

葡萄 SNP 标记的 CAPS 和 TSP 分析

郭大龙*, 李 猛, 张国海*, 郭明晓

(河南科技大学林学院, 河南洛阳 471003)

摘 要: 为了建立起葡萄 SNP 标记分析的一般方法和探索 EST-SNP 标记在葡萄中的应用, 对前期开发的葡萄 EST-SNP 位点进行了筛选, 设计了 28 对 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences, 酶切扩增多态性序列) 标记引物和 22 对 TSP (Temperature-switch PCR, 温度转变 PCR) 标记引物, 并在 31 份葡萄材料中进行了分析, 其中 20 对 CAPS 引物和 10 对 TSP 引物电泳条带较清晰, 多态性较好。基因分型统计显示: 所有的 SNP 位点均含有 2 个等位基因, 平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.336, 平均 Shannon's 信息指数为 0.511。基因分型和葡萄材料聚类结果均显示这两种方法所获结果提供的信息量大且结果可靠。本方法简便、成本低, 可作为 SNP 分型有效方法用于葡萄品种鉴定、基因分型和遗传多样性分析等。

关键词: 葡萄; 单核苷酸多态性; 酶切扩增多态性序列; 温度转变 PCR

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 11-2307-09

CAPS and TSP Analyses of Grape SNP Markers

GUO Da-long*, LI Meng, ZHANG Guo-hai*, and GUO Ming-xiao

(College of Forestry, Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: The grape EST-SNP loci developed previously were firstly screened in order to establish the ordinary analyzing method and investigate the performance of grape SNP markers. Twenty-eight CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) primers and twenty-two TSP (temperature-switch PCR) primers were designed to analyze the screened SNP loci. Finally, twenty CAPS primers and ten TSP primers produced clear and polymorphic bands in 31 grape genotypes. The genotyping results showed that all SNP loci have two alleles. The average polymorphism information content and Shannon index are 0.336 and 0.511, respectively. The genotyping and cluster results of this study showed that CAPS and TSP method were efficient and reliable. The CAPS and TSP primers developed in this study could be used in SNP genotyping, cultivar identification and genetic diversity analysis of grape varieties in future.

Key words: grape; SNP; CAPS; TSP

葡萄 (*Vitis*) 具有悠久的栽培历史和众多的品种资源, 但是由于长期的自然和人工选择, 不断引种和繁育等因素, 品种混杂, 影响了对葡萄品种测试和亲缘关系等鉴定的准确性 (Dong et al.,

收稿日期: 2013-07-15; **修回日期:** 2013-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30800742, 31372026); 河南省高校科技创新人才支持计划项目 (2010HASTTT002, 13HAST1T004); 河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目 (2010GGJS-072); 河南省重点科技攻关项目 (132102110029)

* E-mail: guodalong@haust.edu.cn; zgh_ly@163.com

2010)。分子标记方法不受外界环境因素的影响,可以准确客观地分析葡萄品种间的联系与区别,对种质资源的鉴定有重要作用。SNP (single nucleotide polymorphism, 单核苷酸多态性) 作为第三代分子标记,目前已广泛应用于遗传多样性分析 (van Inghelandt et al., 2010)、品种鉴定 (Dong et al., 2010)、遗传连锁图谱构建 (Tebbi et al., 2011) 和重要性状的基因定位 (Singh et al., 2010) 等相关研究中,是一种便于分析,遗传稳定性强的二态性分子标记 (Kim & Misra, 2007)。近年来,EST (expressed sequence tags) 序列的数量在公共数据库中急剧上升,这就为 EST-SNP 标记的开发和应用提供了良好的基础,目前国内外学者已对玉米 (Batley et al., 2003)、小麦 (Rustgi et al., 2009)、大豆 (束永俊 等, 2010)、番茄 (Labate & Baldo, 2005)、苹果 (Chagne et al., 2008) 和甜橙 (Jiang et al., 2010) 等多个物种进行了 EST-SNP 的分析与验证。

SNP 的检测方法众多 (陈冬和吴登俊, 2008),但这些方法的难度和应用成本均较大,不便于一般的实验室所采用。而 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) 方法,即酶切扩增多态性序列,基于限制性内切酶原理,是检测 SNP 位点的常用方法 (Lee et al., 2009),已成功应用于柑橘 (Jiang et al., 2010) 和大豆 (束永俊 等, 2010) 的候选 SNP 位点检测。TSP (temperature-switch PCR) 方法,即温度转变 PCR,是由 Tabone 等 (2009) 提出,优点是只需要一轮 PCR 即可直接通过琼脂糖凝胶电泳观测 SNP 基因分型结果,方法简便易行。目前 TSP 方法在大麦 (Hayden et al., 2009) 和小麦 (Huang & Brûlé-Babel, 2012) 的 SNP 位点检测分析中的应用效果较好。

