

# 用等位基因特异 PCR 检测普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的单核苷酸多态性

卫 波<sup>1,2</sup>, 景蕊莲<sup>2</sup>, 王成社<sup>1</sup>, 昌小平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100; <sup>2</sup>国家基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点实验室/中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:** 【目的】以 2 份六倍体小麦 Opata85 和 W7984 及其重组近交系 (RIL) 的 111 个株系和 3 份小麦二倍体野生近缘种为材料, 研究用等位基因特异 PCR 检测普通小麦中单核苷酸多态性的方法。【方法】利用直接测序的方法检测 2 份六倍体小麦和 3 份小麦二倍体野生近缘种 *TaDREB1* 基因的 DNA 序列, 在 B 基因组上发现了 2 个 SNPs。以其为 3' 端, 设计等位基因特异引物及其互补引物, 对 SNP 进行分型, 同时研究了特异引物 3' 端碱基错配等位基因特异 PCR 的影响, 优化了 PCR 反应体系。【结果】等位基因特异引物 3' 端不同位置的碱基错配及不同类型的碱基错配 PCR 结果影响较大; 在等位基因特异 PCR 中, Mg<sup>2+</sup>、dNTP 及 Taq DNA 聚合酶的用量均大于普通 PCR。【结论】只要在等位基因特异引物 3' 端加上合适的错配碱基, 并且优化其 PCR 反应体系, 用等位基因特异 PCR 方法检测六倍体小麦中的单核苷酸多态性是可行的。

**关键词:** 六倍体小麦; 单核苷酸多态性; 等位基因特异 PCR; 碱基错配

## Assaying Single Nucleotide Polymorphism in Wheat (*Triticum aestivum* L.) with Allele-Specific PCR

WEI Bo<sup>1,2</sup>, JING Rui-lian<sup>2</sup>, WANG Cheng-she<sup>1</sup>, CHANG Xiao-ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100;

<sup>2</sup>National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** 【Objective】Two hexaploid wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.), Opata85 and W7984, their 111 recombinant inbred lines (RILs), and three diploid relative-species, *T. urartu*, *Ae. Speltoides* and *Ae. Tauschii* were used as plant materials to study the method of assaying single nucleotide polymorphism with allele-specific PCR in wheat. 【Method】Two SNPs were discovered on B genome by aligning the *TaDREB1* genes in two hexaploid wheat cultivars and three diploid relative-species. To type these SNPs, allele-specific primers and their complementary primers were designed using the SNPs as their 3'-end. In addition, we studied the effect of the mismatched bases at the 3'-end of the allele-specific primers on PCR and the optimum PCR system. 【Result】There were distinct effects of the mismatched bases at 3'-end different sites of the allele-specific primers on allele-specific PCR, so did different types of mismatched bases. Moreover, the concentrations of Mg<sup>2+</sup>, dNTP and Taq DNA polymerase in allele-specific PCR were higher than that in conventional PCR. 【Conclusion】It is feasible to assay SNPs by allele-specific PCR in hexaploid wheat, as long as proper mismatched bases were introduced at 3'-end proper sites of the allele-specific primers and the PCR system was optimized reasonably.

**Key words:** Hexaploid wheat; Single nucleotide polymorphism; Allele-specific PCR; Mismatched base

收稿日期: 2005-09-21; 接受日期: 2006-05-10

基金项目: 国家“863”计划项目 (编号: 2004AA211102) 资助

作者简介: 卫 波 (1981-), 男, 山西阳城人, 硕士研究生, 研究方向为小麦抗旱基因资源。E-mail: weibo\_009@yahoo.com.cn。通讯作者景蕊莲 (1958-), 女, 研究员, 研究方向为作物抗旱性的分子生物学。Tel: 010-62186706; E-mail: jingrl@caas.net.cn。王成社 (1960-), 男, 研究员, 研究方向为小麦花培等生物技术育种研究。Tel: 029-87082982; E-mail: wangcs2008@yahoo.com.cn

