

一种大豆 SNP 分型新方法

袁翠平,李英慧,刘章雄,关荣霞,常汝镇,邱丽娟

(中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物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开放实验室,北京 100081)

摘要 单核苷酸多态性(SNP)在大豆基因组中分布广泛,SNP 分型是大豆 SNP 遗传作图,关联分析、分子标记辅助选择等研究的重要技术。本文以 *Rhg4* 基因开发的 5 个 SNP 为例,介绍了一种大豆 SNP 分型的新方法—片段长度差异等位基因特异性 PCR(FLDAS-PCR)。采用 AS-PCR 原理,针对某个 SNP 位点设计 2 条相差 4-5bp 的特异引物和 1 个公用引物,PCR 产物约 100bp 或 150bp,2 种等位基因型 PCR 产物相差 4-5bp,在 2 个特异引物 3' 端第 3 和 4 碱基位置分别人为引入错配碱基来提高 PCR 特异性,通过 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可将纯合和杂合基因型检测出来。探讨了特异引物浓度和退火温度对 *Rhg4*-1592 扩增效果的影响,研究表明,可通过调整特异引物浓度和退火温度优化扩增效果。FLDAS-PCR 对 18 份种质分型结果与 PCR 产物克隆测序法一致,表明本研究建立的 FLDAS-PCR 法是一种简便、快捷、新型的大豆 SNP 分型方法。

关键词 大豆;SNP;分型;片段长度差异等位基因特异性 PCR

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)04-0447-07

A METHOD OF SNP GENOTYPING IN SOYBEAN

YUAN Cui-ping, LI Ying-hui, LIU Zhang-xiong, GUAN Rong-xia, CHANG Ru-zhen, QIU Li-juan

(Chinese Academy of Agricultural Sciences, Institute of Crop Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology (MOA), Beijing 100081)

Abstract Single nucleotide polymorphism (SNP) is a genome-wide mutation type for organisms. SNP genotyping is an important technique for SNP genetic mapping, association analysis, and molecular assistant selection and so on. We introduced a fragment length discrepant allele specific PCR (FLDAS-PCR) method for SNP genotyping in soybean, using 5 SNPs in *Rhg4* as examples. For a SNP loci, we designed 2 allele specific primers which had 4-5bp length difference and 3'-end complementary to each of bi-allelic SNPs, and 1 common primer, as a result PCR products of different alleles had 4-5bp difference in length, which could be separated by 6% denature polyacrylamide gel. In order to improve PCR specificity and data accuracy, an additional base mismatch was introduced at the 3rd or 4th nucleotide closest to the 3'-end of each of the spe-

收稿日期:2007-03-16

基金项目:国家自然科学基金(30471096);国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA100104 和 2006AA10Z164)

作者简介:袁翠平(1978-),女,在读博士生,主要从事大豆胞囊线虫抗病基因发掘与利用研究。E-mail:cpyuan2004@126.com

通讯作者:邱丽娟,研究员,博士生导师, Tel:010-62135623, E-mail:qiu_lijuan@263.net

cific primers. We also investigated the influence of annealing temperature and primer concentration on PCR amplification, *Rhg4*—1592 as an example, and found that lower concentration of the specific primer would reduce its annealing competition in PCR reaction, and behaved more sensitive to annealing temperature, so we could optimize PCR by increasing or reducing specific primer concentration. The genotypes of SNPs by the FLDAS—PCR agreed with the results by PCR cloning and sequencing for 18 soybean genotypes, which approved that the method was effective in SNP genotyping in soybean.

Key words Soybean; SNP; Genotyping; Fragment Length Discrepant Allele Specific PCR

单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 是动植物基因组中分布广泛, 数量巨大, 信息丰富, 易于检测的可遗传变异, 被称为继 RFLP 和 SSR 之后的第三代遗传标记, 广泛用于遗传作图、LD 分析、关联分析、分子标记辅助选择等, 已成为分子生物学和遗传学领域的研究热点^[1~4]。

