

# 大白菜 KASP 反应体系的优化与建立

杨双娟\*, 原玉香\*, 魏小春, 王志勇, 赵艳艳, 姚秋菊, 张晓伟\*\*

(河南省农业科学院园艺研究所, 郑州 450002)

**摘要:** 以大白菜基因组 DNA 为模板, 对影响竞争性等位基因特异性 PCR (Kompetitive allele specific PCR, KASP) 的反应体积、引物浓度和 DNA 模板用量等 3 个参数进行优化, 建立了适用于大白菜的 KASP 反应体系。96 孔模块最佳反应体系中, 总反应体积为 8  $\mu\text{L}$ , 其中模板 DNA ( $60 \sim 80 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , KASP Master mix ( $2\times$ ) 4  $\mu\text{L}$ , 引物混合物 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.14  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu\text{L}$ 。384 孔模块最佳反应体系中, 总反应体积为 4  $\mu\text{L}$ , 其中模板 DNA ( $60 \sim 80 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , KASP Master mix ( $2\times$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 引物混合物 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.07  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 1  $\mu\text{L}$ 。利用不同引物和不同的大白菜材料对优化的反应体系进行验证, 均获得了较好的 KASP-SNP 分型, 验证了该优化体系的稳定性。该反应体系可以用于大白菜遗传多样性研究、基因定位、遗传图谱构建等遗传学研究。

**关键词:** 大白菜; KASP; 反应体系优化

**中图分类号:** S 634.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 12-2442-11

## Optimization and Establishment of KASP Reaction System for Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

YANG Shuangjuan\*, YUAN Yuxiang\*, WEI Xiaochun, WANG Zhiyong, ZHAO Yanyan, YAO Qiuju, and ZHANG Xiaowei\*\*

(Institute of Horticulture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In this study, the KASP (Kompetitive allele specific PCR) reaction system suitable for Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) was established through optimization of three parameters (reaction volume, primer concentration and template DNA amount), which used genomic DNA from Chinese cabbage as template. The optimal KASP reaction system for 96-well plate format was as follows: total volume 8  $\mu\text{L}$ , containing 1  $\mu\text{L}$  template DNA ( $60 - 80 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 4  $\mu\text{L}$  KASP Master mix ( $2\times$ ), 0.14  $\mu\text{L}$  primer assay mix ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and 3  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O. The optimal KASP reaction system for 384-well plate format was as follows: total volume 4  $\mu\text{L}$ , containing 1  $\mu\text{L}$  template DNA ( $60 - 80 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  KASP Master mix ( $2\times$ ), 0.07  $\mu\text{L}$  primer assay mix ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and 1  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O. With the optimal KASP reaction system, high quality results of KASP-SNP genotyping were produced on different Chinese cabbage accessions with different primers, which indicated the stability of the current

**收稿日期:** 2018-07-01; **修回日期:** 2018-12-07

**基金项目:** 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-23-G-16); 农业部黄淮海(河南)蔬菜观测站项目 (10205020); 河南省科技攻关项目 (182102110438); 河南省农业科学院自主创新项目 (2018ZC30)

\* 共同第一作者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xiaowei5737@163.com)

system. The optimized KASP reaction system can be used in genetic study for Chinese cabbage, such as genetic diversity analysis, gene mapping and genetic map construction.

**Keywords:** Chinese cabbage; KASP; reaction system optimization

大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 属于十字花科芸薹属, 起源于中国, 栽培历史悠久, 品种类型丰富多样, 营养价值高, 是中国栽培面积最大的蔬菜作物之一, 在中国蔬菜经济作物中占有重要地位 (于拴仓 等, 2004)。同时, 大白菜是芸薹属禹氏三角 (U's triangle) 的基本种, 遗传变异十分丰富, 是进行基因组进化研究和遗传学研究的良好材料 (Wang & *Brassica rapa* Genome Sequencing Project Consortium, 2011; Cheng et al., 2013, 2016)。

单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) 是动植物基因组中分布最为广泛的 DNA 变异形式, 并且其检测可以实现高通量 (Paux et al., 2012; 郭大龙 等, 2013; 杨润婷 等, 2013; Lou et al., 2017)。因此, SNP 标记被认为是极具应用前景的分子标记技术 (匡猛 等, 2016)。竞争性等位基因特异性 PCR (Kompetitive allele specific PCR, KASP) 是基于引物末端碱基的特异性匹配对 SNP 进行精准的双等位基因判断, 具有准确性高、低成本、高通量等优点, 是目前国际上主流的 SNP 分型方法 (Semagn et al., 2014)。赵勇等 (2016) 比较了直接测序法、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 和 KASP 等 3 种方法对大豆 *Dt1* 基因 4 个 SNP 的分型结果, 发现, 从耗时来看, KASP 最省时, 其次是测序法, CPAS 最耗时; 从成本上来看, KASP 最经济; 认为 KASP 是快速、高效检测大豆 SNP 的方法。Semagn 等 (2014) 比较了 KASP 和 Illumina GoldenGate DNA 芯片技术的优缺点, 发现 KASP 法错误率 (0.7% ~ 1.6%) 远低于 GoldenGate 芯片法 (2.0% ~ 2.4%), 而 KASP 的成本仅仅是芯片法的 7.9% ~ 46.1%, 并且 KASP 比较灵活, 既可以实现少 SNP 位点多样本量的基因分型, 也可以实现较多 SNP 位点少样本量的基因分型。目前, 国外已将 KASP-SNP 分型技术应用于小麦 (Allen et al., 2011; Wu et al., 2018)、大豆 (Shi et al., 2015)、水稻 (Steele et al., 2018)、玉米 (Ertiro et al., 2015) 等作物的遗传图谱构建、基因定位、种质资源分析、分子标记辅助育种、种子纯度鉴定等方面。而国内对 KASP-SNP 分型体系应用的研究报道较少, 只在黄瓜 (Wen et al., 2015)、萝卜 (王庆彪 等, 2017) 和棉花 (匡猛 等, 2016) 等少数作物中有研究报道。

