

大豆脂肪酸 *Fad3a* 基因 HRM 检测体系优化研究

武林, 王艳, 孙梦阳, 赵雪, 韩英鹏, 滕卫丽, 李文滨

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室, 东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 高分辨率溶解曲线分析法可准确检测单核苷酸多态性, 具有稳定性和高效性的特点。建立基于 HRM 的 SNP 检测方法, 确立最佳的反应体系和反应条件是后续基因分型研究的前提和基础。*Fad3a* 基因为大豆脂肪酸合成的关键酶基因, 以 *Fad3a* 基因为研究对象, 通过测序获得大豆品种合丰 25 (亚麻酸含量 5.94%) 和 L-5 (亚麻酸含量 2.75%) 在 *Fad3a* 基因序列上的单核苷酸多态性位点, 根据这 2 个品种的 *Fad3a* 基因测序结果, 利用 Lighter scanner primer design 软件设计产物长度不同的 SNP 突变引物 5 对, 探索 PCR 产物长度和不同的退火温度对 HRM 分型结果的影响。结果表明: HRM 分型的扩增子适宜长度应小于 150 bp, 且在扩增成功的基础上使用相对较高的退火温度可使待测 PCR 产物溶解峰单一, 溶解曲线平稳。

关键词: 大豆; *Fad3a*; SNP; HRM 体系优化

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)06-0882-05

Optimization of High Resolution Melting Analysis System for *Fad3a* Gene of Soybean Fatty Acid

WU Lin, WANG Yan, SUN Meng-yang, ZHAO Xue, HAN Ying-peng, TENG Wei-li, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biolgy and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: High-Resolution Melting (HRM) is an ideal approach for SNP (Single Nucleotide Polymorphism) genetic typing. An optimal detection system based on HRM should be established in order to obtain credible results on genetic typing studies. In this study, *Fad3a* gene, encoding a key enzyme for fatty acid synthesis of soybean, was cloned in two soybean cultivars (Hefeng25 and L-5) with different content of linolenic acid in soybean seed and sequenced to investigate the influence of PCR product length and annealing temperature on HRM genetic typing by designing five pairs of SNP mutation primers with different product lengths using LSPD software. The result indicated that melting peak and curve of PCR product were single and smooth under the condition that amplicon length was less than 150 bp and the annealing temperature was relatively high on the basis of successful amplification.

Key words: Soybean; *Fad3a*; SNP; HRM systematic optimization

单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 是指由于基因组上单个碱基的突变而引起的 DNA 序列多态性, 包括单碱基的转换、颠换以及单碱基的插入/缺失等。SNP 具有密度高、遗传稳定性好、具有代表性、分析易自动化等特点, 已成为继 SSR 之后的新一代遗传学标记, 大豆基因组中 SNP 的分布频率很高, 平均每 273 bp 就存在 1 个 SNP^[1], 大豆 SNP 对大豆遗传图谱的构建以及分子标记辅助育种等都具有重要意义。

HRM (High-Resolution Melting) 分析技术是应用于 SNP 检测分析的一项新技术, 是由犹他大学和 Idaho 科技公司合作开发的^[2], 该技术主要利用不同双链 DNA 分子的片段长短、GC 含量和分布不同, 在加热变性时形成随温度变化的特定溶解曲

线, 进而利用饱和荧光染料和高精密度采集荧光信号仪器进行检测。

与传统的 SNP 和定量探针法相比, HRM 检测具有许多优点, 如高通量: 一次可同时完成对 96 个或 384 个样本的分析; 特异性好: PCR 产物无需后续处理, 完全闭管操作, 特异性达 100%; 高灵敏度: 可达 1% ~ 0.1%, 是传统“PCR + 测序”方法的 25 ~ 250 倍; 操作简便: 不需要序列特异性探针和后续测序, 只需设计 PCR 引物, 进行 PCR 反应, 接着直接进行高分辨率溶解, 即可完成对样品的基因型判断。因此, HRM 大大简化了操作步骤, 并减少了分析时间, 目前该项技术主要应用于基因分型、突变扫描等方面^[3]。HRM 分析技术多应用在临床疾病监测, 在水稻^[4]、大麦^[5]、苜蓿^[6]等植物中也有应

