

一种基于聚合酶链式反应检测 SNP 的方法

郑艳萍^{1,2} Chander Subhash^{1,2} 杨小红^{1,2} 周俊青^{1,2} 李建生^{1,2} 严建兵^{1,2}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 国家玉米改良中心, 北京 100094)

摘要 SNP 是具有广泛利用潜力的第 3 代分子标记, 本文旨在开发一种利用 PCR 技术快速检测 SNP 的方法。设计思路是: 根据已知 SNP 位点设计 2 条特异正向引物, 其最后一个碱基分别与已知 SNP 的 2 个碱基相同, 同时在 1 条引物的 5' 端添加 1 段 20 bp 左右的其他物种的特异序列(如细菌 DNA 序列), 然后选择 1 条合适的反向引物; 最后同时加入 3 条引物, 通过梯度 PCR 选择合适的退火温度进行 PCR 反应。利用这一方法成功将玉米的 ZDS 基因定位在玉米第 7 染色体短臂 7.02 Bin。这种检测 SNP 的方法设计简单, 费用低廉, 尤其适合 SNP 标记的分子标记连锁图构建或者基因定位。

关键词 Allele-Competitive PCR (AC-PCR); 单核苷酸多态性; 基因定位

中图分类号 Q 343.17; S 513

文章编号 1007-4333(2006)03-0051-05

文献标识码 A

Method for detecting SNP based on PCR technique

Zheng Yanping^{1,2}, Chander Subhash^{1,2}, Yang Xiaohong^{1,2}, Zhou Junqing^{1,2}, Li Jiansheng^{1,2}, Yan Jianbing^{1,2}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. National Maize Improvement Center of China, Beijing 100094, China)

Abstract SNP is one kind of powerful molecular markers. The purpose in this study was to establish a simple method of detecting SNP based on PCR technique. Two specific forward primers were synthesized, both were in conformity with the found SNP in the last nucleotide. A 19 bp pecific sequence was added into one primer with other species' sequence (eg. Bacteria DNA sequence) in 5' end. The same reversed primer was selected using the software Primer 5.0. The PCR was performed with the three specific primers using an appropriate anneal temperature selected by gradient PCR. The ZDS gene has been mapped on the short arm of chromosome 7 in maize based on this method. This technique is simple, effective and cheap, and could be helpful in constructing linkage maps and map genes.

Key words Allele-Competitive PCR (AC-PCR); Single Nucleotide Polymorphism (SNP); gene mapping

1980 年 Botstein 等首次提出 DNA 限制性片段长度多态性(RFLP)概念以来^[1], DNA 分子标记技术发展迅速, 已经成为基因定位、连锁图构建、数量性状分析、资源收集评估等研究领域不可或缺的工具, 发展快速、方便和低廉的分子标记技术已成为遗传学和分子生物学研究的重要内容。DNA 分子标记主要分为 3 类: 第 1 类是以核酸分子杂交为基础的分子标记, 以 RFLP 为代表^[2], 这类标记也常被称为第 1 代分子标记; 第 2 类是以聚合酶链式反应(PCR)为基础的分子标记, 如扩增片段长度的多态

性(AFLP)^[3]、随机扩增多态性 DNA (RAPD)^[4]、简单序列重复^[5]等, 以 PCR 为基础的分子标记常被称为第 2 代分子标记。第 3 类是以单核苷酸多态性为基础的分子标记即 SNP, SNP 是指发生在 DNA 序列上某个特定位置上单个碱基的变异, 包括单个碱基的转换(transition), 如 T C 和 A G, 以及颠换(transversion)如 A C、A T、T G 和 G C, 且其中最少数 1 种等位基因在群体中的频率不小于 1%^[6]。1998 年, Science 杂志公布人类第 1 张 SNP 图谱^[7]及人类、大猩猩、鸡、拟南芥和水稻等重要物

收稿日期: 2005-11-30

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2001CB1088); 国家自然科学基金资助项目(30500322)

作者简介: 郑艳萍, 硕士研究生; 严建兵, 副教授, 通讯作者, 主要从事玉米基因组学和分子育种研究, E-mail: yjianbing@cau.edu.cn

