

高分辨率溶解曲线分析技术在大豆 Ecotilling 中的应用

焦 丽¹, 刘相国², 杨春明⁴, 王虎义³, 郝东云^{2,3}, 王庆钰¹

(1. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062; 2. 吉林省农业科学院 生物技术创新中心, 吉林 长春 130124; 3. 吉林大学 生命科学学院, 吉林 长春 130012; 4. 吉林省农业科学院 大豆研究中心, 吉林 长春 130012)

摘要:将高分辨率溶解曲线(High Resolution Melting, HRM)技术运用在大豆 Ecotilling 中,对 256 份栽培大豆的大豆异黄酮合酶基因(*IFS1*)的外显子区域进行 SNP 筛查,并采用直接测序的方法对 HRM 检测结果进行验证。结果表明:模板均一化后的检测效果较未均一化的检测效果差异显著,野生型样本与待测样本按 1:1 及 1:4 比例混样溶解曲线阈值较高,其中 1:4 混样适合高通量检测。HRM 对 *IFS1* 基因外显子区域的检测结果与 PCR 产物测序的结果比对显示,对 *IFS1* 第 5 段外显子和第 7 段外显子检测的准确率分别达到 91.2% 和 100%,表明该研究利用 HRM 技术建立的栽培大豆的 Ecotilling 技术体系是一种高灵敏度、高通量和低成本检测 SNP 的新方法。

关键词:大豆;高分辨率溶解曲线分析技术;Ecotilling;SNP

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)05-0843-04

Application of High Resolution Melting Analysis in Soybean Ecotilling

JIAO Li¹, LIU Xiang-guo², YANG Chun-ming², WANG Hu-yi³, HAO Dong-yun^{2,3}, WANG Qing-yu¹

(1. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062; 2. Biotechnology Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124; 3. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, Jilin, China)

Abstract: Identification of allelic variants in natural populations by Ecotilling has become a rapid Single nucleotide polymorphisms(SNP) discovery method, but it is not convenient for detection. High resolution melting(HRM) analysis is a rapid, sensitive and high-throughput method that can be used in the examination of SNP. In this paper, HRM techniques was used in Ecotilling to detect the SNP of *IFS1* exons in 256 soybean cultivars. The results of HRM was verified by direct sequencing. The effect of homogenization and non-homogenization of the template on the testing was discussed and the result showed that the former had more remarkable effect. The testing effect of different proportions of mixed samples was compared and found that 1:1 and 1:4 mixed samples were optimal. The comparison between the testing results of exon regions of *IFS1* by HRM and results of PCR products sequencing showed the accuracy of fifth and seventh sections of exons were 91.2% and 100%, respectively. It demonstrates that the soybean-cultivating Ecotilling established by the use of HRM is a new method for SNP detection with high sensitivity, throughput and low cost.

Key words: Soybean; High resolution melting; Ecotilling; SNP

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)在植物基因组中位点丰富,遗传稳定性高,被认为是继 RFLP 和 SSR 之后的第三代遗传标记,在高密度图谱构建、LD 分析、关联分析、分子标记辅助育种等研究中广泛应用^[1-3]。大豆基因组存在着丰富的多态性,SNP 的分布频率很高,平均每 273 bp 就存在 1 个 SNP^[4],研究大豆 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。

Ecotilling 技术^[5]是由 Tilling 技术(Targeting Induced Local Lesions In Genomes)发展而来,是一种检测自然群体中的等位基因多态性的技术手段,可

以高效地检测单核苷酸多态性(SNP)。目前,Ecotilling 技术已经成功的在水稻(*Oryza sativa*)^[6]、杨树(*Populus trichocarpa*)^[7]、芸苔属植物(*Brassica*)^[8]等物种中应用,并取得了较好的研究成果。传统的 Ecotilling 研究采用 *CEL I* 酶切结合聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的方法进行,该方法操作步骤繁杂,且考虑到 *CEL I* 酶价格昂贵,很难满足高通量 SNP 筛查的研究需求。

高分辨率溶解曲线(High Resolution Melting, HRM)技术^[9]是近年来兴起的一种检测基因 SNP 的新技术。该技术在 PCR 反应的基础上,通过检测与双链 DNA 结合的荧光染料在变性过程中随着温

