

ARMS-PCR 在水稻米香基因 *Fgr* 检测中的应用

陈晓军,王敬东,殷延勃,马洪文,宋玉霞

(宁夏农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002)

摘要: 根据米香基因的测序结果,设计了4对引物,在0.8%琼脂糖上电泳检测 *Fgr* 基因。结果表明,该方法较好地检测粳稻和籼稻米香基因(*Fgr*),为大规模进行分子标记辅助育种提供有效手段。

关键词: ARMS PCR; *Fgr*; SNP; 香稻

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)增刊-0001-04

The Application of Detection Fragrance Rice *Fgr* with Tetra Primer Amplification Refractory Mutation System PCR

CHEN Xiao-jun, WANG Jing-dong, YIN Yan-bo, MA Hong-wen, SONG Yu-xia

(Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia, Yinchuan 750002, China)

Abstract: *Fgr* gene is a major effect gene that controls fragrance trait in rice. The aim of this study was to establish a tetra primer ARMS PCR method for the detection of *Fgr*. According the sequence of the fragrance rice material, were four primer designed for detection fragrance rice *Fgr* in 0.8% agarose electrophoresis. The result showed that the method was efficient in detection *Fgr* and provided the better method for MAS.

Key words: ARMS PCR; *Fgr*; SNP; Fragrance rice

香稻是一种特种稻,其香味的主要成分是易挥发的有机物质 2-乙酰-1-吡咯啉(2-acetyl-1-pyrroline 2-AP),为白色晶体或结晶粉末,易溶于热水、乙醇、乙醚,但不溶于冷水。香味成份主要分布在种子和叶片中,许多香稻从苗期起就能发出这种香味,尤其在稻花盛开的时候香味更浓^[1-5]。根据国内外学者对水稻香味性状的遗传学研究结果认为,香味是受细胞核隐性基因控制的遗传性状。Bradbury 等对位于8号染色体的米香基因区域的17个基因进行序列测定,发现编码甜菜醛脱氢酶(BADH2)的基因 *Badh2* 在香和非香水稻品种之间有明显区别,其中香稻品种在 *Badh2* 的第7外显子中出现了8 bp 的缺失,结果导致翻译提前终止,产生无功能的截短 BADH2 蛋白。在所有检测的香稻品种中这一8 bp 的缺失都存在。据此,预测 *Badh2* 基因是控制米香性状的基因^[6,7]。进一步研究表明,*Badh2* 共有10个等位基因,其中,第7外显子缺失8 bp 基因型占到79.5%(93/117)^[2]。

选择是育种中最重要的环节之一。利用易于鉴定的遗传标记来辅助选择有助于提高选择效率和降低育种盲目性。育种材料基因型的分子标记是可以识别的,它为实现对基因型的直接选择提供了可能。如果目标基因与某个分子标记紧密连锁,那么通过对分子标记基因型的检测,就能获知目标基因的基因型。对香稻米香基因分子标记的开发大多都是以 SSR-PCR 为基础,银染为主要手段进行的^[8-10]。但是,聚丙烯酰胺凝胶电泳制胶过程繁琐,银染技术环节技术要求较高,这给满足育种需要的大规模基因型检测带来很大困难。

四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术的出现,在很大程度上弥补了上述检测方法的不足。该技术是一种在普通 PCR 基础上发展起来、专门用于检测 SNP 的技术,综合了扩增受阻突变体系(Amplification refractory mutation system, ARMS)和四引物 PCR (Tetraprimer PCR) 技术的优点,对 SNP 检测具有准确、快速、简便、可以区分等位基因是否纯合以及费

收稿日期: 2011-09-20

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(NZ0974); 宁夏回族自治区科技攻关项目(KGZ-16-07-02)

作者简介: 陈晓军(1977-),男,江苏人,硕士,助理研究员,主要从事农作物分子育种研究工作。

通讯作者: 宋玉霞(1963-),女,宁夏人,研究员,主要从事特色野生植物资源利用研究工作。

用低廉等特点^[11]。该技术成功地应用于一些功能基因 SNP 检测,如 BMP1-1B^[12] 和一些致病基因的 SNP 检测当中。

本研究的目的在于建立简便易行、耗时短、结果易于判读、用以检测香稻米香基因(*Fgr*)突变的新方法,以提高测定 *Fgr* 基因型的效率,满足大规模分子育种的需求。

1 材料和方法

1.1 材料

曲阜香稻、03Y-22 香稻、03Y-245 香稻、宁粳 28、日本晴等水稻品种由宁夏农林科学院农作物研究所提供;台湾本地 1 号、9311、春江 06 由中国水稻研究所种质创新组提供。

1.2 生化试剂与分子生物试剂盒

DNA Marker、PCR 扩增试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购于北京天根时代生物公司,试验所用引物均由北京奥科生物技术公司合成,其他化学试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 将上述材料进行水培法培养,取三叶期水稻叶片为试验材料,利用 CTAB 法提取其 DNA^[13]。

1.3.2 引物设计 根据大多数香稻品种在 *Badh2* 基因的第 7 外显子区中出现了一个 8 bp 的缺失,设计了以下 4 对引物进行 ARMS-PCR,如图 1 所示。Out_FP/Out_BP 引物扩增有突变位点存在 1 025 bp 的区域,野生型引物 In_WF 与 Out_BP 引物扩增 743 bp 的片段;突变型引物 In_MB 与 Out_FP 引物扩增 332 bp 的片段,在 AAA 和 TATA 缺少 8 bp。野生型样品与突变型样品在同一管 PCR 反应中表示出长度多态性,达到检测突变的目的。为了确定香稻与非香稻在核苷酸序列上的差别,设计了 Seq_BP 引物进行测序,它与 Out_FP 引物同时扩增 472 bp 的目的片段。

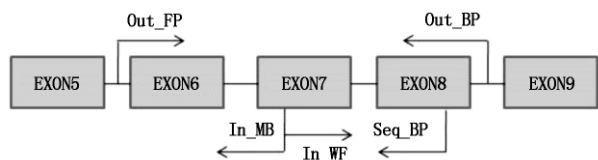


图 1 引物设计示意图

Fig. 1 The primer design

Out_FP: TGTGTGGCATGTCCATGCTGCAAGC

Out_BP: AGTCCTTCCTAACTGCCTTCCTTGCCACG

In_WF: CTGGCAGTTATGAACTGCTAAAAAGATT

In_MB: ACCTTAACCATAGGAGCAGCTGAAATATA

Seq_BP: GAATGATGCTCAAAGTGTCT

1.3.3 香稻与非香稻第 7 外显子测序 选用 Out_FP/Seq_BP 一对引物对香稻品种曲阜香稻、03Y-22 香稻、03Y-245 香稻与非香品种宁粳 28、日本晴进行第 7 外显子的 PCR 扩增,扩增体系为 PCR reaction Buffer(10 ×), 2.5 μL; dNTP(2.5 mmol/L/each), 1.5 μL; *Taq* 酶, 0.5 U; Out_FP/Seq_BP, 10 pmol; DNA 50 ~ 100 ng; 用 ddH₂O 补至 25 μL。反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 40 s, 循环 35 个, 72℃ 最后延长 10 min。PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖电泳, 电压为 8 V/cm。在紫外灯下, 将目的片段切下, 用 DNA 胶回收试剂盒进行纯化, 然后送生物公司测序。

1.3.4 ARMS-PCR 反应体系 选用 Out_FP、Out_BP、In_WF、In_MB 4 条扩增引物, 以香稻品种曲阜香稻、03Y-22 香稻、03Y-245 香稻与非香品种宁粳 28、日本晴为扩增模板, 进行 ARMS-PCR 扩增。扩增体系同上, 将 4 条引物物质的量调整为 0.5 pmol/条, PCR 反应程序 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环 35 个, 72℃ 最后延长 10 min。PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖电泳, 电压为 8 V/cm。紫外灯下拍照。

2 结果与分析

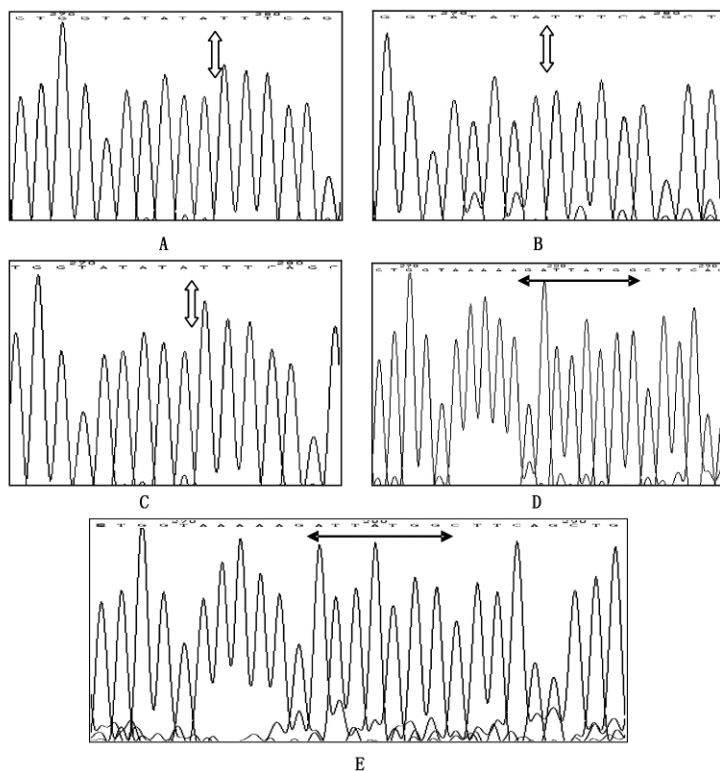
2.1 水稻 *BADH2* 第 7 外显子测序结果

香稻品种曲阜香稻(QF1)、03Y-22 香稻、03Y-245 香稻与非香品种宁粳 28(NG28)、日本晴(NIP)的测序结果(图 2), 序列使用 DNAMAN6.0 生物软件进行序列比对分析(图 3)。

测序和比对结果表明, 香稻品种 QF1、03Y-22、03Y-245 在 *BADH2* 第 7 外显子处存在 GATTATGG 8 bp 缺失; QF1 第 7 外显子与第 8 外显子非表达区域有一个 G-A 的颠换。有趣的是, 香稻品种 QF1、03Y-22、03Y-245 在发生缺失的区域前 4 个碱基均为 TATA, 缺失区域后一碱基为 T, 而非香稻品种 NG28、NIP 此区域前 4 个碱基均为 AAAA, 缺失区域后一碱基为 C。

2.2 ARMS-PCR 结果

在粳稻品种曲阜香稻、3Y-22 香稻、03Y-245 香稻中, 琼脂糖凝胶电泳结果中每个样品同时扩增出 1 017 bp 和 332 bp 目的片段(图 4), 说明存在 *Frg* 基因。在宁粳 28、日本晴等非香品种琼脂糖凝胶电泳结果中每个样品同时扩增出 1 025 bp 和 743 bp 目的片段(图 5), 说明在这些品种中米香基因为野生型。



A. 曲阜香稻; B. 03Y-22; C. 03Y-245; D. 宁粳 28; E. Nipponbare; 香稻类型用空箭头表示。
A. Qufuxiangdao; B. 03Y-22; C. 03Y-245; D. Ningjing 28; E. Nipponbare; The mutation site was demonstrated with an arrow.

图 2 5 个水稻品种 *BADH2* 第 7 外显子多态位点附近测序结果
Fig. 2 The result of sequencing of polymorphic sites in the 7th exon of *BADH2* in five rice varieties

```

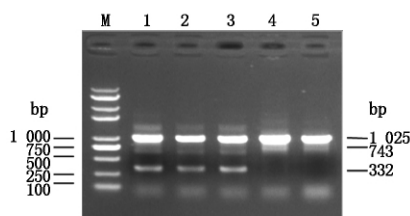
QF1      TTACCAGGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTGTGTAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTG
03Y-22   TTACCAGGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTGTGTAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTG
03Y-245  TTACCAGGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTGTGTAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTG
NG28     TTACCAGGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTGTGTAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTG
NIP      TTACCAGGACTTGTTTGGAGCTTGCTGATGTGTGTAAGAGGTTGGTCTTCCTTCAGGTG
*****
QF1      TGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTTCATCACACCCTG
03Y-22   TGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTTCATCACACCCTG
03Y-245  TGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTTCATCACACCCTG
NG28     TGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTTCATCACACCCTG
NIP      TGCTAAACATAGTGACTGGATTAGGTTCTGAAGCCGGTGCTCCTTTGTTCATCACACCCTG
*****
Qf1      GTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCCTCCTGTAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGAT
03Y-22   GTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCCTCCTGTAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGAT
03Y-245  GTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCCTCCTGTAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGAT
NG28     GTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCCTCCTGTAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGAT
NIP      GTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCCTCCTGTAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGAT
*****
QF1      ATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTCTGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAA
03Y-22   ATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTCTGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAA
03Y-245  ATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTCTGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAA
NG28     ATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTCTGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAA
NIP      ATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTCTGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAA
*****
QF1      CTGGTATATA-----TTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGGTTTGTTCCAAATTTCTG
03Y-22   CTGGTATATA-----TTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGGTTTGTTCCAAATTTCTG
03Y-245  CTGGTATATA-----TTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGGTTTGTTCCAAATTTCTG
NG28     CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGGTTTGTTCCAAATTTCTG
NIP      CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCTATGGTTAAGGTTTGTTCCAAATTTCTG
*****
QF1      TGGATATTTTTTGTTCCTTTCTACTAACTCTCTATTATCAATTCTCAATGTTGTCCTTT
03Y-22   TGGATATTTTTTGTTCCTTTCTACTAACTCTCTATTATCAATTCTCAATGTTGTCCTTT
03Y-245  TGGATATTTTTTGTTCCTTTCTACTAACTCTCTATTATCAATTCTCAATGTTGTCCTTT
NG28     TGGATATTTTTTGTTCCTTTCTACTAACTCTCTATTATCAATTCTCAATGTTGTCCTTT
NIP      TGGATATTTTTTGTTCCTTTCTACTAACTCTCTATTATCAATTCTCAATGTTGTCCTTT
*****
QF1      TCTTTTAACTCCTTTACTTTTAAAAATTGTGATCAAGACACTTTG
03Y-22   TCTTTTAACTCCTTTACTTTTAAAAATTGTGATCAAGACACTTTG
03Y-245  TCTTTTAACTCCTTTACTTTTAAAAATTGTGATCAAGACACTTTG
NG28     TCTTTTAACTCCTTTACTTTTAAAAATTGTGATCAAGACACTTTG
NIP      TCTTTTAACTCCTTTACTTTTAAAAATTGTGATCAAGACACTTTG
*****

```

QF1. 曲阜香稻; NG28. 宁粳 28; NIP. 日本晴。
QF1. Qufuxiangdao; NG28. Ningjing 28; NIP. Nipponbare.

图 3 5 个水稻品种 *BADH2* 第 7 外显子序列比对结果

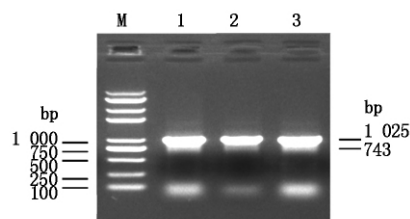
Fig. 3 The BLAST result of sequence of *BADH2* the 7th exon in five rice



M. DNA Marker; 1. 曲阜香稻; 2. 03Y-22 香稻;
3. 03Y-245 香稻; 4. 宁粳 28; 5. 日本晴。
M. DNA Marker; 1. Qufuxiangdao; 2. 03Y-22;
3. 03Y-245; 4. Ningjing 28; 5. Nippobare.

图4 粳稻 ARMS-PCR 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.4 The result of ARMS-PCR electrophoresis
on 0.8% agarose in Japonica rice



M. DNA Marker; 1. 台湾本地 1 号; 2. 9311; 3. 春江 06。
M. DNA Marker; 1. TN1; 2. 9311; 3. Chunjiang06.

图5 籼稻品种的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.5 The result of electrophoresis
on 0.8% agar in indica type rice

在籼稻品种台湾本地 1 号、9311、春江 06 中琼脂糖凝胶电泳结果中每个样品同时扩增出 1 025 bp 和 743 bp 目的片段,说明在这些品种中米香基因为野生型。

由此可见,在粳稻和籼稻品种中香稻与非香品种 ARMS-PCR 存在可识别的多态性,可以标记米香 *Fgr* 基因。

3 讨论

史薇薇^[14]对 34 个香稻品种的 *Badh2* 基因的研究表明,香稻由两种基因型,一类为 *BADH2* 基因第 7 外显子存在 8 个碱基缺失的香稻品种,如苏御糯等;另一类为 *BADH2* 基因第 7 外显子没有 8 个碱基缺失,而第 1 外显子存在 7 个碱基缺失。对于香稻品种,在两个差异位点上,凡是在一个位点上完整的品种,在另一个位点上则发生缺失;而非香品种的序列则都完整。本试验表明所用的香稻材料属于第一类型,且香稻材料突变位点前 4 个碱基为 TATA,突变位点后一个碱基为 T。为什么会发生这样一致的突变以及此突变与香稻香味之间的关联有待于进一步研究。

为了达到定向培育香稻品种,很大程度上依赖于选择,分子标记辅助选择育种为新品种培育提供了有效手段。然而进行高效准确选择就要做水稻育

种材料的基因型检测,同时还需要一定的群体和规模。由于大多数香稻品种在 *Badh2* 基因的编码区中出现了一个 8 bp 的缺失。目前水稻香味基因的基因型检测方法主要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行。聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测只有一个碱基的差异。但是,聚丙烯酰胺凝胶电泳制胶过程繁琐,银染技术环节技术要求较高,这给进行育种这样大规模基因型检测带来很大困难。本试验所用方法能在普通琼脂糖上进行米香基因的检测,同时能检测出纯合体、杂合体;前人利用此技术进行 SNP 检测一个碱基的突变^[12]。本试验表明,引物设计合理,亦可检测 8 bp 的突变,本方法具有简单、快速、技术要求较低、结果鉴定准确的特点。

参考文献:

- [1] Chen S, Yang Y, Shi W. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance [J]. *The Plant Cell* 2008, 20: 1850 - 1861.
- [2] Kovach M J, Calingwion M N, Fitzgerald M A, et al. The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(34): 14444 - 14449.
- [3] Grimm C C, Bergman C, Delgado J T, et al. Screening for 2-acetyl-1-pyrroline in the headspace of rice using SPME/GC-MS [J]. *J Agric Food Chem* 2001, 49: 245 - 249.
- [4] Jezussek M, Juliano B O, Schieberle P. Comparison of key aroma compounds in cooked brown rice varieties based on aroma extract dilution analyses [J]. *J Agric Food Chem* 2002, 50: 1101 - 1105.
- [5] Mahatheeranont S, Keawsa-ard S, Dumri K. Quantification of the rice aroma compound, 2-acetyl-1-pyrroline, in uncooked Khao Dawk Mali 105 brown rice [J]. *J Agric Food Chem* 2001, 49: 773 - 779.
- [6] Bradbury L M T, Fitzgerald T L, Heney R J. The gene for fragrance in rice [J]. *Plant Biotechnology Journal* 2005, 3: 363 - 370.
- [7] Bradbury L M T, Gillies S A, Brushett D J, et al. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice [J]. *Plant Mol Biol* 2008, 68: 439 - 449.
- [8] Garland S, Lewin L, Blakeney A, et al. PCR-based molecular markers for the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet* 2000, 101: 364 - 371.
- [9] 王丰, 李金华, 柳武革, 等. 一种水稻香味基因功能标记的开发 [J]. *中国水稻科学* 2008(4): 347 - 352.
- [10] Shi W, Yang Y, Chen S, et al. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties [J]. *Mol Breeding* 2008, 22: 185 - 192.
- [11] Ye S, Dhillon S, Ke X, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms [J]. *Nucleic Acids Research* 2001, 29(17): e88.
- [12] 管峰, 杨利国, 艾君涛, 等. 四引物扩增受阻突变体系 PCR 快速测定绵羊 BMPR-1B 基因型方法的建立 [J]. *遗传* 2005, 27(04): 579 - 583.
- [13] 孙川, 陈刚, 饶玉春, 等. 水稻基因组 DNA 简易制备方法 [J]. *中国水稻科学* 2010, 24(6): 677 - 680.
- [14] 史薇薇. 水稻米香基因标签标记的开发与利用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2007.