

One tube nested-PCR 在 SNP 基因型分型中的应用

张羽¹, 张晓娟¹, 王胜宝², 宋晓利¹, 李小刚²

(1.陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2.陕西省农业科学研究所, 陕西 汉中 723000)

摘要: nested-PCR 是一种在普通 PCR 基础上发展起来的专门用于检测单核苷酸多态性(SNP)的技术。结合 nested-PCR 技术在水稻中检测 SNP 的研究, 以 1 个水稻香味基因 *Fgr* 和 3 个稻瘟病基因 *Pi-ta*、*Pi9*、*Pigm* 为例, 把 nested-PCR 的 4 条引物同时加在一管 PCR 反应中进行扩增, 在其序列内针对 SNP 位点设计功能标记, 用来扩增含有突变位点的 DNA 片段。通过优化引物浓度梯度和改良反应程序, 达到了一步快速检测 SNP 基因型的目的。

关键词: nested-PCR; 单核苷酸多态性; 基因型分型

中图分类号: Q789 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2015)02-0136-07

Application of one tube nested-PCR on genotyping of SNP

Zhang Yu¹, Zhang Xiaojuan¹, Wang Shengbao², Song Xiaoli¹, Li Xiaogang²

(1.School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000, China; 2.Hanzhong Institute of Agricultural Sciences, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

Abstract: Based on common PCR, nested-PCR technology was developed to specially detect single nucleotide polymorphism (SNP). In this study, one tube nested-PCR technique was adopted to explore SNPs in four structural genes of rice, there were *Fgr*, a rice aroma gene and *Pi-ta*, *Pi9* and *Pigm*, three rice blast resistance genes. Primers with effectively marked at targeting SNP sites were designed and four primers were mixed in one tube to amplify DNA fragments harboring mutation sites. In addition, reaction conditions including primer concentration and PCR program were optimized to identify different SNP genotypes in one step. Therefore, the one tube nested-PCR provided a feasible and efficient strategy to analyze SNP genotypes.

Keywords: nested-PCR; single nucleotide polymorphism (SNP); genotyping

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)主要是指由于基因组核苷酸水平上的单碱基的转换、颠换以及单碱基的插入或缺失变异引起的 DNA 序列多态性, 是许多物种基因组中最常见的变异形式, 在基因组中的分布频率很高。SNP 在人类^[1]、老鼠^[2]、拟南芥^[3]、大麦^[4-5]、大豆^[6]、甜瓜^[7]、玉米^[8] 和水稻^[9-12] 等多个物种中的高密度分布已有报道。作为第 3 代分子标记的 SNP, 在基因组中数量多, 分布密度高, 特别是由于其不需要根据片段大小将 DNA 分型, 因此, 可以用高通量基因芯片技术自动化完成基因分型。目前, 检测

SNP 的方法有很多种, 但有的需要昂贵的设备及试剂; 有的检测过程繁琐, 适合于普通实验室检测的不多。传统的 nested-PCR(巢式 PCR)是一种 PCR 改良模式, 它由 2 轮 PCR 扩增和 2 套引物对组成。首先利用外引物对 DNA 进行第 1 轮扩增, 然后以第 1 次 PCR 反应的产物作为模板进行第 2 轮扩增, 第 2 次 PCR 引物与第 1 次反应产物的序列互补, 第 2 次 PCR 产物即为目的基因^[13-16]。其优点在于: 如果第一次扩增产生了错误片断, 那么, 第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的几率是很低的, 因此, 巢式 PCR 的扩增特异性强, 且传统的巢式

PCR 需要进行 2 轮 PCR。本研究中利用 one tube nested-PCR 方法,把 nested-PCR 的 4 条引物同时加在 1 管 PCR 反应中进行扩增,通过引物设计、引物浓度梯度优化及反应程序改良,达到一步快速检测 SNP 基因型的目的。本研究中以 1 个水稻香味基因 *Fgr* 和 3 个稻瘟病基因 *Pi-ta*、*Pi9*、*Pigm* 为例,探索了 one tube nested-PCR 技术的引物设计原理和反应条件,旨在为生物的 SNP 基因分型研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