收稿日期:2011-04-16

基金项目:吉林省科技发展计划重大资助项目(20086029)。

第一作者简介:焦丽(1987-),女,在读硕士,研究方向为大豆分子育种。E-mail: jiaoli87@163.com。

通讯作者:王庆钰(1963-),女,教授,博士生导师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

度升高从双链 DNA 上脱离,引起荧光强度的变化,产生的溶解曲线形状的不同来判断核酸片段中单碱基的突变。HRM 技术具有灵敏度高、特异性强、速度快、通量高、操作简便等优点,并在农学^[9]、医学^[10]中已得到了广泛应用,但在大豆 Ecotilling 中的应用鲜有报道。

该研究以栽培大豆为研究对象,利用 HRM 技术开展对大豆异黄酮合酶基因(*IFS1*)的 SNP 筛查研究工作,在此基础上,建立以 HRM 技术为基础的大豆 Ecotilling 研究体系,为大豆 SNP 筛查提供方便、快捷、有效的检测方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

256 份栽培大豆核心种质资源,由吉林省农业科学院大豆研究中心提供。

1.2 试剂和仪器

Primer Star Mix(2×)购自宝生物(大连)有限公司;Eva Green(20×)饱和荧光染料购自美国 Idaho 公司;石蜡油购自鼎国生物技术(北京)有限责任公司。TissueLyser 高通量组织研磨器为德国 Qia-gen 公司产品;2-16PK 冷冻离心机为德国 Sigma 公司产品;NanoDrop 2000c 微量分光光度计为美国 Thermo Scientific 公司产品;TC-512 梯度 PCR 仪为英国 Techne 公司产品;Lightscanner TM HR-I 96 为美国 Idaho 公司产品;3700 型测序仪为美国 ABI 公司产品。引物合成由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 取 0.1 g 栽培大豆叶片,用 TissueLyser 高通量组织研磨器研磨至粉末状,采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[11]。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因 DNA 的完整性。用 Nano-Drop 2000c 微量分光光度计检测 DNA 浓度和质量,并全部标准化为 50 ng·μL⁻¹。

1.3.2 PCR 扩增 根据 GENBANK 核酸数据库(AF195798.1)提供的大豆 *IFS1* 基因序列,得知 *IFS1* 基因由 2 个外显子和 1 个内含子组成,并在外显子与内含子结合区域设计 7 对扩增引物,引物使用 Primer Premier 5.0 软件设计,序列见表 1,由上海生工公司合成。

探索模板浓度均一化对 HRM 检测的影响,分别将浓度未均一化的 Williams82(野生型)与浓度未均一化的已知突变型模板等体积混合,即二者浓度混合比例未知,将浓度均一化的 Williams82(野生型)与浓度均一化的已知突变型模板等体积混合,

表 1 *IFS1* 基因外显子引物

Table 1 Exon primers of *IFS1*

外显子编号 Exon No.	片段大小 PCR products (allele)/bp	引物序列 Sequence(5' > > 3')
1	119	GAGATGGCGTTCCGGGTTTCTG
		TACGAGTTAAGAAGAGGCCGGTGT
2	286	GTCTCTTCGGCACGGTCCAGGT
		CATACCGATACTCAAGATGCTACTTATAGCC
3	310	GCAAGTTCCTTAGGGTTATG
		GTTCTTTCTCCTTCTGACGA
4	165	CAGAAGGAGAAAGAACGGAGAA
		GGAGAGAAGAAGGAAACTTACGA
5	325	TTGGGTATGTAGGACTTTTTCTCT
		TTTGGGCTCCCTTCCTACTT
6	336	AAGTAGGAAGGACCCCAAATA
		GCAAGTGAACACAAACGAGAC
7	215	TATTGAAAGGTGATGATGCC
		ATTAAGAAAGGAGTTTAGATGC

即二者浓度一致等量混合,再进行 HRM 检测。

分别选取浓度为 50 ng·μL⁻¹ 已知突变型模板与浓度为 50 ng·μL⁻¹ Williams82(野生型)模板以体积 1:1、1:4、1:7、1:10 的比例混样,选取最优的比例进行大规模检测。

PCR 反应体系为 10 μL,其中包括 5 μL Primer Star Mix(2×),2.5 μL ddH₂O,0.5 μL Eva Green(20×)饱和荧光染料,1 μL 上下游引物混合物,模板总量 50 ng,每一体系中加入 10 μL 石蜡油,防止液体挥发。

PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,67℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。在进行高分辨率溶解曲线分析数据之前,进行变性和复性处理:95℃ 变性 30 s,0.1℃·s⁻¹ 速度下降到 40℃ 保持 15 min,4℃ 保存。

1.3.3 HRM 分析 LightScanner 仪器直接对 PCR 产物进行分析,从 75℃ 开始采集溶解曲线,以 0.3℃·s⁻¹ 的斜率采集溶解曲线,到 96℃ 结束,用 LightScanner Call IT 软件对采集后的曲线进行分析。

1.3.4 测序验证 回收纯化上述 PCR 扩增产物片段,PCR 纯化产物测序在 ABI3730 测序仪上完成。

2 结果与分析

2.1 HRM 分析

2.1.1 模板浓度均一化与未均一化处理 HRM 分

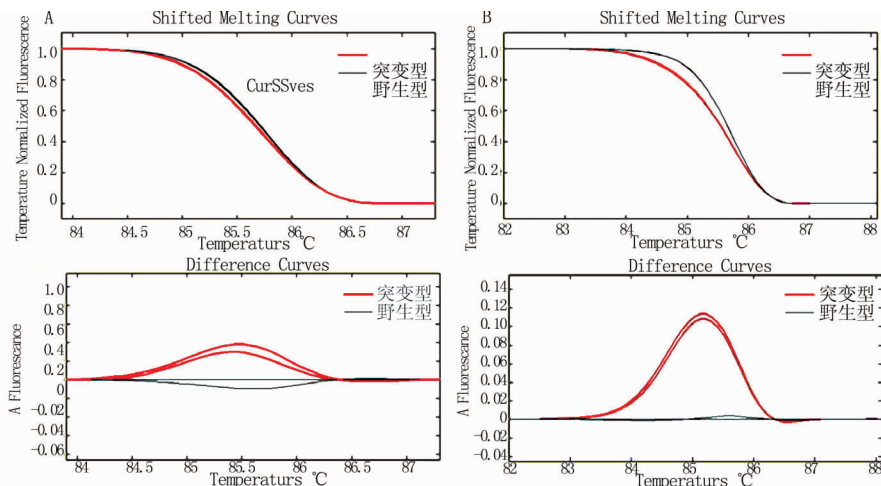


图 1 比较模板均一化(A)与未均一化(B)标准溶解曲线图

Fig.1 Normalized melting curve with DNA

homogenization (A) and without DNA homogenization (B)

2.1.2 不同模板混合比例的 HRM 分析 分别选取已知突变型模板与 Williams82 (野生型) 模板以 1:1、1:4、1:7、1:10 的比例混样, 分析 *IFS1* 第 7 段外显子。由图 2 可知, 随着混合比例的增加, 突变型溶解曲线阈值逐渐降低。其中, 1:1 的比例混合时阈值最高, 1:4 比例混合的阈值低于 1:1 混合的阈值, 但是仍然高于 0.05, 仍旧可以区分突变型, 1:7 及 1:10 比例混合时突变型的阈值低于 0.05, 在筛查大量样本时不利于突变型筛查。

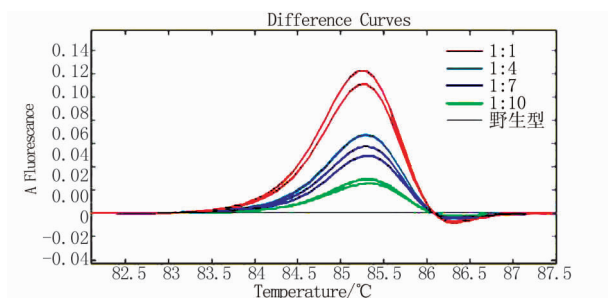


图 2 比较不同模板混合比例的标准溶解曲线图

Fig.2 Normalized melting curve with different proportions of template

2.1.3 *IFS1* 外显子检测 由于突变型与野生型按 1:4 混样时溶解曲线也有较好的分离效果, 所以选择 4 种待测样本与野生型 DNA 等体积混合。如果待测样本基因型与 Williams82 基因型相同, 则其溶解曲线与 Williams82 参照样本的溶解曲线一致。如果待测样本基因型是其它基因型, 则表现出与野生型参照样本不一致的溶解曲线。如图 3 和 4 所示, 分别对 *IFS1* 第 5 段、第 7 段外显子进行 HRM 检测,