面临数目巨大的 SNP, SNP 分型是 SNP 研究领域的一个重要课题。根据不同研究需要和实验条件, 已建立了不同的分型方法, 包括寡核苷酸微阵分析、质谱法以及基于 PCR 的等位基因特异性 PCR (AS—PCR) 等^[5~12]。AS—PCR 法通过特异引物的巧妙设计, PCR 对 DNA 基因组信息的放大和合适的检测方法将不同的 SNP 基因型分辨开来, 具有费用低, 程序简单, 易于操作等优点, 适于中小型研究单位对较小规模 SNP 检测^[4, 13, 14]。目前, 改良的 AS—PCR 方法已有较多报道, 如片段长度差异等位基因特异性 PCR (FLDAS—PCR)、四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术等^[15~19]。通过扩增产物长度差异达到分型目的有 2 种方法^[5, 15, 17], 其一, 3 个引物 (包括 2 个特异引物与 1 个公用引物) 扩增与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测相结合, 该方法中 2 个特异引物位于 SNP 位点的同一侧 (上游或下游), 除了长链引物比短链引物在 5' 端多出 4—6 个碱基和在 3' 端区域存在 2 个碱基差异外, 它们在序列上也是相同的; 其二, 4 个引物 (包括 2 个外引物与 2 个特异引物) 扩增与琼脂糖凝胶电泳检测相结合, 这种方法的 2 个特异引物分别位于 SNP 的上游和下游, 它们的 3' 末端碱基与 SNP 位点互补。

SNP 在大豆基因组中分布频率高达 0.0037 (1SNP/273bp)^[3], 是加密大豆遗传图谱、重要性状 QTL 定位及其分子标记辅助选择的重要手段。近

年来, 美国启动了大豆基因组测序、SNP 发现及 SNP 标记开发等研究。Zhu 等^[3]对 25 个大豆种质 76kb 的基因组 DNA 测序, 较全面地分析了大豆 SNP 的发生频率及其特点。Van 等^[20]研究了韩国及美国 QTL 作图群体的 15 份亲本 SNP 多态性。此外, 关于大豆某些基因如 *Lx₂* 和 *Rhg4* 的 SNP 亦见诸报道^[21, 22]。但是, 关于大豆 SNP 分型方法报道较少。Jeong 等^[4]利用与 *Rsv1* 和 *Rsv3* 位点连锁紧密的 SNP, 采用改良的 AS—PCR 法和琼脂糖凝胶电泳对 8 个作图群体亲本及 F₂ 进行了分型, 但该方法鉴定 1 个 SNP 需要多个扩增反应, 增加了实验费用。Kim 等和 Jang 等分别将 *Lx₂* 基因 251 位点和 *Rhg4* 基因 4847 位点的 SNP 转化成分子标记, 采用 SNaPshot™ 多重反应试剂盒 (Applied Biosystems, USA) 对 RILs 群体进行基因型检测, 成功地将 *Lx₂* 和 *Rhg4* 分别定位在 LG F 距 Sat_074 8.6cM 处和 LG A2 距 Sat187 6.3cM 处^[21, 22], 但该方法需要荧光标记探针和昂贵的毛细管电泳系统。

针对上述问题, 借鉴改良的 AS—PCR 方法一片段长度差异等位基因特异性 PCR (FLDAS—PCR), 对大豆胞囊线虫候选抗病基因 *Rhg4* 序列中发现的 5 个 SNP 进行分型, 试图建立简便快捷的大豆 SNP 分型方法, 以为大豆 SNP 标记的开发应用提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 供试材料

用 18 份大豆种质, 包括 5 份选育品种, 6 份地方品种和 7 份野生大豆。通过对这些种质胞囊线虫候选抗病基因 *Rhg4* 的序列进行分析, 鉴定出 5 个 SNP (表 1)。

表 1 18 份大豆种质及其 SNP 基因型

Table 1 Eighteen soybean genotypes used in the experiment and their SNP genotypes