本试验以大白菜 DH (Doubled Haploid) 系 Y177-12 和 Y195-93 基因组 DNA 为模板, 基于荧光定量 PCR 仪, 对影响 KASP-PCR 反应的反应体积、引物浓度和 DNA 模板量等主要因素进行优化, 以期建立适用于大白菜的 KASP 反应体系, 为今后利用 KASP-SNP 分型技术开展大白菜种质资源多样性研究、遗传图谱构建、基因定位和分子标记辅助育种等研究工作提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试大白菜材料共 94 份, 均来自河南省农业科学院园艺研究所。其中 Y177-12 和 Y195-93 用于 KASP 反应体系的优化研究, 两者在种皮颜色、叶面茸毛、花色和抽薹性等方面存在明显差异 (原玉香 等, 2010)。Y177-47、Y635-10、Y510-1 和 Y510-9 等 4 份材料用于验证更多的 KASP-SNP 引物, 31 份材料用于 96 孔模块 KASP 优化反应体系的验证, 57 份材料用于 384 孔模块优化体系的验证。

选用引物 K01 (表 1) 用于 KASP 反应体系的优化。KASP 引物 K01 包括 3 条引物: 两条等位基因特异性正向引物 K01Fa 和 K01Fb, 1 条共同的反向引物 K01R。两条特异性正向引物 3' 末端碱基为 SNP 位点变异碱基 (G 或 A), 5' 端分别加上 FAM 和 HEX 荧光序列标签序列 (表 1 下划线和波浪线部分)。

表 1 KASP 引物名称和序列  
 Table 1 KASP primers used in this study

引物组合 Primer	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
K01	K01Fa	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCATGTTTGGCTAGCCAGG</u>
	K01Fb	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCATGTTTGGCTAGCCAGA</u>
	K01R	ATCGGATCGAACTTAAACCGT
K02	K02Fa	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACCACTTCAATTCATTGATCG</u>
	K02Fb	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACCACTTCAATTCATTGATCC</u>
	K02R	CTGATTCCCTCGTTGGATCTTTTATC
K03	K03Fa	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAAGAGGAAGTGGTGGATAA</u>
	K03Fb	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAAGAGGAAGTGGTGGATAAC</u>
	K03R	GTAAGTTACTTGTCTGGCAAAGTCATC
K04	K04Fa	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGCAGTTTCAGATTTACACAG</u>
	K04Fb	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTGCAGTTTCAGATTTACACAC</u>
	K04R	GCTGATGGGATAAACCCCTTAATG
K05	K05Fa	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAACATATCCAACCTTGGTGC</u>
	K05Fb	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAACATATCCAACCTTGGTGG</u>
	K05R	GCAGCCTACCGTAGCTGCCACTGG
K06	K06Fa	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAATCACATGCGATCTATC</u>
	K06Fb	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAATCACATGCGATCTATG</u>
	K06R	ATAAGTGGATCTAGTTTAGCATCTTAC
K07	K07Fa	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCAGACTCTGTTGTCCGAAAG</u>
	K07Fb	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCAGACTCTGTTGTCCGAAAC</u>
	K07R	TGGTACACTCTCAATCTCATCAAACC
K08	K08Fa	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACCTGCTTCATGGCTCTCTC</u>
	K08Fb	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACCTGCTTCATGGCTCTCTG</u>
	K08R	ACGTGAAGAAACGGAGGAGCAAG
K09	K09Fa	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTTCTCGTCTTCTCCACCAG</u>
	K09Fb	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCTTCTTCTCGTCTTCTCCACCAC</u>
	K09R	TGTAGCAGAAGAGCGTAAAGCTCG
K10	K10Fa	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCATCGACATCACCAGAAGC</u>
	K10Fb	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCATCGACATCACCAGAAGG</u>
	K10R	TGCAATCTCATTCGAAAGGAGCTG
K11	K11Fa	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAGGCAGAAGAAAGAGAGTTTG</u>
	K11Fb	<u>GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAGGCAGAAGAAAGAGAGTTTC</u>
	K11R	GGCAGACTTCAGCAACTGAATAAAC

注: 下划线部分为 FAM 荧光标签序列; 波浪线部分为 HEX 荧光标签序列。

Note: The underlined parts are FAM labeled sequences; The wave line parts are HEX labeled sequences.

## 1.2 基因组 DNA 提取与定量

将 94 份大白菜材料的种子放在培养皿里加水催芽, 待下胚轴长至 1.5 ~ 2.0 cm 高时, 取子叶于 2.0 mL Eppendorf 离心管中, 采用 CTAB 法提取大白菜基因组 DNA (薛银鸽 等, 2012)。用 NanoDrop One (Thermo Scientific 公司) 和 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量和浓度。

## 1.3 KASP 基本反应体系

96 孔模块的 KASP 基本反应体系为 10  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  DNA 模板 ( $60 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 5  $\mu\text{L}$  KASP master mix

(2×), 0.14 μL 引物混合物 (primer assay mix), 4 μL ddH<sub>2</sub>O。384 孔模块的 KASP 基本反应体系为 5 μL: 1 μL DNA 模板 (60 ng · μL<sup>-1</sup>), 2.5 μL KASP master mix (2×), 0.07 μL 引物混合物, 1.5 μL ddH<sub>2</sub>O。由于引物混合物在 KASP 反应体系中所占比例很小, 所以其体积在总反应体系中忽略不计, 以下体系类同。

KASP 引物混合物需要在配制 PCR 反应体系之前预先混匀制备。首先需要将 KASP 引物 K01 的 3 条引物 (K01Fa、K01Fb 和 K01R) 干粉稀释至 100 μmol · μL<sup>-1</sup>, 分别取 12、12 和 30 μL, 最后加 46 μL ddH<sub>2</sub>O, 制备成引物混合物。

#### 1.4 KASP 反应体积优化

针对 96 孔 PCR 模块设置 6、8 和 10 μL 等 3 种反应体积, KASP master mix (2×) 分别为 3、4 和 5 μL, DNA 模板 (ng · μL<sup>-1</sup>) 为 1 μL, 引物混合物 (100 μmol · L<sup>-1</sup>) 均为 0.14 μL, ddH<sub>2</sub>O 分别为 2、3 和 4 μL (表 2), 对 96 孔模块 KASP 反应体系进行优化。

针对 384 孔 PCR 模块设置 3、4 和 5 μL 等 3 种反应体积, KASP master mix (2×) 分别为 1.5、2.0 和 2.5 μL, DNA 模板 (ng · μL<sup>-1</sup>) 为 1 μL, 引物混合物 (100 μmol · L<sup>-1</sup>) 均为 0.07 μL, ddH<sub>2</sub>O 分别为 0.5、1.0 和 1.5 μL (表 2), 对 384 孔模块 KASP 反应体系进行优化。

表 2 KASP 反应体积的设置

Table 2 Parameter settings of KASP reaction volume

成分 Component	96 孔模块/μL 96-well plate format			384 孔模块/μL 384-well plate format		
	DNA (60 ng · μL <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1
KASP Master mix (2×)	3	4	5	1.5	2	2.5
Primer assay mix (100 μmol · L <sup>-1</sup> )	0.14	0.14	0.14	0.07	0.07	0.07
ddH <sub>2</sub> O	2	3	4	0.5	1	1.5
总体积 Total volume	6	8	10	3	4	5

#### 1.5 KASP 引物浓度优化

在 KASP 反应体积优化基础上, 将 K01 的 3 条引物分别稀释成 100、50、25 和 10 μmol · L<sup>-1</sup> 等 4 种引物浓度, 然后按照 1.3 中的方法制备成相应的引物混合物, 分别以 P100、P50、P25 和 P10 作为代号, 对 KASP 反应体系进行优化。

#### 1.6 KASP DNA 模板量优化

在 KASP 反应体积和引物浓度优化基础上, 将大白菜品系 Y177-12 和 Y195-93 的基因组 DNA 稀释成 10、20、60、80、100、150、200 和 400 ng · μL<sup>-1</sup> 等 8 种浓度, 对 KASP 反应体系进行优化。

#### 1.7 KASP-PCR 扩增与检测

KASP-PCR 扩增程序为: 第 1 阶段 94 °C 变性 15 min; 第 2 阶段 94 °C 变性 20 s, 61 °C 退火 60 s, 共 10 个循环 (从第 2 个循环开始, 每个循环降低 0.6 °C); 第 3 个阶段 94 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 60 s, 共 26 个循环; 第 4 阶段 37 °C 1 min。

KASP-PCR 扩增产物用罗氏荧光定量 PCR 仪 LightCycler 480 Instrument II (LC480 II) 进行终点荧光信号读取。利用 LC480 software v1.5.1 分析 SNP 分型结果: 聚合在 X 轴附近的显示蓝色的基因型为连接 FAM 荧光标签序列的等位基因型, 聚合在 Y 轴附近的显示绿色的基因型为连接 HEX 荧

光标序列的等位基因型，中间显示红色的基因型为两种等位基因的杂合型。用两个参数来衡量 KASP-SNP 分型结果，其一是基因型信号点的荧光信号值，荧光信号值越高 KASP-SNP 分型结果越好，其二是两种纯合基因型的夹角，夹角越大 KASP-SNP 分型结果越好。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物 K01 的 KASP-SNP 分型结果

本试验所选用的大白菜材料 Y177-12 和 Y195-93 在基因组某一位置存在 G-A 的 SNP 变异(Yuan et al., 2009),引物 K01 是本研究针对该 SNP 位点设计的 KASP 引物,能够成功将 Y177-12 和 Y195-93 两种基因型区分开来(图 1)。Y177-12 的基因型为 G:G, 5'末端连接 FAM 荧光标签序列的引物竞争性扩增,聚合在 X 轴,信号点为蓝色;Y195-93 的基因型为 A:A, 5'末端连接 HEX 荧光标签序列的引物扩增,聚合在 Y 轴,信号点为绿色。Y177-12 和 Y195-93 信号点的荧光信号值都比较高,两种基因型之间的夹角也比较大,由此认为,引物 K01 对 Y177-12 和 Y195-93 的 KASP-SNP 分型效果较好。

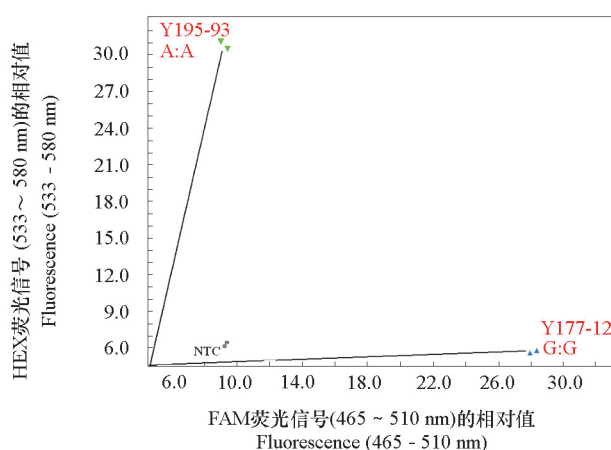


图 1 利用引物 K01 对 Y177-12 和 Y195-93 进行 KASP-SNP 分型 (终点荧光信号散点图)

坐标轴内的每个点代表一个单株,数据点可能存在重叠。

Fig. 1 KASP-SNP genotyping of Y177-12 and Y195-93 by K01 primer (Endpoint fluorescence scatter plot)

These spots within the axis represent different single plant, and data spots might be overlapped.

### 2.2 反应体积对 KASP-SNP 分型的影响

KASP 反应体系中 Master mix 占反应体积的一半,是决定 KASP 反应成本的最主要部分,减少 KASP 反应体积则同时也减少 Master-mix 的用量(表 2),可以大大降低成本。因此,首先比较了不同反应体积对 KASP-SNP 分型的影响,结果表明,反应体积显著影响基因型信号点的荧光信号值。96 孔 PCR 模块设置了 6、8、10  $\mu$ L 等 3 种反应体积,均实现了很好的基因分型,6  $\mu$ L 反应体积下,基因型信号点的荧光信号值显著低于 10  $\mu$ L,8  $\mu$ L 处于另外两者之间(图 2, A)。

综合考虑 KASP-SNP 分型结果以及试验成本,选择 8  $\mu$ L 为 96 孔 PCR 模块的最优反应体积。384 孔 PCR 模块设置的 3、4、5  $\mu$ L 等 3 种反应体积中,3 与 5  $\mu$ L 反应体积的荧光信号值差异较大,

而 4 与 5  $\mu\text{L}$  差异较小 (图 2, B), 综合考虑选择 4  $\mu\text{L}$  为 384 孔 PCR 模块的最优反应体积。

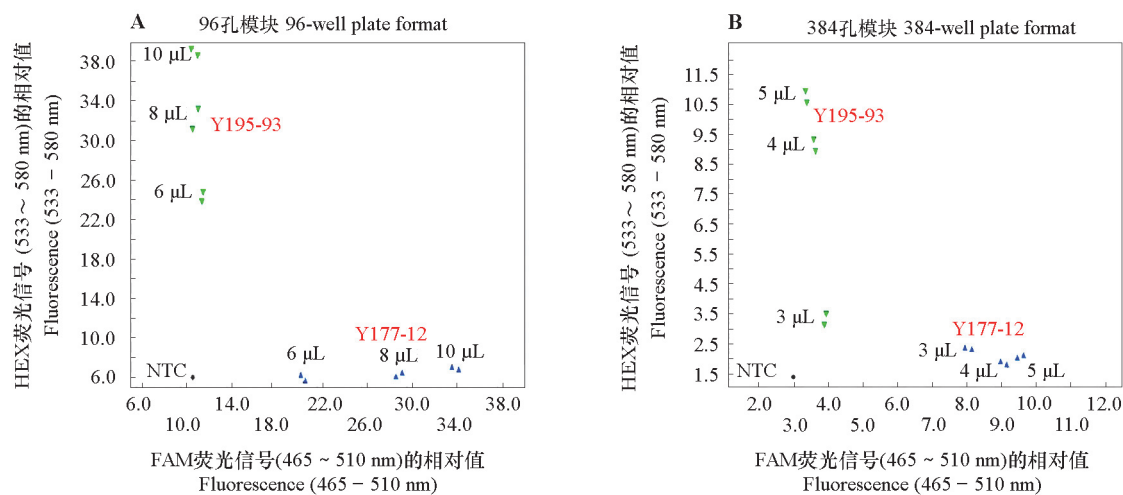


图 2 不同反应体积的 KASP-SNP 分型结果 (终点荧光信号散点图)

Fig. 2 The result of KASP-SNP genotyping with different reaction volumes (Endpoint fluorescence scatter plot)

### 2.3 引物浓度对 KASP-SNP 基因分型的影响

在 KASP 反应体积优化基础上, 比较了不同引物浓度对 KASP-SNP 分型的影响, 结果 (图 3) 表明, 引物浓度显著影响两种纯合基因型之间的夹角。

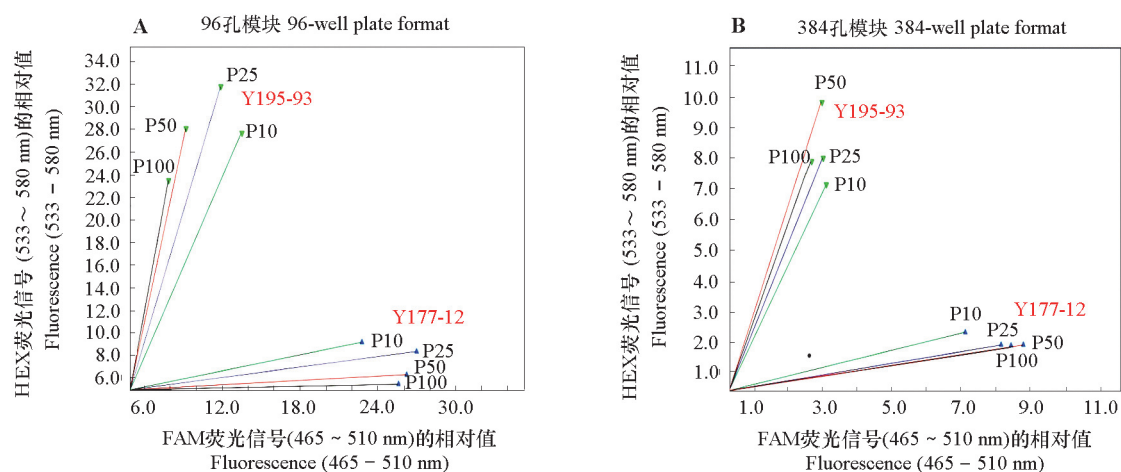


图 3 不同引物浓度的 KASP-SNP 分型结果 (终点荧光信号散点图)

Fig. 3 The result of KASP-SNP genotyping with different primer concentrations (Endpoint fluorescence scatter plot)

96 孔模块中 (图 3, A), 引物浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 (P100), Y177-12 和 Y195-93 两种基因

型信号点之间的夹角为  $76^\circ$  (图 3, A 中两条黑色直线之间的夹角); 引物浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 (P50), 夹角为  $72^\circ$  (图 3, A 中两条红色直线之间的夹角); 为  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 (P25), 夹角为  $63^\circ$  (图 3, A 中两条蓝色直线之间的夹角); 为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时 (P10), 夹角为  $52^\circ$  (图 3, A 中两条绿色直线之间的夹角); 由此可见, 随着引物浓度的降低, 基因型信号点逐渐偏离 X 轴或者 Y 轴, 向中间靠拢, 两种纯合基因型之间的夹角逐渐减小, KASP-SNP 分型效果下降。P25 和 P10 时两种基因型之间的夹角显著低于 P100, 而 P50 和 P100 时两种基因型之间的夹角差异不大, 并且 P50 时 Y177-12 和 Y193-93 信号点的荧光信号值更强, 因此选择  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作为  $8 \mu\text{L}$  反应体积下的最优引物浓度。

在 384 孔模块中 (图 3, B), Y177-12 和 Y195-93 信号点的变化规律与 96 孔 PCR 模块的变化规律基本一致。P100 时, Y177-12 和 Y195-93 两种基因型信号点之间的夹角为  $59^\circ$ ; P50 时, 夹角为  $61^\circ$ ; P25 时, 夹角为  $55^\circ$ ; P10 时, 夹角为  $48^\circ$ 。P50 时, Y177-12 和 Y193-93 信号点的荧光信号值最强, 并且两种纯合基因型之间的夹角最大, KASP-SNP 分型效果最好 (图 3, B)。因此, 选择  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作为  $4 \mu\text{L}$  反应体积下的最优引物浓度。

## 2.4 DNA 模板量对 KASP-SNP 反应结果的影响

在 KASP-PCR 反应体积和引物浓度优化基础之上, 比较了不同 DNA 模板量对 KASP-SNP 分型的影响, 结果 (图 4) 表明, DNA 模板量对 KASP-SNP 分型的影响较小。

96 孔模块中, Y177-12 和 Y195-93 两种基因型在 DNA 模板量为 10 和 20 ng 时的荧光信号值显著低于其他模板量的荧光信号值, 而 60、80、100、150、200 和 400 ng 的荧光信号值则差异不大 (图 4, A), 即当 DNA 模板量增加到 60~80 ng 时, 荧光信号值到达了一个平台期 (图 4, C), 增加速率减慢, 甚至荧光信号逐渐减弱 (例如 Y177-12 基因型 DNA 模板量为 400 ng 的荧光信号比 20 ng 的还弱), 因此选择 60~80 ng 作为最优 DNA 模板量。

384 孔模块中, DNA 模板量的变化对 Y177-12 的影响很小, 各个 DNA 模板量下的荧光信号值差异不大; Y195-93 在 DNA 模板量为 80 ng 时荧光信号最强, 之后随着 DNA 模板量的增加, 荧光信号逐渐减弱 (图 4, B、D)。综合 Y177-12 和 Y195-93 的结果, 选择 60~80 ng 作为最优 DNA 模板量。

## 2.5 KASP-SNP 优化体系稳定性验证

根据以上结果, 确定了适用于大白菜的 KASP 反应体系。96 孔模块的最优反应体系为: 总反应体积为  $8 \mu\text{L}$ , 其中模板 DNA ( $60 \sim 80 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $1 \mu\text{L}$ , KASP Master mix ( $2\times$ )  $4 \mu\text{L}$ , 引物混合物 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.14 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $3 \mu\text{L}$ 。

384 孔模块的最优反应体系为: 总反应体积为  $4 \mu\text{L}$ , 其中模板 DNA ( $60 \sim 80 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $1 \mu\text{L}$ , KASP Master mix ( $2\times$ )  $2 \mu\text{L}$ , 引物混合物 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.07 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $1 \mu\text{L}$ 。

为了验证此反应体系的稳定性, 在 96 孔 PCR 模块下, 利用 4 份大白菜材料筛选出 10 组 KASP-SNP 分型效果较好的引物 (表 1; 图 5, A 和 B), 并利用引物 K04 对 31 份大白菜材料进行了 KASP-SNP 分型, 分型效果较好 (图 5, C); 在 384 孔 PCR 模块下, 利用引物 K01 对 57 份大白菜材料同样获得了较好的 KASP-SNP 分型 (图 5, D), 说明本研究建立的 KASP-SNP 优化体系稳定可靠。

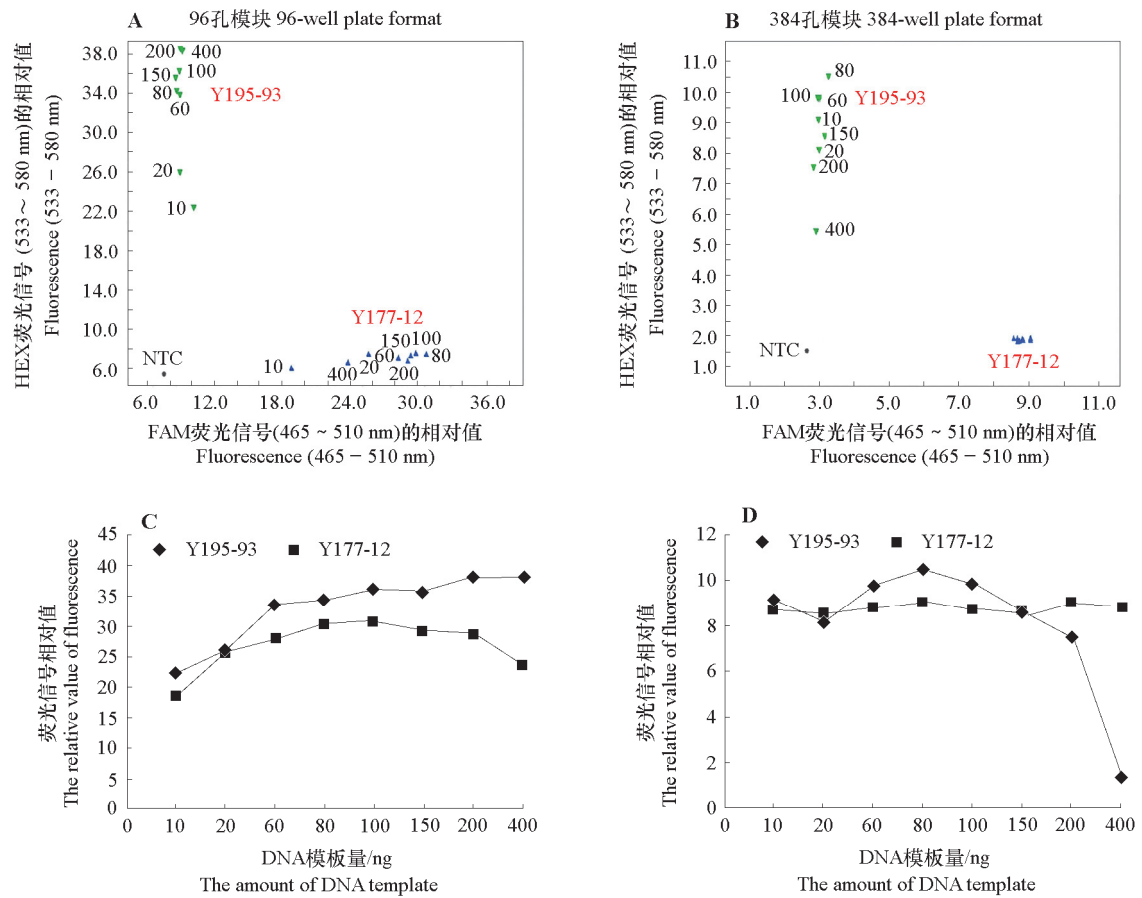
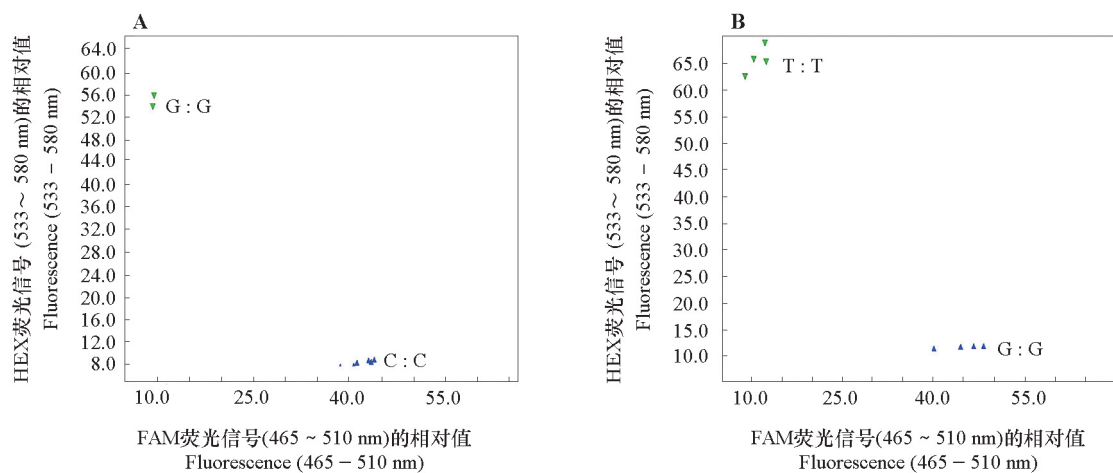


图 4 不同 DNA 模板量的 KASP-SNP 分型结果

Fig. 4 The result of KASP-SNP genotyping with different amount of DNA template





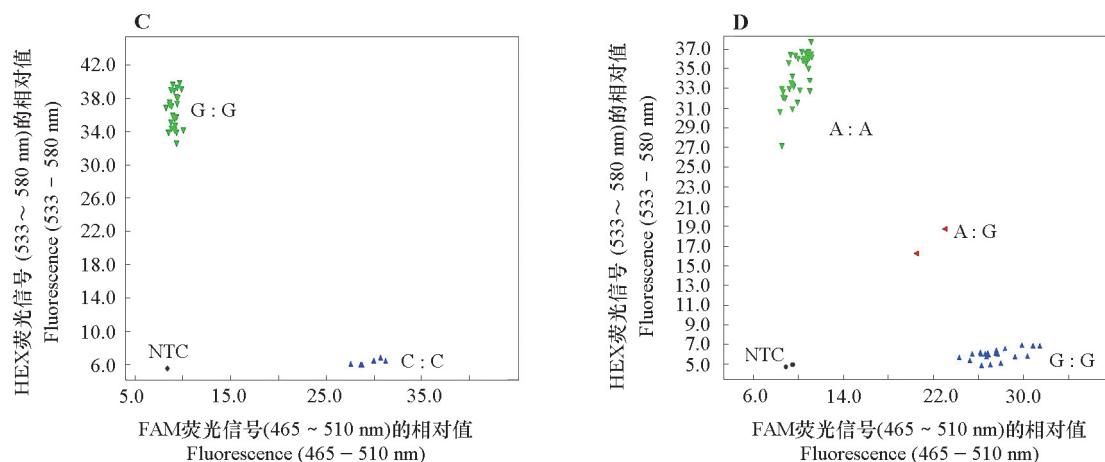


图 5 KASP-SNP 优化反应体系的验证

引物 K02 (A)、K03 (B) 对 4 份大白菜材料 (Y177-47、Y635-10、Y510-1 和 Y510-9, 每份材料两次重复) 在 96 孔模块下的 KASP-SNP 分型结果; 引物 K04 (C) 对 34 份大白菜材料在 96 孔模块下的 KASP-SNP 分型结果; 引物 K01 (D) 对 57 份大白菜材料在 384 孔模块下的 KASP-SNP 分型结果。

Fig. 5 The confirmation of optimal KASP-SNP reaction system

The result of KASP-SNP genotyping of 4 Chinese cabbage lines (Y177-47, Y635-10, Y510-1 and Y510-9, each with two replicates) with primer K02 (A) and K03 (B) in 96-well plate format; The result of KASP-SNP genotyping of 34 Chinese cabbage lines with primer K04 (C) in 96-well plate format; The result of KASP-SNP genotyping of 57 Chinese cabbage lines with primer K01 (D) in 384-well plate format.

### 3 讨论

本研究中首次对 KASP 反应体系进行了优化, 探讨了反应体积、引物浓度和 DNA 模板量对 KASP-SNP 分型结果的影响。结果表明, 引物浓度和反应体积对 KASP-SNP 分型的影响较大, 而 DNA 模板量对其影响较小。

引物浓度会对 PCR 的扩增产生明显影响, 当引物浓度过低时, 引物与模板结合效率低, 不能产生足够的扩增产物; 而引物浓度过高时, 会导致引物二聚体的形成和非特异性扩增, 进而影响靶序列的产量 (梁爽 等, 2012; 徐爽 等, 2012)。在本研究中, 引物浓度为 10 和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的荧光信号值反而没有 25 和 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的荧光信号值高, 说明引物浓度过低和过高都不行, 需要通过试验来确定合适的引物浓度。引物浓度降低时, 基因型信号点逐渐偏离 X 轴或者 Y 轴, 两种纯合基因型的夹角逐渐变小, KASP-SNP 分型效果下降。引物浓度升高时, 两种纯合基因型的夹角变大, 但是基因型信号点的荧光信号值降低, KASP-SNP 分型效果也下降。本研究中反应体积比基本反应体积减少后, 引物浓度会变高, 荧光信号值降低。因此, 反应体积对 KASP-SNP 分型的影响可能主要是通过引物浓度的变化而造成的。

DNA 模板量是保证特异性扩增的前提, DNA 量过少时扩增产物少甚至无扩增条带, 过多时又会降低扩增特异性, 增加非特异性产物。本研究中 10 ~ 400 ng DNA 模板量均能产生较好的 KASP-SNP 分型, 说明大白菜 KASP-PCR 反应对模板 DNA 的浓度敏感度较小, 模板量许可范围较大, 这一结论与 InDel (梁爽 等, 2012)、ISSR (徐爽 等, 2012) 等研究结果相似。

本研究从结果稳定性和经济性出发, 对反应体积、引物浓度和 DNA 模板用量等 3 个参数进行

优化, 最终确定了适用于大白菜的 KASP 反应体系, 并且利用不同的引物在较多的大白菜材料中验证了该优化体系的稳定性。此外, 利用罗氏荧光定量 PCR 仪进行 KASP-PCR 扩增以及分析 SNP 分型结果, 而不是 LGC 公司的 SNPLine 平台, 灵活度高, 大多数实验室都能够实现 KASP 的应用。本研究所建立的大白菜 KASP 反应体系, 将为快速开展大白菜种质资源遗传多样性研究、基因定位、遗传图谱构建等遗传学工作提供技术支持。

## References

- Allen A M, Barker G L, Berry S T, Coghill J A, Gwilliam R, Kirby S, Robinson P, Brenchley R C, D'Amore R, McKenzie N, Waite D, Hall A, Bevan M, Hall N, Edwards K J. 2011. Transcript-specific, single-nucleotide polymorphism discovery and linkage analysis in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 9: 1086 - 1099.
- Cheng F, Mandakova T, Wu J, Xie Q, Lysak M A, Wang X. 2013. Deciphering the diploid ancestral genome of the mesohexaploid *Brassica rapa*. *The Plant Cell*, 25: 1541 - 1554.
- Cheng F, Sun R, Hou X, Zheng H, Zhang F, Zhang Y, Liu B, Liang J, Zhuang M, Liu Y, Liu D, Wang X, Li P, Liu Y, Lin K, Bucher J, Zhang N, Wang Y, Wang H, Deng J, Liao Y, Wei K, Zhang X, Fu L, Hu Y, Liu J, Cai C, Zhang S, Zhang S, Li F, Zhang H, Zhang J, Guo N, Liu Z, Liu J, Sun C, Ma Y, Zhang H, Cui Y, Freeling M R, Borm T, Bonnema G, Wu J, Wang X. 2016. Subgenome parallel selection is associated with morphotype diversification and convergent crop domestication in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Nature Genetics*, 48: 1218 - 1224.
- Ertiro B T, Ogugo V, Worku M, Das B, Olsen M, Labuschagne M, Semagn K. 2015. Comparison of kompetitive allele specific PCR (KASP) and genotyping by sequencing (GBS) for quality control analysis in maize. *BMC Genomics*, 16 (1): 908 - 919.
- Guo Da-long, Li Meng, Zhang Guo-hai, Guo Ming-xiao. 2013. CAPS and TSP analyses of grape SNP markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (11): 2307 - 2315. (in Chinese)
- 郭大龙, 李 猛, 张国海, 郭明晓. 2013. 葡萄 SNP 标记的 CAPS 和 TSP 分析. *园艺学报*, 40 (11): 2307 - 2315.
- Kuang Meng, Wang Yanqin, Zhou Dayun, Ma Lei, Fang Dan, Xu Shuangjiao, Yang Weihua, Wei Shoujun, Ma Zhiying. 2016. High-throughput genotyping assay technology for cotton hybrid purity based on single-copy SNP markers. *Cotton Science*, 28 (3): 227 - 233. (in Chinese)
- 匡 猛, 王延琴, 周大云, 马 磊, 方 丹, 徐双娇, 杨伟华, 魏守军, 马峙英. 2016. 基于单拷贝 SNP 标记的棉花杂交种纯度高通量检测技术. *棉花学报*, 28 (3): 227 - 233.
- Liang Shuang, Yuan Yuxiang, Zhang Xiaowei, Xue Ying, Yao Qiuju, Jiang Wusheng, Tian Baoming, Zhang Qiang, Zhao Yanyan. 2012. Optimization of InDel-PCR reaction system for Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 41 (9): 110 - 113. (in Chinese)
- 梁 爽, 原玉香, 张晓伟, 薛银鸽, 姚秋菊, 蒋武生, 田保明, 张 强, 赵艳艳. 2012. 大白菜 InDel-PCR 反应体系的优化. *河南农业科学*, 41 (9): 110 - 113.
- Lou H, Dong L, Zhang K, Wang D W, Zhao M, Li Y, Rong C, Qin H, Zhang A, Dong Z, Wang D. 2017. High-throughput mining of E-genome-specific SNPs for characterizing *Thinopyrum elongatum* introgressions in common wheat. *Molecular Ecology Resources*, 17: 1318 - 1329.
- Paux E, Sourdille P, Mackay I, Feuillet C. 2012. Sequence-based marker development in wheat: advances and applications to breeding. *Biotechnology Advances*, 30: 1071 - 1088.
- Semagn K, Babu R, Hearne S, and Olsen M. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding*, 33: 1 - 14.
- Shi Z, Liu S, Noe J, Arelli P, Meksem K, Li Z. 2015. SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. *BMC Genomics*, 16: 314 - 325.
- Steele K A, Quinton-Tulloch M J, Amgai R B, Dhakal R, Khatiwada S P, Vyas D, Heine M, Witcombe J R. 2018. Accelerating public sector rice breeding with high-density KASP markers derived from whole genome sequencing of Indica rice. *Molecular Breeding*, 38: 38 - 51.

- Wang Qingbiao, Zhang Li, Wen Changlong, Yang Jingjing. 2017. Development and application of high-throughput SNP markers for Ogura-CMS fertility restorer gene in radish. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (7): 1309 - 1318. (in Chinese)  
王庆彪, 张丽, 温常龙, 杨静静. 2017. 萝卜 Ogura-CMS 育性恢复基因 *Rfo* 的高通量 SNP 标记开发及其应用. *园艺学报*, 44 (7): 1309 - 1318.
- Wang X, *Brassica rapa* Genome Sequencing Project Consortium. 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*, 43: 1035 - 1039.
- Wen C, Mao A, Dong C, Liu H, Yu S, Guo Y, Weng Y, Xu Y. 2015. Fine genetic mapping of target leaf spot resistance gene *cca-3* in cucumber, *Cucumis sativus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 128 (12): 2495 - 2506.
- Wu J, Liu S, Wang Q, Zeng Q, Mu J, Huang S, Yu S, Han D, Kang Z. 2018. Rapid identification of an adult plant stripe rust resistance gene in hexaploid wheat by high-throughput SNP array genotyping of pooled extremes. *Theoretical and Applied Genetics*, 131 (1): 43 - 58.
- Xu Shi, Zhang Yaochuan, Li Shucheng, Yao Tao, Niu Zhengang, Chen Wenli, Bai Sulan. 2012. Establishment and optimization of the ISSR-PCR system for *Ginkgo biloba*. *Letters in Biotechnology*, 23 (1): 80 - 85. (in Chinese)  
徐爽, 张耀川, 李树成, 姚涛, 牛振刚, 陈文俐, 白素兰. 2012. 银杏 ISSR-PCR 扩增反应体系的建立与优化. *生物技术通讯*, 23 (1): 80 - 85.
- Xue Ying, Yuan Yuxiang, Zhang Xiaowei, Dong Sensen, Yao Qiuju, Jiang Wusheng, Tian Baoming, Zhang Qiang, Zhao Yanyan, Wei Xiaochun. 2012. Purity identification of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) hybrid Yuxin No.4 by InDel markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 22 (4): 449 - 456. (in Chinese)  
薛银鸽, 原玉香, 张晓伟, 董森森, 姚秋菊, 蒋武生, 田保明, 张强, 赵艳艳, 魏小春. 2012. 利用 InDel 标记鉴定大白菜杂交种豫新四号种子纯度. *农业生物技术学报*, 22 (4): 449 - 456.
- Yang Run-ting, Wu Bo, Li Chong, Zeng Pei, Zeng Ji-wu, Zhong Yun, Jiang Bo, Zhou Bi-rong, Zhong Guang-yan. 2013. Comparison of Allele-specific PCR and high resolution melting analysis in SNP genotyping and their application in pummelo cultivar identification. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (6): 1061 - 1070. (in Chinese)  
杨润婷, 吴波, 李翀, 曾培, 曾继吾, 钟云, 姜波, 周碧容, 钟广炎. 2013. 两种 SNP 分型方法的比较及其在柚品种鉴定中的应用. *园艺学报*, 40 (6): 1061 - 1070.
- Yu Shuancang, Wang Yongjian, Zheng Xiaoying. 2004. Mapping and analysis QTL controlling agronomic traits related to head in *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 37 (1): 106 - 111. (in Chinese)  
于拴仓, 王永健, 郑晓鹰. 2004. 大白菜叶球相关性状 QTL 定位与分析. *中国农业科学*, 37 (1): 106 - 111.
- Yuan Y X, Wu J, Sun R F, Zhang X W, Xu D H, Bonnema G, Wang X W. 2009. A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa* *FLC1* gene is associated with variation in flowering time. *Journal of Experimental Botany*, 60 (4): 1299 - 1308.
- Yuan Yuxiang, Zhang Xiaowei, Sun Rifei, Wang Xiaowu, Zhang Hui, Jiang Wusheng, Yao Qiuju, Geng Jianfeng. 2010. Construction of a genetic linkage map anchoring to chromosomes of Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 25 (3): 80 - 86. (in Chinese)  
原玉香, 张晓伟, 孙日飞, 王晓武, 张慧, 蒋武生, 姚秋菊, 耿建峰. 2010. 大白菜遗传图谱的构建及与染色体关联分析. *华北农学报*, 25 (3): 80 - 86.
- Zhao Yong, Liu Xiaodong, Zhao Hongkun, Yuan Cuiping, Qi Guangxun, Wang Yumin, Dong Yingshan. 2016. Comparison of methods for SNP genotyping in soybean. *Molecular Plant Breeding*, 15 (9): 3540 - 3546. (in Chinese)  
赵勇, 刘晓冬, 赵洪锟, 袁翠平, 齐广勋, 王玉民, 董英山. 2016. 大豆 SNP 分型方法的比较. *分子植物育种*, 15 (9): 3540 - 3546.