析 通过 HRM 分析模板浓度均一化与未均一化的 PCR 产物的结果(图 1)显示, 模板均一化相比未均一化, 突变型与野生型 T_m 值相差较大, 溶解曲线阈值较高, 更易于区分出突变型。

在第 5 段及第 7 段外显子中发现了不同的基因型。在第 5 段外显子中, 与野生型一致的样本占 142 份, 突变型占 114 份; 第 7 段外显子中, 与野生型一致的样本占 206 份, 突变型占 50 份。

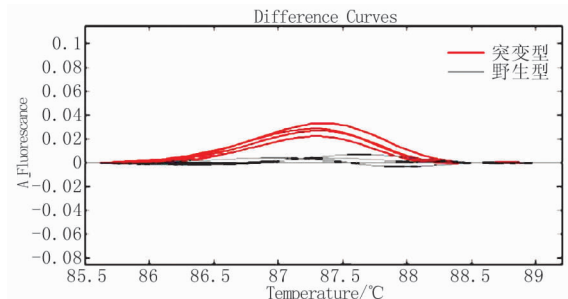


图 3 *IFS1* 第五段外显子标准溶解曲线分型结果

Fig.3 Genotype results of the fifth exon in *IFS1* in normalized melting curve

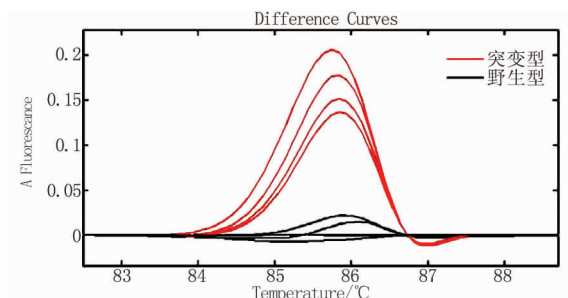


图 4 *IFS1* 第七段外显子标准溶解曲线分型结果

Fig.4 Genotype results of seventh exon in *IFS1* in normalized melting curve

2.2 测序结果

对检测的 256 份样本进行测序。在 *IFS1* 外显

子区共发现2个SNP位点,分别位于第5段和第7段外显子内部。

第5段外显子内,Williams82在1482 bp处碱基为T(图5A),104份突变型栽培大豆品种在1482 bp处碱基为A(图5C),其余152份待测样本在该位点处表现和Williams82一致,为T(图5B)。与HRM分析结果对比,发现HRM检测到的突变型其中有10份假阳性结果,其准确率达91.2%。

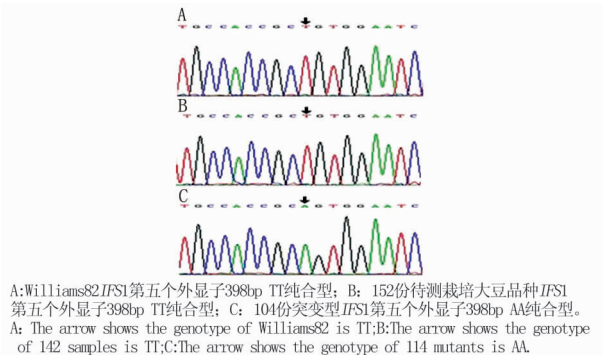


图5 *IFS1* 第五段外显子SNP位点398 T/A测序结果

Fig. 5 The sequencing result of 398 T/A

第7段外显子内,Williams82在1788 bp处碱基为C(图6A),50份突变型栽培大豆品种在1788 bp处碱基为T(图6C),其余206份待测样本在该位点处表现和Williams82一致,为C(图6B)。HRM分析结果与测序结果完全一致,准确率达100%。

