利用分子標誌輔助研發低消化性蛋白之水稻品種[1]

林泰佑[2]、吳文欽[4]、黃佳興[2]、潘昶儒[3]

摘 要

本研究利用 DNA 專一性分子標誌與 SDS-PAGE 單向蛋白質電泳技術進行低消化性蛋白突變 *Lgc1* 之測定並作為育種篩選之工具，期能育出具有較低易消化性穀蛋白(glutelin)含量且適應台灣氣候環境之品種。具 *Lgc1* 突變之水稻品種總蛋白質含量較一般品種無太大差異，但其蛋白質比例中穀蛋白含量與親本「春陽」相同，約為一般品種‘台粳 16 號’之 57.5%，而不易消化之醇溶蛋白(prolamin)含量則有提升。本研究以具有低穀蛋白含量誘變基因 *Lgc1* 之日本品種 ‘春陽’ 與優質豐產的良質米品種‘台粳 16 號’雜交後代作為材料，*Lgc1* 專一性 DNA 分子標誌及單向蛋白質電泳作為篩選工具，結果顯示具有同結合 *Lgc1* 訊號之品系，其蛋白質電泳分析結果顯示位於 37-39 kD 及 22-23 kD 分子量處之穀蛋白訊號呈現較弱，進行雙重分析比對後，進一步顯示該分子標誌亦適用於分析台灣粳稻品種與 *Lgc1* 品種之雜交後代，可作為台灣優良水稻品種導入低穀蛋白 *Lgc1* 突變之快速篩選工具。由具 *Lgc1* 突變品系之中針對兩親本較優異之農藝性狀進行篩選，選出具優良性狀及低穀蛋白含量之‘花粳育 154 號’品種，可供低腎臟負擔能力之民眾食用，深具推廣之潛力。

關鍵詞：水稻、低穀蛋白

1.花蓮區農業改良場研究報告第 249 號。

2.花蓮區農業改良場作物改良課助理研究員。

3.花蓮區農業改良場作物改良課副研究員。

4.花蓮區農業改良場作物改良課約用助理。

前　言

水稻是國際上三大糧食作物之一，亦是超過半數世界人口的主要糧食，稻米的營養價值豐富，白米除了主要成份澱粉可供給大部份熱量來源外，也包含了約 7%的蛋白質，在以粳米為主食的亞洲國家中，由米飯攝取的蛋白質約占總蛋白質攝取量的 15% (Tanaka, 1983)。隨著社會生活水準提高慢性病患者數量也隨之提升，其中慢性腎臟病患者必須限制蛋白質的攝取以降低腎臟負擔(Fouque, *et al*. 2000)，因此若能透過育種、加工等技術降低稻米中的蛋白質含量，則可作為慢性腎臟病患者適宜的食品。市面上已有透過乳酸菌代謝蛋白質的加工技術，或利用米穀粉加工以移除蛋白質的澱粉重組米等加工技術可降低米粒蛋白質含量，但加工產品往往有失去米飯原有風味，且生產成本偏高消費者難以負擔等問題(Morita, *et al*. 2009)。

稻米中具有四種蛋白質，可依照溶解條件略分為水溶性的乳清白蛋白(albumins)、鹽溶性的球蛋白(globulins)、醇溶性的醇溶蛋白(prolamines) 及酸鹼溶性的穀蛋白質(glutelins)，其中以消化性穀蛋白所占的比例最高，大約占 75-80%，醇溶蛋白次之約占 10-15%。而醇溶蛋白及穀蛋白多分布於胚乳(陳與黃，2014)。

稻米的儲藏性蛋白質常以 SDS-PAGE 蛋白質電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)分析。常見的有分子量為 55-57 kD 的穀蛋白蛋白質前驅物(precursor)，及前驅物經降解後形成的 37-39 kD 酸性次單元體(acidic subunits) 與 21-23 kD 鹼性次單元體(basic subunits)。此外，也包括分子量為 10-16 kD 之醇溶蛋白與 26 kD 之球蛋白(Ogawa *et al*., 1987)。因此蛋白質電泳分析可檢視水稻蛋白質之變異。Iida 等人(1993)利用日本良質米品種 ‘Nihonmasari’進行誘變，開發出具低穀蛋白及高醇溶蛋白的水稻品種 *LGC1*。而 *LGC1* 品種經研究顯示為顯性突變 *Lgc1* 所造成，該突變為 3.5kb 的基因片段缺失，發生於第二條染色體上(Kusaba *et al*., 2003)。