材料名称 Soybean germplasm	统一编号 Code	Rhg4—1592	Rhg4—1724	Rhg4—1760	Rhg4—2120	Rhg4—2387
油 1298	ZDD20449	T	A	T	A	A
早熟 18	—	T	A	T	A	A
吉黄 138	ZDD22798	T	A	T	A	A
小粒秣食豆	ZDD17767	T	A	C	A	G
Forrest	WDD00721	G	C	C	T	G
Peking	WDD00467	G	C	C	T	G
PI437654	WDD00643	G	C	C	T	G
黑豆	ZDD10734	G	C	C	T	G
灰皮支黑豆	ZDD02315	G	C	C	T	G
三股条黑豆	ZDD10254	G	C	C	T	G
双城 56	—	G	C	C	T	G
—	ZYD03431	G	C	C	T	G
—	ZYD03294	G	A	C	A	G
—	ZYD03888	G	A	C	A	G
—	ZYD04217	G	A	C	A	G
—	ZYD00755	G	A	C	A	A
绥农 14	ZDD22648	G	A	T	A	A
—	ZYD03149	G	A	T	A	A

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取种子研磨成粉末后称取 0.500 g,参照关荣霞等^[23]的大豆快速提取法提取基因组 DNA。用 PerkinElmer® Lambda 35 Spectrometer 检测 DNA 浓度和质量。

1.2.2 FLDAS—PCR

1.2.2.1 引物设计 根据上述每个 SNP 位点设计 3 个引物,即 2 个特异引物和 1 个公用引物。2 个特异引物 3'末端碱基分别与 SNP 位点碱基互补,在其 3'端第 3 或 4 个碱基分别引入错配碱基。引物长度约 21bp 或 26bp,之间相差 4 或 5 个 bp。针对 5 个 SNP 位点共设计了 15 个 SNP 分型引物,序列见表 2,由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.2.2.2 退火温度梯度和引物浓度梯度 以基因型存在差异的Forrest 和小粒秣食豆为材料,针

对 Rhg4—1592 位点设计 50℃,51.1℃,53.8℃,55.3℃,56.7℃,58.1℃,60.9℃ 7 个退火温度,4 个特异引物浓度梯度(0.10 μM、0.12 μM、0.15 μM 和 0.18 μM),共组成 56 个处理,探讨退火温度和引物浓度对扩增效果的影响。

1.2.2.3 PCR 扩增 PCR 反应体系为 20 μL,其中包括 1×Buffer,长链引物和公用引物 0.15 μM,适量浓度的短链引物,0.15 mM dNTP,60 ng DNA,0.5 U rTaq(购自 Taraka 公司)。PCR 扩增在 Biometra®热循环仪上进行,程序为:94℃预变性 5 min,接下来是(94℃变性 30 s,合适退火温度下退火 30 s,72℃延伸 30 s)×32 个循环,然后 72℃延伸 6 min,最后 4℃保存。

1.2.3 SNP 基因型检测 FLDAS—PCR 产物通过 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离^[24]。SNP 基因型通过电泳谱带进行鉴定,2 个纯合等位基因

型为相差 4 或 5bp 的单一谱带,杂合型为 2 条谱带。

2 结果与分析

2.1 提高 SNP 分型特异性所采取的策略

2.1.1 多重 PCR 的基本原理 为提高扩增特异性,本研究采用多重 PCR 原理,每个 SNP 位点设计 3 条引物,在同一个 PCR 体系中进行扩增反应。引物设计是多重 PCR 的关键^[25],在设计引物时除了遵守引物设计的基本原则外,还要考虑多重 PCR 对引物的特殊要求。本研究设计的 FLDAS-PCR 引

物预期扩增片段长度大约 100bp 或 150bp,2 个特异引物间存在 4-5bp 的差异,从而使得两种基因型相差 4-5 个 bp,通过 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳即可分离。

