

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00751

四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术在中国明对虾 SNP 基因分型中的研究

张建勇^{1,2,3}, 王清印², 王伟继², 孟宪红², 孔杰², 张全启¹

1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266002;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
3. 山东理工大学 生命科学学院, 山东 淄博 255049

摘要: 采用四引物扩增受阻突变体系 PCR(Tetra-primer ARMS-PCR)技术, 对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 80 个单核苷酸多态性位点(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)进行验证。结果表明, 通过优化 PCR 反应条件、调整内外引物浓度和采取 Touchdown PCR 程序可优化扩增效果, 80 组引物中有 20 组引物得到良好的分型效果。群体多态性分析表明有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)及多态性信息含量(PIC)的范围分别为 1.127~1.993、0.136~0.607、0.119~0.492 和 0.145~0.373。结果显示四引物扩增受阻突变体系技术聚合酶链式反应是一种简单快速而有效 SNP 基因分型的方法。

关键词: 单核苷酸多态性; 基因分型; 中国明对虾; 四引物扩增受阻突变体系 PCR

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0751-09

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)是基因组中最常见的变异形式^[1], 在基因组中的分布频率很高, 并往往和特定的性状关联^[2]。SNPs 在品种鉴定^[3]、遗传多样性分析^[4]、关联分析^[5]、高密度遗传连锁图谱构建^[6]和分子标记辅助育种^[7]等方面均表现出了良好的应用前景。目前已报道的 SNP 检测方法很多^[8], 包括基于聚合酶链式反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)^[5]、单链构象多态性(Single-strand conformational polymorphism, SSCP)^[9]、引物延伸技术(primer extension)^[10]、TaqMan 探针技术^[11]、变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)^[12]、高分辨熔解曲线检测技术(High-Resolution Melting, HRM)^[13]和 DNA 微阵列技术^[14]等。但这些方法检测过程繁琐、检

测所用时间长、使用试剂昂贵等, 因而不利于广泛的推广应用。四引物扩增受阻突变体系 PCR(tetra-primer amplification refractory mutation system PCR, Tetra-primer ARMS-PCR)是在普通 PCR 基础上发展起来、专门用于检测 SNP 的技术, 对单核苷酸突变检测具有快速、简便、费用低等特点, 针对不同的已知单核苷酸突变, 设计适当的引物, 通过 PCR 扩增和电泳就可以直接达到区分突变型与野生型的目的^[15]。

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是中国重要的经济虾类, 在 20 世纪 70–80 年代曾是中国海水养殖虾类的主导种类。但由于病害频发、养殖环境恶化等问题, 导致中国明对虾的养殖规模和产量急剧减少^[16]。在这一大背景下, 培育生长快、抗逆能力强的新品种就成为必然的选择^[17]。分

收稿日期: 2010-12-13; 修订日期: 2011-02-21。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31072206); 山东省自然科学基金项目资助(ZR2009DQ002)。

作者简介: 张建勇(1977–), 男, 博士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: zhangjy1977@126.com

通信作者: 王清印, 研究员, 博士生导师。E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

子标记技术的发展与实用化,使得开展分子标记辅助育种成为可能。本研究在中国明对虾转录组 454 高通量测序 GS FLX 系统大规模测序的基础上,依据预测的 SNP 位点设计引物,通过四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术(tetra-primer ARMS-PCR)进行 SNP 位点多态性的验证,建立简便快捷的中国明对虾 SNP 分型方法,为中国明对虾遗传图谱构建、重要性状 QTL 定位以及分子标记辅助选择育种等研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料及基因组 DNA 提取

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)于 2009 年 8 月取自中国水产科学研究院黄海水产研究所青岛鳌山卫的水产遗传育种中心。共采取 30 尾中国明对虾个体,活体运输至实验室,置 -80°C 超低温冰柜内保存备用。DNA 的提取参照王伟继等^[18]的方法,基因组 DNA 样品浓度通过 GENE QUANT pro (Pharmacia Biotech Ltd.)RNA/ DNA 分析定量仪测定,稀释成 $15\text{ ng}/\mu\text{L}$, -20°C 保存备用。