本研究中采用 CAPS 和 TSP 的方法来对前期已开发的葡萄 EST 序列中 SNP 位点 (李猛 等, 2012) 进行分析,以期建立一种简单高效易行的葡萄 SNP 分析方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料及 EST 序列

试验于 2012 年 4—10 月在河南科技大学果树实验室完成。用于 DNA 提取的葡萄叶片均采自中国农业科学院郑州果树研究所国家葡萄种质资源圃,其类别包括欧亚种、欧山杂种和野生种,共计 31 份材料 (表 1)。

表 1 本研究所用葡萄材料
Table 1 Grape materials used in this study

种系 Species	编号 No.	材料名称 Varieties name	种系 Species	编号 No.	材料名称 Varieties name
欧亚种 <i>Vitis vinifera</i>	1	87-1		17	泽香 Zexiang
	2	和田红 Hetianhong		18	郑果大无核 Zhengguo Dawuhe
	3	黑鸡心 Heijixin		19	90-1
	4	红鸡心 Hongjixin		20	玫瑰香 Muscat Hamburg
	5	京秀 Jingxiu		21	莎巴珍珠 Pearl of Csaba
	6	京亚 Jingya		22	无核白鸡心 Centennial Seedless
	7	洛浦早生 Luopu Zaosheng		23	灰比诺 Pinot Gris
	8	李子香 Lizixiang	欧山杂种 Hybrid	24	左山一号 Zuoshan 1
	9	龙眼 Longyan	野生种 Wild species	25	塘尾葡萄 Tangwei Putao
	10	马奶 Manai		26	麝香葡萄 Moscatel
	11	木纳格 Munage		27	刺葡萄 <i>V. davidii</i> Foex.
	12	牛奶 Niunai		28	山葡萄 <i>V. amurensis</i> Rupr.
	13	瓶儿葡萄 Pinger Putao		29	华东葡萄
	14	无核白 Thompson Seedless			<i>V. pseudorticulata</i> W. T. Wang
15	夏白 Xiabai		30	毛葡萄 <i>V. quinqueangularis</i> Rehd.	
16	香妃 Xiangfei		31	葛藟 <i>V. flexuosa</i> Thunb.	

1.2 葡萄基因组 DNA 提取与 SNP 位点的开发

利用河南惠尔纳米科技有限公司的惠彤™磁珠法植物 DNA 提取试剂盒对葡萄叶片进行基因组 DNA 提取。葡萄 EST 序列的前处理与候选 SNP 位点的开发参考李猛等 (2012) 的方法。

1.3 SNP 位点的检测

1.3.1 CAPS 方法检测 SNP 位点

对具有酶切位点的候选 SNP 随机挑选进行 CAPS 标记的引物设计, 内切酶选用: *Kpn* I、*Bam*H I、*Hind*III、*Pst* I、*Xho* I、*Eco*R I。

CAPS 标记的扩增体系为 25 μ L, 其中包括: 灭菌双蒸水 16.8 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} 1.5 mmol \cdot L $^{-1}$, 上下游引物各 0.2 μ mol \cdot L $^{-1}$, dNTPs 0.2 mmol \cdot L $^{-1}$, *Taq* 酶 1 U, 葡萄基因组 DNA 50 ng。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增结束后对 PCR 产物进行 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 2 h, 然后用限制性内切酶对应的 Loading Buffer 终止酶切反应, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.3.2 TSP 标记检测 SNP 位点

随机挑选候选 SNP 位点进行 TSP 标记的引物设计, 其引物设计原则参照 Tabone 等 (2009)。设计 2 个位点特异性引物和 1 个等位基因特异性引物, 其中, 位点特异性引物是在 SNP 位点的两侧, 引物退火温度为 60 ~ 65 $^{\circ}$ C (63 $^{\circ}$ C 最佳), 产物长度至少为 400 bp, 等位基因特异性引物在 SNP 位点上游, 其 3' 的核苷酸要与 SNP 位点的等位基因互补配对, 退火温度为 43 ~ 48 $^{\circ}$ C (45 $^{\circ}$ C 最佳), 然后在 5' 端人工添加 2 ~ 3 bp 的核苷酸序列, 使其不与模板序列互补配对, 且添加完 5' 尾巴后, 要使整条等位基因特异性引物的退火温度达到 52 ~ 55 $^{\circ}$ C (53 $^{\circ}$ C 最佳), 此外, 要注意位点特异性引物的上游引物与等位基因特异性引物之间的距离, 两者至少间隔 50 bp, 以方便 SNP 基因分型的直观判断。

PCR 反应体系为 25 μ L, 其中包括: 灭菌双蒸水 15.6 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} 1.5 mmol \cdot L $^{-1}$, 位点特异性引物 0.2 μ mol \cdot L $^{-1}$, 等位基因特异性引物 0.96 μ mol \cdot L $^{-1}$, dNTPs 0.2 μ mol \cdot L $^{-1}$, *Taq* 酶 1 U, 葡萄基因组 DNA 50 ng。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 位点特异性引物与模板 DNA 结合阶段为 15 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 等位特异性引物与位点特异性引物竞争阶段为 5 个循环: 94 $^{\circ}$ C 10 s, 45 $^{\circ}$ C 30 s; 最后是等位基因特异性引物与模板 DNA 结合阶段 15 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s。扩增结束, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。