收稿日期: 2012-09-10

基金项目: 农业部大豆产业技术体系 (CARS-04-PS04); 国家“十二五”科技支撑计划课题 (2011BAD35B06); 国家重点基础研究发展计划“973 计划”前期项目 (2012CB126311); 国家自然科学基金项目 (31201227); 中国博士后项目 (20110491024); 黑龙江省博士后项目 (LBH11220); 黑龙江省骨干教师项目 (1252G014)。

第一作者简介: 武林 (1988-), 男, 在读硕士, 研究方向为大豆生物化学与分子生物学。E-mail: linwu8811@sina.com。

通讯作者: 李文滨 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

用,目前其在大豆 SNP 检测上尚未见报道。

本研究以大豆品种合丰 25、L-5 为材料,以与大豆脂肪酸积累相关的 *Fad3a* 基因为研究对象,对大豆 HRM 分析技术体系进行了优化。

1 材料与方法

1.1 供试品种

高亚麻酸大豆品种合丰 25(亚麻酸含量 5.94%);低亚麻酸品种 L-5(亚麻酸含量 2.75%)。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Primer pairs for PCR

引物名 Primer name		碱基序列(5'→3') Base sequences(5'→3')	PCR 产物片段大小 PCR product length/bp
Fad3a-1	F	TCAGCAAACACTTGCGCA	141
	R	TTTAGGATTCCACATGATGCAG	
Fad3a-2	F	AGGGAGAGAGATGAATCCTG	191
	R	GTATGTATCGGGACTAATTGGC	
Fad3a-3	F	GAGCTCCCTTTCTTCACTATCC	260
	R	AGTAGGGTTCATTGGGTCT	
Fad3a-4	F	ACCCTTCAGCTATCCGAC	280
	R	GTGGCATGTTCATTTC	
Fad3a-5	F	GACTATGACACAAGATCACGAG	297
	R	CACGACGAAAGTTTCGCA	
Fad3a-6	F	ATCACCTTGACAATCTTGCT	141
	R	AACAAGATGCCTCCAGATTC	

1.3.2 DNA 模板均一化 PCR 反应体系: LC Green 1.0 μL,DNA 模板 1.0 μL,引物 1.5 μL,dNTP 0.15 μL,*Taq* 酶 0.15 μL,Buffer 1.0 μL,去离子水 5.2 μL,总体积 10 μL。

PCR 反应程序:94℃ 变性 6 min,94℃ 预变性 30 s,退火 30 s(采用引物最佳退火温度),72℃ 30 s,35 个循环,72℃ 6 min,10℃ 保存。

HRM 基因分型检测在 Idaho 公司的 Lighter scanner 上完成。

2 结果与分析

2.1 DNA 模板均一化

HRM 技术具有稳定性,模板 DNA 量从 10 ng 到 100 ng 均能得到正确分型,随着模板浓度增大溶解曲线的均一性增强,一般 20 ng 就能达到要求^[8-9]。如果模板 DNA 起始浓度差异很大,就会造成产物量的差异,从而影响到荧光强度,最终影响检测结果^[10-11],因此在本研究中含丰 25 和 L-5 的 DNA 浓度被均一化(图 1),以保证二者的严格

1.2 引物设计与合成

利用 Lighter scanner primer design 软件(Idaho, USA)设计 *Fad3a* 基因(Genebank 登陆号:EF175461)同一位点的不同 PCR 产物长度的引物(表 1)。