水稻穀粒蛋白質含量及比例易受到施肥量、氣候等環境條件的影響，其蛋白質含量及比例亦是多基因遺傳，與環境交感作用下較不穩定且遺傳率較低。為了提升低穀蛋白品種選育選拔效率，Morita 等人於 2009 年開發了 *Lgc1* 突變專一性分子標誌，並利用此分子標誌選育出 ‘LGC-Katsu’ 以及 ‘LGC-Jun’ 兩個低消化性蛋白品種，國內亦針對該突變進行分子標誌之開發與研究，設計不同的位置之專一性引子對及實際育種利用(王 等，2014；林 等，2014)。本研究以具有 *Lgc*1 突變的日本低消化性蛋白水稻品種 ‘Shunyo’與台灣優良水稻推廣品種‘台粳 16 號’雜交後代之族群，並以 Morita (2009)等人開發的分子標誌進行 DNA 基因型與穀粒蛋白質含量之雙重選拔，期能選育適宜台灣栽培的低消化性水稻品種。

材料與方法

一、 試驗材料

本試驗材料於 2007 年一期作以具有 *Lgc1* 突變之日本品種‘Shunyo’為母本，及‘台粳 16 號’為父本，於花蓮區農業改良場進行雜交授粉，並利用譜系法進行世代演進與選拔，至 2012 年獲得 135 個高度同質結合之 F8 世代族群，各品系於分蘗期剪取葉片，並於黃熟期分株收取穀粒，針對各品系之 *Lgc1* 突變進行基因型與外表型分析。基因型分析以 *Lgc1* 專一性分子標誌進行小片段序列增幅(PCR)，外表型以各品系收穫穀粒進行碾製精米後進行蛋白質電泳分析。

二、 DNA 萃取

針對 135 個 F_8 世代及兩親本品系為樣本，採取嫩葉 80-120 mg，以液態氮磨碎後利用 GeneMark Plant Genomic DNA Purification Kit 進行 DNA 萃取，萃取得之 DNA 以 NanoPhotometer (Implen)光電比色計

測定 OD260/OD280 之比值，並以 OD260 值計算 DNA 濃度，分別稀釋成濃度為 20 ng·ul^{-1}，以進行專一性分子標誌分析。

三、 *Lgc1* 專一性分子標誌基因型分析

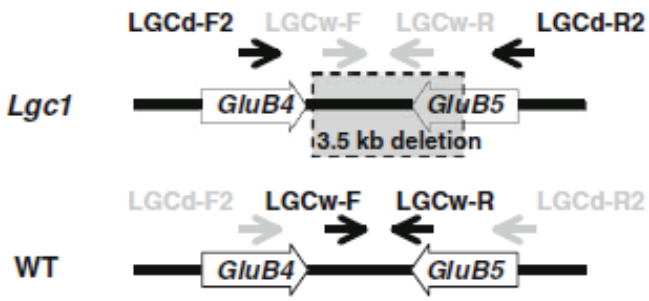
根據 Morita 等人(2009)針對 *Lgc1* 突變開發專一性分子標誌，在一般型及突變型各別設計一組專一性分子標誌引子對(表一)，該引子對針對 3.5 kb 缺失片段上，以及缺失片段兩端設計引子對，並控制 PCR 條件延伸(extension)時間，以避免擴增目標以外之條帶，其擴增片段示意圖及擴增片段分子量大小如圖一所示(Morita, *et al*. 2009)，PCR 反應體積為 20 µl，內含 1 unit Taq DNA 聚合酶（Invitrogen）、1× PCR buffer、1.5 m M $MgCl_2$、0.2 mM dNTP、0.8 mM 引子及 40 ng DNA 模板，PCR 儀器為 96-Well GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems），溫度設定為 94℃ 5 min，再進行 42 次的 94℃ 30 s，53-57℃ 40 s，72℃ 110 s，最後進行 72℃ 7 min；將反應後之產物以電泳進行分析。

表一、本研究所使用之引子對序列

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used in this study.