## 0 引言

【本研究的重要意义】单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指群体中基因组 DNA 序列上单个核苷酸的变异<sup>[1]</sup>。因其在基因组中数量多、密度大、遗传稳定、便于快速分型检测<sup>[2]</sup>, 被认为是继限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 之后的第三代新型分子标记。已被广泛应用于人类疾病检测、生物进化和种群多样性分析、群体遗传学和连锁不平衡分析, 以及作物高密度遗传连锁图谱构建等研究领域。目前, 已经建立了很多 SNP 的分型技术, 例如 PCR-RFLP、单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP)、变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳 (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、变性高效液相色谱技术 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)、基因芯片技术 (gene chip) 等技术。尽管这些技术可以高通量地对 SNP 进行分型, 但其昂贵的仪器设备和极高的分析成本是许多实验室所无法承担的。相比之下, 利用等位基因特异 PCR (allele-specific PCR) 对 SNP 进行分型快速、简便、成本低<sup>[3]</sup>。目前, 已经有一些关于等位基因特异 PCR 的报道, 但是其研究对象大多是基因组相对简单的二倍体物种, 包括人类<sup>[4]</sup>、水稻<sup>[5]</sup>、甜樱桃<sup>[6]</sup>、拟南芥<sup>[7]</sup>等。而普通小麦为异源六倍体植物, 其 3 个基因组之间的部分同源性是 SNP 标记开发的最大障碍, 因此研究用等位基因特异 PCR 方法对小麦中的 SNP 进行分型具有重要的理论意义和实际应用价值。【前人研究进展】近几年, 利用等位基因特异 PCR 的方法检测作物中的 SNP 已经受到有关研究者的广泛重视。Bundock<sup>[8, 9]</sup>等通过生物信息学手段分别比对了大麦细胞色素 *P450* 基因和  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂 *Isa* 基因的 EST 序列, 分析了其相关的 SNP, 为设计位点特异性引物奠定了基础。Hayashi<sup>[5]</sup>等研究水稻 *Piz* 和 *Piz-t* 基因的 SNP 和 InDel 后, 开发了这两个基因的等位基因特异引物并对其 SNP 进行了分型。Jeong<sup>[10]</sup>等开发了大豆 2 个抗病相关基因 *Rsv1* 和 *Rsv3* 的 SNP 标记。Sonneveld<sup>[6]</sup>用等位特异 PCR 方法检测了甜樱桃自交不亲和等位基因 *S1* 和 *S2* 的单核苷酸多态性。2004 年 Schwarz<sup>[11]</sup>等报道了利用生物信息学方法开发小麦高分子量麦谷蛋白等位基因 *Glu-B1-1d(Bx-6)* 序列特异

(sequence-specific) 引物。Zhang 等<sup>[12]</sup>在 2003 年开发了小麦  $\gamma$ -醇溶蛋白等位基因的特异 PCR 引物。Tyrka<sup>[13]</sup>等开发出了与小麦抗叶锈病基因 *Lr1* 紧密连锁的 SNP 分子标记。最近, Boisson 等<sup>[14]</sup>人根据小麦氮代谢重要酶基因 *Fd-GOGAT* 的 SNP 设计特异引物, 将其定位在 2D 染色体上。【本研究切入点】由于普通小麦 3 个基因组之间的部分同源性, 以及庞大的基因组和高度的序列重复性, 使得开发小麦等位基因特异引物的工作障碍重重, 本研究在总结前人经验的基础上, 研究利用等位基因特异 PCR 检测普通小麦单核苷酸多态性的方法。【拟解决的关键问题】本研究拟通过设计小麦基因组特异引物分离目标基因在某一基因组上的特异序列, 以排除同源基因组干扰, 再开发出等位基因特异引物, 并优化其 PCR 反应体系, 为利用等位基因特异 PCR 方法检测普通小麦单核苷酸多态性提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试植物材料种子均来自于中国农业科学院国家种质资源库, 包括 2 份六倍体小麦 (*T. aestivum* L.) (AABBDD) 材料: Opata85 和 W7984 及其重组近交系 (RIL) 的 111 个株系 [重组近交系 (Opata85 × W7984) 来源于国际小麦作图组织 (ITMI, 美国)], 3 份小麦二倍体野生近缘种材料: 乌拉尔图小麦 (*T. urartu*) 203 (AA)、拟斯卑尔脱山羊草 (*Ae. Speltoides*) 4042 (SS) 及粗山羊草 (*Ae. tauschii*) 4857 (DD), 其中拟斯卑尔脱山羊草是小麦 B 基因组的供体。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 用酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.2.2 *TaDREB1* 基因 B 基因组特异序列的分离 在实验中, 首先设计了小麦 *TaDREB1* 基因的特异引物, 获得不同供试材料的扩增产物, 将其测序结果分别与普通小麦二倍体野生近缘种材料的测序结果进行比对, 发现在拟斯卑尔脱山羊草 4042 中 *TaDREB1* 的序列缺失了 72 bp。根据这一特点, 设计了 B 基因组特异引物, 正义链引物: 5'TTGTGCTCCTCATGGGTAC TT3', 反义链引物: 5'CCCAACCCAAGTGATAATAA TCT 3'; 分离到 *TaDREB1* 基因在 B 基因组上的序列 717 bp。PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, 包括 ddH<sub>2</sub>O 11.78  $\mu$ l, 10× PCR Buffer 2  $\mu$ l, 引物 (2  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 2.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol·L<sup>-1</sup>) 1.4  $\mu$ l, dNTP (25 mmol·L<sup>-1</sup>) 0.16  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 (5U) 0.16  $\mu$ l, 模板 DNA (40 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup>)

2  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应在 Biometra T1 thermocycler 热循环仪上进行。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 34 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