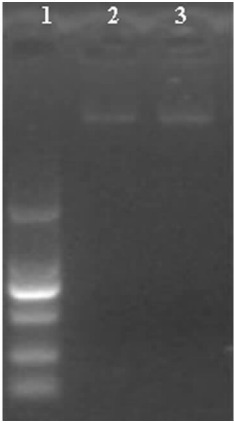
1.3 实验方法

1.3.1 样品准备 将合丰 25、L-5 籽粒充分研磨,取豆粉 0.3 g,SDS 法提取基因组 DNA^[7],充分消解 RNA。

一致。

2.2 扩增子长度对 HRM 的影响

针对单碱基突变而设计的特异引物,理论上应该得到单一的峰值。5 种扩增子长度的 HRM 分型

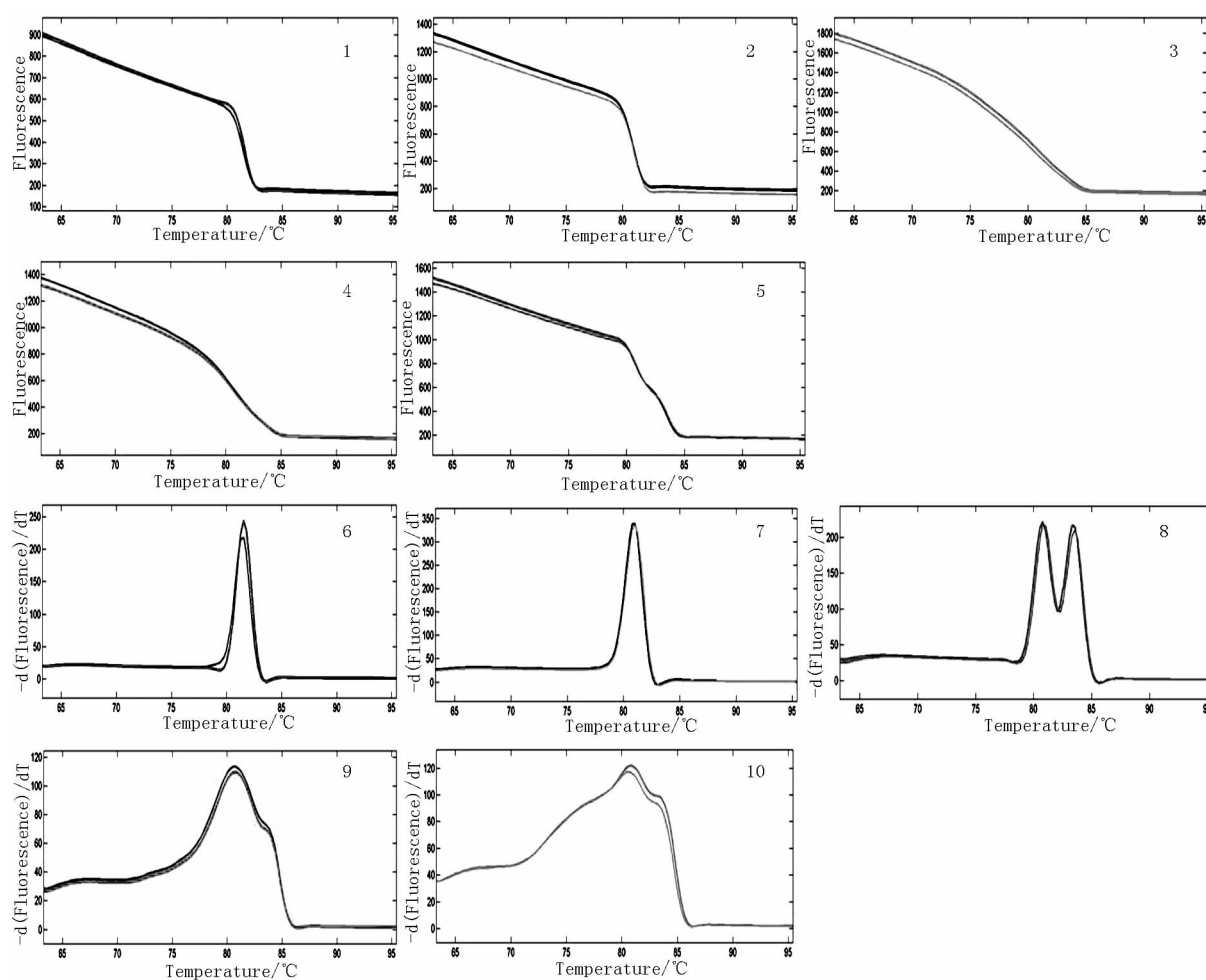


1:DL2000 Marker;2:合丰 25;3:L-5
1:DL2000 DNA Marker;2:Hefeng 25;3:L-5

图 1 合丰 25 和 L-5 基因组 DNA 的提取
Fig.1 Extract of genomic DNA of Hefeng 25 and L-5

结果如图 2 所示,随着产物片段长度的增加,熔解曲线平滑度下降,熔解峰也变多,影响了对熔解曲线的结果分析。通过比较可以看出,141 bp 扩增子的熔解曲线最为平滑,熔解峰单一,且重复实验的