Primer	Sequence (5'-3')
LGCd-F2	CGGGTAAAGAATGGCCTTAAAC
LGCd-R2	ATTTGGTCATACTAGTCTAGTT
LGCw-F	GCAAGCACGAAGCCTTAAGA
LGCw-R	TGAGTCCACAGTTGATTGCT

(Morita *et al*., 2009)



圖一、*Lgc1* 突變專一性 PCR 分子標誌之設計

Fig. 1. PCR markers designed for the detection of the *Lgc1* mutation.

四、 DNA 電泳分析

經專一性分子標誌分析之 20 µl PCR 反應產物加入 4 µl 的 6× DNA loading dye，以 2% agarose (LE) 膠體，0.5× TBE (45 mM Tris-HCl, pH 8.3, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA，pH7)的電泳緩衝液進行 DNA 電泳，電泳槽為 BIO-RAD sub Cell (G7)，電壓 110V，電泳時間約 90-100 min，結束後置於 0.5 mg·ml^{-1} 的 Ethidium bromide (溶於 0.5× TBE buffer)中染色 20 min，並以清水退染約 10 min，再置於紫外燈箱中，檢視膠體上 DNA 多型性片段，並利用 Gel catcher1200 影像系統公司照相，以進行 DNA 條帶之分析、基因型判讀。

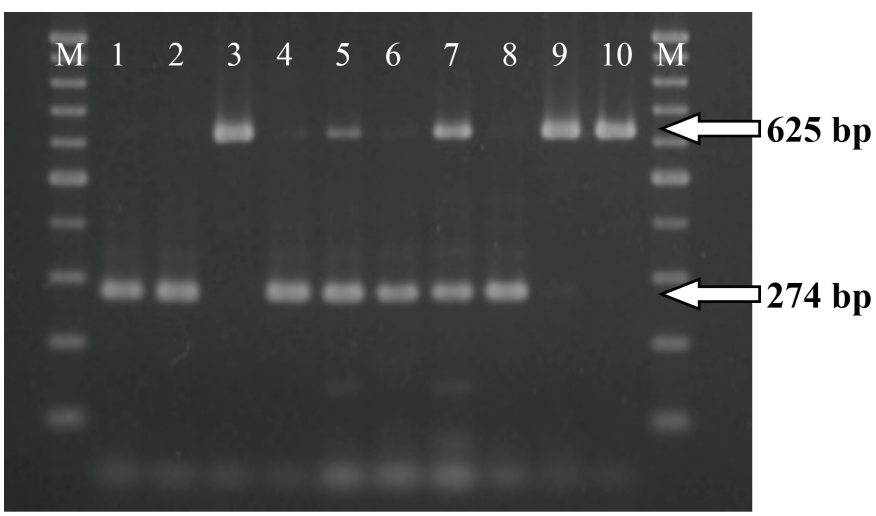
五、 SDS-PAGE 蛋白質電泳及蛋白質含量比例分析

各品系與兩親本全蛋白質的萃取，將各品系碾製成白米後以高速震盪均質器(KURABO SH-100)進行磨粉，均質完成後每品系各取 0.1 g 加入 1 ml 的種子蛋白萃取液 (63 mM Tris-HCl pH7.6，20 mM $MgCl_2$，4 mM PMSF)，混成均質態。加入 0.5 ml Laemmli protein solubilization buffer (186 mM Tris- HCl, pH 6.8; 6% SDS; 15% β- mercaptoethanol; 22.5% glycerol; Laemmli, 1970)，混合均勻。室溫下，以 15,000 rpm 離心 10 min (260D，Denville/USA)。取上清液，於 100℃水浴 10 min 後，移至 4℃，10 min。室溫下，以 15,133 rpm 離心 10 min，收集上清液。再以 12.5% 的 SDS-PAGE 電泳進行蛋白的分離，並用 Coomassie Brilliant Blue R-250 進行染色，染色及退染後之膠片以掃描機進行影像記錄。電白質電泳訊號圖以 Quantity ONE® quantitation 軟體 (Bio-Rad)分析計算各品系中穀蛋白、球蛋白及醇溶蛋白占總蛋白之比例，並利用自動化學分析儀 (FOSS FIAstar-5000 及 SOFIA 操作軟體系統，以凱氏氮分析法為基礎，以注入式自動抽取樣品及分析系統進行總蛋白質含量分析。