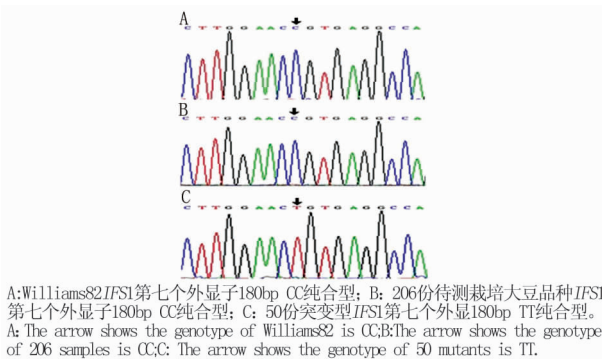


图6 *IFS1* 第七段外显子SNP位点180 C/T测序结果

Fig. 6 The sequencing result of 180 C/T

3 结论与讨论

该研究选用Ecotilling技术进行大豆多态性的检测,并利用高分辨率溶解曲线分析(HRM)技术对Ecotilling技术进行了改进。检测植物基因多态性有多种方法,如变性高效液相色谱法^[12]、单链构象多态性^[13]、变性梯度凝胶电泳^[14]等,这些方法存在准确度不高、分辨率较低或者费用相当昂贵的缺点。Ecotilling技术是一种快速检测自然群体中等位基因SNP的有效手段。然而,传统的Ecotilling技术^[5]利用核酸内切酶 *CEL I* 酶切,再经变性聚丙烯

酰胺凝胶电泳,才能检测到等位基因的多态性。其中,技术中的关键酶 *CEL I* 只有一家公司生产,而且价格昂贵,限制了Ecotilling技术的推广,而且变性聚丙烯酰胺凝胶电泳操作复杂,影响高通量检测。HRM技术利用简单的PCR反应,将扩增产物直接用于Lightscanner仪器检测,便可以获得SNP信息。相比传统的Ecotilling技术,HRM的主要优点是省去了PCR反应后期的处理步骤,从而实现快速度、高通量和低成本的检测。

该研究表明,模板均一化比模板未均一化更易于突变体的检测。将突变型与野生型样品DNA按1:1混合时,溶解曲线的差异最大,但是成本较高,通量降低,而1:4混样检测的突变型阈值也在0.05以上,不影响检测结果。所以在大规模检测的过程中,选择1:4的模板混合方式可以显著提高检测速度、降低检测成本。不同核酸分子的扩增片段会影响T_m值变化,除此之外,反应体系中的各种物理和化学因素也会影响样本的T_m值,进而影响筛查结果的准确性。因此,尽量保持PCR体系的均一性可以提高检测准确率。

该试验中第5段外显子的SNP为A碱基变异为T碱基,而第7段外显子的SNP为C碱基变异为T碱基。HRM分析结果表明,第5段的变异检测阈值明显小于第7段,同时测序结果也显示,HRM对A/T的检测准确率要低于C/T。一般来说,SNP按变异碱基的不同可分为4类。1、2类SNP,一种是AT碱基对变异成CG,另一种是GC碱基对变异为AT;3、4类SNP又称为碱基对中性变异,碱基对AT互换或CG互换但GC含量不变。通常1、2类SNP的T_m值相差0.8~1.4℃,而3、4类SNP的T_m值相差不到0.4℃。T_m值相差过小,会影响SNP筛查的准确性。

该研究表明,HRM技术在大豆Ecotilling中的应用是可行的,模板均一化可提高检测的效果。同时,HRM技术对于检测1、2类SNP更为有效,检测的准确率高达100%。

参考文献

- [1] Chasman D, Adams R M. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 307(2): 683-706.
- [2] Shattuck-Eidens D M, Bell R N, Neuhausen S L, et al. DNA sequence variation within maize and melon: observations from polymerase chain reaction amplification and direct sequencing[J]. *Genetics*, 1990, 126(1): 207.

(下转第850页)