2 结果与分析

2.1 SNP 位点筛选

针对 SNP 标记分析时 CAPS 方法 (Thiel et al., 2004) 和 TSP 方法 (Tabone et al., 2009) 设计引物的要求, 对前期开发的 EST-SNP 位点 (李猛 等, 2012) 进行了筛选, 对存在酶切位点的候选 SNP 位点进行 CAPS 标记引物设计, 共 28 对; 对无合适酶切位点的候选 SNP 位点随机进行 TSP 标记引物设计, 共 22 对。这 50 对引物进一步在供试葡萄材料中进行分析。

2.2 CAPS 标记结果

用 28 对 CAPS 标记引物对 31 份葡萄材料进行 PCR 扩增, 并用相应的限制性内切酶对扩增产物进行酶切分析。结果显示: 28 对 CAPS 引物均能扩增出与预期长度相吻合的特异性产物, 其中有 20

对引物（表 2）酶切后的电泳条带较清晰，显示出较好的多态性。

表 2 CAPS 标记引物序列
Table 2 Primer sequences of CAPS markers

编号 No.	正向引物序列 (5' - 3') Sequence of forward primer	反向引物序列 (5' - 3') Sequence of reverse primer	内切酶 Endonucleases
C1	TAATGCTGGCTTGCCGTGTC	CGCCACATCATCCCCATTAT	<i>Kpn</i> I
C2	TACTGAGGCTGTTGCTGATGC	CCTGTATTTTGGTTTGCTTGC	<i>Bam</i> H I
C3	TTGGAGTGAACATGGGCGA	GAGGGTGGTGTGTGTGGGT	
C4	CCCTCTTACCTCTTCCACG	TATGTCCCAAAGGGCTTGTAAAC	
C5	CCGAGAGACAAACCTACCAGC	AGAAAAACACCAACCGCA	
C6	CAAAATGTCTCGGAGGTATGA	GCTCTTGTAAGCGTAGGTGTA	<i>Hind</i> III
C7	GAGGTGATTGTACCACCTTTGAG	TTGTGCTGCTCGCAGTTTCT	
C8	TCACTTCTCTTACCTGGTCTCT	TTTGAAACTGAAAAACGGCA	
C9	GATGTGCCGACCGACTTGCCCT	ATGGGTTGCGCCTGGCTCGAAA	
C10	CTGAATGTGCTCAAACGGAC	CATCTAGTACCTGAACTAGGGAAG	<i>Pst</i> I
C11	ACAAGTCGGAGAAAGACCCTG	CAAGACACAAACTCATCCAACAT	
C12	CTCTCTGTCTCAACTTCTTCATTC	AACCCACCTTCAACCTACCA	
C13	GACAAGTTGGGACTCAGGCAC	CCCCATTTAAATGTGTTGATATCT	
C14	AAGGGGAGACCCAGCCACATT	CACCAATCCTTTCAAAGTGCC	<i>Xho</i> I
C15	TCTTAAACAGGGGTCGCAC	CAGCACTGGAGTCAAATGG	
C16	AGAAAAAGTCCACCGCCAA	TCAAAGCCACAATCAAAGTT	
C17	CTAAGATGTTCAATGGAGGGCA	CAGATGACGGAATAGGTGTGGA	
C18	TGAAGTTTCTGATCTATGGTCG	ATTGGGCGTATCCTCCTC	<i>Eco</i> R I
C19	ATCGTTGAGATGGATGGAG	AAGCCTGGGAATGTTTTTG	
C20	CGTTTCTACTTTTCGCTTCTC	CCTCATAACAGTTCATTTCCA	

如图 1 所示，利用引物 C1，内切酶 *Kpn* I 对候选 SNP 位点 T/C 进行 CAPS 标记分型，从电泳条带可看出，共有 3 种酶切产物，其中 87-1 (1)、和田红 (2)、黑鸡心 (3)、夏白 (15)、郑果大无核 (18)、玫瑰香 (20)、灰比诺 (23)、左山一号 (24)、刺葡萄 (27) 和葛藟 (31) 为纯合子 TT；京亚 (6)、香妃 (16)、塘尾葡萄 (25) 和山葡萄 (28) 为纯合子 CC；其余 3 条带的均为杂合子 T/C。