**1.2.3 SNP 检测** 利用 B 基因组特异引物检测六倍体小麦 B 基因组中的 SNP。采用北京天为时代科技有限公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物, 将其进行连接、转化后, 挑取克隆, 用 3730XI DNA Analyzer 测序仪测序。

利用 DNASTar 序列分析软件包中的 SeqMan 软件对每个基因型的 12 个有效克隆序列进行比对, 得到目标基因型的序列 (consensus sequence)。将 2 个六倍体小麦材料 Opata85 和 W7984 的序列用 DNASTar 序列分析软件包中的 MegAlign 软件进行比对, 在 B 基因组上检测到 2 个 SNP, 即 S608 和 S732。

**1.2.4 等位基因特异引物设计** 用 primer premier 5.0 引物设计软件设计所有引物。

为了在不同材料中检测并分型目标 SNP, 采用等位基因特异 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) 方法, 其引物设计原理如图 1 所示: 野生型 (wide type, WT) 和突变型 (mutation type, MT) 之间存在着 1 个核苷酸的突变 T $\rightarrow$ G, 在序列的 5' 端设计公用的正义链引物, 反义链引物的 3' 端与 SNP 位点的某一基因型相匹配, 而与该位点另外一种基因型不匹配, 与反义引物相匹配的等位片段有扩增产物, 不匹配的没有扩增产物。在图 1 中, primer 1 与 MT 序列相匹配, 仅在 MT 中有扩增产物; primer 2 与 WT 序列相匹配, 在 WT 中才有扩增产物, 因此, primer 1 和 primer 2 为 1 对互补的等位基因特异引物。

在引物设计过程中, 还在反义引物的 3' 端另外加入 1 个或 2 个错配碱基, 以增强等位基因特异 PCR 的

扩增效果。关于碱基的错配, 有文献认为 G/A、C/T 为强错配类型, C/A、G/T 为弱错配类型, A/A、C/C、G/G、T/T 为中等错配类型<sup>[15]</sup>。在试验中, 选择了强错配和中等错配的碱基错配类型。同时, 还设计了与等位基因特异 PCR 引物互补的引物, 验证等位基因特异 PCR 引物的可靠性, 以及不同基因型材料在目标 SNP 位点是杂合型, 还是纯合型, 以及是哪种纯合型。等位基因特异 PCR 中所用的正义链引物与分离 B 基因组特异序列的正义链引物相同, 3' 端等位基因特异 PCR 引物及其互补引物 (反义引物) 的情况见表 1。

**1.2.5 等位基因特异 PCR 及 PCR 产物检测** 等位基因特异引物的 PCR 反应体系为 20  $\mu\text{l}$ , 包括 ddH<sub>2</sub>O 10.02  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$  PCR Buffer 2  $\mu\text{l}$ , MgCl<sub>2</sub> (25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2.8  $\mu\text{l}$ , 正义和反义引物各 (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ , dNTP (25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.36  $\mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶 (5U) 0.32  $\mu\text{l}$ , 模板 DNA (40 ng $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应在 Biometra T1 thermocycler 热循环仪上进行。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 34 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳或 1.5%~2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 B 基因组 *TaDREB1* 基因序列分离

通过比对六倍体小麦的 3 个二倍体野生近缘种材料乌拉尔图小麦 203 (AA)、拟斯卑尔脱山羊草 4042 (SS) 及粗山羊草 4857 (DD) 的 *TaDREB1* 基因序列, 发现 B 基因组供体材料拟斯卑尔脱山羊草 4042 与 A 和 D 基因组的材料相比缺失了 72 bp (图 2)。根据这一特点, 设计了 B 基因组特异引物, 分离到了六倍体小麦 B 基因组特异的 *TaDREB1* 基因序列。

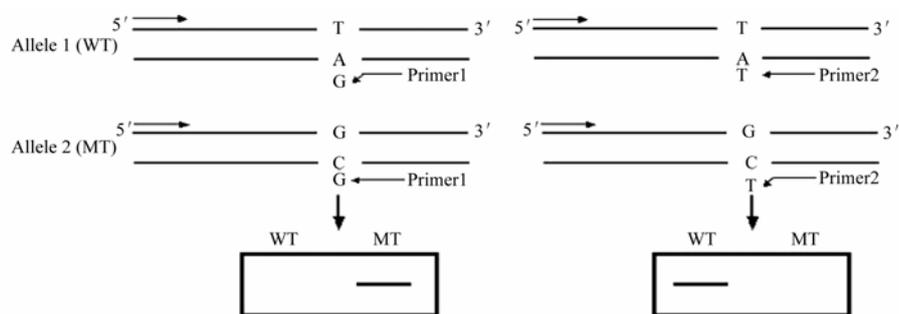


图 1 等位基因特异引物及其互补引物的扩增原理

Fig. 1 The amplification principle of allele-specific primers and their complementary primers