1.2 四引物 ARMA-PCR 扩增

1.2.1 引物设计 中国明对虾转录组 454 高通量测序、contig 的拼装和 SNP 位点的预测由国家人类基因组南方研究中心完成。根据测序结果所推断出来的 SNP 位点,利用 tetra-primer ARMS-PCR 引物在线设计程序进行引物设计(http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html),共设计出 80 组引物,产物片段大小控制在 $150\sim 500\text{ bp}$ 。针对每个 SNP 位点设计两条 3'末端分别与 SNP 两个等位基因碱基配对且延伸方向相反的内侧引物和 2 个方向相反的外引物,同时在内引物 3'端第 3 位碱基引入错配以增加扩增特异性^[19](表 1,斜体字母代表错配碱基)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 四引物 ARMS-PCR 扩增体系优化 除了引物设计之外,对四引物 ARMS-PCR 反应体系的进行了优化。对退火温度在 $50\sim 70^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内的每组引物进行了优化,以确定最佳的退火温

度。在最适退火温度下(表 1), $15\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系中分别对 Mg^{2+} 浓度(1.5 、 2.0 、 2.5 、 3.0 mmol/L)、dNTP 浓度(0.15 、 0.20 、 0.25 、 0.3 mmol/L)和 Taq 酶的用量(0.5 、 1.0 、 1.5 U)进行优化。在最适退火温度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度和 Taq 酶用量条件下,在 $15\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系中主要对内、外引物各浓度比例组合在 4 个比例水平($10:1$ 、 $4:1$ 、 $2:1$ 、 $1:1$)上进行优化。

1.2.3 四引物 ARMS-PCR 扩增 利用设计出的 80 组 tetra-primer ARMS-PCR 引物对中国明对虾 30 个个体 DNA 样品进行 PCR 扩增,优化后的 PCR 反应体积为 $15\text{ }\mu\text{L}$,包括 45 ng 基因组 DNA、 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ $10\times\text{PCR}$ 缓冲液、 1.5 mmol/L Mg^{2+} 、 0.5 U Taq DNA 聚合酶、dNTP 各 0.2 mmol/L ,两条内引物各 $0.8\text{ }\mu\text{mol/L}$,两条外引物各 $0.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。Touchdown PCR 反应程序为 94°C 预变性 5 min , 94°C 变性 1 min , $T_{\text{a}}+5^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min (梯度为 1°C),降至 T_{a} (表 1)温度时进行余下的循环, 72°C 延伸 10 min ,共 35 个循环。PCR 反应在 Mastercycler epgredient S PCR 仪上进行。

1.2.4 SNP 基因型检测 PCR 扩增产物在浓度为 3%的含 Genefinder 染料的琼脂糖凝胶上于 $0.5\times\text{TBE}$ 缓冲液中电泳,用 Maker B 100 bp DNA Ladder 作分子量标记,在凝胶成像系统(UVP EC3 Imaging System)上成像,确定 SNP 位点的基因型。SNP 基因型通过电泳谱带进行鉴定,纯合等位基因型为 2 条谱带,杂合型为 3 条谱带。

1.3 统计分析

SNP 位点的分型结果采用 POPGENE32 (version 1.32)软件处理,统计各位点的有效等位基因数(effective number of alleles, N_{e}),观测杂合度(observed heterozygosity, H_{o}),期望杂合度(expected heterozygosity, H_{e}),检测各个位点的哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡,参照 Botstein 等^[20]的方法多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。