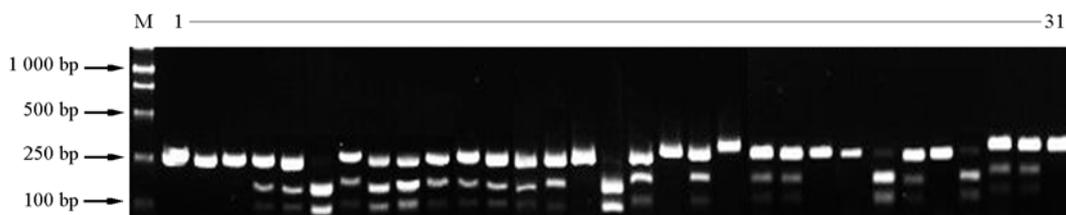


图 1 CAPS 标记引物 C1 的内切酶 *Kpn* I 分析结果

M: DL2000 marker; 1~31 对应于表 1 中的材料编号。

Fig. 1 The results of CAPS marker C1 by enzyme *Kpn* I

M: DL2000 marker; 1 - 31 are corresponding to the numbers in Table 1.

2.3 TSP 标记结果

用 22 对 TSP 标记引物对 31 份葡萄材料进行 PCR 扩增，结果显示：22 对 TSP 标记引物均能扩增出与预期长度相吻合的特异性产物，其中有 10 对引物（表 3）的电泳条带较清晰，显示出较好的多态性。

表 3 TSP 标记引物序列
Table 3 Primer sequences of TSP markers

编号 No.	位点特异性正向引物 (5'-3') Specific forward primer	位点特异性反向引物 (5'-3') Specific reverse primer	等位基因特异性引物 (5'-3') Allele-specific primer
T1	GAAAATGGTGGAGGGTCCGAAA	ATCGCCACATCATCCCCATTATA	AGGCTTTGATGGATACTAGGTA
T2	CAAACAGCCTTGCTTTCCTCCG	CAAAGGTGATACAAAAGGGGCG	ACAAGAGAGAAGCAACGGA
T3	CTGAAGGGCGTCTCTACCAAGTC	ATTGTGCTGCTTGATTGTTGCC	TGCATCCTTTGACAGGATT
T4	GGCATCGGACAGGAAGTTGAA	ATTGAACCCGACACCTGACCC	GTGACGCCCTGTTCTCTAG
T5	AAAGTTGAGAGTTTGAAGGGGAAG	ACGGGACTGAGAGACTAAGATGGA	TCTGATGAGTCGTTCAATGG
T6	GGGACCAAAGGGAATTTCAAGAT	GGTGACGATGATCCGATTCAAAA	GCATCTCGCTTATTGCTTT
T7	TAGCTGCTAGTGATTGACATTGTGC	AATGTTTCTCGTTGACAGTCCCTT	CTCGTTTTTCATCACAAAA
T8	GTGGTTGAGATGGGGTCCAATTAT	AGAAGGATGGCTAGAGTGAATGG	AGCAGGTTTCCGGCTAT
T9	TTCCCTACTGTGCGACCTTCTTT	CCCTTACAGTCTTTCCTTCCTCCT	TGCAGAAAGAGACCCTCG
T10	AACTATGAAACCAATACAACCTGCTG	CTGGTGTGTCAGATACCCGTTTC	GGGACAGACAACCTTCAACT

如图 2 所示, 利用引物 T1 对候选 SNP 位点 G/T 进行 TSP 标记分型, 从电泳条带可得出, 共有 3 种 TSP 产物, 其中红鸡心 (4)、龙眼 (9)、马奶 (10)、香妃 (16)、麝香葡萄 (26) 和葛藟 (31) 表现为纯合子 TT; 87-1 (1)、木纳格 (11)、瓶儿葡萄 (13)、90-1 (19) 和玫瑰香 (20) 表现为杂合子 G/T, 其余位置在 250 bp 左右的 1 条带均为纯合子 GG。

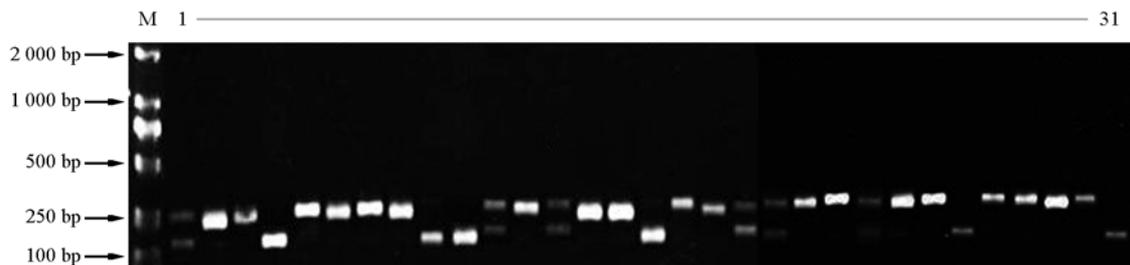


图 2 TSP 标记引物 T1 分析结果

M: DL2000 marker; 1~31 对应于表 1 中的材料编号。

Fig. 2 The results of TSP marker T1

M: DL2000 marker; 1 - 31 are corresponding to the numbers in Table 1.