表 1 基于 SNP 位点 S608 和 S732 设计的等位基因特异引物

Table 1 Allele-specific primers based on S608 and S732 SNPs

SNP	引物编号 No. of primer	引物序列* Sequence of the primers	Ta (°C)	产物 Length of products (bp)
S608	P1	5'ATATGGATTGCCTTGATGCC 3'	56.0	554
	P2	5'ATATGGATTGCCTTGATGCA 3'**	56.0	554
	P3	5'GTGATATGGATTGCCTTGATTAC 3'	56.0	557
	P4	5'GTGATATGGATTGCCTTGATTAA 3'**	56.0	557
	P5	5'GATATGGATTGCCTTGATTCC 3'	56.0	555
	P6	5'GATATGGATTGCCTTGATTGC 3'	56.0	555
S732	P7	5'CCAAGGAAACAAGGATAGCAT 3'	55.0	679
	P8	5'CCAAGGAAACAAGGATAGCAC 3'**	55.0	678
	P9	5'CACCAAGGAAACAAGGATAGACT 3'	55.0	681
	P10	5'ACCAAGGAAACAAGGATAGACC 3'**	55.0	679
	P11	5'CACCAAGGAAACAAGGATAGAAT 3'	55.0	681
	P12	5'CACCAAGGAAACAAGGATAGATT 3'	55.0	681

\* 黑体字母为错配碱基; \*\* 在 S608 位点上, 引物 P2、P4 分别与 P1、P3、P5、P6 互补; 在 S732 位点上, 引物 P8、P10 分别与 P7、P9、P11、P12 互补

\* Bold letters represent the mismatched bases; \*\* At the site of S608, primer P2 and P4 are complementary to primer P1, P3, P5 and P6; at the site of S732, primer P8 and P10 are complementary to primer P7, P9, P11 and P12

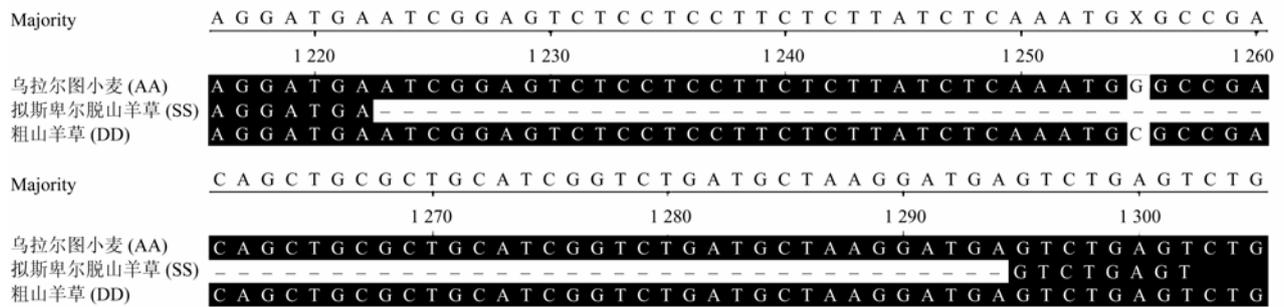


图 2 3 个小麦二倍体野生近缘种中 TaDREB1 基因序列比对

Fig. 2 Comparative alignment of TaDREB1 gene sequences of the three diploid relative-species

2.2 B 基因组 TaDREB1 基因的 SNP

通过比对 2 个六倍体小麦材料 Opata85 和 W7984 B 基因组上的 TaDREB1 基因序列, 分别在第 608 位和第 732 位发现了 SNP, 二者均位于 TaDREB1 基因的内含子区域 (图 3)。

2.3 引物 3' 端不同位置碱基错配的 PCR 效果

试验中, 分别在等位基因特异引物 3' 端的第 1、2、3 个碱基位置引入错配碱基, 研究不同位置碱基错配对六倍体小麦 PCR 效果的影响, 结果发现不同位置的碱基错配对 PCR 结果的影响很大 (图 4)。



S608 代表第 608 位的 SNP; S732 代表第 732 位的 SNP  
S608 and S732 represent the SNPs at 608th and 732nd loci, respectively

图 3 小麦 B 基因组上 TaDREB1 基因的 2 个 SNP S608 和 S732

Fig. 3 Two SNPs on B genome in TaDREB1 gene loci S608 and S732

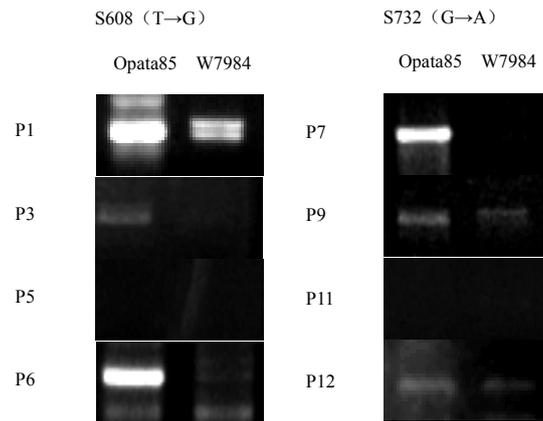


图 4 引物 3' 端 3 个碱基中不同位置的碱基错配和不同碱基错配类型对 PCR 效果的影响

Fig. 4 Effect of allele-specific primers designed at 3 base loci in 3'-end with different mismatch closet on PCR products