种全基因组测序完成以来,寻找与目标性状相关的 SNP 已经成为各大研究机构和公司追逐的目标^[8]。SNP 在基因组中有很高的频率,在人类基因组中每 1 000 个 bp 就存在 1 个 SNP^[9],而玉米中平均大约 100 bp 就存在 1 个 SNP^[10],因此这类标记可能达到基因组多态性的极限^[11]。因而利用 SNP 可以在 1 个基因的内部或附近提供一系列标记,这弥补了其他标记多态性不足的缺点;同时 SNP 是基于单核苷酸的突变,突变率为 10^{-9} ,因而与其他标记的多态性相比,它具有更高的遗传稳定性。因此 SNP 也被称为第 3 代分子标记。随着研究的深入,各个物种的 SNP 数据库也纷纷建立(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>),收集的 SNP 数目也成为指数级上升,毫无疑问这些数据为进一步的基因组学研究,如在基因的精细定位和克隆,高密度遗传连锁图谱绘制、遗传图谱和物理图谱的整合、基于 SNP 的连锁不平衡关联分析、种群多样性及分子进化研究等方面将发挥越来越重要的作用。

目前,检测 SNP 的方法有多种,如基因芯片技术、变性高效液相色谱法(DHPLC)、直接测序法和单链构象多态性(SSCP)等。前面 3 种方法都要用到昂贵的仪器设备,成本太高,一般的实验室难以承受。尽管 SSCP 法成本低廉,但重复性和稳定性难以保证,也没有得到广泛应用。本研究试图开发一种基于 PCR 技术的费用低廉的 SNP 检测方法,用

于分子标记连锁图构建或基因定位。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以本实验室发展的包含 294 个家系 RIL 群体和双亲(综 3,87-1)为试验材料,收集苗期新鲜叶片,采用 CTAB 法^[12]提取亲本和重组自交系群体总 DNA,并利用该群体已经完成的包含 263 个 SSR 标记,平均间距 8.97 cm 的分子标记连锁图数据。

1.2 SNP 检测设计思路

根据已知的基因/EST/基因组序列设计了特异引物,对 2 个亲本材料进行 PCR 扩增,扩增片段回收、连接、转化和测序,通过序列比较发现 SNP,然后根据 SNP 位点重新设计 2 条正向引物和 1 条反向引物,1 条正向引物(Primer1)的最后 1 个碱基与 1 个亲本的 SNP 位点的碱基一致,另 1 条正向引物(Primer2)的最后 1 个碱基与另 1 个亲本的 SNP 位点碱基一致,同时在 1 条引物的 5 端随机添加长度为 20 bp 左右的其他物种特异 DNA 序列(如细菌 DNA 的序列),然后利用 Primer 5 软件设计共同的反向引物(图 1)。同时加入 3 条引物,在较高的退火温度下进行 PCR 扩增,这样通过人为添加一段序列,就可以把单碱基水平的突变转换成长度的差异而容易被检测。这种方法也叫 Allele-competitive PCR(AC-PCR)法。

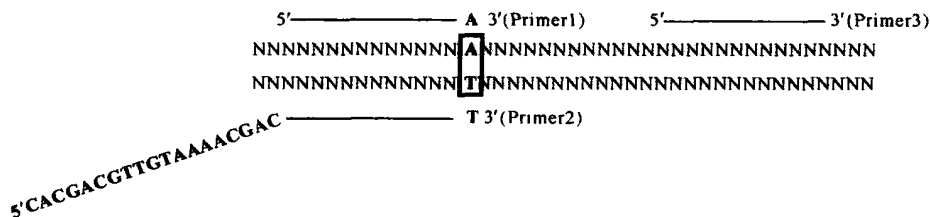


图 1 基于 PCR 检测 SNP 的设计思路

Fig. 1 Method of detecting SNP based on PCR technique

1.3 AC-PCR 法检测 SNP 的验证

1) 引物设计。根据玉米 *ZDS* 基因(AF047490, 控制玉米类胡萝卜素合成的候选基因)的 cDNA 序列设计一对特异引物(表 1, 引物 1),对综 3 和 87-1 2 个亲本进行 PCR 扩增,扩增片段进行回收、连接、电击转化和测序(采用天为时代公司的离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、Promega 公司的 PGEM-T Easy Vector System 1 连接试剂盒,方法同盒内说明书;感受态细胞的制备及电击转化法同通用方法^[13],测序在 Invitrogen(英俊)公司完成),根