以宜香 A 为香稻品种对照材料,黄花占为非香稻品种对照材料。*Pi-ta* 的抗病对照材料为 Tetep,感病对照材料为 Nipponbare。*Pi9* 基因抗病对照材料为 WHD75-1-127,感病对照材料为 93-11。*Pigm* 基因抗病对照材料为谷梅 4,感病对照材料为 Nipponbare^[17]。以上材料均由陕西省水稻研究所和国家水稻种质资源中期库提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

通过 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) GenBank 登录号找出所研究基因的核苷酸序列及 Nipponbare 和 93-11 中对应的染色体序列,编号为 AP004463。BAC 克隆得到水稻非香型基因的核苷酸序列,香型基因核苷酸序列来自文献[18]的报道。GenBank 登录号为 AF207842 和 AY196754 的 BAC 克隆得到编码稻瘟病基因 *Pi-ta* 的基因序列; GenBank 登录号为 DQ285630.1 的 BAC 克隆得到 *Pi9* 基因序列; GenBank 登录号为 AP005930.3 的 BAC 克隆得到 Nipponbare 的 6 号染色体序列; GenBank 登录号为 AAAA02018909 的 BAC 克隆得到 93-11 的 6 号染色体序列。

同一基因的不同基因型个体进行同源序列比对,根据序列差异设计引物。在设计引物时,3'端落在发生 SNP 的位置,由于 *Taq* 酶缺乏 3'→5'外切酶的活性,因此,如果 3'末端的碱基和模板不互补,特异性扩增条带就会因为延伸速度低于正常末端碱基配对引物的延伸速度而不出现,表明模板 DNA 与引物 3'末端没有相应的突变;反之,则表明模板

DNA 上存在与引物 3'末端相应的突变碱基。如图 1 所示,将特异引物(P2 和 P3)的 3'端落在发生 SNP 的位点上,如果设计 P2 的 3'端和野生型互补,那么 P3 的 3'端就设计成和突变型互补。如图 2 所示,2 条特异性条带(P1P3 和 P2P4)和对照带(P1P4)都出现的个体为杂合体,只出现 1 条特异性条带和对照带的为纯合体。

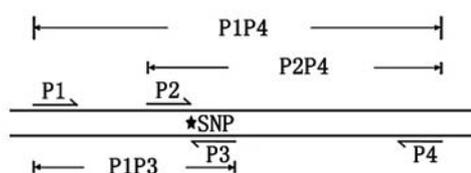


图 1 PCR 4 条引物的位置

Fig.1 Relative positions of four primers for PCR

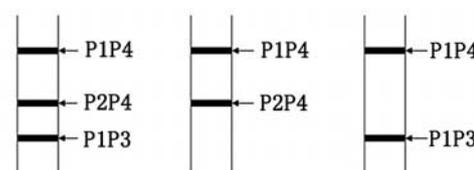


图 2 PCR 扩增电泳结果示意图

Fig.2 Schematic of PCR products on electrophoresis

1.2.2 基因组 DNA 提取及 PCR

用 SDS 法提取水稻基因组 DNA。用 0.8%的琼脂糖凝胶检测水稻基因组 DNA。

PCR 反应体系为: 2×*Taq* MasterMix 15 uL, 水稻基因组 DNA 1 μL, 内外引物比 5 : 1, 反应总体积 30 μL。

反应程序为: 94.0 °C 预变性 3.5 min, 94.0 °C 变性 30 s, 4 条引物中 T_m 最高值增加 5 °C 开始降温, 每个循环降低 1 °C, 退火 1 min, 72.0 °C 延伸 45 s, 15 个循环。94 °C 变性 30 s, T_m 最低值降低 5 °C, 退火 30 s, 72.0 °C 延伸 30 s, 20 个循环, 最后 72.0 °C 延伸 7 min。

用 2%~3%的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 用 BioRad 凝胶成像仪拍照, 或用 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 产物, 用银染法显色拍照。