从图 4 中可以看出,在 2 个 SNP 位点 S608(T→G) 和 S732 (G→A) 处,用引物 P3 和 P7 分别在两亲本中得到了有明显差异的扩增产物, P1 和 P9 在双亲之间的扩增产物有差异,但不显著。另外,在这 2 个 SNP 位点上,当把 3'端的第 1、2、3 位点都设计为错配碱基时,两亲本均无扩增产物,如 P5 和 P11。所有只在 3'端第 1 位碱基上错配的引物,在 2 个六倍体小麦材料之间都没有获得有明显差异的 PCR 产物,这与 Hayashi 等<sup>[5]</sup>和黄代新等<sup>[16]</sup>的研究结果类似。因此,等位基因特异引物 3'端的 3 个碱基中不同位置的碱基错配以及错配碱基的数目对 PCR 产物的影响很大。同时,对于不同的 SNP 突变类型,错配发挥作用的位置不同,在 S608 (T→G) 位点,引物 3'端第 1、3 位碱基的错配起决定性作用;而在 S732 (G→A) 位点,引物 3'端第 1、2 位碱基错配对于抑制等位基因特异引物与模板的结合起着决定性作用。另外, P5 和 P11 在两个亲本中均无扩增,对于 Opata85 来说,这 2 个引物在 3'端第 1 个碱基处均与模板匹配,说明仅在反义引物 3'端第 2 位或第 3 位置入错配碱基,就可以有效抑制引物与模板的结合。

#### 2.4 引物 3'端不同碱基错配类型的 PCR 效果

为了研究引物 3'端 3 个碱基不同错配类型对 PCR 产物的影响,在 S608 (T→G) 位点设计了 P5 和 P6 引物,二者也是只在 3'端第 2 位碱基位置的错配类型不同(表 1),其中 P5 为 C/T 错配, P6 为 G/T 错配,从 PCR 的效果来看, P5 没有任何扩增产物,因此, C/T 错配强于 G/T 错配。类似地,在 S732 (G→A) 位点处设计了 P11 和 P12 引物,二者仅在 3'端第 2 个

碱基位置的碱基错配类型不同, P11 为 A/G 错配, P12 为 T/G 错配,二者的 PCR 效果完全不同, P11 没有任何扩增产物,可见, A/G 错配要强于 T/G 错配。

#### 2.5 互补引物检测 SNP 基因型

为了对 S608 SNP 位点 (T→G) 基因型进行分型,笔者设计与 P3 互补的引物 P2,以获得与前者相反的 PCR 产物,这样既可以相互验证 2 对引物的正确性,又可以检测到 2 个材料在该 SNP 位点的基因型是纯合基因型还是杂合基因型,以及是哪种纯合基因型<sup>[17, 18]</sup>。分别设计了 2 个亲本材料 Opata85 和 W7984 的互补引物并获得了稳定的 PCR 产物差异,验证了这 2 对引物的可靠性,结果见图 5。S608 位点是 T→G 突变,在 Opata85 中该位点为纯合基因型 G/G,在 W7984 中该位点为纯合基因型 T/T。因此,凡是只用 P3 可以获得差异的基因型在该位点是纯合基因型 G/G;只用 P2 可以获得差异的基因型在该位点是纯合基因型 T/T;凡是这 2 对引物获得相反差异的为杂合基因型 T/G。即 RIL 株系 28、30、31、32、33、34、39 为纯合 SNP,基因型为 G/G;株系 29、35、38、41 为纯合 SNP,基因型为 T/T;株系 36、37、40 为杂合 SNP,基因型为 T/G。

#### 2.6 等位基因特异 PCR 条件对扩增效果的影响

等位基因特异 PCR 非常灵敏,其扩增效果与 PCR 反应体系中每个组分的用量以及 PCR 程序都密切相关。其中以引物的退火温度、Mg<sup>2+</sup>及 dNTP 浓度的影响较大<sup>[19, 20]</sup>。笔者对等位基因特异引物的退火温度进行梯度检测,同时也梯度筛选了 Mg<sup>2+</sup>和 dNTP 浓度。

以引物 P6 和 P7 为例,实验所用 Mg<sup>2+</sup>浓度范围是

从  $1.75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  到  $5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 以  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  为浓度梯度。结果发现 2 对引物在  $\text{Mg}^{2+}$  浓度小于  $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和大于  $4.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的条件下均无扩增, 在  $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $4.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时均有非特异扩增, PCR 的最佳  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

在 dNTP 的浓度筛选过程中, 设计了 11 个梯度, 浓度范围从  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  到  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 以  $50$