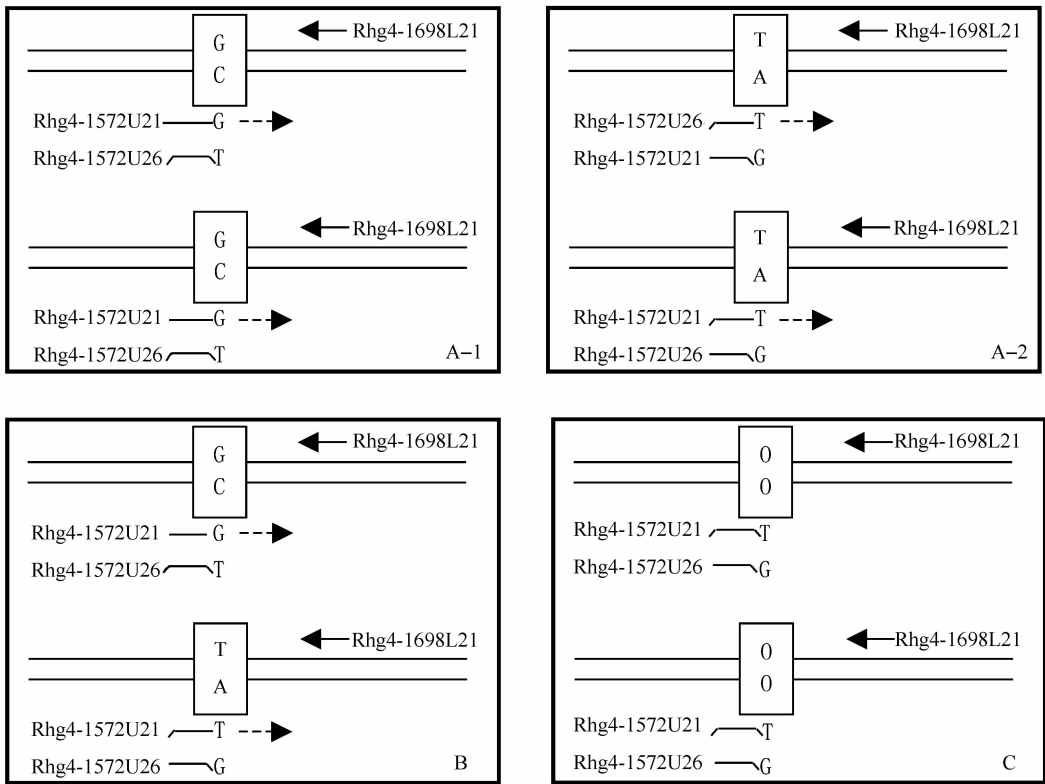
2.1.2 在引物 3'端不同位置人为引入错配碱基 引物 3'末端碱基与模板互补则会在适合的条件 下发生延伸,否则不能延伸,故被比作扩增延伸“开 关”,在实际应用中,3'末端单个碱基错配通常不能 阻止扩增延伸^[11]。因此,除 3'末端碱基外,本研究 在 2 个特异引物 3'端第 3 个和第 4 个碱基不同位 置分别引入错配碱基来提高反应的特异性(表 2)。

表 2 用于 FLDAS-PCR 的引物
Table 2 Primers for FLDAS-PCR

SNP 位点 SNP loci	引物名称 Primer	引物序列 Sequence (5'>>3')	扩增产物大小(等位基因) PCR products(allele)
Rhg4-1592	Rhg4-1572U26	TATCTAGCATAAGCCTCGCTTCGtAT <u> </u>	147bp(G)
	Rhg4-1572U21	AGCATAAGCCTCGCTTCaCAG <u> </u>	152bp(T)
	Rhg4-1698L21	GACGGTTTGGAGGAAAGAAAG	
Rhg4-1724	Rhg4-1605U21	ACACTCCCCTCGGATCTCAAT	140bp(C)
	Rhg4-1724L26	ACTATGAGGAGAAGTTGTTGCGGaTT <u> </u>	145bp(A)
	Rhg4-1724L21	GAGGAGAAGTTGTTGCGaTTG <u> </u>	
Rhg4-1760	Rhg4-1630U21	TCTCTCAACTCCGCACTCTCT	151bp(T)
	Rhg4-1760L21	AGGGAGGTTAGGGAGGCGtAA <u> </u>	156bp(C)
	Rhg4-1760L26	TCTATAGGGAGGTTAGGGAGGCtAA <u> </u>	
GRhg4-2120	Rhg4-2042U21	CGGTACCCTCCTCGTCCTCTC	104bp(A)
	Rhg4-2120L26	TCTATGTGCATTGCGATAAATCCtG <u> </u>	100bp(T)
	Rhg4-2120L22	CGTGCAATTGCGATAAATCtGG <u> </u> A	
Rhg4-2387	Rhg4-2257U21	CTGTGCCCGTGTTTGGGAAAG	151bp(A)
	Rhg4-2387L21	CACGACTCTGCCAACCGcAT <u> </u>	156bp(G)
	Rhg4-2387L26	TCACTCACGACTCTGCCAACCGAcT <u> </u> C	

注:引物序列中小写字母为错配碱基,具有下划线的字母为与 SNP 等位基因互补的碱基。
Note:The lower letter is mismatch nucleotide,the underlined letter is the nucleotide complement with SNP.