2 结果与分析

2.1 引物信息

用来扩增 4 个结构基因的引物序列如表 1 所示。

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

基因	P1(5' 3')	P2(5' 3')	P3(3' 5')	P4(3' 5')
<i>Fgr</i>	ATTAGGTTCTGAAGCCGGTG	CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA	ATATAAAGTCGACGAGGATAC	CAGGATATCACCACAAACTA
<i>Pi-ta</i>	TGGTGCTGAAGGGAGAGACT	CCGTGGCTTCTATCTTTACCTG	AGATACGTAGAAGTTGGACTGAAC	GGCATCTTACAACCGGGATT
<i>Pi9</i>	ACACCAAGCAGGCTGTGTGTC	AGGCTTGAACCTGTCTGGTA	GACGAAGTACCTAGTCCTCG	GGCATCTTACAACCGGGATT
<i>Pigm</i>	GCCGCCATATAACTGCCGGT	AACAACACTTCTCTCACA	CTTAAGCTGATTTGAGCTTT	CAGTGCTTAGATTAACATG

2.2 发生 SNP 的位置及内外引物的位置

图 3、图 4、图 5、图 6 中方框所示为发生 SNP 的位置，下划线处为 4 条引物所在位置。从图 3 可以看出，非香稻和香稻基因核苷酸序列同源性比

对，发生了 3 个 SNP(A→T, A→T, C→T)和 8 个 Indel。如果设计的特异引物序列包含了这 11 个突变，那么扩增特异性将非常强。

Non-Fragrant	GCTAAACATA	GTGACTGGAT	TAGGTTCTGA	AGCCGGTCT	CCTTGTGCAT	CACACCCTGG	6120
Fragrant	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Non-Fragrant	TGTAGACAAG	GTACAGCTAT	TCCTCTGTGA	ATCATGTATA	CCCCATCAAT	GAAATGATA	6180
Fragrant	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Non-Fragrant	TTCTCTCAA	TACATGGTTT	ATGTTTCTG	TTAGGTTGCA	TTACTGGGA	GTTATGAAAC	6240
Fragrant	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Non-Fragrant	<u>TGGTAAAAAG</u>	<u>ATTATGGCTT</u>	<u>CAGCTGCTCC</u>	<u>TATGGTTAAG</u>	GTTTGTTC	AAATTTCTGT	6300
Fragrant	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Non-Fragrant	GGATATTTT	TGTCTCTTT	CTACTAACTC	TCTATTATCA	ATTCTCAATG	TGTCTCTTT	6360
Fragrant	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Non-Fragrant	CTTTAACTC	CTTACTTTT	TAGAATTGTG	ATCAAGACAC	TTGAGCATC	ATTCTAGTAG	6420
Fragrant	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Non-Fragrant	CCAGTTCTAT	CCTGTTTCTT	ACCTTTTAT	GGTTCGICTT	TTCTTGACAG	CCTGTTTCAC	6480
Fragrant	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Non-Fragrant	TGGAACTTG	TGGAAAAAGT	CCTATAGTGG	TGTTGATGA	TGTTGATGT	GAAAAAGTA	6540
Fragrant	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

图 3 非香稻和香稻 *Fgr* 基因结构部分核苷酸序列的同源性比对结果

Fig. 3 Results of homology alignment on partial *Fgr* sequences of fragrant and non-fragrant strains

图 4 为抗病材料和感病材料 *Pi-ta* 基因核苷酸序列的比对结果。本研究中发生了 1 个 SNP(G→T)。依照 Bryan 等^[19]的研究结果，由于发生了 1 个