2 结果与分析

2.1 四引物 ARMS-PCR 扩增条件优化

根据 PCR 扩增条件,对引物的退火温度,以

表 1 中国明对虾 20 个 SNP 位点的特征

Tab. 1 Characterization of 20 SNP loci for *Fenneropenaeus chinensis*

SNP 位置 contig and locus	引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	退火温度/°C T _a	片段大小/bp product size
C3422-126-T>C	C3422-126FI	GCCTTAAATAACTTGTAGATTCATAGGT	59	T 119
	C3422-126RI	AGGAAGAAAACCTTTTACACATTACATAG		C 136
	C3422-126F	TAAGACATTTTAAGACCCCTTTGTTTC		Outer 198
	C3422-126R	CCATTGTAAATGACAAGTTATATGG		
C4413-277-T>C	C4413-277FI	GCGTTTGAGACTGTTTTGTCTTTGGT	54	T 136
	C4413-277RI	TGCTTATCGTTCAACTTTTTATATATTGCG		C 120
	C4413-277F	AATTTGTTTTTGTACATTGCTTTCCAAAA		Outer 488
	C4413-277R	ACCTGACCCTGTATTACAAAAGAACCTG		
C9863-273-G>C	C9863-273FI	GTCTGTTGGCCCTTGGAGGAGCGAGGGG	68	G 137
	C9863-273RI	GGTCACAGCATTGACTCCGTGGTCGTGGG		C 171
	C9863-273F	ACAGCCTCGTCTGCGTCCCTCCACTCGC		Outer 251
	C9863-273R	CAATGGCCACACCAGGGCGCAAAAAACA		
C11528-234-A>C	C11528-234FI	ATAATAGGAACAAAAATAACGAAGGGC	62	A 170
	C11528-234RI	CATCCCTTTTTCCTTTTCCTTTTCCT		C 200
	C11528-234F	AAATCCTGATAAATACTCCCCAAGAGGT		Outer 315
	C11528-234R	ACAGGCAGACAGACAGAAGGAAATAGAT		
C14198-323-A>C	C14198-323FI	GTTCTTCCATTTTCCCTTTCACTTCTGC	60	A 134
	C14198-323RI	GAGAAGCGAGTTTGAAGCAAACCTT		C 108
	C14198-323F	TAATGAAAACGTGTGGTCTTCTCAACGCA		Outer 188
	C14198-323R	TTGAAACAGATGAAGAAATTGGAAGGGA		
C18153-299-C>T	C18153-299FI	TCCCTGTATGCCTCCGGTCGTACCACTTGC	68	C 194
	C18153-299RI	ACACCGTCACCAGAGTCGCAAAACCGGA		T 152
	C18153-299F	CCCCTCAACCCCAAGGCCAATCGTGAG		Outer 289
	C18153-299R	CAGCGGTGGTGGTGAAGGAGTAGCCACG		
C18153-524-T>C	C18153-524FI	TTGCTACATCGCCCTTGACTTCGAGCGT	68	T 209
	C18153-524RI	AGGAAGCAGCAGCAACATTCATCGCG		C 169
	C18153-524F	CTCGATCTTGCTGGTCGTGATCTGACCC		Outer 324
	C18153-524R	GCACCTCATGATGGAGTTGTGGACGGTT		
C244-659-C>G	C244-659FI	GGACGCTGACTAGTTTGTACCCCTTGGGGC	68	C 217
	C244-659RI	GGCTTCGCTGAGGGCTTGATCCACGC		G 255
	C244-659F	GTAGGGGTTGATGGCGATGCAGAAGAGGC		Outer 416
	C244-659R	ACTTATAAACACGCGCCACCATGCCCGG		
C6414-458-G>T	C6414-458FI	GTTCTGGCCATAAGCATCGCGACACTTGG	68	G 160
	C6414-458RI	AGGTGTCCGTTCCCATCGTGTCTGACGA		T 215
	C6414-458F	AGGGTAGTTGGGACGGGCACAGCCGTAG		Outer 318
	C6414-458R	TCCATCGATATCCCGCTCAGGGTCACG		
C6707-288-A>G	C6707-288FI	GAGATCACGAGCCAGCCTCTCGAACGCA	68	A 224
	C6707-288RI	GGGAGGAGGTCGTCGCCGAGAAGAGAGC		G 162
	C6707-288F	TTTTCCACGACCTGGAAGCCTGCCACAA		Outer 330
	C6707-288R	TGTCGTACGGCGTGCAAGCAGTCAGACC		