荧光值一致性最好。理论上,扩增子长度应控制在 50 ~ 100 bp,而从本研究的结果可以推断 150 bp 以内的扩增子长度均适用于大豆 SNP 分型。



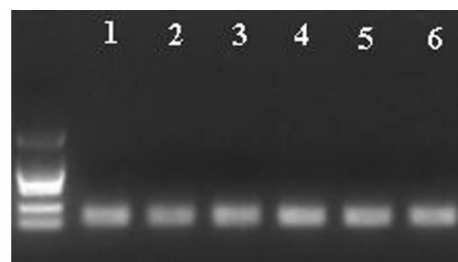
1 ~ 5: 熔解曲线; 6 ~ 10: 熔解峰
1-5: Melting curves; 6-10: Melting peaks

图 2 扩增子长度对 HRM 的影响

Fig. 2 Influence of amplicon length to HRM

2.3 不同退火温度对 HRM 的影响

以 141 bp 扩增子为研究对象,进一步探讨 PCR 过程中退火温度对 HRM 分型的影响。比较图 3 和图 4 的结果可以发现,利用凝胶电泳分离同一扩增子不同退火温度的 PCR 产物的结果基本相同(图 3),而 HRM 分型可显示出上述情况的差别(图 4),说明退火温度对 HRM 基因分型的结果影响很大。在可获得特异 PCR 产物的各退火温度中,随着退火温度的升高,熔解曲线变得平稳,熔解峰也变成了单峰;在 6 种退火温度中,最高的 2 个温度 62°C 和 64.6°C 为 HRM 分型适宜的退火温度。



1: 49.8°C; 2: 51.1°C; 3: 54.3°C; 4: 58.3°C; 5: 62°C; 6: 64.6°C.

图 3 不用退火温度下 Fad3a-6 梯度 PCR 结果
Fig. 3 Gradient PCR of Fad3a-6 under different annealing temperature