SNP(G→T)，导致抗感基因的编码产物由抗病产物的丙氨酸(GCT)变异为感病产物的丝氨酸(TCT)。

Resistant	TGGTGATT	GGATCTTGG	TGCTGAAGGG	AGAGACTTGG	ATGAAGATT	GGCACAACAA	6540
Susceptible	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Resistant	GATGATCAG	GGTATGGTAA	TTTCATTCTA	TTCCAGGTT	ACAACCTTACA	AGGATTATTG	6600
Susceptible	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Resistant	AGCTTCTTC	TTTCTCTGCC	GTGGCTCTA	TCTTTACCTG	CTATGCATCT	TCAACCTGAC	6660
Susceptible	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Resistant	<u>TTGATGATTG</u>	TTTGAACCA	ATTTAATC	AAGTTAAATG	TTATTGTTGT	GACCCTGAAT	6720
Susceptible	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Resistant	CAGGTTTGT	ATGCTACCG	AATCCTCTC	ACGTCTTCAG	AGTAGAGGTA	ATTTTGTTC	6780
Susceptible	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Resistant	TTGTCATTT	ACAGTTACAG	TTCATCTTCT	TAAGGAATTA	ATGGGAGTTC	CTATATTTTC	6840
Susceptible	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Resistant	TCGGGTACCT	AGAAGGTGTG	GTTCTAGCT	TTACCTCCTT	AAGAACCGTA	GAATGTTGGA	6900
Susceptible	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Resistant	<u>CCTAACACTT</u>	GGATCAAAGA	ACGAAAG				6927
Susceptible	*****	*****	*****				

图 4 抗病材料和感病材料 *Pi-ta* 基因结构部分核苷酸序列的同源性比对结果

Fig. 4 Results of homology alignment on partial *Pi-ta* sequences of the resistant and susceptible strains

图 5 为 *Pi9* 基因、籼稻 Nipponbare 的 6 号染色体与籼稻 93-11 的 6 号染色体基因序列的同源性比对结果。从理论上讲，只要含 *Pi9* 基因和不含 *Pi9*

基因的材料发生了 SNP 的变化，都可以在发生 SNP 处设计引物加以区别。

<i>Pi9</i>	TGCAACCACC	ACCAACACCA	AGCAGGCTGT	TGTCGTCGCC	TTCTCCTTGT	GCCGTCGGAG	1659
Nipponbare	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1658
93-11	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1673
<i>Pi9</i>	CGCGCCACC	GGCTGCTCCT	CCCGCAGCCG	CAGGGCCACG	CTGACGACGC	CGCTCCTCCC	1719
Nipponbare	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1718
93-11	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1733
<i>Pi9</i>	GCAGCCGTAG	CACCATGCCG	ACCACGCCAC	TCCTCCACA	GCTGCAAGGC	CACTCGCTAC	1779
Nipponbare	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1778
93-11	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1793
<i>Pi9</i>	CTCCTAGTCC	CTGGAGGCTT	GAACCCTGCT	GGTATGCTTC	ATGGATCAGG	AGCGCCGGTT	1839
Nipponbare	*****	*****	*****	***C*****	*****	*****	1838
93-11	*****	*****	*****	***C*****	*****	*****	1853
<i>Pi9</i>	AGCAAGCATG	GAATCCAAGA	ACCGTAGCAA	GGGGAAGAAA	TTGTCAGGAG	CTTCTCCCTC	1899
Nipponbare	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1898
93-11	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1913
<i>Pi9</i>	TAGTTTGACT	CCAGCCGGCA	GCCACCTCGC	CTCTGTTCAG	AAGCCACCAA	GACAGAGACC	1959
Nipponbare	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1958
93-11	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1973
<i>Pi9</i>	TAAAGCAAGT	CCACCAACCT	CACATCAAGC	AAGTGTGCGA	TCAATATTTT	TCACAATTTG	2019
Nipponbare	*****	*****	*****	*****	*****	*****	2018
93-11	*****	*****	*****	*****	*****	*****	2033
<i>Pi9</i>	TAGCAATTTT	TTTT-CCTAA	TTTTGTCACT	GATTGAACCA	TTCAACTTGT	GATGCACAAT	2078
Nipponbare	*****	*****	*****	*****	*****	*****	2077
93-11	*****	***T*****	*****	*****	*****	*****	2093
<i>Pi9</i>	CTGTAGTAAG	TGTTCTGTAG	GTTTGTTTTC	TTATTCTGTG	GTGCACTGAT	GATGGACATA	2138
Nipponbare	*****	*****	*****	*****	*****	*****	2137
93-11	*****	*****	*****	*****	*****	*****	2153