結果與討論

一、 親本及雜交後代 DNA 分析結果

親本及 136 個雜交後代 DNA 分析結果顯示所有條帶均符合 Morita 等人於 2009 的研究，分析結果中父本‘台粳 16 號’呈現一般型 (wild-type)之 625 bp 訊號，母本‘春陽’呈現突變型(*Lgc1*-type)之 274 bp 訊號，Morita 等人於 2009 的研究中之結果一致，136 個 F8 世代品系中，共有 53 個品系於 625 bp 處呈現條帶訊號，為與‘台粳 16 號’親本同質結合基因型；76 個品系於 274 bp 處呈現條帶，為與‘春陽’親本同質結合之基因型；以及 7 個品系於 625 bp 處及 274 bp 處均呈現條帶訊號，為異質結合基因型。此結果顯示約 95% 之品系呈現同質結合訊號，應為多代自交後趨於高同質結合之結果。基因型分析結果如圖二所示，由分析結果可知 LGCd 引子對以及 LGCw 引子對分析親本與 136 個後代均出現對應之條帶訊號，應可作為篩選 *Lgc1* 突變之工具，但仍須以蛋白質表現之外表型分析 (phenotyping)進行比對確認。

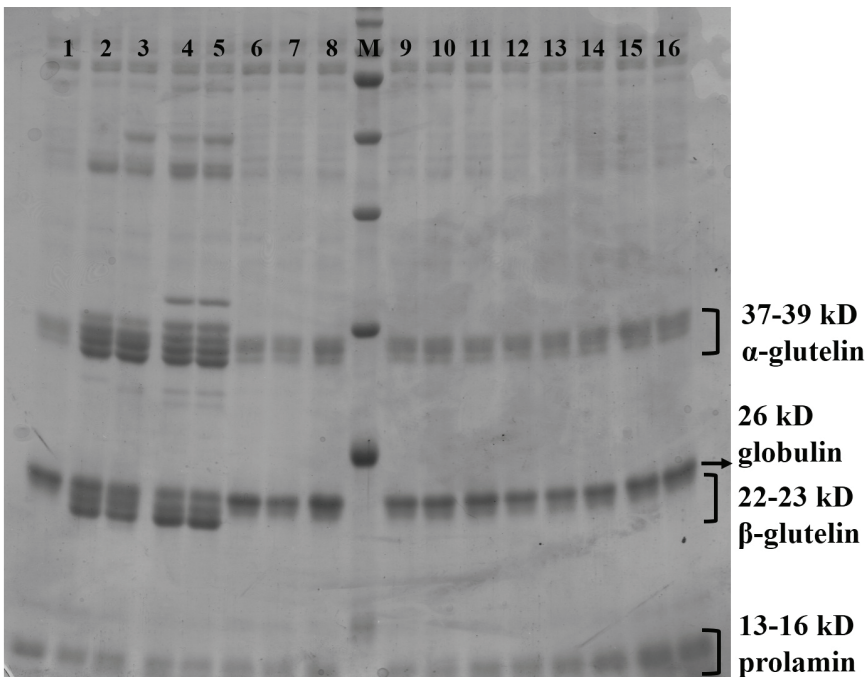


圖二、*Lgc1* 基因座專一性分子標誌之基因型分析結果

Fig. 2. Genotyping for the *Lgc1* locus using specific PCR markers. M:100 bp MW Marker. Lanes 1, 2, 4, 6, 8: *Lgc1/Lgc1*. Lanes 5, 7: *Lgc1*/Wildtype. Lanes 3, 9, 10: wild-type/wild-type.