2.4 CAPS 标记和 TSP 标记的基因分型结果

根据 SNP 标记的特点, 结合琼脂糖凝胶电泳图, 对 CAPS 标记和 TSP 标记进行基因分型结果统计, 纯合子记为 AA, BB, 杂合子记为 AB。

将统计结果导入 PopGen32 软件, 对 SNP 位点进行杂合度, Shannon's 信息指数, 等位基因频率, 多态性信息含量 (PIC) 等相关数值进行计算。

由表 4 可以看出, 所有的 SNP 位点均含有 2 个等位基因 (N_a), 次要等位基因频率 (MAF) 从 0.050 ~ 0.450 不等, 平均杂合度 0.072 ~ 0.495, Shannon's 信息指数 0.198 ~ 0.688, 多态性信息含量 (PIC) 0.072 ~ 0.495。PIC 是反映 DNA 位点变异程度的重要指标, 当 $PIC > 0.5$ 时, 表明该位点为高多态性; 当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时, 表明该位点为中多态性, 当 $PIC < 0.25$ 时, 表明该位点为低多态性。本次试验的大部分位点表现为中多态性, PIC 均在 0.25 ~ 0.5 之间, 仅对 1 份材料成功分型的引物 C3 表现为最低的多态性, PIC 仅为 0.072。

表 4 30 个 SNP 标记的基因分型结果
Table 4 The genotyping results of 30 SNP markers

编号 No.	N_a	MAF	Obs_Het	Exp_Het	Ave_Het	I	PIC
C1	2.000	0.387	0.425	0.480	0.474	0.667	0.475
C2	2.000	0.212	0.025	0.338	0.334	0.517	0.335
C3	2.000	0.037	0.025	0.073	0.072	0.159	0.072
C4	2.000	0.450	0.750	0.501	0.495	0.688	0.495
C5	2.000	0.362	0.075	0.468	0.462	0.654	0.462
C6	2.000	0.200	0.100	0.324	0.320	0.500	0.320
C7	2.000	0.125	0.050	0.221	0.218	0.376	0.219
C8	2.000	0.287	0.175	0.414	0.409	0.599	0.410
C9	2.000	0.350	0.200	0.460	0.455	0.647	0.455
C10	2.000	0.212	0.375	0.338	0.334	0.507	0.335
C11	2.000	0.175	0.000	0.292	0.288	0.463	0.289
C12	2.000	0.050	0.000	0.096	0.095	0.198	0.095
C13	2.000	0.250	0.100	0.379	0.375	0.562	0.375
C14	2.000	0.162	0.025	0.275	0.272	0.443	0.272
C15	2.000	0.137	0.025	0.240	0.237	0.400	0.237
C16	2.000	0.225	0.000	0.353	0.348	0.533	0.349
C17	2.000	0.112	0.175	0.202	0.199	0.351	0.200
C18	2.000	0.325	0.050	0.444	0.438	0.630	0.439
C19	2.000	0.425	0.050	0.494	0.488	0.681	0.489
C20	2.000	0.300	0.050	0.425	0.420	0.610	0.420
T1	2.000	0.237	0.475	0.366	0.362	0.548	0.362
T2	2.000	0.275	0.550	0.403	0.398	0.588	0.399
T3	2.000	0.150	0.300	0.258	0.255	0.422	0.255
T4	2.000	0.262	0.525	0.392	0.387	0.575	0.387
T5	2.000	0.175	0.250	0.292	0.288	0.463	0.289
T6	2.000	0.362	0.725	0.468	0.462	0.654	0.462
T7	2.000	0.100	0.200	0.182	0.180	0.325	0.180
T8	2.000	0.337	0.675	0.452	0.447	0.639	0.447
T9	2.000	0.075	0.150	0.140	0.138	0.266	0.139
T10	2.000	0.312	0.625	0.435	0.429	0.621	0.430

注: MAF 为次要等位基因频率, Obs_Het 为观测杂合度, Exp_Het 为期望杂合度, Ave_Het 为平均杂合度, I 为 Shannon's 信息指数, PIC 为多态性信息含量。

Note: MAF : Minor allele frequency; Obs_Het : Observed heterozygosity; Exp_Het : Expected heterozygosity; Ave_Het : Averaged heterozygosity; I : Shannon index; PIC : Polymorphism information content.