FLDAS-PCR 扩增出现 3 种结果(以大豆 Rhg4-1592 G/T 为例):(1)如为纯合 SNP 基因型(GG 或 TT),则其中的一条特异引物因 3'末端碱基不能互补导致无法延伸,结果只能获得一条片段,检测为 GG 或 TT 的基因型。(2)如为杂合基因型(GT),则扩增出 2 条目的条带,分别表现 G 和 T 的基因型。(3)如为除 G 和 T 之外的罕见基因型(C 或 A),因 2 条特异引物均不能延伸,没有扩增片段产生(图 1)。



A-1:纯合型 GG;A-2:纯合型 TT;B:杂合型 GT;C:其它突变碱基。

Rhg4-1572U21 和 Rhg4-1572U26 是 2 个特异引物(相差 5bp),Rhg4-1698L21 为公用引物
A-1:homozygous genotype GG;A-2:homozygous genotype TT;B:heterozygous genotype GT;C:
other mutation

Rhg4-1572U21 and Rhg4-1572U26 were two allele specific primers which had 5bp length differ-
ence,Rhg4-1698L21 was a common primer

图 1 片段长度差异等位基因特异性 PCR(FLDAS-PCR)模式图(以 Rhg4-1592 G/T 为例)
Fig. 1 Model of Fragment Length Discrepant Allele Specific PCR (FLDAS-PCR) (Rhg4-1592
G/T as an example)

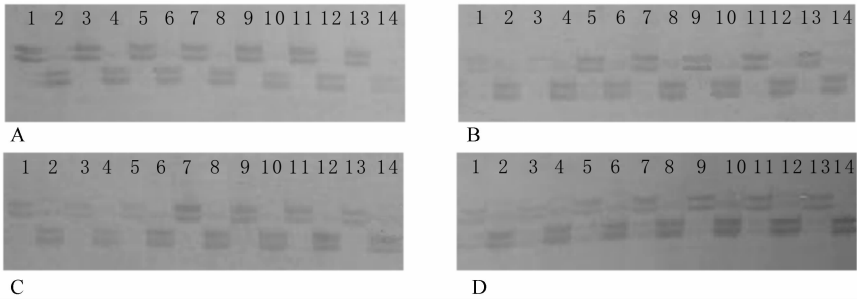
2.2 引物浓度和退火温度对 FLDAS-PCR 扩增效果的影响

2.2.1 引物浓度 以 Rhg4-1592 位点为例,在长链特异引物浓度 0.15 μM 情况下,短链特异引物设计 4 个浓度(0.10 μM , 0.12 μM , 0.15 μM 和 0.18 μM),以小粒秣食豆和 Forrest 进行 FLDAS-PCR 扩增。4 个浓度水平均有扩增产物,但扩增效果差异明显。当浓度为 0.10 μM 时,短链特异引物与公用引物的扩增产物(GG 型)较长链特异引物的(TT 型)弱(图 2,A),随着浓度增加,GG 型扩增产物量逐渐增大(图 2,B、C 和 D);浓度为 0.18 μM 时,GG 型扩增较 TT 型强,这可能是因为短链引物浓度逐渐增大,导致其退火优势逐步增强,扩增强度逐渐增大。短链引物浓度为 0.12 μM 或 0.15 μM

时,不同基因型扩增效果较好,无明显差异(图 2,B 和 C)。这一结果表明,可通过引物浓度来调节 FL-DAS-PCR 扩增强弱。

2.2.2 退火温度 在 7 个退火温度下,2 种基因型均没有出现非特异谱带,但扩增产物的强弱存在明显差异,且浓度较低的特定引物,其扩增反应对退火温度较敏感。在短链引物浓度为 0.10 μM 时,对于 GG 基因型,较低退火温度下(50 $^{\circ}\text{C}$, 51.1 $^{\circ}\text{C}$, 53.8 $^{\circ}\text{C}$),其扩增产物较强,而 60.9 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增产物很弱,扩增效果变化较明显,而 TT 基因型扩增效果变化不大(图 2 A)。短链引物浓度为 0.18 μM 时,50 $^{\circ}\text{C}$ 和 51.1 $^{\circ}\text{C}$ 的退火温度下,TT 基因型的扩增产物较强,而 60.9 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增产物很弱,对于 GG 基因型,扩增效果差异小(图 2 D)。本试验中,在