据 2 序列对比后发现的 SNP 位点重新设计引物根据综 3 的序列设计正向引物,引物的 3 端刚好位于 SNP 处且碱基与综 3 的一致,根据 87-1 的序列设计的正向引物,引物的 3 端刚好位于 SNP 处且碱基与 87-1 的一致,且在 5 端加上一段 M13 序列(5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'),根据 2 个亲本一致的序列利用 Primer 5 设计反向引物 3,使扩增长度在 100~500 bp 之间,利用这 3 条特异引物进行 AC-PCR 反应(表 1, 引物 2 和 3)。

2) PCR 反应条件。AC-PCR 的 15 μ L 扩增体系

表 1 PCR 扩增所用的引物序列

Table 1 Primers for PCR

引物	5 端引物	3 端引物
1	5 GGTTGGGTTGGATAAACCTT3	5 TCTGATCAGGCCTGAATG3
2	5 GCAAAATGTAATTCACCTTCCACA3	5 TACCTGCTTTTGAACCTTAC3
3	5 CACGACGTTGTA AAAACGACCAAATGTAATTCACCTTCCACG 3	5 TACCTGCTTTTGAACCTTAC3

包括 100 ng 的基因 DNA 10 ×buffer 1.5 μL, 25 mmol Mg²⁺ 0.9 μL, 2.5 mmol dNTP 0.3 μL, 2.5 U/μL TagE 0.2 μL, 以及 3 条引物 (10 μmol 各 0.5 μL)。筛选合适退火温度的热循环程序为: 95 预变性 5 min, 35 个循环 (95 变性 1 min, 50 ~ 70 退火 1 min, 72 延伸 1 min), 72 延伸 10 min。群体扩增的的热循环程序为: 95 预变性 5 min, 35 个循环 (95 变性 1 min, 选定温度退火 1 min, 72 延伸 1 min), 72 延伸 10 min。扩增的 DNA 片段进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 (采用 6% (质量分数) 的变性聚丙烯酰胺凝胶, 配方为 57 克丙烯酰胺、

3 克 N-N 亚甲双丙烯酰胺、100 mL 5 ×TBE, 420 g 尿素, 过滤定容至 1 000 mL)。

2 结果

1) 根据 ZDS 基因的 cDNA 序列设计一对引物 (表 1, 引物 1) 在综 3 和 87-1 2 个亲本中都扩增出 558 bp 的条带, 测序结果发现, 在 2 个亲本中有 8 个 SNP, 高出玉米 1 SNP/100 bp 的平均值 (图 2), 根据序列中的第一个 SNP 设计了 AC-PCR 引物用于进一步的 SNP 检测 (表 1, 引物 2 和 3)。