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为一个梯度。结果发现在等位基因特异 PCR 中, 每个梯度都有扩增, 且在 2 个亲本中都有差异。但是, 从  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  到  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 扩增产物的量都较少且有非特异扩增; 而大于  $450 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 目标片段的扩增产物相对较多, 但非特异扩增也较多; 仅  $450 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  目标片段有特异扩增产物, 无非特异扩增产物, 因此, 选择了  $450 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 dNTP 浓度。

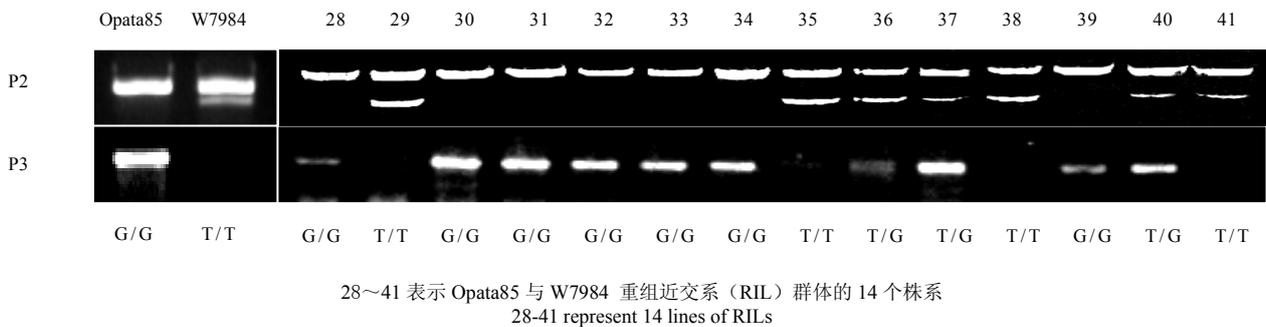


图 5 互补引物检测 S608 SNP 的基因型

Fig. 5 Assaying SNP genotypes of S608 with complementary primers

### 3 讨论

#### 3.1 等位基因特异引物中碱基错配对 PCR 结果的影响

在等位基因特异 PCR 中, 反义引物 3' 端的 1 个碱基错配往往不能完全抑制引物与模板的结合, 从而导致引物的特异性下降<sup>[21]</sup>, 因此仅靠 3' 端 1 个碱基的错配不能充分而可靠地区分 SNP 等位基因的基因型<sup>[5]</sup>, 还应该在反义引物 3' 端附近的几个碱基位置处分别加入合适的错配类型碱基。Ye 等<sup>[15]</sup>的研究认为, 在特异引物 3' 端 1、2 位加入错配碱基就可以获得较好的差异产物, 并且 G/A 和 C/T 错配为强的碱基错配类型; C/A 和 G/T 为弱的碱基错配类型; A/A、C/C、G/G 和 T/T 为中等的碱基错配类型。也就是说不同嘌呤、不同嘧啶之间的错配分别为强错配, 相同嘌呤、相同嘧啶之间的错配分别为中等错配类型, 嘌呤和嘧啶之间的错配为弱错配。在特异引物 3' 端错配碱基的搭配方面采取强弱搭配, 或者中中搭配, 获得理想扩增效果的可能性较大。Hayashi 等<sup>[5]</sup>的研究认为, 除了在反义引物 3' 端第 1 位设计错配碱基外, 在第 2、3、4 位加入错配碱基都有可能获得理想的特异引物。试验中, 我们首先选用强的和中等的碱基错配类型, 对两种 SNP 突变类型, 分别在第 2 和第 3 位加入了错配碱基, 发现

对于不同的 SNP 突变类型, 加入错配碱基的位置不同会产生不同的扩增效果。在 S608 (T→G) 位点, 3' 端第 1、2 位碱基错配的等位基因特异引物在 2 个六倍体小麦亲本材料的扩增产物无明显差异, 但是第 1、3 位碱基错配的引物在 2 个亲本材料中获得了具有明显差异的扩增产物; 而 S732 (G→A) 位点的结果正好相反, 用 1、2 位碱基错配的等位基因特异引物获得了特异的扩增产物。根据不同的 SNP 突变类型设计等位基因特异引物, 其错配碱基的位置及类型对 PCR 结果影响较大, 这可能与反义引物末端不同错配碱基产生的碱基堆积力、氢键及其立体结构的稳定性有关。还可能与错配碱基对和 DNA 聚合酶之间的相互作用造成的空间位阻有关。

#### 3.2 SNP 基因型的检测

利用 SNP 的二态性和便于分型的特点<sup>[2]</sup>, 通过等位基因特异 PCR 对 SNP 进行分型是很有效的。黄代新等<sup>[14]</sup>用 FLDAS-PCR (fragment length discrepant allele specific PCR) 方法检测 SNP, 他们设计了 2 条反义引物, 在其中 1 条反义引物的 5' 端加上了 4~6 bp 的非匹配碱基, 将 3 条引物置入同一反应管复合扩增, 并于同一泳道中进行检测, 可以检测不同的 SNP 基因型。Ye 等<sup>[15]</sup>介绍了一种 4 引物的等位基因特异 PCR, ARMS-PCR (amplification refractory mutation system-