2.5 葡萄材料的聚类分析

对 CAPS 标记和 TSP 标记的所有基因分型结果进行 1/0 统计, 利用 NTSYS 软件中的 Simqual 程序计算 Jaccard 相似指数矩阵, 用 SHAN 程序中的 UPGMA 法进行聚类分析, Find 模式搜寻所有可能的树, 通过 UPGMA 算法进行遗传关系作图 (图 3)。可以看出, 大部分的欧亚品种聚在一起, 所有的野生种聚在一起, 欧亚酿酒品种灰比诺和欧山杂种左山一号聚在一起。其中亲缘关系最近的为野生种塘尾葡萄与刺葡萄, 遗传系数达到 0.99。本次试验所得到的聚类结果中, 大部分相同种系的不同材料都被分到了同一组, 表现出较近的遗传关系。洛浦早生为京亚的芽变, 在聚类图中两者明显分开, 其他有亲缘关系的材料如泽香与龙眼也聚在一起, 这些都显示了本研究中所用 SNP 位点良好的品种区分能力。

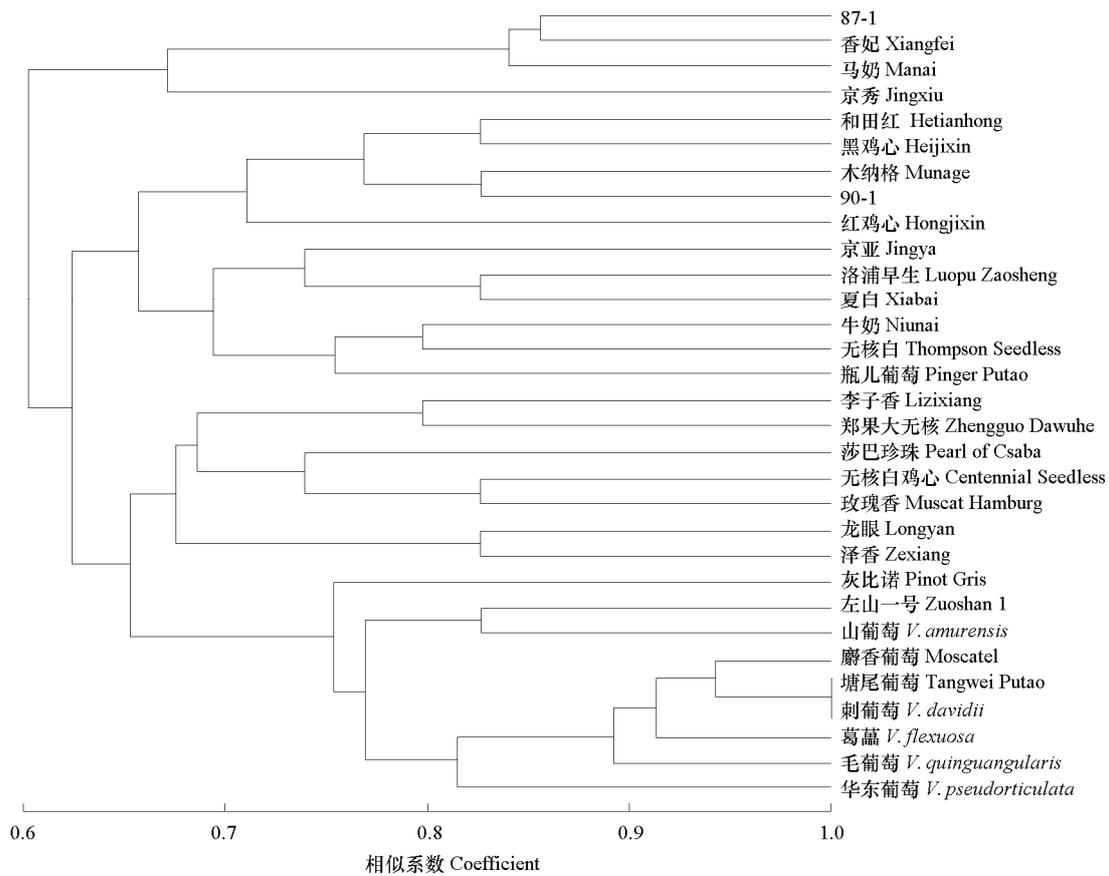


图 3 31 份葡萄材料的聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis of 31 grape genotypes

3 讨论

3.1 CAPS 标记和 TSP 标记的影响因素

引物设计是影响 CAPS 标记和 TSP 标记的关键因素，其中发卡结构、二聚体、错配、退火温度以及产物长度均能对扩增造成直接影响，不可忽略任意一点。本试验共设计了 CAPS 标记引物 28 对，TSP 标记引物 22 对，其中 20 对 CAPS 引物和 10 对 TSP 引物得到较好扩增结果，可用来进行后续的数据分析。CAPS 标记和 TSP 标记对产物长度的要求较高，从电泳结果来看，产物长度过大或过小时，均使得条带之间难以区分，不易分析。因此，本试验将扩增产物长度设计在 100 ~ 500 bp，为能更好的得到基因分型结果，分型后的产物至少相差 50 bp，具体体现在：CAPS 的酶切位点要距离上下游引物的 3'端至少 50 bp，且不能设计在产物的中间，要距离中间位置 50 bp 左右（上下游均可）；TSP 的等位基因特异性引物要距离位点特异性上游引物至少 50 bp，如果分型产物自身的长度过小或分型产物之间的长度差异过小，在琼脂糖凝胶电泳时就会使得条带重叠，无法判断基因分型结果 (Neff et al., 1998)。其实在实践中，对 CAPS 标记的扩增产物长度要求并不是十分严格，因为即使酶切位点在产物的中间位置，产物被酶切后的长度明显区别于与不被酶切的产物，这样就可以根据电泳后的条带位置与个数分析纯合子和杂合子的基因分型结果，根据酶切位点所处的位置不同，酶切电泳后，纯合子就会在琼脂糖凝胶上显示出 1 条带或 2 条带，杂合子则会显示出 2 条带或 3 条带 (Xiang et al., 2006)。