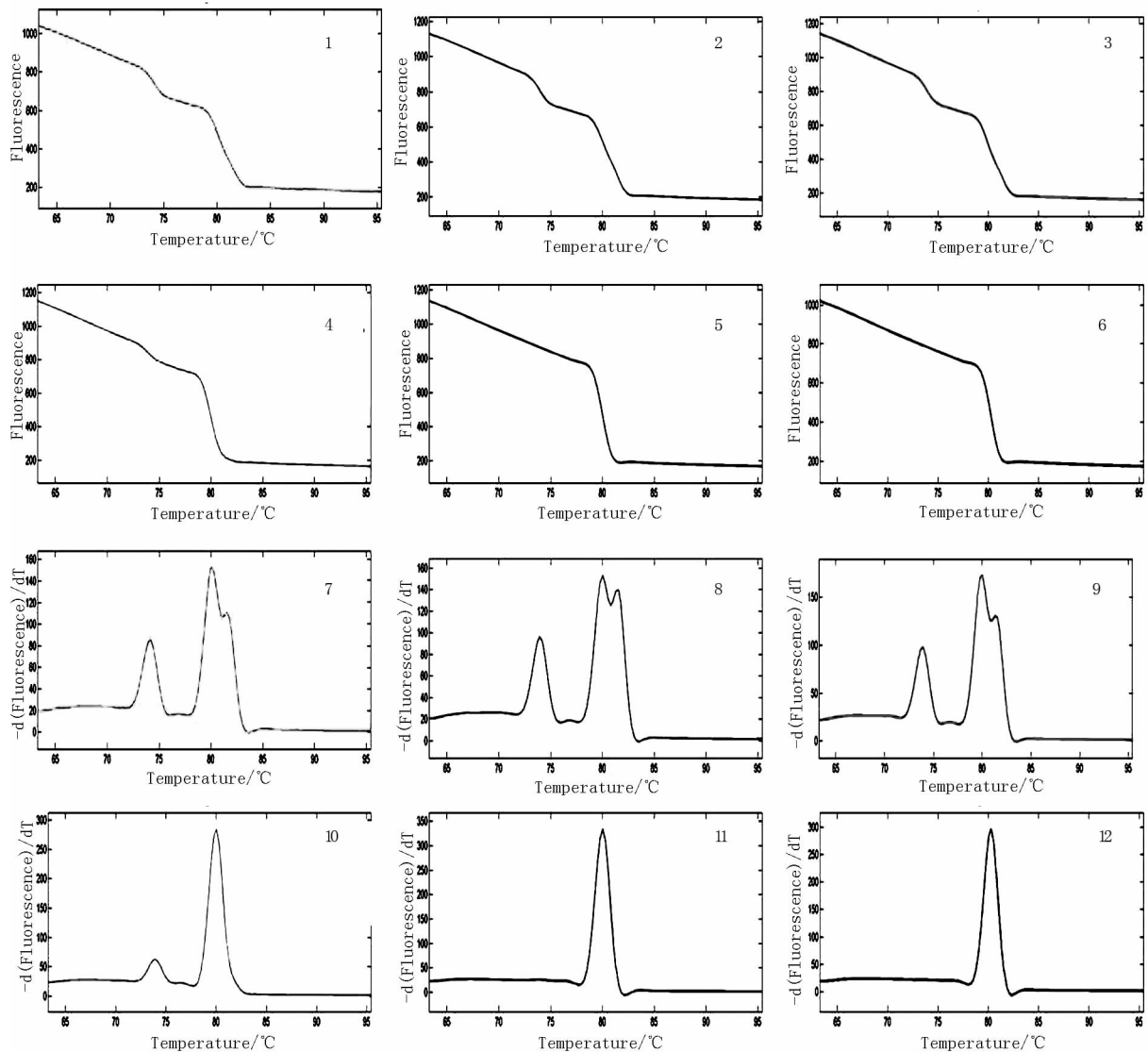


图3 对应的 HRM 曲线;1~6:熔解曲线;7~12:熔解峰

HRM curves of Fig. 3;1-6:Melting curves;7-12:Melting peaks

图4 引物退火温度对 HRM 基因分型的影响

Fig.4 Influence of primer annealing temperature to HRM typing

3 讨 论

HRM 检测基因突变和基因分型适用范围广泛,且灵敏度高,正因如此,HRM 对分型对象即通过 PCR 反应所获得扩增子的质量有较高的要求。扩增子的设计和 PCR 反应过程是影响 HRM 分型结果的重要因素,因此建立适合大豆 SNP 分型的 HRM 方法体系时,对上述过程进行优化是非常必要的。

体系内 DNA 模板浓度影响 PCR 产物的最终浓度,不同样本间 DNA 浓度不同会导致 PCR 产物浓度差异,在利用 HRM 分型时,与染料结合的 PCR 产物发出的荧光信号强度就不在一个水平线上,这对不同样本间的基因正确分型是不利的。本研究也证实了这一理论,并对模板 DNA 浓度进行了优化,将不同待测样本的 DNA 浓度精确调节到 $5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$

的终浓度进行 PCR 反应,得到了较好的分型结果。

研究表明,PCR 产物长度大于 300 bp 对 HRM 的敏感性和特异性有影响^[12-14]。也有研究表明,当 PCR 产物大于 200 bp 时,扩增子发生错配的几率很高,且对仪器的分辨率要求更高^[15]。在黄瓜 SNP 筛选的研究中,PCR 产物长度在 80 bp 以内^[16]。本研究针对大豆脂肪酸基因优化 HRM 检测体系发现,扩增片段在 150 bp 以内基因分型结果较为理想。

本研究在比较同一扩增子在不同退火温度下的 PCR 产物分型结果时,发现 6 个退火温度的琼脂糖电泳检测结果是一致的,而 HRM 分型结果却大相径庭。因此,目标扩增子对应引物退火温度需要用 HRM 进行确定。研究表明,提高退火温度可增强引物与模板的特异性结合^[17]。本研究结果显示