PCR), 他设计了 2 条外侧引物用来限定片段的大小, 2 条内侧引物分别与 SNP 的 1 种基因型相匹配, 利用这种方法可以实现同一个 PCR 反应体系中检测不同基因型。管峰等<sup>[22]</sup>利用该方法快速测定了绵羊 *BMPR-IP* 的基因型。然而, 小麦是异源六倍体作物, 含 A、B、D 等 3 个基因组, 其基因组庞大, 而且 90% 以上的序列为重复序列<sup>[23]</sup>。如果在同一反应体系中加入 3 条或 4 条引物可能会产生较多的非特异扩增, 因此, 在小麦中使用多条引物同管进行 PCR, 检测 SNP 的基因型有较大的难度。笔者根据 *TaDREB1* 基因 S608 SNP 位点的特点, 设计了互补的等位基因特异引物用来检测 SNP 的基因型, 可以辨别基因型是杂合型, 还是纯合型, 以及是哪种纯合型。本研究用来验证等位基因特异引物效果的重组近交系 (Opata85×W7984) 群体, 虽然通过 10 代的自交, 已经高度纯合, 但是根据 RIL 群体的构建原理, 仍然会存在一定频率的杂合基因型<sup>[24]</sup>, 笔者利用互补的等位基因特异引物也有效检测出了杂合 SNP 基因型。利用该作图群体, 已经将 *TaDREB1* 基因定位于 3BS 上, 结果另行发表。

### 3.3 等位基因特异 PCR 反应体系的优化

等位基因特异 PCR 反应体系具有很高的灵敏性,  $Mg^{2+}$ 、Taq DNA 聚合酶及 dNTP 的浓度对扩增效果均有影响, 其中以  $Mg^{2+}$  的浓度影响最大。在试验中, 如果采用一般 PCR 反应体系中  $1.75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $Mg^{2+}$  浓度进行扩增, 效果不稳定; 当  $Mg^{2+}$  浓度调整到  $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时获得了相对稳定的 PCR 产物, 而且不同的等位基因特异 PCR 反应体系中所用的最适  $Mg^{2+}$  浓度不同。与一般的 PCR 相比, 在等位基因特异 PCR 反应体系中,  $Mg^{2+}$  及 Taq DNA 聚合酶的用量都比较大, 这可能是由于在等位基因特异 PCR 的反应中, 引物与 DNA 模板存在着碱基错配的情况, 较大的酶量和较高的酶活性有助于特异引物在模板-引物复合体处启动延伸。另外, 笔者还发现当 dNTP 的浓度在  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  到  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  之间时, 等位基因特异 PCR 都有扩增产物, 在  $450 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时效果最佳。Kwok 等<sup>[19]</sup>的研究也发现当 dNTP 的浓度在  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 等位基因特异 PCR 的扩增效果是相似的。因此, 在等位基因特异 PCR 的扩增方面,  $Mg^{2+}$  浓度在相对较窄的范围内影响 PCR 效果, 而 dNTP 则在较大的浓度范围内进行 PCR 都有扩增产物。

另外, 在等位基因特异 PCR 中, 等位基因特异引物的长度也是比较关键的。在试验中, 笔者所采用的

引物长度都在 20 bp 左右。若引物过长, 会增加等位基因特异引物的非特异性, 不容易得到理想的差异, 因为错配碱基仅仅是在等位基因特异引物的 3' 端, 而且起作用的是几个错配碱基, 如果 5' 端过长, 会增加引物与模板的结合能力, 但不利于获得特异性的 PCR 产物; 如果引物过短, 则降低了引物本身的特异性。

## 4 结论

利用普通小麦基因组特异引物分离到目标基因的基因组特异序列, 能够有效排除小麦 3 个基因组部分同源性的干扰。发掘小麦中控制重要性状基因的 SNP, 在等位基因特异引物 3' 端加入适当的错配碱基并优化其 PCR 反应体系, 开发稳定的等位基因特异引物, 可以有效检测普通小麦中的单核苷酸多态性。