55.3℃、56.7℃和 58.1℃退火温度下,扩增效果较好(图 2)。



A、B、C 和 D 分别表示短链特异引物浓度为 0.10 μM 、0.12 μM 、0.15 μM 和 0.18 μM 的扩增效果,泳道 1、3、5、7、9、11、13 分别为小粒林食豆在 50℃、51.1℃、53.8℃、55.3℃、56.7℃、58.1℃ 60.9℃退火温度处理的扩增效果,基因型为 TT,泳道 2、4、6、8、10、12、14 分别为 Forrest 在 50℃、51.1℃、53.8℃、55.3℃、56.7℃、58.1℃ 60.9℃退火温度处理的扩增效果,基因型为 GG。

A、B、C and D was SNP genotyping of Xiaolimoshidou and Forrest with 0.10 μM 、0.12 μM 、0.15 μM and 0.18 μM shorter specific primer concentration treatment respectively. Lane 1、3、5、7、9、11、13 were SNP genotype (TT) of Xiaolimoshidou under 50℃、51.1℃、53.8℃、55.3℃、56.7℃、58.1℃ and 60.9℃ annealing temperature, respectively; lane 2、4、6、8、10、12、14 were SNP genotype (GG) of Forrest under 50℃、51.1℃、53.8℃、55.3℃、56.7℃、58.1℃ and 60.9℃ annealing temperature, respectively.

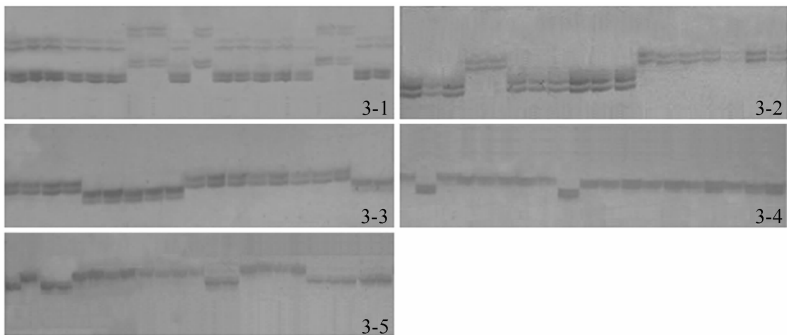
图 2 7 个不同退火温度和 4 个不同引物浓度处理下 FLDAS-PCR 扩增效果

Fig. 2 SNP genotyping under 7 annealing temperatures and 4 primer concentration

2.3 SNP 分型效果准确性分析

针对候选基因 *Rhg4* 的 5 个 SNP 位点,通过设置退火温度梯度和调节引物浓度,找到了合适的 FLDAS-PCR 参数,对 18 份大豆种质进行了分型(在不影响分型效果的情况下,本试验采取一致的退火温度

(56.7℃)和引物浓度(1.5 μM),其它参数见本研究试验方法)。结果表明,采用这种方法能将 SNP 基因型分开并可获得清晰的检测图谱(图 3)。该分型结果与 PCR 产物克隆测序的基因型完全一致,因此,这种 FLDAS-PCR 可有效进行大豆 SNP 分型。



3-1、3-2、3-3、3-4 和 3-5 分别为 *Rhg4*-1592、*Rhg4*-1724、*Rhg4*-1760、*Rhg4*-2120 和 *Rhg4*-2387 的分型效果

3-1、3-2、3-3、3-4 and 3-5 is SNP genotyping at *Rhg4*-1592、*Rhg4*-1724、*Rhg4*-1760、*Rhg4*-2120 and *Rhg4*-2387 respectively