续表 1 Tab.1 continued

SNP 位置 contig and locus	引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	退火温度/°C T _a	片段大小/bp product size
C9258-329-C>G	C9258-329FI	TAAAAGGTTGGGCATTGGCTGCTGTGTC	68	C 207
	C9258-329RI	CAAGTTTCGAAGGCAGCTCACTTGGATGC		G 144
	C9258-329F	GCTCGAGTCTCCACATGTCTGCTGAGCC		Outer 294
	C9258-329R	CCTGATAACGCCCACGGAGCAGAACATT		
C14418-530-C>A	C14418-530FI	CAGAGAGCGCTACTGAAACGGGACAAGCC	66	C 242
	C14418-530RI	TGTTTGTCCTGTTTCAGTAGCGCTCCCT		A 209
	C14418-530F	TAAGTGTTTTGCTTGGAGGGGGCCTTGC		Outer 394
	C14418-530R	GCTGTCCATTCTCTGGCATCATTTCCCG		
C17091-559-A>C	C17901-559FI	TGAAAGCCCTAGTATGAAAAAAAAAAGAA	61	A 259
	C17901-559RI	TCATAATGTCCAGTATCATATCACACTCTG		C 219
	C17901-559F	TACCTCAAGTGTTAAGTTGTCTCATTGTG		Outer 420
	C17901-559R	AGTAAGAATGCCAATGTACACTCACTTG		
C4698-355-C>T	C4698-355FI	GAAACCCGTGTAAAGGAGGAGCAGCTTC	66	C 197
	C4698-355RI	ATACTGTTACGGTACTCGGAGGCCCA		T 231
	C4698-355F	GATTCCATGCAAGCTTCTCTCGAGGTTG		Outer 373
	C4698-355R	GGTTGGTGAGGTTGTTGATCTGTTACG		
C5806-373-C>A	C5806-373FI	TTAACGATTGGGACGAAACTTGCGACGC	63	C 200
	C5806-373RI	AATGTAATCCCCCTTCTCTAAGCGGT		A 156
	C5806-373F	AGAAGAAGGATGCTCAGATTGCGAGCT		Outer 301
	C5806-373R	TGCACTTGTTCACTGAGTAAACCAATCCAA		
C12635-182-T>A	C12635-182FI	AGCGGAAGATGACCTTGATGAAGAAGT	63	T 179
	C12635-182RI	CTCATCAAGGTCATCTTCCCTCCAATTAT		A 149
	C12635-182F	TGAAGGAATGGAAGATGACGATGAAGA		Outer 271
	C12635-182R	TTCCTGTCTATTTCCACAGAACCATCG		
C17838-344-T>C	C17838-344FI	ACTTGCTTCCATGTGTTCTACTCATCTT	56	T 194
	C17838-344RI	GTATCAGCAGCAACAGATATACATGGAG		C 237
	C17838-344F	CTTCTCTGAAGTTCTAGGAAGTCGTCA		Outer 375
	C17838-344R	TTTGACCTGACACTACAAATTATGGTCA		
C17838-737-C>T	C17838-737FI	CATGAGCTTCATCGTATATAGGCAGTTC	56	C 210
	C17838-737RI	AGAGACAAGGTAGATATCCCGACTGAAA		T 163
	C17838-737F	TTTGTACAAATTCTCCCTTAGATCCTGG		Outer 317
	C17838-737R	TGGAGTCATGCCGAATAACTGTATAAAG		
C18477-208-C>A	C18477-208FI	TCAAGATGTTTTAGTGTACCAITTTGTATC	58	C 183
	C18477-208RI	CTTGCCGTTTAGTTGGTTTACACCTT		A 223
	C18477-208F	TGGAGTGAAAGTGTGGAAGATTACATAG		Outer 351
	C18477-208R	GATGTTTCATGAAACCCAAGGTAATAAAC		
C929-994-A>G	C929-994FI	ACAAGAAGAACCACGAGAGGATGCCGA	66	A 195
	C929-994RI	TCTTCTGCTGGAGCTTGTCGACCAAGTTC		G 280
	C929-994F	ATGCGTAAGGGTCTGGAGGTGTCTGTGA		Outer 420
	C929-994R	TCATGTCCGGCTCTTGTCGGCATTATAA		

表 2 中国明对虾 20 个 SNP 位点的多态性分析
Tab. 2 Analysis of polymorphism on 20 SNPs loci of *Fenneropenaeus chinensis*