利用梯度 PCR 仪选择 50 ~ 70 (50、50.5、

```

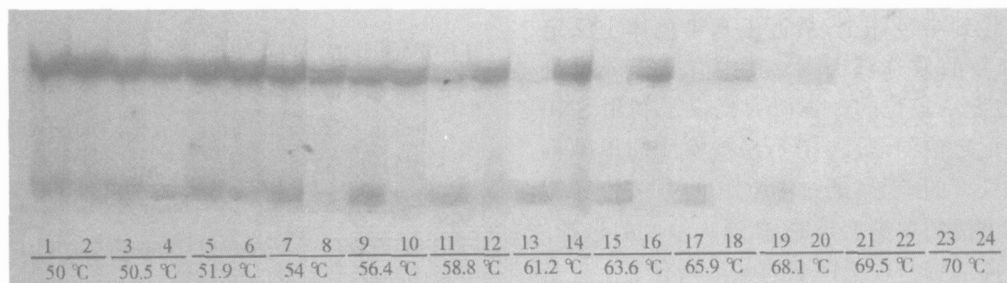
Z3zds      GGTTGGGTTGGATAACCTTTGTACACGGCGGATGCAGACTTTTCTGTTTTTCGGACCTTGCTCTCTCATCTCCTGCTGATTACTACATTGAAGGGCAAGGTTCCCTGATCCAGTAAGT
87-1zds    GGTTGGGTTGGATAACCTTTGTACACGGCGGATGCAGACTTTTCTGTTTTTCGGACCTTGCTCTCTCATCTCCTGCTGATTACTACATTGAAGGGCAAGGTTCCCTGATCCAGTAAGT
Z3zds      CTACTCTTTTCCAAGTATCAAAATTAATGCTTCTGCTCGAAAATGATTCACTTCCACCTCTAAATTCATCTGCAGAGCTGTGCTGACTCTGGAGATCCATACATGCCATTGCCAAACGA
87-1zds    CTACTCTTTTCCAAGTATCAAAATTAATGCTTCTGCTCGAAAATGATTCACTTCCACCTCTAAATTCATCTGCAGAGCTGTGCTGACTCTGGAGATCCATACATGCCATTGCCAAACGA
Z3zds      GGAGATCATTAGTAAGGTTCAAAGCAGGTAGGTTTGTAATAGCTTCTGTTTTGGTCAAATTCGCTGTTCCTTTTACATACTGAGCAAACCCCAATTTCAATCACTTAAAG
87-1zds    GGAGATCATTAGTAAGGTTCAAAGCAGGTAGGTTTGTAATAGCTTCTGTTTTGGTCAAATTCGCTGTTCCTTTTACATACTGAGCAAACCCCAATTTCAATCACTTAAAG
Z3zds      AGAGAGATTTCTTCTGCTTATGTTATTTTGTAATCTTCCAAAGCTCACATCAGTAATAAACACATGTAATTTCCACAGGTTGTAGAAGTGTCCCATCTTCCCGGGCTTGAAGTTA
87-1zds    AGAGAGATTTCTTCTGCTTATGTTATTTTGTAATCTTCCAAAGCTCACATCAGTAATAAACACATGTAATTTCCACAGGTTGTAGAAGTGTCCCATCTTCCCGGGCTTGAAGTTA
Z3zds      CATGGTCCAGTGTGGTAAAGATCGGACAATCGCTGTACCGTGAGGCTCCTGGAAAGCACCCATTGAGGCTGATCAGA
87-1zds    CATGGTCCAGTGTGGTAAAGATCGGACAATCGCTGTACCGTGAGGCTCCTGGAAAGCACCCATTGAGGCTGATCAGA
    
```

图 2 2 个亲本中扩增出的部分 ZDS 序列及 SNP 位置

Fig. 2 Partial sequence of ZDS and SNPs in two parents

51.9、54、56.4、58.8、61.2、63.6、65.9、68.1、69.5 和 70) 的退火温度反应梯度, 在 2 个亲本中进行 PCR 扩增, 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 如图 3 所示。在 50 ~ 58.8 , 2 个亲本间都扩增出与目标片段一致的条带, 但在 2 个亲本之间没有明显多态性, 表明 2 条正向引物与 2 个亲本 DNA 都发生特异

结合, 没有扩增出特异产物; 在 69.5 和 70 之间没有明显扩增产物; 在 61.2、63.6、65.9 和 68.1 4 个温度上 2 个亲本不但有特异条带而且还具有明显的多态性, 说明 2 条正向引物分别与两亲本发生了特异结合, 但扩增条带的亮度依次减弱, 最后选择 64 为 AC-PCR 的最适宜退火温度。



奇数为综 3, 偶数为 87-1

图 3 亲本的梯度 PCR 反应结果

Fig. 3 Gradient PCR in both parents

2)为进一步验证这种方法在基因定位上是否有效,继续利用这3条引物在基于这2个亲本所发展的RIL分离群体中进行了PCR反应,部分结果如图4所示,在群体中得到了预期的清楚的特异条带。将来源于综3的带型记为1,87-1的带型记为2,缺失的带型记为0。利用Mapmaker 3.0作图软件