图 3 FLDAS-PCR 对 *Rhg4* 基因 5 个 SNP 位点的分型效果

Fig. 3 Genotyping of SNPs at 5 SNP loci in *Rhg4* by FLDAS-PCR

3 讨论

AS-PCR 已成为一种低成本、简便、快速、有效的 SNP 分型方法,广泛应用于动、植物 SNP 基因

型检测^[2,5,7,8,13,14]。AS-PCR 比较灵敏,受 PCR 体系中 dNTP、引物、 Mg^{2+} 等组分浓度以及退火温度影响较大,如 dNTP、引物等组分浓度过低,扩增弱,易出现假阴性,浓度太高,导致扩增非特异性,出现假阳性^[5,14,16,17]。不同方法和不同 SNP 位点对

PCR 参数要求也不一致,但研究表明通过调整 PCR 组分浓度或改变 PCR 程序能够优化 PCR 效果,例如通过采用热启动方法和提高退火温度来解决非特异性^[14,17,26]。人为引入错配碱基的位置和类型也对 PCR 效果有影响。研究表明,在 3'端第 2、3、4 位置引入错配碱基,均可以提高引物的特异性^[5,14,16,17]。FLDAS-PCR 中,在 2 条不同特异性引物 3'端第 3 和 4 位置分别引入错配碱基与在 2 条不同特异性引物 3'端第 3 或 4 同一位置引入不同错配碱基可起到同样的提高 PCR 特异性效果^[17]。碱基错配根据不稳定性分为 3 类:强错配型(C/T 和 G/A)、中等错配型(C/A 和 G/T)和弱错配型(A/A, C/C、G/G 和 T/T),在特异引物 3'端错配碱基强弱搭配,或者中中搭配,获得理想扩增效果的可能性较大^[5]。

以 *Rhg4* 基因的 5 个 SNP 为例构建的 FLDAS-PCR,采用多重 PCR 技术及在 2 条不同特异性引物 3'端第 3 和 4 位置分别人为引入错配碱基提高其扩增特异性和准确度,通过设置退火温度梯度和调节引物浓度,获得较好的大豆 SNP 分型效果,是一种简便、有效的大豆 SNP 分型新方法。

4 引物扩增和 3 引物扩增策略均有应用^[5,15~17],笔者对 *Rhg4* 的 5 个 SNP 位点进行引物设计时,对 3 引物单管扩增和 4 引物单管扩增策略均作了尝试。对 SNP 位点附近 DNA 序列的碱基组成分析及引物评价结果表明,3 引物单管扩增较好,而 4 引物单管扩增,由于 2 个特异引物分别位于 SNP 位点两侧,其 T_m 有时相差很大,2 个外引物除了考虑 T_m 外还要考虑预期扩增片段大小,设计分型效果较好的引物难度较大。

前人研究表明长链特异引物使用浓度比短链特异引物低,认为长链特异引物存在退火优势^[17]。因此,本研究在长链特异引物浓度不变的情况下(0.15 μM),短链特异引物设计了 4 个浓度水平(0.10 μM , 0.12 μM , 0.15 μM 和 0.18 μM),探讨了引物浓度对扩增效果的影响。研究发现,短链引物浓度为 0.12 μM 或 0.15 μM 时,不同基因型扩增效果好,而没有发现“长链特异引物使用浓度比短链特异引物低”现象。笔者认为,较长特异引物中额外增加的 4~6 个碱基与模板的互补程度可能会影响退火优势,前人发现的“较长特异引物使用浓度比较短特异引物低”可能是因长链引物与模板存在较大程度互补造成的,而非长链特异引物碱基数较多的结果。