对于 TSP 标记的产物长度则必须严格按照引物设计原则, 位点特异性上游引物距离等位基因特异性引物过近的话, 在基因分型时就会使得位点特异性产物与等位基因特异性产物区分不开, 它们之间至少相差 50 bp 才能简便直观地分析基因分型结果。Hayden 等 (2009) 的研究显示, 用 TSP 标记区分纯合子与杂合子时, 与 CAPS 标记有所区别, 当模板为纯合子时, TSP 标记的电泳结果只会产生 1 条带, 因为等位基因特异性引物与位点特异性引物是竞争关系, 非此即彼, 所以在 PCR 时只会得到一种产物, 只有两种等位基因都存在情况下, 即模板为杂合子时, 电泳结果才会显示出两条带 (Hayden et al., 2009)。但这是在理想状态下的理论值, 通过试验发现, 只有当引物设计的较理想时, 才会出现真正的 1 条带, 大部分引物的电泳结果均为两条带, 而实际上, 通过比较 CAPS 标记的电泳结果, 所供试的葡萄材料中完全没有如此多的杂合子。

此外, 本次试验的引物设计均是以葡萄的 EST 序列为模板, 在以葡萄基因组 DNA 为模板进行扩增的时候, 内含子就会在一定程度上干扰扩增产物的基因分型结果。Wang 等 (2008) 的研究也显示: 利用 Bead array 技术对扩增产物进行基因分型时, 只有当引物完全落在外显子区域, 才能成功对扩增产物进行基因分型。因此, 为提高基因分型的成功率, 这些引物的改进就需要在已知的基因组序列上进行重新设计, 提高引物的特异性, 尽量避免内含子序列在扩增产物中出现。

3.2 CAPS 标记与 TSP 标记比较

CAPS 标记和 TSP 标记各有优势, CAPS 标记能从结果直接判断纯合子与杂合子, 但其成本较高, 通量较低, 内切酶的使用也是种类繁多, 无章法可循, 因此在前期的试验设计上需要投入较多的精力。目前, Jeong 等 (2011) 开发出仅用 12 种限制性内切酶检测所有 SNP 的方法, 这在一定程度上改善了 CAPS 标记的检测效率, 为内切酶的选择提供了特定的规律, 简化了操作步骤。TSP 标记成本低廉, 简便快捷, 是 AS-PCR 的升级版 (雷天刚 等, 2012), 只需进行一轮 PCR 即可直接从电泳结果分析 SNP 位点, 但其对于纯合子与杂合子的判断, 受引物自身影响较多。同时 TSP 标记对引物设计的要求相对较高, 就像不能保证所有的序列都存在天然的酶切位点一样, 也不能保证 TSP 标记的引物设计原则适合于所有的序列模板, 3 条引物之间的发卡结构, 错配, 二聚体, 位点特异性引物和等位基因特异性引物各自的退火温度, 均是 TSP 引物的重要设计原则。Hayden 等 (2009) 的研究表明 TSP 标记的基因分型成率是 100%。TSP 标记引物设计好后, 其操作是基于琼脂糖凝胶电泳基础上的, 检测方法快捷, 简便, 结果的可靠度也较高, 大规模操作能力较强, 可作为一般的实验室进行 SNP 分型的有效方法。

References

- Batley J, Barker G, O Sullivan H, Edwards K J, Edwards D. 2003. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data. *Plant Physiology*, 132 (1): 84 - 91.
- Chagne D, Gasic K, Crowhurst R N, Han Y, Bassett H C, Bowatte D R, Lawrence T J, Rikkerink E H, Gardiner S E, Korban S S. 2008. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics*, 92 (5): 353.
- Chen Dong, Wu Deng-jun. 2008. Approaches for SNP genotyping. *Biotechnology Bulletin*, (2): 93 - 96, 104. (in Chinese)
- 陈冬, 吴登俊. 2008. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展. *生物技术通报*, (2): 93 - 96, 104.
- Dong Q H, Cao X, Guang Y, Yu H P, Nicholas K K, Wang C, Fang J G. 2010. Discovery and characterization of SNPs in *Vitis vinifera* and genetic assessment of some grapevine cultivars. *Scientia Horticulturae*, 125 (3): 233 - 238.
- Hayden M J, Tabone T, Mather D E. 2009. Development and assessment of simple PCR markers for SNP genotyping in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 119 (5): 939 - 951.
- Huang X Q, Brûlé-Babel A. 2012. Sequence diversity, haplotype analysis, association mapping and functional marker development in the waxy and starch synthase IIa genes for grain-yield-related traits in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breeding*, 30: 627 - 645.