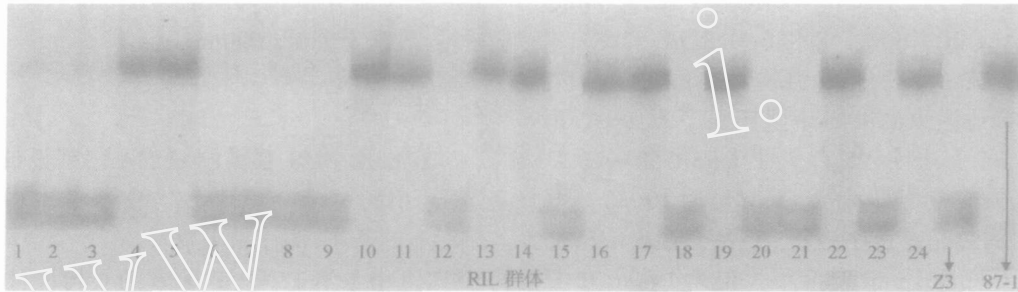


图4 ZDS基因SNP标记在部分RIL群体中的分离

Fig. 4 SNP marker segregation of ZDS gene in the partial RIL population

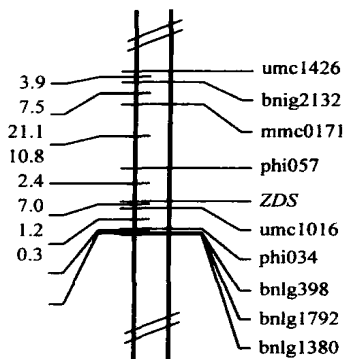


图5 利用本研究开发的SNP标记将ZDS基因定位在玉米第7染色体短臂上

Fig. 5 ZDS has been mapped on the short arm on chromosome 7 with the developed SNP marker

3 讨论

SNP标记是有着广阔应用前景的分子标记,其多态性非常丰富,理论上可以把任何一个基因或者目标片段定位到染色体上,最近玉米染色体上又定位了1450个新的候选基因^[15],其中有一部分就是利用SNP的方法定位的。本研究提供了利用SNP进行分子标记定位的思路,把不易被检测的单碱基突变转换成长度的差异,通过PAGE的方法将其检测出来。该方法的关键就是PCR退火温度的选择,因为2条正向引物与模板匹配的碱基只有1个有差别,容易造成错配。在大规模反应之前需要利用梯度PCR的方法选择合适的退火温度,这样才能保证扩增产物的特异性。但比起基于分子杂交的RFLP

($LOD > 3.0$)和实验室原有的群体标记数据对ZDS基因进行了定位,结果将该SNP标记定位于第7染色体7.02 Bin(图5),与临近的2个标记phi057和umc1016的连锁距离分别是10.8和2.7 cm,这一结果与前人研究结果完全一致^[14]。

技术或者PCR后再酶切的CAPs技术来说,操作简单;能够检测的多态性也多,因为RFLP和CAPs都基于特定的酶切位点,而这种方法可以是随机位点;同时费用也低。该方法不仅可用于分子标记连锁图构建,基因定位等研究,还可以用于群体遗传学,基于SNP的分子进化等领域的研究。

本研究只是利用了正向引物1个碱基的突变,理论上还可以同时利用多个SNP位点,提高反应的特异性 and 提高反应的效率。比如:如果2个SNP位点发生在20 bp以内,可以在引物设计同时加入这2个突变位点;还可在正向或反向引物中同时考虑不同SNP位点,可以提高反应的特异性。还可以针对多个SNP位点,合成不同长度的特异物种DNA,通过多引物PCR同时检测多个SNP位点,提高反应效率。

参考文献

- [1] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-331
- [2] Saghai Maroof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population, and population dynamics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(24): 8014-8018
- [3] Vos P R, Hogers, Bleeker M, Reijmans M, et al. AFLP:

- a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21):4407-4414
- [4] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535
- [5] Senior L, Lynn M, Heun M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer[J]. *Genome*, 1993, 36(5): 884-889
- [6] Landegren U, Nilsson M, Kwok P Y. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis[J]. *Genome Res*, 1998, 8(8): 769-776
- [7] Wang D G, Fan J B, Siao C J, et al. Large - Scale identification, mapping, and Genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome[J]. *Science*, 1998, 280(5366): 1077-1082
- [8] 刘万清,贺林. SNP 为人类基因组描绘新的蓝图[J]. *遗传*, 1998, 20(6):38-40
- [9] Zwick M E, Cutler D J, Chakravarti A. Patterns of genetic variation in Mendelian and complex traits[J]. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2000, 1: 387-407
- [10] Tenaillon M I, Sawkins M C, Long A D, et al. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 98(16): 9161-9166
- [11] Lemieux B. Overview of DNA chip technology. *Mol Breed*, 1998, 4(4): 277-289
- [12] Saghai Maroof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population, and population dynamics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(24): 8014-8018
- [13] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔, DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂, 等译. 北京:科学出版社, 2002:99-102
- [14] Matthews P D, Luo R, Wurtzel E T. Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops[J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(391): 2215-2230
- [15] Falque M, Decousset L, Dervins D, et al. Linkage mapping of 1454 new maize candidate gene loci[J]. *Genetics*, 2005, 170(4): 1957-1966