- and utilization in china[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010; 90-145.)
- [2] Ranilla M J, Carro M D, Lo'pez S, et al. Influence of nitrogen source on the fermentation of fibre from barley straw and sugarbeet pulp by ruminal micro-organisms in vitro[J]. The British Journal of Nutrition, 2001, 86(6): 717-25.
 - [3] 韩永俊, 陈海涛, 刘丽雪, 等. 水稻秸秆纤维制取工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2011, 27(4): 281-286. (Han Y J, Chen H T, Liu L X, et al. Optimization of technical parameters for preparing fiber from rice straw[J]. Transactions of the CSAE, 2011, 27(4): 281-286.)
 - [4] 韩永俊, 陈海涛, 刘丽雪, 等. 水稻秸秆纤维地膜制造工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2011, 27(3): 242-247. (Han Y J, Chen H T, Liu L X, et al. Optimization of technical parameters for making mulch from rice straw fiber[J]. Transactions of the CSAE, 2011, 27(3): 242-247.)
 - [5] 陈海涛, 李浩, 孙培灵. 一种组合式秸秆纤维制取机: 中国, 200910206283. 4[P]. 2009. (Chen H T, Li H, Sun P L. A combined type straw fiber extruder: China, 200910206283. 4 [P]. 2009.)
 - [6] Chevanan N, Womac A R, Bitra V S P, et al. Flowability parameters for chopped switchgrass, wheat straw and corn stover[J]. Powder Technology, 2009, 193: 79-86.
 - [7] Fasina O O. Flow and physical properties of switchgrass, peanut hull, and poultry litter[J]. Transactions of the ASABE, 2006, 49(3): 721-728.
 - [8] GB/T 5262-2008. 农业机械试验条件测定方法的一般规定[S]. (GB/T 5262-2008. Agricultural machinery testing conditions-general rules for measuring methods[S].)
 - [9] Mani S, Tabil L G, Sokhansanj S, et al. Mechanical properties of corn stover grind[C]. An ASAE Meeting Presentation, 2003.
 - [10] Puri V M. Characterizing powder flowability[J]. Chemical Processing, 2002, 65(1): 39-42.
 - [11] 周祖鄂. 农业物料学[M]. 北京: 农业出版社, 1994: 101-109. (Zhou Z E. Agricultural material science[M]. Beijing: Agricultural Press, 1994: 101-109.)
 - [12] GB/T 4934.1-2008. 土工试验仪器 剪切仪 第1部分: 应变控制式直剪仪[S]. (GB/T 4934.1-2008. Instrument for soil test-Shear apparatus-Part1: Strain-controlled direct shear apparatus [S].)
 - [13] 谢晓旭, 沈湘林, 汤雪美, 等. 煤粉流动特性若干影响因素的研究[J]. 煤炭学报, 2008, 33(1): 85-88. (Xie X X, Shen X L, Tang X, et al. Study on some factors impacting flowability of pulverized coal[J]. Journal of China Coal Society, 2008, 33(1): 85-88.)
 - [14] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 72-86. (Yuan Z F, Zhou J Y. Design and analysis of experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 72-86.)
 - [15] Chen H T. Study on the cluster separator for automatically planting baker's garlic in a sandy field[D]. Tottori Japan: Tottori University, 2004: 74-77.
 - [16] B. 布尚. 摩擦学导论[M]. 北京: 机械工业出版社, 2006: 137. (Bharat B. Introduction to tribology[M]. Beijing: China Machine Press, 2006: 137.)

(上接第 846 页)

- [3] Schmid K J, S rensen T R, Stracke R, et al. Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*[J]. Genome Research, 2003, 13(6): 1250-1257.
- [4] Zhu Y, Song Q, Hyten D, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean[J]. Genetics, 2003, 163(3): 1123-1134.
- [5] Comai L, Young K, Till B J, et al. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling[J]. The Plant Journal, 2004, 37(5): 778-786.
- [6] Kadaru S B, Yadav A S, Fjellstrom R G, et al. Alternative Ecotilling protocol for rapid, cost-effective single-nucleotide polymorphism discovery and genotyping in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2006, 24(1): 3-22.
- [7] Gilchrist E J, Haughn G W, Ying C C, et al. Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa* [J]. Molecular ecology, 2006, 15(5): 1367-1378.
- [8] Wang N, Shi L, Tian F, et al. Assessment of FAE 1 polymorphisms in three *Brassica* species using Ecotilling and their association with differences in seed erucic acid contents[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 137-147.
- [9] 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.
- [10] Willmore-Payne C, Holden J A, Tripp S, et al. Human malignant melanoma; detection of BRAF-and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis[J]. Human pathology, 2005, 36(5): 486-493.
- [11] Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
- [12] Caldwell D G, McCallum N, Shaw P, et al. A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. The Plant Journal, 2004, 40(1): 143-150.
- [13] Martins-Lopes P, Zhang H, Koebner R. Detection of single nucleotide mutations in wheat using single strand conformation polymorphism gels[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19(2): 159-162.
- [14] He S, Ohm H, Mackenzie S. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84(5): 573-578.