本研究发现有时 *Rhg4*-1592 位点的扩增产物

出现“多条谱带”现象,且不同样品间变化趋势完全一致(图 3 中 3-1),这可能是 PCR 产物变性不完全所致,但对分型结果的准确性没有影响。

参 考 文 献

- [1] Schmid K J, Sørensen T R, Schmid K J, et al. Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genome Research*, 2003, 13: 1250-1257.
- [2] 马厚勋, 谢正祥, 牛永红, 等. 汉族人群 NOS3 A-922G、NOS3 T-2786C 与 NOS3 G894T SNP 的等位基因及其组合分布与高血压的相关性[J]. *遗传*, 2006, 28(1): 3-10.
- [3] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean [J]. *Genetics*, 2003, 163: 1123-1134.
- [4] Jeong S C, Saghai Maroof M A. Detection and genotyping of SNPs tightly linked to two disease resistance loci, *Rsv1* and *Rsv3* of soybean [J]. *Plant Breeding*, 2004, 123: 305-310.
- [5] Ye S, Dhillon S, Ke X Y, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(17): e88.
- [6] Syvanen A C. Toward genome-wide SNP genotyping [J]. *Nature Genetics Supplement*, 2005, 37: s5-s10.
- [7] Bundock P C, Cross M J, Shapter F M, et al. Robust allele-specific polymerase chain reaction markers developed for single nucleotide polymorphisms in expressed barley sequences [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 358-365.
- [8] Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, et al. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1212-1220.
- [9] Chen X N, Livak K J, Kwok P Y. A Homogeneous, Ligase-Mediated DNA Diagnostic Test [J]. *Genome Research*, 1998, 8: 549-556.
- [10] Burmeister J, Bazilyanska V, Grothe K, et al. Single nucleotide polymorphism analysis by chip-based hybridization and direct current electrical detection of gold-labeled DNA [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 379: 391-398.
- [11] Sauer S, Gelfand D H, Boussicault F, et al. Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(5): e22.
- [12] Simeonov A, Nikiforov T T. Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(17): e91.
- [13] Hayashi K, Yoshida H, Ashikawa I. Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 251-260.

proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 343—357.

- [22] Sugimoto K, Takeda S, Hirochika H. Transcriptional activation mediated by binding of a plant GATA-type zinc finger protein AGP1 to the AG-motif (AGATCCAA) of the wound-inducible Myb gene *NtMyb2* [J]. *Plant Journal*, 2003, 36: 550—564.
- [23] Rushton P J, Torres J T, Parniske M, et al. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes [J]. *Journal of European Molecular Biology Organization*, 1996, 15: 5690—5700.
- [24] Ezcurra I, Ellerstrom M, Wycliffe P, et al. Interaction between composite elements in the *napA* promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 699—709.
- [25] [25] Yamagata H, Yonesu K, Hirata A, et al. TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the cucumis gene [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 11582—11590.
-
- (上接 453 页)
- [14] 卫波, 景蕊莲, 王成社, 等. 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 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(7): 1313—1320.
- [15] Chiapparino E, Lee D, Donini P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR [J]. *Genome*, 2004, 47: 414—420.
- [16] 管峰, 艾君涛, 杨利国. 一种 SNP 检测新方法: 四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术 [J]. *生命的化学*, 2004, 24(6): 514—516.
- [17] 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 SNP 分型新方法 [J]. *法医学杂志*, 2005, 21(1): 11—14.
- [18] 彭翠英, 胡卫民, 周翠兰, 等. 单核苷酸多态性敏感分子开关在基因组单核苷酸多态性检测中的特异性分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 279—281.
- [19] 汪维鹏, 倪坤仪, 周国华. 一种基于适配器连接介导的等位基因特异性扩增法测定多重 SNP [J]. *遗传*, 2006, 28(2): 219—226.
- [20] Van K, Hwang E Y, Kim M Y, et al. Discovery of SNPs in soybean genotypes frequently used as the parents of mapping populations in the United States and Korea [J]. *J of Heredity*, 2005, 96(5): 529—535.
- [21] Kim M Y, Ha B K, Jun T H, et al. Single nucleotide polymorphism discovery and linkage mapping of lipoxygenase-2 gene (*Lx2*) in soybean [J]. *Euphytica*, 2004, 135: 169—177.
- [22] Jang S Y, Van K, Kim M Y, et al. SNP discovery and mapping of a major gene *Rhg4* conferring resistance to soybean cyst nematode [J]. *Korean J Breed*, 2004, 36(2): 76—80.
- [23] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟. 用于 SSR 分析的大豆 DNA 的快速提取 [J]. *大豆科学*, 2003, 22, (1): 73—74.
- [24] 关荣霞, 刘秀敏, 常汝镇, 等. 辽宁新宾县原保护区野生大豆 (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) 遗传多样性分析 [J]. *高技术通讯*, 2006, 6(1): 67—72.
- [25] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素 [J]. *遗传*, 2003, 25(1): 65—68.
- [26] 颜志强, 杨胜利, 龚毅. PCR 及其衍生技术在基因突变检测中的应用 [J]. *遗传*, 2003, 25(2): 198—200.