP-TDI assay로 genotyping 될 수 있다는 의미이다 [Hsu et al., 2001b].

비록 FP-TDI assay가 현재 여러가지 다양한 자동화된 genotyping 방법 중의 하나이지만, 이 방법은 여러 장점을 가지고 있다. 첫째, 필요한 기기는 thermal cycler 와 형광편광 측정이 가능한 fluorescence plate reader 만 있으면 된다. 둘째, 이 측정법은 probe의 어떠한 변형도 필요하지 않기 때문에 상대적으로 비용이 적게 든다. 두개의 PCR primer 와 하나의 SNP-specific probe 는 빠르고 매우 저렴하게 얻을 수 있다. 셋째, 이 측정법은 최적화가 매우 용이하다. 왜냐하면 누구든지 몇 시간내에 primer 를 얻을 수 있도록 편리하게 개발되었기 때문이다. 즉, 연구에 필요한 새로운 marker 가 요구될 때, 재디자인하거나 특별한 probe 를 재조합하거나 microarray 등이 필요없다. 마지막으로, FP-TDI assay는 형광편광을 측정형태로 이용하는데, 이것은 형광 강도에 영향을 받지 않고 또한 결합된 dye-terminator로부터 분리할 필요가 없다는 점이다.

THE FP-TAQMAN® ASSAY

5'-nuclease assay는 한 단계로 DNA 샘플의 변형 상태를 측정할 수 있는 가장 단순화된 진단 측정법의 하나이다[Livak, 1999]. 일반적인 the 5'-nuclease assay의 측정법으로는 reporter fluorophore 가 PCR 동안 doubly-labeled probe 가 분열되면서 quencher 로부터 나올 때, 형광 강도가 증가하는데 달려있다[Lee et al., 1999]. 5'-nuclease assay는 큰 probe 가 작은 분자로 분열되는 방식이므로 형광편광 측정을 이용할 수 있다(see Figure. 4).

우리는 최근에 형광편광 측정이 실제로 5'-nuclease assay에 적합하다는 것을 보여주었다 [Latif et al., 2001]. 실험에는 이전에 5'-nuclease assay에 최적화된 20개의 marker 를 사용하였다. 두개의 allele-specific probe 는 reporter dye VIC (allele 1) 과

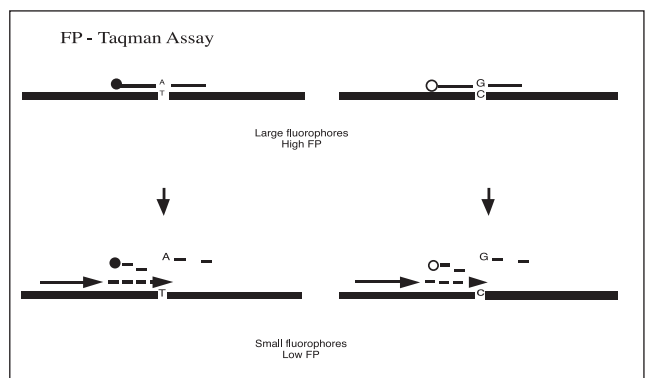


Figure 4. 5'-Nuclease assay with FP detection.

FAM(allele 2)를 각각 레이블링한 각 SNP에 디자인하였다. 이러한 probe 는 또한 nonfluorescent quencher를 가지고 있으며, minor groove binder 에 꼭 맞도록 하였다 (probe 의 길이를 최소화하여 one-base mismatch 효과를 극대화시킴)

[Kutyavin et al., 1997; Afonina et al., 1997]. 5'-nuclease assay에서 증폭과 대립유전자 판별 단계는 동시에 수행되었다. 그러므로, 반응이 시작된 후에는 더 이상의 조작이 필요하지 않았다. 이 실험의 형광편광 분석 결과는 Figure 5에 나타나있다. 이 경우에 positive 반응에는 낮은 형광편광 값을 보여주었다 (형광 강도 값이 높은 것과 반대로). Negative control에서는 양쪽 probe 모두 반응의 끝쪽에 완전하게 남아있었으며, 양쪽 reporter의 형광편광 값 모두 높았다. 따라서, negative