## References

- [1] Brookes A J. The essence of SNPs. *Gene*, 1999, 234: 177-86.
- [2] 郝岗平, 杨清, 吴忠义, 曹鸣庆, 黄丛林. 植物的单核苷酸多态性及其在作物遗传育种中的应用. *植物学通报*, 2004, 21: 618-624.  
Hao G P, Yang Q, Wu Z Y, Cao M Q, Huang C L. Single nucleotide polymorphism (SNP) and its applications in crop genetics and breeding. *Chinese Bulletin of Botany*, 2004, 21: 618-624. (in Chinese)
- [3] 陈吉宝, 景蕊莲, 员海燕, 卫波. 等位基因特异 PCR 技术的研究与应用. *植物遗传资源学报*, 2006, 6: 469-473.  
Chen J B, Jing R L, Yun H Y, Wei B. Development of allele-specific PCR. *Journal of Plant Genetic Resources*. 2006, 6: 469-473. (in Chinese)
- [4] Brightwell G, Wycherley R, Potts G, Waghorn A. A high-density SNP map for the FRAX region of the X chromosome single-nucleotide polymorphisms. *Journal of Human Genetics*, 2002, 47(11): 567-575.
- [5] Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 1212-1220.
- [6] Sonneveld T, Tobutt K R, Robbins T P. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles *S1* to *S16* using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 1059-1070.
- [7] Drenkard E, Richter B G, Rozen S, Stutius L M, Angell N A, Mindrinos M, Cho R J, Oefner P J, Davis R W, Ausubel F M. A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2000, 124: 1483-1492.
- [8] Bundock P C, Christopher J T, Eggler P, Ablett G, Henry R J, Holton T

- A. Single nucleotide polymorphisms in cytochrome *P450* genes from barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106: 676-682.
- [9] Bundock P C, Henry R J. Single nucleotide polymorphism, haplotype diversity and recombination in the *Isa* gene of barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 543-551.
- [10] Jeong S C, Saghai M A, Maroof. Detection and genotyping of SNPs tightly linked to two disease resistance loci *Rsv1* and *Rsv3*, of soybean. *Plant Breeding*, 2004, 123: 305-310.
- [11] Schwarz G, Felsenstein F G, Wenzel G. Development and validation of a PCR-based marker assay for negative selection of the HMW glutenin allele Glu-B1-1d (Bx-6) in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 1064-1069.
- [12] Zhang W, Gianibelli M C, Ma W, Rampling L, Gale K R. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for gamma-gliadin alleles in *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 130-138.
- [13] Tyrka M, Blaszczyk L, Chelkowski J, Lind V, Kramer I, Weilepp M, Wisniewska H, Ordon F. Development of the single nucleotide polymorphism marker of the wheat *Lr1* leaf rust resistance gene. *Cell Molecular Biology Letter*, 2004, 9(4B): 879-889.
- [14] Boisson M, Mondon K, Torney V, Nicot N, Laine AL, Bahrman N, Gouy A, Daniel-Vedele F, Hirel B, Sourdille P, Dardevet M, Ravel C, Le Gouis J. Partial sequences of nitrogen metabolism genes in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110: 932-940.
- [15] Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins A R, Day I N. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(17): E88-8.
- [16] 黄代新, 杨庆恩, 赵贵森. 片段长度差异等位基因特异性 PCR——一种改良的分型新方法. *法医学杂志*, 2005, 21(1): 11-14.  
Huang D X, Yang Q E, Zhao G S. A simple and rapid modified-new method for SNP typing by fragment length discrepant allele specific PCR. *Journal of Forensic Medicine*, 2005, 21(1): 11-14. (in Chinese)
- [17] Michael Y T, Naomi Q H, Kenneth RC, Iraj B, Uttam G. Determination of a T/G polymorphism at nucleotide 3206 of the Apolipoprotein C III gene by amplification refractory mutation system. *Clinical Chemistry*. 1994, 40: 2235-2239.
- [18] Alfredo C, Ida B, Elisabetta M, Sebastiano C, Stefano B. Simple detection of a point mutation in LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in southern Italy by allele-specific polymerase chain reaction. *Journal of Lipid Research*, 1998, 39: 1101-1105.
- [19] Kwok S, Kellogg D E, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky J J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 999-1005.
- [20] Simsek M, Adnan H. Effect of single mismatches at 3'-end of primers on polymerase chain reaction. *Medical Sciences*, 2000, 2: 11-14.
- [21] Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, Powell S J, Summers C, Kalsheker N, Smith J C, Markham A F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 2503-2516.
- [22] 管 峰, 杨利国, 艾君涛, 刘守仁, 石国庆. 四引物扩增受阻突变体系 PCR 快速测定绵羊 *BMPr-IP* 基因型方法的建立. *遗传*, 2005, 27: 579-583.  
Guan F, Yang L G, Ai J T, Liu S R, Shi G Q. Development of a rapid mismatch PCR method using tetra-primer ARMS for detection of *BMPr-IB* gene mutation in sheep. *Hereditas*, 2005, 27: 579-583. (in Chinese)
- [23] Wan L L, Zhang P, John P F, Bernd F, Bikram S G. Sequence composition, organization, and evolution of the core *Triticeae* genome. *The Plant Journal*, 2004, 40: 500-511.
- [24] 徐云碧, 朱立煌. 分子数量遗传学. 北京: 中国农业出版社, 1994: 92-98.  
Xu Y B, Zhu L H. *Molecular Quantitative Genetics*. Beijing: China Agricultural Press, 1994: 92-98. (in Chinese)

(责任编辑 孙雷心)