二、 親本及雜交後代 DNA 分析結果

SDS-PAGE 單向蛋白質電泳分析選取基因型分析中具 *Lgc1* 同結合之後代、兩親本與高蛋白品種‘花蓮 24’號進行分析，結果如圖三顯示，電泳圖分析結果可將蛋白質表現分為兩型，第 1 型為一般型，如水稻台粳 16 號及花蓮 24 號，於 37-39 kD 及 22-23 kD 分子量處之 glutelin 蛋白訊號較為強烈；第 2 型為突變型，如水稻春陽及 *Lgc1* 同結合後代品系，於 37-39 kD 及 22-23 kD 分子量處相較一般型訊號較弱。經分析結果顯示第一型與基因型檢定中一般型條帶訊號共分離，第二型與基因型檢定中突變型條帶訊號共分離 (cosegregation)。由此結果顯示低穀蛋白表現與專一性分子標誌分析結果一致，此 DNA 分子標誌可作為 *Lgc1* 突變之優良選拔工具，蛋白質電泳分析也應證了 *Lgc1* 突變會影響穀蛋白之合成。

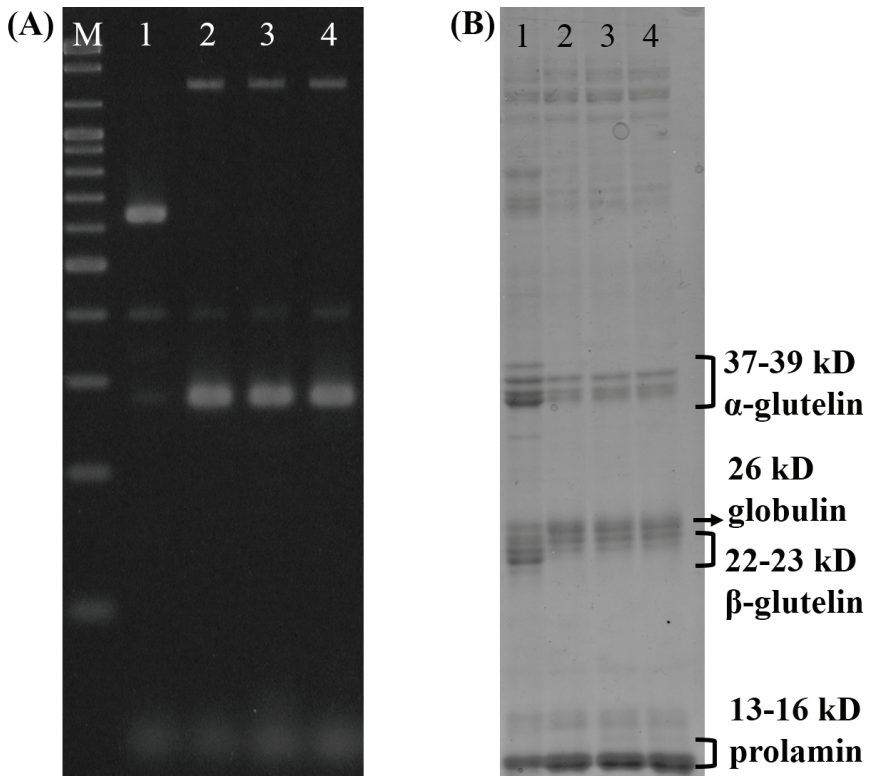


圖三、利用 SDS-PAGE 分析水稻蛋白質外表型之結果

Fig. 3. Phenotyping of the rice protein by SDS-PAGE analysis.
M: Marker. Lane 1:Shunyo(春陽). Lanes 2, 3: TK16. Lanes 4, 5: HL24.
Lanes 6-16: F8 lines from Shunyo × TK16.