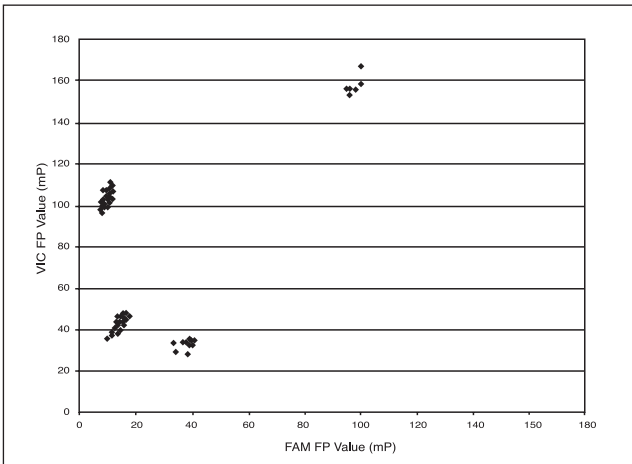


Figure 5. Fluorescence polarization analysis of 5'-nuclease assay with marker D2S1301 on 90 individuals. The homozygous allele 1 samples have low VIC FP values but high FAM FP values and occupy the lower right corner. The homozygous allele 2 samples have low FAM FP values but high VIC FP values and occupy the upper left corner. The heterozygotes have low FP values for both dyes and are found near the origin. The negative controls occupy the upper right corner, with high FP values for both dyes.

control의 데이터 값은 scatter plot의 오른쪽 위를 차지하였다. Allele 1의 homozygous 샘플에 대해, VIC probe는 분열되었지만, 반면에 FAM probe는 완전하게 남아있었다. 이렇게 VIC FP는 낮고, FAM FP는 높은 결과는 플랏의 오른쪽 아래 부분을 차지한 결과로 나타났다. 마찬가지로 allele 2의 homozygote는 FAM FP는 낮고 VIC FP가 높은 결과로서 플랏의 왼쪽 코너 위를 차지하였다. Heterozygote에 대해서는, 양쪽 probe 모두 분열되어 VIC 그리고 FAM FP 값 모두 낮은 결과로서 플랏의 원점 쪽을 차지하였다. FP analysis로 불리는 genotype은 conventional analysis method로 불리는 genotype과 완전하게 일치하였다[Latif et al., 2001]. 측정방법으로 형광편광을 이용하는 것은 quencher의 필요없이 어느 정도 저렴한 probe를 이용할 수 있는 가능성을 열어 놓았다. 게다가, 형광편광 측정은 분열 반응이 완전하게 수행되는 방향으로, 그리고 변형된 probe의 한정된 양을 이용할 수 있도록 함으로써, 결국에는 반응의 비용을 절감할 수 있게 하였다. 만일 형광편광 측정에 알맞은 visible/infrared 파장대의 dye가 발견된다면, 적절한 수준의 multiplexing (아마 20 alleles, 또는 10 SNP markers까지)이 가능해 질 것이다.

