

## 采用 ASPCR 技术检测抗药性雨久花 ALS 突变基因 碱基种类的探讨

吴明根<sup>1</sup>, 金万赫<sup>2</sup>, 许勇男<sup>3</sup>

(1. 延边大学农学院, 延吉 133000; 2. 延边州农委, 延吉 133000; 3. 延吉市农业局, 延吉 133000)

**摘要:** 等位基因特异性扩增 (Allele-specific PCR 简称:ASPCR) 技术是一项快速、简便、低成本的检测等位基因单核苷酸多态性的新方法。作者针对雨久花感抗磺酰脲类生态型 ALS 基因编码区第 592 位碱基密码 (ALS 氨基酸第 197 位) 特征, 采用在引物 3' 末端设有胸腺嘧啶核苷酸 (感性) 或鸟嘌呤 (抗性) 核苷酸的 2 种引物, 对延边稻田发生的雨久花感抗磺酰脲类生态型 ALS 基因编码区第 592 位进行了 ASPCR。检测结果显示, 当以引物 3' 末端设有胸腺嘧啶引物时, 感性类型出现 ASPCR 扩增带, 而抗性类型无带出现, 反之抗性类型有带而感性类型无带, 检测到延边稻田发生的抗磺酰脲类雨久花生态型的 ALS 197 位点的脯氨酸被组氨酸替代, 证明了该方法的有效性和可靠性。

**关键词:** 等位基因特异性扩增; 雨久花; 乙酰乳酸合成酶基因; 抗药性; 检测

中图分类号: S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)02-0296-03

### Development of allele-specific PCR for detection of herbicide-resistance in *Monochoria korsakowii* Regel et Maack

WU Ming-gen<sup>1</sup>, JIN Wan-he<sup>2</sup>, XU Yong-nan<sup>3</sup>

(1. Agricultural College, Yanbian University, Yanji 133000; 2. Agricultural Office of Yanbian, Yanji 133000;

3. Agricultural Bureau of Yanji, Yanji 133000)

**Abstract:** Allele-specific PCR is a rapid, simple, and low-cost method for single-nucleotide polymorphism identification. Using this technique, a single-nucleotide polymorphism primer marker of thymine(susceptible) or guanine(resistant) at the 3' end on 592 point of ALS(acetolactate synthetase) gene encoding site (197 point of ALS amino acid) was designed to detect the herbicide-resistant type of *Monochoria korsakowii* Regel et Maack in Yanbian region. The result shows that susceptibility primer marker can be used to detect the susceptibility biotype; otherwise can be detected resistant biotype; the cause of resistance to sulfonylurea herbicide type can be induced by substitution of Pro<sub>197</sub> to histidine. It proved that the technique was efficient and feasible to detect ALS gene of herbicide-resistant type.

**Key words:** Allele-specific PCR; *Monochoria korsakowii* Regel et Maack; ALS gene; herbicide-resistance; detection

田间抗药性普查结果, 雨久花、慈姑、蔗草、牛毛毡、狼把草等已突变为抗磺酰脲类除草剂生态型<sup>[1-2]</sup>。在防控抗药性杂草技术体系中, 准确、快速、简易鉴别抗药性生态型是关键问题。常规杂草 ALS 基因抗药性突变位点检测, 一般采用技术难度较大的 RT-PCR、RACE-PCR 等方法测序抗、感不同生

生态型近 3 000 bp 碱基排序特征<sup>[3]</sup>。实际杂草 ALS 氨基酸抗性突变位点大约 5~6 处, 且一般第 1 位或第 2 位碱基易发生抗性替换。

ASPCR 技术是一项在 PCR 基础上发展起来的一种快速、简便、低成本、高通量的检测基因单核苷酸多态性的方法<sup>[4]</sup>, 通过 PCR 和凝胶电泳即可检

测出 DNA 中各种点碱基突变的信息特征。其引物设计原理为等位基因特异性碱基位于引物的 3'端。这种设计是基于耐热 *Taq* DNA 聚合酶缺乏 3'→5'外切校正活性的特点, 引物 3'端的特异碱基分别互补于野生型和突变型等位基因的相对碱基, 若此碱基对形成错配, 链延伸反应就会因 3',5'-磷酸二酯键形成障碍而受阻。其扩增结果为: “野生”模板阻碍, “突变”引物放大; 或“突变”模板阻碍, “野生”引物放大。

对此, 作者为了探讨 ASPCR 和 SCAR(sequence characterize amplified region) 分子标记技术在鉴别杂草 ALS 感抗药不同生态型等位基因单碱基突变类型的可行性, 以雨久花 ALS 普遍导致抗性突变的 197 位点为引物 3'端, 进行了 ASPCR 检测。

表 1 不同来源雨久花感抗型 ALS 基因编码区 592 位点区域碱基排序

Table 1 The nucleotide sequencing of section of the ALS gene encoding 592 point in susceptible and resistant biotypes of *M.korsakowii*.

感抗来源 Origin	雨久花感抗型 ALS 基因编码区 592 位点区域碱基排序														
	The nucleotide sequencing of ALS gene encoding 592 point in susceptible and resistant types														
	573					592					612				
野生型 (柳河) Wild type	gcc	atc	acc	ggc	cag	gtc	cct	cgc	cgc	atg	atc	ggc	act	g	
抗药型 (柳河) Resistant type	gcc	atc	acc	ggc	cag	gtc	cat	cgc	cgc	atg	atc	ggc	act	g	

表 2 雨久花 ALS 基因 ASPCR 特异引物组合

Table 2 The ASPCR specific primers of ALS gene of *M.korsakowii*.

引物 Primer No.	上游引物碱基排序(无突变位点保守序列) Nucleotide sequencing of upstream primer (conserved sequence without mutation)	下游引物碱基排序(3'末端含 592 位突变位点) Nucleotide sequencing of downstream primer (containing mutation site in the 592 point at 3' end)	突变类型 Type of mutation
1	5'tcgtggaggccctggagagg 3'	5'agtgccgatcatcggcgag 3'	抗性 Resistant
2	5'tcgtggaggccctggagagg 3'	5'agtgccgatcatcggcgag 3'	感性 Susceptive
引物 Primer No.	下游引物碱基排序(无突变位点保守序列) Nucleotide sequencing of downstream primer (conserved sequence without mutation)	上游引物碱基排序(3'突变位点) Nucleotide sequencing of upstream primer (3' mutation site)	突变类型 Type of mutation
3	5'cc(t/g)gtcac(c/g)cgatcatc(g/a)aa 3'	5'gccatcaccggccaggtccc 3'	感性 Susceptive

### 1.3 ASPCR 反应体系

采用 CTAB 法提取总 DNA, Buffer、dNTPs、*Taq* 酶等试剂由东洋纺公司提供, 反应体系为: Buffer (2.0  $\mu\text{L}$ )、cDNA (1.0  $\mu\text{L}$ )、Ap1 (10  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1.0  $\mu\text{L}$ )、Ap2 (10  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1.0  $\mu\text{L}$ )、dNTPs (4.0  $\mu\text{L}$ )、*Taq* (0.5  $\mu\text{L}$ )、ddH<sub>2</sub>O (10.5  $\mu\text{L}$ )。扩增在 WD9402-A 型 PCR 仪上进行, 扩增程序为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$  7 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min; 66 $^{\circ}\text{C}$  1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min; 共 35 个循环。

## 2 结果与分析

以抗性雨久花 ALS 197 突变位点的 (脯氨酸被

## 1 材料与方法

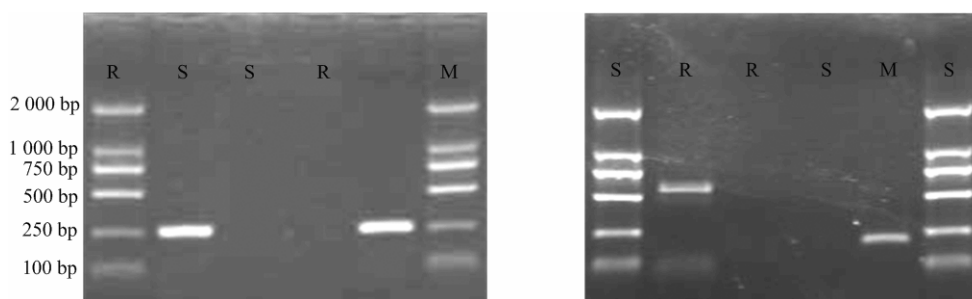
### 1.1 供试植物

雨久花 (*Monochoria korsakowii* Regel et Maack.) 抗性材料采自多年连续使用苄嘧磺隆、吡嘧磺隆的延边地区稻田, 敏感性采自野外池塘。

### 1.2 ASPCR 特异引物设计与组合

ASPCR 特异引物由上海生工公司合成。ASPCR 特异引物根据 (NCBI) 提供的 100 多种植物 ALS 编码信息和吉林柳河雨久花 ALS 基因突变位点碱基信息<sup>[5]</sup>设计 ASPCR 专用的 SCAR 标记 (表 1 和表 2)。

组氨酸替代) 碱基序列作为下游引物 3'端, 通过 1 号引物组合对其进行 ASPCR 标记结果 (见图 1 左) 抗药性生态型雨久花约在 250 bp 大小出扩增带, 表现出显性反应, 感性生态型无扩增带。同样以感性雨久花 ALS 197 突变位点的脯氨酸碱基序列作为上或下游引物 3'端, 通过 3 号和 2 号引物组合对其进行 ASPCR 标记结果 (见图 1 中), 感性生态型雨久花在 550 bp (3 号引物) 和 250 bp (2 号引物) 左右有扩增带, 而抗性生态型无扩增带。



左图: 1号引物组, 右图: 3号引物组(左侧)和2号引物组(右侧); M: DNA分子质量标准; R: 抗药性; S: 感药性  
Left: No.1 primer; Right: No.3(Left side) and No.2 primers(Right side); M: DNA Marker; R: Resistant biotype; S: Susceptive biotype.

图1 感抗型雨久花ALS 197位点ASPCR分子标记

Figure 1 ASPCR maker of ALS genes in herbicide resistant and susceptible biotypes of *M.korsakowii*.

通过以上的 ASPCR 分子标记, 认为延边地区收集的感抗不同生态型 ALS 在 197 位点氨基酸(感性为脯氨酸)的碱基密码发生了替换突变, 氨基酸替代类型至少一种是由脯氨酸被组氨酸替代。

### 3 讨论

国内外研究结果, 杂草 ALS 基因抗性突变具有特定突变区域和特定突变位点<sup>[6-7]</sup>。通过多种抗药性杂草 ALS 基因图谱不难看出, 目前常发生抗性突变的 5 个位点(如: 第 122 位 Ala, 197 位 Pro, 205 位 Ala, 574 位 Trp 和 653 位 Ser) 均都是其保守区域。某种杂草的抗药性突变强度、交叉抗药性范围等量化性状与突变部位、突变点数量、被取代的氨基酸种类也有相关性。

常规杂草 ALS 基因抗药性突变位点检测, 目前一般采用 RT-PCR、RACE-PCR 等方法通过 DNA 片段扩增、克隆和碱基测序过程完成。本试验采用 ASPCR 技术对雨久花 ALS 感抗磺酰脲类生态型的 197 位突变点分子标记鉴定结果, 抗磺酰脲类突变是由感性 ALS 197 位点的脯氨酸被其它氨基酸替代所致; 当脯氨酸碱基密码 cct(第 3 位是兼并密码: a/g/c/t) 的第 2 位碱基 c 设为下游引物 3'端时, 能扩增出感性 DNA 片段; 当第二位碱基 c 改为组氨酸密码的碱基 a 时, 可扩增出抗性 DNA 片段。从扩增 DNA 片段的大小分析, 当 1 号和 2 号引物组设计扩增范围为 280 bp、3 号引物组为 540 bp, 实际扩增的大小虽有差异, 但差异不大。如果雨久花的 ALS 基因像水稻<sup>[8]</sup>、播娘蒿<sup>[9]</sup>一样不含内含子或扩增区域内无内含子片段, 可以证明本试验的扩增分子标记片段与实验设计是吻合的。

本试验证明, ASPCR 技术在检测杂草 ALS 基因单碱基抗药性突变类型上与常规 RT-PCR、

RACE-PCR 技术相比, 具有快速、简便、低成本等特点, 但局限于已知待测碱基位点信息及部分基因保守区碱基排序的基础上。同时, 对于异花授粉植物的杂合型等位基因检测时, 抗性生态型出现感抗引物均有扩增带的现象(未发表), 需采取改良 ASPCR 技术的巢式 PCR 方法<sup>[4]</sup>方可区分杂合与纯合性等位基因的单核苷酸种类。

### 参考文献:

- [1] 吴明根, 曹凤秋, 刘亮. 磺酰脲类除草剂对抗感性雨久花乙酰乳酸合成酶活性的影响[J]. 植物保护学报, 2007, 34(5): 545-548.
- [2] 吴明根, 吴松权, 朴仁哲. 磺酰脲类除草剂对抗、感药性慈姑 ALS 活性的影响[J]. 农药, 2007, 46(10): 701-703.
- [3] 吴明根, 郑承志, 李昕珈. 抗苯磺隆慈姑 ALS 基因突变位点[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 222-224.
- [4] 陈吉宝, 景蕊莲, 员海燕, 等. 等位基因特异技术的研究与应用[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(4): 469-473.
- [5] 卢宗志, 张朝贤, 李贵军. 雨久花对磺酰脲类除草剂的抗药性机理[C]//第九届全国杂草科学大会论文集. 西宁, 2009, 7: 116-117.
- [6] Tranel P J, Wright T R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned?[J]. Weed Science, 2002, 50(4): 700-712.
- [7] Tranel P J, Wright T R, Heap I M. ALS mutations from herbicide-resistant weeds[J/OL]. Online Internet, 2007, 12, January, Available <http://www.weedscience.com>.
- [8] 宋贵生, 冯德江, 魏晓丽, 等. 水稻乙酰乳酸合成酶基因的克隆和功能分析[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(3): 66-72.
- [9] 金海兰, 卢宗志, 隋标峰, 等. 197 位脯氨酸突变导致播娘蒿对苯磺隆产生抗药性[C]//第九届全国杂草科学大会论文集. 西宁, 2009, 7: 113-114.