三、 蛋白質含量分析

利用 Quantity ONE® quantitation 軟體測定一般型水稻‘台粳 16 號’，以及具 *Lgc1* 突變之‘春陽’和雜交後代中具 *Lgc1* 突變同結合之品系‘花粳育 154 號’ (HKY154)單株之蛋白質電泳訊號強弱，以進行各種水稻蛋白質含量比例分析 (圖四)。由分析結果顯示，‘台粳 16 號’之總蛋白質含量約為 7.8%，37-39 kD 及 22-23 kD 分子量穀蛋白含量約為總蛋白 44.7%，26 kD 球蛋白含量約為 10.1%，醇溶蛋白含量約為 18.8%，總消化性蛋白占總蛋白比例約為 81.2%；‘春陽’之總蛋白質含量約為 7.5%，37-39 kD 及 22-23 kD 分子量穀蛋白含量約為總蛋白之 26.6%，26 kD 球蛋白含量約為 14.2%，醇溶蛋白含量約為 47.7%，總消化性蛋白占總蛋白比例約為 52.3%；‘花粳育 154 號’之總蛋白質含量約為 6.8%，37-39 kD 及 22-23 kD 分子量穀蛋白含量約為總蛋白 27.1%，26 kD 球蛋白含量約為 14.2%，醇溶蛋白含量約為 46.9%，總消化性蛋白占總蛋白比例約為 53.1% (表二)。



圖四、*Lgc1* 突變之基因型與外表型分析比較

Fig. 4. Comparison of phenotyping and genotyping for the *Lgc1* mutants.
(A)Genotyping with *Lgc1* specific markers. (B)Phenotyping with SDS-PAGE.
M: Marker. Lane 1: TK16, lane 2: Shunyo, lane 3: HKY154-1, lane 4:HKY154-2.

表二、‘台粳 16 號’、‘春陽’及‘花粳育 154 號’蛋白質分析

Table 2. Protein analysis in milled rice of ‘TK16’, ‘Shunyo’ and ‘HKY154’.

	Protein content (%)	Easy-to-digest protein (%)	Glutelin (%)	26-kD globulin (%)	Prolamine (%)
TK16	7.8	81.2	44.7	10.1	18.8
Shunyo	7.5	52.3	26.6	14.2	47.7
HKY154	6.8	53.1	27.1	14.2	46.9

由分析結果顯示一般型與突變型的總蛋白質含量差異不大，但消化性蛋白占總蛋白之比例則有明顯不同，其中突變型品系相較一般型易消化性蛋白質含量約降低 35.6%，穀蛋白含量約降低 40.5%，球蛋白提升 40.6%，醇溶蛋白則提升 153.7%，由此結果可知該突變造成穀蛋白含量的下降，使不易消化的醇溶蛋白比例大幅提升，卻也使同樣為消化性蛋白的球蛋白提升，但因球蛋白所佔比例較低，故不影響整體消化性蛋白的比例降低，該結果亦符合 Nishimura 等人於 2005 的研究結果。

由以上分析結果可知，由 Morita 等人於 2009 年所開發之分子標誌可有效利用於選育低消化性水稻品種，加速選拔流程及選拔精準度。低消化性蛋白品種可能適合於腎臟病患者食用，但仍須配合人體消化試驗，以進一步確認對於腎臟病患者之影響。

結　論

本研究針對水稻低消化性蛋白突變 *Lgc1* 進行研究，參考 Morita 等人於 2009 年的研究開發之分子標誌，分析由日本引種具有 *Lgc1* 突變之品種 ‘春陽’與台灣優良品種‘台粳 16 號’之雜交後代，結果顯示基因型與蛋白質分析呈現共分離，且突變型後代穀蛋白降低結果與春陽一致，由此可知此分子標誌可作為台灣低消化性水稻品種選育之篩選工具，加速低消化性蛋白水稻選育之效率。以基因型及外表型雙重分析，於雜交後代中選出具 *Lgc1* 且適應台灣栽培之品系‘花粳育 154 號’，期能作為未來腎臟病患米食之提供。