THE FP-INVADER® ASSAY

Invader® assay는 타겟 DNA에 결합하는 probe의 오버랩

핑으로 형성된 특정한 구조의 분열을 기본으로 SNP genotyping을 하는 방법이다. 이 방법은 모든 SNP marker에 대해 allele-specific, dye-labeled probes가 필요하지 않기 때문에 실험에 소요되는 비용이 그리 높지 않다. PCR-Invader® assay의 일반적인 반응 형태는 fluorescence resonance energy transfer (FRET)를 이용하여 doubly labeled fluorescent probe (the signal probe)의 분열을 측정하는 방식이다[Mein et al., 2000]. 다시 말해, PCR product를 두개의 올리고뉴클레오타이드와 (일명 Invader® oligonucleotide (SNP-specific), primary probe (allele-specific)와 함께 배양한다. Invader® oligonucleotide는 polymorphic site의 아래쪽 부분에 결합하고, primary probe의 3' 지역은 polymorphic site의 위쪽 부분과 상보적으로 된다. 만일 polymorphism이 primary probe의 반대쪽 염기와 상보적이라면, probe는 Invader oligonucleotide의 3' 끝을 오버래핑하여 인식될 수 있는 구조를 형성하고, 특정한 위치에서 Cleavase enzyme으로 잘리게 되어 결과적으로 primary probe의 5' arm이 풀리게 된다 [Kaiser et al., 1999]. 다음으로 이렇게 잘린 5' arm이 두번째 반응에 있어 Invader oligonucleotide의 대용이 됨으로써, Cleavase enzyme으로 doubly labeled signal probe가 잘릴 수 있게 한다. Signal probe는 5' 끝에 fluorophore로, 안쪽에는 quencher로 레이블링 되어있기 때문에, 잘려지게 되면 5' fluorophore가 제거되어 형광을 증대시키게 된다 (Figure. 6). 이와는 대조적으로, primary probe와 타겟 DNA 사이가 잘못 결합되면, 꼭 필요한 triplex structure가 생기지 않고, primary probe가 잘리지 않게 되며, 2차 반응에 이용되는 invader probe가 생성되지 않는다.

우리는 최근에 형광편광 측정에 적합한 Invader assay를 발표하였다[Hsu et al., 2001a]. 예전에 제시된 표준 프로토콜대로

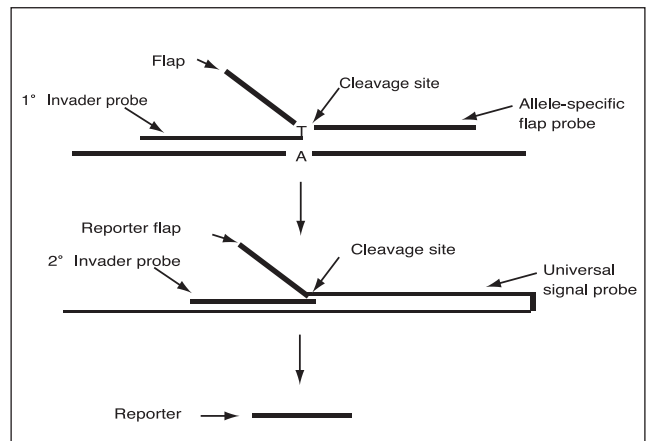


Figure 6. Invader Assay. When there is a match between allele-specific flap probe (primary probe) and DNA target at the polymorphic site, an overlapping structure between the 1° Invader probe and the primary probe is formed. A thermostable Cleavase enzyme recognizes this structure and cleaves the allele-specific probe, which releases the 5' flap. This 5' flap in turn serves as the 2° Invader probe in the second reaction where the signal probe was cleaved and the fluorescent molecule is released.

라면, 샘플의 형광편광 값은 모든 SNP markers에 대해 4개의 서로 다른 그룹으로 나뉘는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는

직신 DNA 실험기법

Figure 7에 보여주고 있다. DNA 가 없는 negative control 에서, 두개의 signal probe 모두 완전한 상태로 분석된 두개의

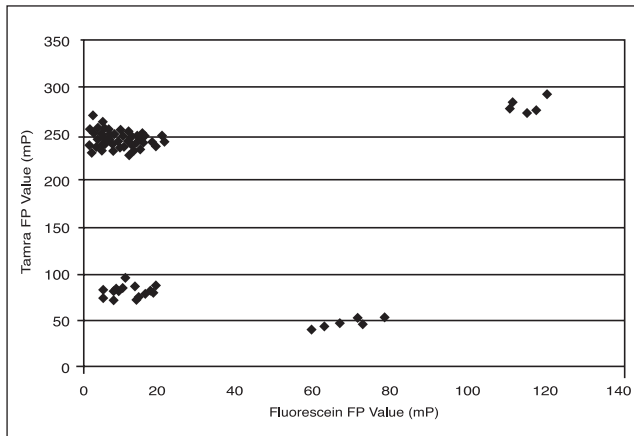


Figure 7. PCR-Invader genotyping data for TSC 1469. Homozygous T individuals form a cluster in the upper left corner with high Tamra FP values and low Fluorescein FP values. Homozygous G samples form a cluster in the lower right corner with high Fluorescein FP values and low Tamra FP values. Heterozygotes have low Tamra and Fluorescein FP values, and they cluster in the lower left corner. The no-DNA negative controls, with both signal probes intact, have high FP values for both dyes analyzed and occupy the right upper corner of the plot, indicating that both dyes are part of high molecular weight species.

dye 에 대해 높은 형광편광 값을 가지고, 플랏의 오른쪽 윗부분을 차지하고 있는데, 이것은 양쪽 dye 모두 높은 분자량을 갖는 종들의 부분이라는 의미이다.

Homozygous T individuals 에 있어, Fluorescein 에 대한 형광 편광 값이 낮고 Tamra 에 대한 값이 높다는 것은, Fluorescein signal probe 는 많이 분열하였으나, Tamra signal probe 는 아주 적게 분열하였고, 이러한 데이터 값들이 플랏의 왼쪽 윗부분을 차지하게 되었다. 반대로, homozygous G individuals에 있어 Tamra 의 형광편광 값이 낮고, Fluorescein 의 값이 높은 것은 데이터 값이 플랏의 오른쪽 낮은 부분을 차지하게 된다.

Heterozygous individuals 에 대해, Fluorescein 과 Tamra 의 형광편광 값은 둘다 낮았는데, 이것은 양쪽의 signal probe 모두 현저한 분열이 있었기 때문이다. 따라서, 데이터 값들은 거의 플랏의 중심에 위치하게 된다[Hsu et al., 2001a].

두 개의 서로 다른 fluorophore 를 이용한 두 개의 signal probe 때문에, SNP의 양쪽 대립 유전자는 한번의 반응으로 분석될 수 있고, 따라서 시간 절약과 유전자형의 오기를 감소시키는 효과를 가져올 수 있다. 앞으로는 두 개 이상의 fluorophore 를 사용하여 보다 적절한 multiplexing assay를 수행할 수 있을 것이다.

Conclusion

SNP marker 를 사용하는 여러 연구들에 있어, 수백개의 샘플을 테스트 할 수 있는 다양하고 새로운 genotyping assay 들이 신속히 개발되어야 할 것이다. 따라서, 최적화와 실험 수행이 용이하다는 점이 매우 중요하다. 이러한 요구에 따라, primer

extension assay 는 개발하기에 가장 저렴하면서도 유용하다. 결국에 전체 지놈 연구나 분석을 요하는 일련의 유전자가 선택될 때, 이것은 약 10만개 정도의 SNP 로 구성되어 다양한 연구에 이용될 것이다. 즉, High-density SNP mapping 매우 낮은 비용이 드는 확실한 측정법을 요구하게 될 것이다. Taqman[®] assay 와 Invader[®] assay 는 그 방법이 개발된 후에 측정에 있어 가장 간편한 방법들이다.

형광편광 측정법은 primer extension, Taqman[®], 그리고 Invader[®] assays에 대한 측정 방법으로 간단하면서도, 비용이 적게 들고 매우 정확하다. 또한, 형광 강도와 무관하기 때문에, 생성물로부터의 물질의 분리가 필요없다. 또한 이러한 형광 편광을 사용하게 되면Taqman[®] assay 와 Invader[®] assay 에 있어 매우 저렴한 probe 를 이용할 수 있는 가능성을 가지며, TDI assay 에 있어 레이블링을 하지 않은 primer 를 이용할 수도 있다. 게다가, 형광편광 측정은 초기의 재료들로부터 최종 생성물로 전환을 완전하게 끝내기 때문에, 값비싼 형광 시약을 최소한으로 제한할 수 있으므로, 향후 반응에 필요한 비용을 절감할 수 있다. 결론적으로, 형광 편광 측정은 homogeneous SNP genotyping 에 있어 매우 유용한 방법이라는 것이 입증되었다.

References

1. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. 1997. Efficient p priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 25:2657-2660.
2. Checovich WJ, Bolger RE, Burke T. 1995. Fluorescence polarization a new tool for cell and molecular biology. *Nature* 375:254-256.
3. Chen X, Levine L, Kwok PY. 1999. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis. *Genome Res* 9:492-498.
4. Gibson NJ, Gillard HL, Whitcombe D, Ferrie RM, Newton CR, Little S. 1997. A homogeneous method for genotyping with fluorescence polarization. *Clin Chem* 43: 1336-1341.
5. Heyduk T, Ma Y, Tang H, Ebright RH. 1996. Fluorescence anisotropy: rapid, quantitative assay for protein-DNA and protein-protein interaction. *Methods Enzymol* 274:492-503.
6. Hsu TM, Law SM, Duan S, Neri BP, Kwok PY. 2001a. Genotyping single nucleotide polymorphisms by the Invader assay with dual-color fluorescence polarization detection. *Clin Chem* 47:1373-1377.
7. Hsu TM, Chen X, Duan S, Miller RD, Kwok PY. 2001b. A universal SNP genotyping assay with fluorescence polarization detection. *Biotechniques* 31:560-570.
8. Kaiser MW, Lyamicheva N, Ma W, Miller C, Neri B, Fors L, Lyamichev VI. 1999. A comparison of eubacterial and archaeal structure-specific 5'-exonucleases. *J Biol Chem* 274:21387-21394.
9. Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB. 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on

hybridization. *Nucleic Acids Res* 25:3718-3723.

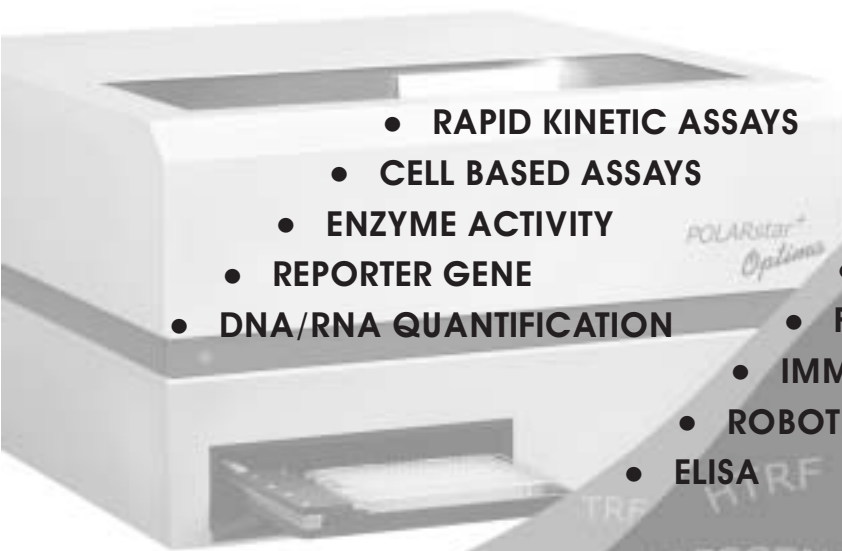
10. Kwok PY. 2001. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:235-258.

11. Latif S, Bauer-Sardina I, Ranade K, Livak KJ, Kwok PY. 2001. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis II: 5'-nuclease assay. *Genome Res* 11: 436-440.

12. Lee LG, Livak KJ, Mullah B, Graham RJ, Vinayak RS, Woudenberg TM. 1999. Seven-color, homogeneous detection of six PCR products. *Biotechniques* 27:342-349.


13. Livak KJ. 1999. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 14:143-149.

NEED A MICROPLATE READER?



- RAPID KINETIC ASSAYS
- CELL BASED ASSAYS
- ENZYME ACTIVITY
- REPORTER GENE
- DNA/RNA QUANTIFICATION
- SECONDARY MESSENGERS
- FRET
- IMMUNOASSAYS
- ROBOTIC COMPATIBLE
- ELISA

FLUORESCENCE POLARIZATION
 LUMINESCENCE INTENSITY


 BMG Labtechnologies
www.bmglabtech.com