SNP 位置 contig and locus	有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	P	多态信息含量 PIC	SNP 位置 contig and locus	有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	P	多态信息含量 PIC
C3422-126-T>C	1.867	0.378	0.467	0.146	0.352	C9258-329-C>G	1.478	0.329	0.410	0.373	0.269
C4413-277-T>C	1.490	0.368	0.325	0.249	0.259	C14418-530-C>A	1.516	0.347	0.326	0.562	0.287
C9863-273-G>C	1.127	0.136	0.119	0.702	0.145	17091-559-A>C	1.719	0.409	0.352	0.275	0.306
C11528-234-A>C	1.728	0.353	0.461	0.154	0.347	4698-355-C>T	1.993	0.607	0.492	0.293	0.372
C14198-323 -A>C	1.164	0.391	0.374	0.874	0.324	C5806-373-C>A	1.155	0.402	0.382	0.553	0.322
C18153-299-C>T	1.672	0.359	0.413	0.171	0.227	C12635-182-T>A	1.541	0.367	0.465	0.264	0.256
C18153-524-T>C	1.472	0.268	0.327	0.308	0.285	C17838-344-T>C	1.870	0.433	0.378	0.150	0.334
C244-659-C>G	1.705	0.467	0.342	0.285	0.331	C17838-737-C>T	1.980	0.501	0.492	0.970	0.373
C6414-458-G>T	1.826	0.368	0.474	0.259	0.350	C18477-208-C>A	1.748	0.346	0.208	0.254	0.281
C6707-288-A>G	1.250	0.237	0.203	0.525	0.204	C929-994-A>G	1.381	0.303	0.269	0.365	0.226

及 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、*Taq* 酶用量和内/外引物浓度进行优化, 确定的最佳退火温度如表 1 所示。较高的退火温度使扩增体系更稳定^[21]。除了温度对该体系的影响外, Mg^{2+} 和 dNTP 的浓度对扩增效果的影响也很大。本实验所用的 Mg^{2+} 浓度范围是 1.5~3 mmol/L, Mg^{2+} 浓度在 1.5 mmol/L 时为最佳, 大于 1.5 mmol/L 时出现非特异性的条带。所用 dNTP 的浓度范围为 0.15~0.3 mmol/L, dNTP 浓度在 0.2 mmol/L 时为最佳。内外引物的浓度比例对扩增结果影响较大, 在内外引物之比为 4:1 时 3 种基因型 PCR 扩增结果最佳, 条带清晰, 判断基因型正确率高。

2.2 不同个体基因分型的检测结果

共设计了 80 组 tetra-primer ARMS-PCR SNP 分型引物对中国明对虾基因组 DNA 进行扩增, 结果表明有 20 组引物分型成功(表 1)。图 1 为 SNP 位点 contig4698-355(C→T)、contig17838-344(T→C)和 contig18477-208(C→A)ARMS-PCR 扩增的电泳结果。从图 1 中可以看出, 每个个体都可以扩增出外引物产物, 被外引物扩增的条带在每一个样品中均出现, 主要起到阳性对照的作用, 它也可以有效地降低非特异 PCR 产物的扩增和引物二聚体的形成^[22]。野生型和突变型的个体只能再

扩增出等位基因所对应的片段, 所以杂合个体都是 3 条带, 而纯合个体只有 2 条带。

contig4698-355 位点 SNP 类型为 C→T。从图 1A 中可以看出, 每个个体都可以扩增出 373bp 的外引物产物, 只扩增出 231 bp 特异片段的个体基因型为 TT, 只扩增出 197 bp 特异片段的个体基因型为 CC, 而 2 种特异片段都扩增出的个体基因型为 CT。contig17838-344 位点 SNP 类型为 T→C。从图 1B 中可以看出, 每个个体都可以扩增出 375 bp 的外引物产物, 只扩增出 194 bp 特异片段的个体基因型为 TT, 只扩增出 237 bp 特异片段的个体基因型为 CC, 而 2 种特异片段都扩增出的个体基因型为 TC。contig18477-208 位点 SNP 类型为 C→A。从图 1C 中可以看出, 每个个体都可以扩增出 351 bp 的外引物产物, 只扩增出 183 bp 特异片段的个体基因型为 CC, 只扩增出 223 bp 特异片段的个体基因型为 AA, 而 2 种特异片段都扩增出的个体基因型为 CA。实验结果表明四引物 ARMS-PCR 技术能够有效验证预测的 SNP 位点。

2.3 群体多态性分析

用表 1 中的 20 组 SNP 位点 ARMS-PCR 引物对 30 尾中国明对虾进行扩增, 扩增产物通过 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。对琼脂糖电泳结果进行统