在同样的荧光强度下,利用较高的退火温度进行PCR反应可获得较好的分型结果。

参考文献

- [1] Zhu Y, Song Q, Hyten D, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean[J]. *Genetics*, 2003, 163(3): 1123-1134.
- [2] Gundry C, Vandersteen J, Reed G, et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2003, 49(3): 396-406.
- [3] Montgomery J, Wittwer C T, Palais R, et al. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2: 59-66.
- [4] Li J, Wang X, Dong R, et al. Evaluation of high-resolution melting for gene mapping in rice[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29: 979-985.
- [5] Hofinger B J, Jing H C, Hammond-Kosack K E, et al. High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119: 851-865.
- [6] Han Y, Khu D M, Monteros M J, et al. High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *Molecular Breeding*, 2012, 29: 489-501.
- [7] 朱振雷, 束永俊, 李勇, 等. 大豆种子 DNA 快速提取方法的改良及应用[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(10): 60-63. (Zhu Z L, Shu Y J, Li Y, et al. Improvement and application of the rapid DNA extraction method from soybean seeds[J]. *Journal of North-east Agricultural University*, 2009, 40(10): 60-63.)
- [8] 尤崇革, 李玉民, 马克君, 等. 基于高分辨熔解技术进行单核苷酸多态性基因分型的方法学评价[J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(7): 1786-1790. (You C G, Li Y M, Ma K J, et al. Evaluation on the methodology of SNP genotyping based on high resolution melting[J]. *Chinese Journal of Clinicians*, 2012, 6(7): 1786-1790.)
- [9] 白牡丹, 王彩虹, 殷豪, 等. 苹果不同 HRM 反应体系分析效果评价[J]. *分子植物育种*, 2012, 10(1): 115-120. (Bai M D, Wang C X, Yin H, et al. Evaluation of different reaction systems for HRM analysis in apple[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2012, 10(1): 115-120.)
- [10] 焦丽, 刘相国, 王虎义, 等. 高分辨率溶解曲线分析技术在大豆 Ecotilling 中的应用[J]. *大豆科学*, 2011, 30(5): 843-846. (Jiao L, Liu X G, Wang H Y, et al. Application of high resolution melting analysis in soybean ecotilling[J]. *Soybean Science*, 2011, 30(5): 843-846.)
- [11] 欧展辉. HRM 分析检测单基因遗传病点突变及 β -地中海贫血的临床检测[D]. 广州医学院第三附属医院, 2011. (Ou Z H. Screening of gene mutations in hereditary disease by HRM and detecting β -thalassemia in clinic[D]. Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, 2011.)
- [12] Reed G H, Wittwer C T. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis[J]. *Clinical Chemistry*, 2004, 50(10): 1748-1754.
- [13] Hofinger B J, Jing H C, Hammond-Kosack K E, et al. High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119(5): 851-865.
- [14] Ye M H, Chen J L, Zhao G P, et al. Sensitivity and specificity of high-resolution melting analysis in screening unknown SNPs and genotyping a known mutation[J]. *Animal Science Papers and Reports*, 2010, 28(2): 161-170.
- [15] Liew M, Seipp M, Durtschi J, et al. Closed-tube SNP genotyping without labeled probes/a comparison between unlabeled probe and amplicon melting[J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 2007, 127(3): 341-348.
- [16] 兰青阔, 张桂华, 王永, 等. 基于高分辨率熔解曲线技术快速筛选黄瓜 SNP[J]. *分子植物育种*, 2011, 9(5): 642-647. (Lan Q K, Zhang G H, Wang Y, et al. Discovery of single nucleotide polymorphism in cucumber based on high resolution melting analysis[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9(5): 642-647.)
- [17] 刘阳, 杨淑霞, 李敏惠, 等. 引物浓度与退火温度不当导致巢式 PCR 非特异性扩增[J]. *成都医学院学报*, 2008, 3(2): 111-114. (Liu Y, Yang S X, Li H M, et al. Improper primer concentration and annealing temperature may cause nonspecific amplification in nested PCR[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2008, 3(2): 111-114.)
- [18] Taylor D C, Katavic V, Zou J T, et al. Field testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 8: 317-322.
- [19] Bouvier-Navé P, Benveniste P, Oelkers P, et al. Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267: 85-96.
- [20] Jako C, Kumar A, Wei Y, et al. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 861-874.
- [21] Weselake R J, Shah S, Tang M, et al. Metabolic control analysis is helpful for informed genetic manipulation of oilseed rape (*Brassica napus*) to increase seed oil content[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59: 3543-3549.
- [22] Xu J, Francis T, Mietkiewska E, et al. Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6: 799-818.

(上接第 881 页)