參考文獻

1.王妙屹、陳榮坤、羅正宗、黃文理 2014 利用分子標誌輔助低穀蛋白水稻新品系之選育 作物科學講座暨研究成果發表會專刊 臺灣農藝學會編印 p. 115。
2.林泰佑、吳文欽、黃佳興、潘昶儒 2014 利用分子標誌輔助低消化性蛋白水稻品種研發 作物科學講座暨研究成果發表會專刊 臺灣農藝學會編印 p. 105。
3.陳榮坤與黃文理 2014 低消化性蛋白質含量稻米品種之改良與研究現況 糧食安全與稻米科技 39:50-55。
4.Fouque, D., P. Wang, M. Laville and J. P. Boissel. 2000. Low protein diets delay end-stage renal disease in non-diabetic adults with chronic renal failure. Nephrol. Dial. Transplant. 15:1986-1992.
5.Iida, S., T. Amano and T. Nishio. 1993. A rice (Oryza sativa L.) mutant having a low content of glutelin and a high content of prolamine. Theor. Appl. Genet. 87:374-378.
6.Kusaba, M., K. Miyahara, S. Iida, H. Fukuoka, T. Takano, H. Sassa, M. Nishimura and T. Nishio. 2003. Low glutelin content1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. Plant Cell 15:1455-1467.
7.Morita, R., M. Kusaba, S. Iida, T. Nishio and M. Nishimura. 2009. Development of PCR markers to detect the glb1 and *Lgc1* mutations for the production of low easy-todigest protein rice varieties. Theor. Appl. Genet. 119:125-130.
8.Nishimura, M., M. Kusaba, K. Miyahara, T. Nishio, S. Iida, T. Imbe and H. Sato. 2005. New rice varieties with low levels of easy-to-digest protein 'LGC-Katsu' and 'LGC-Jun'. Breed. Sci. 55:103-105.
9.Ogawa, M., T. Kumamaru, H. Satoh, N. Iwata, T. Omura, Z. Kasai and K. Tanaka. 1987. Purifcation of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. Plant Cell Physiol. 28:1517-1527.
10.Tanaka, S. 1983. Seed protein of rice and possibilities of its improvement through mutant genes. p. 225-244. In: Gottschalk W. Seed proteins. Biochemistry, genetics, nutritive value. Kluwer, Dordrecht.

Development of Low Contents of Easy-to-digest Protein Rice by Marker-assisted Selection[1]

Tai-Yu Lin[2] Wen-Chin Wu[3] Chia-Shing Huang[2] Cheng-Zu Pan[4]

Abstract

In order to develop low gutelin content and climate adapted rice varieties in Taiwan, we analyzed low levels of easy-to digest protein mutant *Lgc1* by DNA specific marker and protein contents using SDS-PAGE electrophoresis. We used the F8 generation derived from Japanese variety 'Shunyo' with *Lgc1* gene and 'TK16' from Taiwan as materials for analysis. The difference in the total protein content between the *Lgc1* mutant and normal rice varieties was not significant, but the proportion of glutelin contents in *Lgc1* rice was the same as 'Shunyo'. The gutelin content of 'Shunyo' was reduced to 57.5% of 'TK16'. In this study, we analyzed the F8 generations by genotypes using *Lgc1* specific marker and SDS-PAGE electrophoresis. The F8 lines with low gutelin contents also showed homozygosity to 'Shunyo' by genotyping. Both results of genotyping were consistant. In phenotyping, the signals of the *Lgc1* lines and 'Shunyo' were weaker than which of 'TK16' in molecular weight 37-39 kD and 22-23 kD donated as glutelin. It indicated that the *Lgc1* specific marker could be used as an efficient tools for detecting low gultelin content rice in marker-assisted selection. The line 'HKY154' was selected according to favorable agronomic characters and low levels of protein contents. This line has a good potential to be the food for patient with chronic kidney disease.

Key words: rice, glutelin.

1. Research article No.249 of Hualien District Agricultural Research and Extension Station.
2. Assistant researcher, Division of Crop Improvement, Hualien DARES.
3. Associate researcher, Division of Crop Improvement, Hualien DARES.
4. Contract-based assistant, Division of Crop Improvement, Hualien DARES.