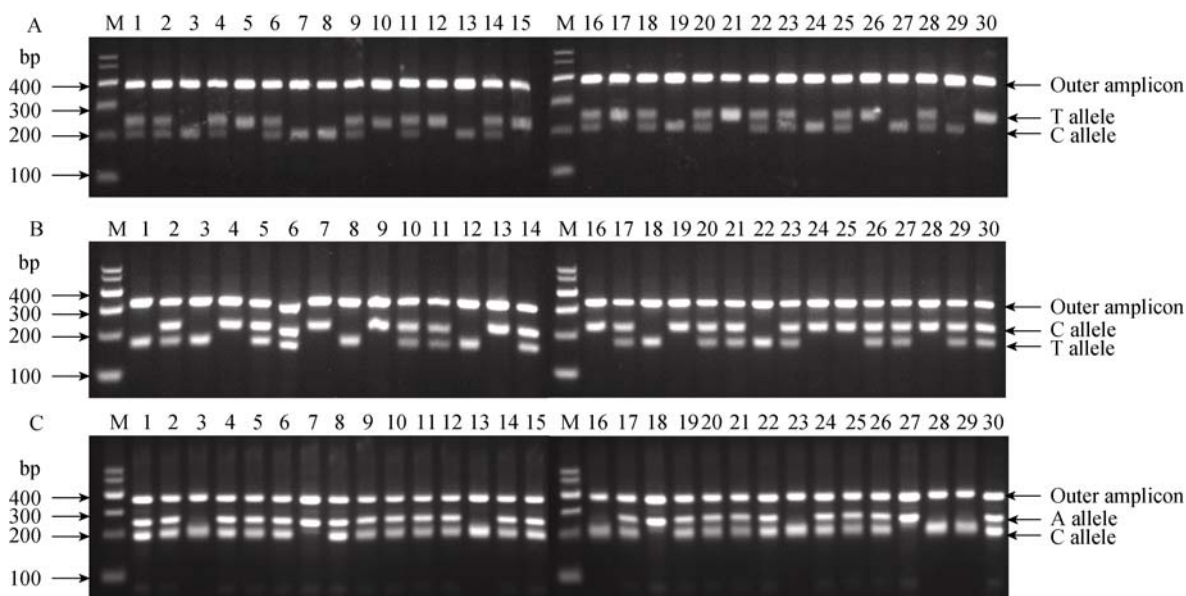


图 1 SNP 位点 contig4698-355(A)、contig17838-344(B)和 contig18477-208(C)的 ARMS-PCR 分型的电泳结果

Fig.1 Genotyping of SNP loci by ARMS-PCR.

A: contig4698-355, B: contig17838-344, C: contig18477-208

计, 纯合子分别记为 AA 和 BB, 杂合子记为 AB, 利用 POPGENE32(version 1.32)软件处理分型数据, 获得各个位点的有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和各位点的多态信息含量范围分别为 1.127~1.993、0.136~0.607、0.119~0.492 和 0.145~0.373(表 2)。多态信息含量低于标准值 0.5^[20], 对于一个只有 2 个等位片段的标记或基因来说, 多态信息含量较高, 可以作为分子标记。通过哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg)检验, 显示所有位点符合哈迪-温伯格平衡, 这表明检测的 SNP 位点适合中国明对虾群体遗传分析。

3 讨论

目前用于 SNP 发现的途径有很多^[23-24]。根据转录组 454 高通量测序系统 GS FLX 大规模测序所预测的 SNP 位点, 然后设计 ARMS-PCR 引物对 SNP 位点进行基因分型, 是获得与目标性状相关的 SNP 分子标记途径之一^[25]。面临数目巨大的 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, 这些方法大都技术复杂且耗费巨大, 使 SNP 开发和应用受到限制。四引物 ARMS-PCR 技术能在已知 SNP 位点变化的情况下, 一组引物就能够确定一个 SNP 位点 2 种不同的基因型。为了提高四引物 ARMS-PCR 对 SNP 的检出率和扩增特异性。Ye 等^[15]的研究认为, 在特异引物 3'端第 2 位加入错配碱基就可以获得较好的差异产物, 并且要注意碱基错配类型。卫波等^[26]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。本研究在引物 3'末端的第 3 位碱基引入第 2 个错配碱基, 使引物的稳定性好, 扩增特异性高, 减少了假阳性的发生^[19]。在同一反应体系中加入 4 条引物可能会产生较多的非特异扩增, 因此在实验中调整引物浓度和靶 DNA 浓度, 以及 *Taq* 酶的用量和退火温度等来提高产物的特异性^[27], 其中内外引物的浓度比例对扩增结果影响较大^[28]。本研究对内外引物浓度比例进行了优化, 结果表明在内外引物之比为 4:1 时特异性最