图 5 抗病材料和感病材料 *Pi9* 基因结构部分核苷酸序列的同源性比对结果

Fig. 5 Results of homology alignment on partial *Pi9* sequences of disease-resistant and disease-susceptible strains

Deng Yiwen 等^[20]将谷梅 4 号的 *Pigm* 定位于水稻第 6 号染色体上标记 C5483 和 C0428 之间的 70 kb 区间内，包含 5 个 NBS-LRR 抗性基因，与 *Pi2*、*Pi9* 紧密连锁或等位，并在此区间开发了检测 *Pigm*

基因的 CAPS(酶切扩增多态性序列)标记。笔者将 *Pigm* 基因的 CAPS 标记转换成 SNP 标记。图 6 所示为 *Pigm* 基因包含 CAPS 标记的部分核苷酸序列。

TGACCGCCCT	TCGCGCCATC	GACGCTTGT	GCCGCCATAT	AACTGCCGGT	GTGACCGAGC	15841
AGTTGCCTCT	GGTCTGATCG	CTGGTATCT	GTCGGTGTGA	TCGCTGCATC	TGAGCAAAC	15901
ACAAATAAA	AGATGTCTTG	AAAGTTCGTA	GATTGAATTT	TATTGCTTAT	ATTGCTGTTA	15961
CAAAGTACAA	CAACAACACT	TCTCTCACAG	AATTCGACTA	AACTCGAAAC	CTTAACTTTT	16021
CTCTAAATTA	AACTCTCCCA	AAATCGATAT	AAGGATATCT	CAACTCCCTC	TCTATTTATA	16081
CCCAAGACAA	GCAGCCTAAA	GTCACGAATC	TAATTTGTAC	AAGAAGTTCT	AATTCAC TAG	16141

方框标记处为感病材料的 G。

图 6 *Pigm* 基因标记的相对位置及序列

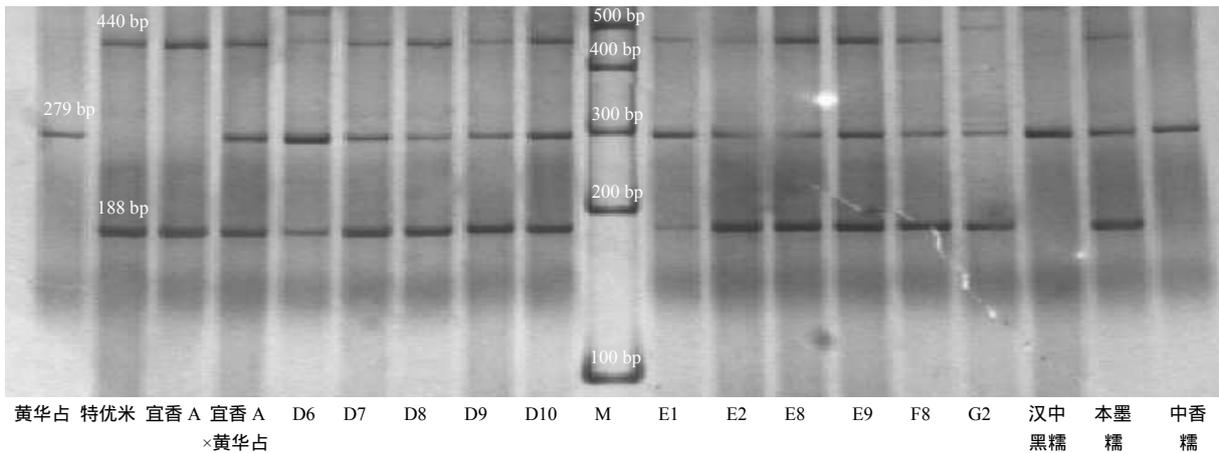
Fig. 6 Relative marker positions and sequence of *Pigm*

2.3 检测结果

如图 7 所示，在水稻的香味基因和非香基因 DNA 序列比对中不仅出现了 3 个 SNPs，还有 8 bp

的 InDels，这使得包含此多态性序列的特异性引物的特异性结合进一步增强，用 one tube nested-PCR 方法，在野生型和突变型基因型上很容易区分。香

稻材料扩增出 188 bp 的特异性条带,非香稻材料扩
引物扩增的共有带。 引出扩增的共有带。
增多 279 bp 的特异性条带,400 bp 左右的条带为外



M 为 DNA Marker 2000 ; 字母为材料代号。

图 7 one tube nested-PCR 检测 *Fgr* 基因结果

Fig. 7 The detection results of *Fgr* gene with one tube nested-PCR

稻瘟病抗性基因 *Pi-ta* 的抗病材料扩增出 286
bp 的特异条带,感病材料扩增出 161 bp 的特异条

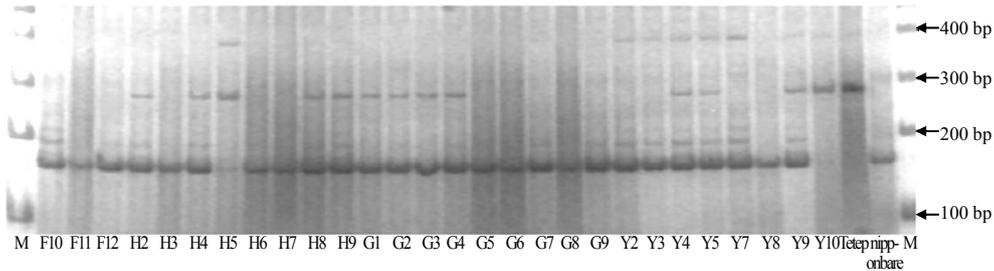
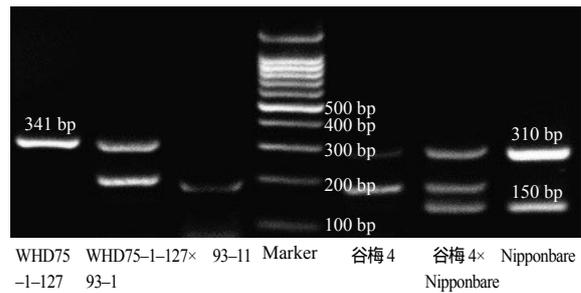


图 8 One tube nested-PCR 检测 *Pi-ta* 基因结果

Fig. 8 The detection results of *Pi-ta* gene with one tube nested-PCR

Pi9 基因的分子标记有 PB8^[21-22]和 PB9-1^[23]。
PB8 标记是显性标记,不能区分个体的基因型是杂
合体还是纯合体,只能用在育种的早期世代选择。
PB9-1 标记虽然是共显性标记,但含有抗性 *Pi9* 基
因的材料和粳稻材料只相差 3 bp,和籼稻材料只相
差 5 bp,用琼脂糖凝胶区分不了,而聚丙烯酰胺凝
胶只有在胶浓度大、胶薄、电泳时间长的实验条件
下才能区别开来^[24]。本研究中根据 *Pi9* 基因序列和
感病对照材料 Nipponbare、93-11 进行同源性比较
的结果和不同水稻基因型的 SNP 开发出了与 *Pi9* 基
因紧密连锁的共显性标记,抗病材料扩增出 341 bp
的特异条带,感病材料扩增出 219 bp 的特异条带,
外引物扩增出 521 bp 左右的条带(图 9 所示)。

基于目前公共数据库中还没有 *Pigm* 基因序列,
而 CAPS 标记就是因为酶切识别序列内发生了
SNP,根据 PCR 扩增后酶切判断基因型,如果酶切



Marker 左侧为 *Pi9* 基因检测结果;右侧为 *Pigm* 基因检测结果。

图 9 one tube nested-PCR 检测 *Pi9* 和 *Pigm* 的结果

Fig.9 Detection results of *Pi9* and *Pigm* gene with one tube nested-PCR

不完全会造成基因型误读,另外有的酶价格十分昂
贵,故本研究中将 Deng Yiwen 等^[20]报道的检测
Pigm 基因的 CAPS 标记转换成 SNP 标记。经研究,
Pigm 基因感病纯合体的一段序列为 GAATTC,这
正好是 *EcoRI* 的酶切识别位点,而其抗病纯合体的
此段序列突变为 AAATTC(G→A)。本研究中根据发

生的这个 SNP, 设计了 4 条引物进行 *Pigm* 基因的检测。抗病材料扩增出 150 bp 的特异带, 感病材料扩增出 200 bp 的特异带, 外引物扩增出 310 bp 左右的带(图 9)。

3 利用开发的基因标记鉴定资源的结果

在构建引物时, 发生 SNP 的位置决定了 2 条内引物(特异引物)的位置, 1 条内引物的 3' 末端设计成和野生型基因的序列完全互补, 另 1 条内引物的 3' 末端设计成和突变型匹配。外引物的位置调整遵循以下的原则: 首先, 保证 2 条特异性条带大小容易在琼脂糖凝胶上区分(至少把 2 条特异性条带大小

差异控制在 50 bp 以上); 其次, 外引物扩增的条带不能太大, 虽然外引物条带不影响基因型的判读, 由于和传统 PCR 技术及 nested-PCR 技术不同, 在本研究中, 当目的片段大小在 400 bp 以上时难以扩增出产物, 从 *Pi-ta* 和 *Pi9* 基因的目的片段大小及扩增结果得到验证(图 8、图 9、图 10), 借鉴前面的经验, 在设计 *Pigm* 的 4 条引物的时候, 把 *Pigm* 的目的片段控制在 400 bp 以内, 所有的目的片段都得到了很好的扩增(图 11)。图 10 和图 11 为检测陕西省 2013 年水稻区域试验结果的随机抽取, 由于试验材料大部分为 F_1 , 因此基因型大多数为杂合体。

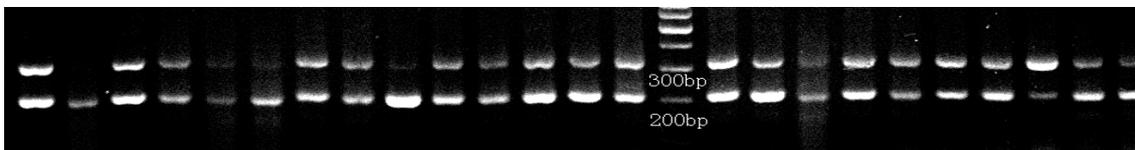


图 10 利用开发的 *Pi9* 基因标记鉴定资源结果

Fig.10 Detection resource results via developed *Pi9* genetic markers

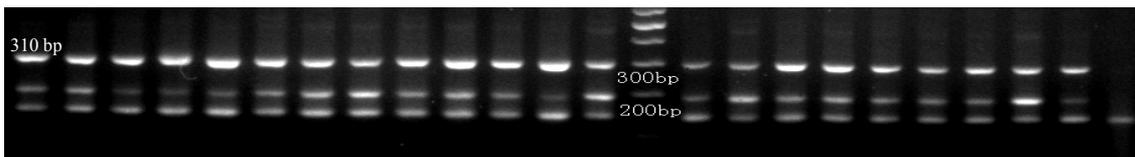


图 11 利用开发的 *Pigm* 基因标记鉴定资源结果

Fig.11 Detection resource results via developed *Pigm* genetic markers

4 讨论

传统的三引物法检测 SNP 需要对同一个样品进行 2 次 PCR, 而 one tube nested-PCR 技术, 通过一管 PCR 扩增, 即可判读材料的基因型。one tube nested-PCR 技术由于是在 1 个 PCR 反应中同时加入 4 条引物, 反应中不仅涉及引物与模板间的竞争, 同时还涉及引物之间的竞争, 因此它比常规的 nested-PCR 技术要难, 关键是多个靶点扩增条件往往不兼容, 特别是退火温度, 克服 4 条引物的退火温度不一致的情况, 可以采用以下方式增加 PCR 扩增的特异性: 1) 复性温度采用变温的方式, 先高温复性后低温复性以及先低温后高温复性的方式进行 PCR 扩增; 2) 采用传统的 touch-down PCR 的方法, 从 4 条引物中的最高 T_m 值每个循环降低 1°C 至最低 T_m 值; 3) 改良 touch-down PCR 的方法, 在 4 条引物中最高温度的 1 条 T_m 值增加 5°C 开始降温,

每个循环降低 1°C , 运行 15 个循环, 然后再在 4 条引物中最低 1 条的 T_m 值降低 5°C , 运行 20 个循环。另外, 不同引物的浓度也会影响反应结果, 首先, 4 条引物按相同浓度添加, 然后通过增加“弱”条带的引物浓度和减少“强”条带的引物浓度来使 3 条带扩增强度一致。

参考文献:

- [1] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S C, et al. The International SNP map working group: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms[J]. *Nature*, 2001, 409: 928-933.
- [2] Lindblad-Toh K, Winchester E, Daly M J, et al. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse[J]. *Nature Genet*, 2000, 24(4): 381-386.
- [3] Cho R J, Mindrinos M, Richards D R, et al. Genome-wide mapping with bi-allelic markers in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Genet*, 1999, 23(2): 203-207.

- [4] Kato R, Varshney R K, Thiel T, et al. Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley[J]. *Hereditas*, 2001, 135(2/3): 145–151.
- [5] Kanazin V, Talbert H, See D, et al. Discovery and assay of single-nucleotide polymorphisms in barley[J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(5/6): 529–537.
- [6] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean[J]. *Genetics*, 2003, 163(3): 1123–1134.
- [7] Morales M, Roig E, Monforte A J, et al. Single-nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon[J]. *Genome*, 2004, 47(2): 352–360.
- [8] Balley J, Barker G, Edwards K J, et al. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertion/deletion in maize expressed sequence tag data[J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(1): 84–91.
- [9] Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome[J]. *Science*, 2002, 297(5565): 92–100.
- [10] International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome[J]. *Nature*, 2005, 436(7052): 793–800.
- [11] Nasu S, Suzuki J, Ohta R, et al. Search for an analysis of single nucleotide polymorphism(SNP) in rice and establishment of SNP markers[J]. *DNA Res*, 2002, 9(5): 163–171.
- [12] Feltus F A, Wan J, Schulze S R, et al. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies indica and japonica genome alignments[J]. *Genome Res*, 2004, 14(9): 1812–1819.
- [13] 王婧, 毕阳, 朱艳, 等. 巢式PCR快速检测西瓜细菌性果斑病菌[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(2): 284–291.
- [14] Jiang J Z, Liang Y Y, Luo L J, et al. Nested PCR detection of abalone shriveling syndrome-associated virus in China[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 184: 21–26.
- [15] Shimano S, Sambe M, Kasahara Y. Application of nested PCR–DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis) for the analysis of ciliate communities in soils[J]. *Microbes and Environments*, 2012, 27(2): 136–141.
- [16] Shen Wankuan, Xi Pinggen, Li Minhui, et al. Development of a sensitive nested-polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Ustilago scitaminea* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(46): 10541–10547.
- [17] 国家水稻数据中心. 基因数据库. <http://www.Ricedata.cn/gene/>, 2014–05.
- [18] Louis M, Bradbury T, Timothy L, et al. The gene for fragrance in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005, 3: 363–370.
- [19] Bryan G T, Wu K S, Farrall L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(11): 2033–2046.
- [20] Deng Y, Zhu X, Shen Y, et al. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm* (t) tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety[J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 705–713.
- [21] Liu G, Lu G, Zeng L, et al. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9* (t) and *Pi2* (t) are physically linked on rice chromosome 6[J]. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267: 472–480.
- [22] Qu S H, Liu G F, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice[J]. *Genetics*, 2006, 172: 1901–1914.
- [23] 殷得所, 夏明元, 李进波, 等. 抗稻瘟病基因 *Pi9* 的 STS 连锁标记开发及在分子标记辅助育种中的应用[J]. *中国水稻科学*, 2011, 25(1): 25–30.
- [24] 张羽, 冯志峰, 张晗, 等. 陕西省水稻种质资源中 *Pi9* 基因的分布状况[J]. *四川农业大学学报*, 2013, 31(2): 115–121.

责任编辑: 苏爱华

英文编辑: 王 库