- Jeong Y S, Lee S Y, Choi I H, Lim Y P, Hur Y K, Staub J E, Chung S M. 2011. A method for selection of restriction enzymes for sdCAPS marker construction. *Plant Breeding*, 130 (3): 401 - 403.
- Jiang D, Ye Q L, Wang F S, Cao L. 2010. The mining of citrus EST-SNP and its application in cultivar discrimination. *Agricultural Sciences in China*, 9 (2): 179 - 190.
- Kim S, Misra A. 2007. SNP genotyping: Technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9: 289 - 320.
- Labate J A, Baldo A M. 2005. Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing. *Molecular Breeding*, 16 (4): 343 - 349.
- Lee G A, Koh H J, Chung H K, Dixit A, Chung J W, Ma K H, Lee S Y, Lee J R, Lee G S, Gwag J G. 2009. Development of SNP-based CAPS and dCAPS markers in eight different genes involved in starch biosynthesis in rice. *Molecular Breeding*, 24 (1): 93 - 101.
- Lei Tian-gang, He Yong-rui, Peng Ai-hong, Xu Lan-zhen, Liu Xiao-feng, Yao Li-xiao, Zou Xiu-ping, Jiang Dong, Chen Shan-chun. 2012. Development of CAPS markers and allele-specific PCR primers in citrus. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (6): 1027 - 1034. (in Chinese)
雷天刚, 何永睿, 彭爱红, 许兰珍, 刘小丰, 姚利晓, 邹修平, 江 东, 陈善春. 2012. 柑橘 CAPS 标记和 AS-PCR 引物的开发. *园艺学报*, 39 (6): 1027 - 1034.
- Li Meng, Guo Da-long, Liu Chong-huai, Zhang Guo-hai, Hou Xiao-gai. 2012. Information and characteristics of EST-SNP loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Zhejiang University: Agric & Life Sci*, 38 (3): 263 - 270. (in Chinese)
李 猛, 郭大龙, 刘崇怀, 张国海, 侯小改. 2012. 葡萄 EST-SNP 位点的信息与特征. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 38 (3): 263 - 270.
- Neff M M, Neff J D, Chory J, Pepper A E. 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal*, 14 (3): 387 - 392.
- Rustgi S, Bandyopadhyay R, Balyan H S, Gupta P K. 2009. EST-SNPs in bread wheat: Discovery, validation, genotyping and haplotype structure. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 45: 106 - 116.
- Shu Yong-jun, Li Yong, Wu Na-la-hu, Bai Xi, Cai Hua, Ji Wei, Zhu Yan-ming. 2010. Mining and identification of SNP from EST sequences and conversion of CAPS markers in soybean. *Acta Agronomica Sinica*, 36 (4): 574 - 579. (in Chinese)
束永俊, 李 勇, 吴娜拉胡, 柏 锡, 才 华, 纪 巍, 朱延明. 2010. 大豆 EST-SNP 的挖掘, 鉴定及其 CAPS 标记的开发. *作物学报*, 36 (4): 574 - 579
- Singh A, Singh P K, Singh R, Pandit A, Mahato A K, Gupta D K, Tyagi K, Singh A K, Singh N K, Sharma T R. 2010. SNP haplotypes of the BADH1 gene and their association with aroma in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*, 26 (2): 325 - 338.
- Tabone T, Mather D, Hayden M. 2009. Temperature Switch PCR (TSP): Robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs. *BMC Genomics*, 10 (1): 580.
- Thiel T, Kota R, Grosse I, Stein N, Graner A. 2004. SNP2CAPS: A SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Research*, 32 (1): e5.
- Trebbi D, Maccaferri M, de Heer P, Sørensen A, Giuliani S, Salvi S, Sanguineti M C, Massi A, van der Vossen E A G, Tuberosa R. 2011. High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics*, 123 (4): 555 - 569.
- van Inghelandt D, Melchinger A E, Lebreton C, Stich B. 2010. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 120 (7): 1289 - 1299.
- Wang S, Sha Z, Sonstegard T S, Liu H, Xu P, Somridhivej B, Peatman E, Kucuktas H, Liu Z. 2008. Quality assessment parameters for EST-derived SNPs from catfish. *BMC genomics*, 9 (1): 450.
- Xiang T, Wang L, Pang J, Hu J Q, Shentu L F, Wu K. 2006. Development of SNP marker and CAPS marker linked to ACC synthase gene in different sexual phenotypes of cucumber. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 33 (4): 362.