好。特异性引物浓度过高就不能很好阻断扩增而出现假阳性, 浓度过低则条带不清而不能准确判读结果。同时采用 Touchdown PCR 方法, 得到稳定特异的扩增结果。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。在实验中, 所采用的引物长度都在 27 bp 左右, 如果引物过短, 则降低了引物本身的特异性。

从 20 世纪 90 年代起, 分子标记就应用于中国明对虾遗传学研究, 本研究中对 SNP 分型数据分析表明有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)及多态性信息含量(PIC)的范围分别为 1.127~1.993、0.136~0.607、0.119~0.492 和 0.145~0.373。中国明对虾群体表现出比较低的遗传多态性, 但与其他分子标记技术相比, 要高于随机扩增多态 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)^[29]且低于微卫星(Simple Sequence Repeats, SSR)^[30], 对于 SNP 二等位基因分子标记来说, 大量位点的应用可以弥补多样性的不足。SNP 广泛存在于基因组中, 在遗传育种研究中对与目的性状相关的 SNP 进行研究更有意义, Tao 等^[5]对北极嘉鱼(*Salvelinus alpinus* L.)与生长相关的 10 个候选基因进行了 SNPs 位点的筛选, 并进行了 SNPs 位点与生长性状的关联分析。结果表明, 10 个候选基因中有 5 个含有 SNPs 位点, 其中位于基因 GHRH/PACAP2 上的 SNPs 位点与北极嘉鱼早期生长速率存在极显著性相关。因此 SNP 位点的发现与验证尤为重要。SNP 作为第 3 代分子标记, 具有广阔的应用前景, 在水产动物 SNP 的研究仅见罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[31]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[32]、牡蛎(*Crassostrea virginica*)^[33]等, 但关于中国明对虾 SNPs 的研究尚处于起步阶段, 相关的报道还不多见。本方法以 PCR 扩增片段长度差异来检测 SNP, 是一种快速、简单、实用的 SNP 分型方法, 适合大规模检测。随着 SNP 研究的不断深入, 越来越多的中国明对虾 SNP 标记将被开发出来, 推动 SNP 与性状间的关联分析、遗传图谱构建以及 QTL 定位等研究的开展, SNP 在中国明对虾遗传育种的研究也将越来越深入, 应用将越来越广泛。

参考文献:

- [1] Brookes A J. The essence of SNPs[J]. Gene, 1999, 234: 177–186.
- [2] Kang J H, Lee S J, Park S R, et al. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fish Sci, 2002, 68: 494–498.
- [3] Itoi S, Nakaya M, Kaneko G, et al. Rapid identification of eels *Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla* by polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphism-based specific probes[J]. Fish Sci, 2005, 71: 1356–1364.
- [4] Lin B Zh, Sasazaki S, Mannen H. Genetic diversity and structure in *Bos taurus* and *Bos indicus* populations analyzed by SNP markers[J]. Anim Sci J, 2010, 81(3): 281–289.
- [5] Tao W J, Boulding E G. Association between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.)[J]. Heredity, 2003, 91: 60–69.
- [6] Stickney H L, Schmutz J, Woods L G, et al. Rapid mapping of zebrafish mutations with SNPs and oligonucleotide microarrays[J]. Genome Res, 2002, 12: 1929–1934.
- [7] Prudence M, Moal J, Boudry P, et al. An amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*[J]. Anim Genet, 2006, 37: 348–351.
- [8] Evandro N, Derek R D, William G F, et al. High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome[J]. BMC Genom, 2008, 9: 312–325.
- [9] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2766–2770.
- [10] Jessica K, Penelope C I, Theodore K C. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by primer extension reaction and a dual-analyte bio/chemiluminometric assay[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 388: 1747–1754.
- [11] Akihiko M, Tomohiro N, Nobutaka D, et al. Genotyping of triallelic SNPs using TaqMans PCR[J]. Molecul Cellul Probes, 2007, 21(3): 171–176.
- [12] Fasano T, Bocchi L, Pisciotto L. Denaturing high-performance liquid chromatography in the detection of ABCA1 gene mutations in familial HDI deficiency[J]. J Lipid Res, 2005, 46(4): 817–822.
- [13] Michael L, Robert P, Robert P, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons[J]. Clin Chem, 2004, 50(7): 1156–1164.
- [14] Divne A M, Allen M, A DNA microarray system for forensic SNP analysis[J]. Forensic Sci Int, 2005, 154: 111–121.
- [15] Ye S, Dhillon S, Ke X, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(17): e88.
- [16] Wang Q Y, Yang C H, Yu J. The shrimp farming industry in China: past development, present status and perspectives on the future[C]//Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95, World Aquaculture Society. 1995, 1–12.
- [17] Wang Q Y, Li J, Kong J, et al. Seeking better growth and disease resistance for Chinese shrimp[J]. Asian Aqu Mag, 2003, 2: 19–21.
- [18] 王伟继. I 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性状的 QTL 定位研究: II 蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建及性别决定机制初探[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [19] Little S. ARMS analysis of point mutation[M]//Taylor G R. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. Boca Raton: CRC Press, 1997: 45–51.
- [20] Botstein D, White R L. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Anim Genet, 1980, 32: 314–331.
- [21] 金凤媚, 杨迎霞, 薛俊, 等. 利用等位基因特异性 PCR 技术检测番茄高色素基因 *hp1* 和 *hp2* 的单核苷酸多态性[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(5): 851–857.
- [22] Jeong S C, Maroof M A S. Detection and genotyping of SNPs tightly linked to two disease resistance loci, *Rsv1* and *Rsv3*, of soybean [J]. Plant Breed, 2004, 123: 305–310.
- [23] Daryl J S, Robert K, Mariko M, et al. Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs[J]. Genome, 2003, 49: 431–437.
- [24] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean[J]. Genetics, 2003, 163 (3): 1123–1134.
- [25] Barbazuk W B, Emrich S J, Chen H D, et al. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing[J]. The Plant J, 2007, 51: 910–918.
- [26] 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(70): 1313–1320.

- [27] 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.
- [28] 卜莹, 古卓良, 张晓丹, 等. 四引物 PCR 扩增反应的单管 SNP 快速测定法[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(2): 252–256.
- [29] Meng X H, Wang Q Y, Jang I K, et al. Genetic differentiation in seven geographic populations of the fleshy shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* based on microsatellite DNA[J]. Aquaculture, 2009, 287: 46–51.
- [30] 马春艳, 孔杰, 孟宪红, 等. 中国对虾 5 个地理群体的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 245–249.
- [31] Nguyen M T, Andrew C B, Peter B M, et al. Single nucleotide polymorphisms in the actin and crustacean hyperglycemic hormone genes and their correlation with individual growth performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2010, 301: 7–15.
- [32] Cecilia C S, Timothy P S, Ralph T W, et al. Single nucleotide polymorphism discovery in rainbow trout by deep sequencing of a reduced representation library[J]. BMC Genom, 2009, 10: 559–566.
- [33] Liu S Zh, Xi M G. Development and validation of single nucleotide polymorphism markers in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin by mining ESTs and resequencing[J]. Aquaculture, 2010, 302: 124–129.

Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction in SNP genotyping of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

ZHANG Jianyong^{1, 2, 3}, WANG Qingyin², WANG Weiji², MENG Xianhong², KONG Jie², ZHANG Quanqi¹

1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266002, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China

Abstract: Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (Tetra-primer ARMA-PCR) was introduced to investigate single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and 80 putative SNPs loci were studied. Twenty out of the 80 SNP tetra-primer ARMA-PCR primer sets were validated following touchdown profiles and the outer and the expected inner bands were amplified. Homozygous and heterozygous were detected by agarose gel and the genotypes were obtained. Polymorphism of these distinct loci was assessed using 30 individuals, and the results showed that the 20 loci were all polymorphic. The values of N_e , H_o , H_e and PIC varied from 1.127 to 1.993, from 0.136 to 0.607, from 0.119 to 0.492 and from 0.145 to 0.3730, respectively. The results indicated that tetra-primer ARMA-PCR is a simple, rapid and efficient method for SNP genotyping which make it useful in a broad aspects of *Fenneropenaeus chinensis* genetic and breeding studies.

Key words: single nucleotide polymorphisms (SNP); genotyping; *Fenneropenaeus chinensis*; tetra-primer ARMA-PCR

Corresponding author: WANG Qingyin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn