

文章编号: 1001- 2486(2008) 02- 0056- 05

东乡野生稻 NBS-LRR 类抗性基因同源序列的分离与鉴定*

王正华¹, 杲修杰¹, 曹孟良²

(1. 国防科技大学 计算机学院, 湖南 长沙 410073; 2. 国家杂交水稻工程技术研究中心, 湖南 长沙 410125)

摘要: 基于植物的抗性基因具有保守序列, 根据已克隆基因的保守序列设计探针, 利用菌落杂交的方法, 对东乡野生稻大片段基因组文库进行筛选, 得到两个候选克隆。序列比对发现其中含有 NB-ARC 的保守序列, 可用于后续转基因鉴定。

关键词: NBS-LRR; 抗性基因; 菌落杂交; 基因组文库

中图分类号: Q94- 33 **文献标识码:** A

Isolation and Characterization of NBS-LRR Resistance Gene Homology Sequences from Dongxiang Wild Rice

WANG Zheng-hua¹, GAO Xi-jie¹, CAO Meng-liang²

(1. College of Computer, National Univ. of Defense Technology, Changsha 410073, China;

2. National Hybrid Rice R&D Center, Changsha 410125, China)

Abstract: The resistant gene of plants has conservative sequence. Probes were designed in terms of the sequences of known resistance gene. With the colony hybridization method, the genomic library of Dongxiang wild rice was screened and two candidate clones were obtained. The sequences were analyzed with the blast program to the GenBank database and a conservative NB-ARC domain was found in both of the sequences. The clones would be transferred into rice for a further analysis.

Key words: NBS-LRR; resistance gene; colony hybridization; genomic library

植物病虫害是导致农作物减产的重要原因, 每年的损失估计约数亿美元^[1]。常规的化学农药虽能暂时抑制病虫害的发生, 但也带来粮食、水果药物残留超标和环境污染等威胁人类健康的严重问题。而野生植物长期处于野生状态, 经受了各种灾害和不良环境的自然选择, 形成了对生物因子(如病虫害)和非生物因子(如干旱、酸性土壤、寒冷等)较强的抗性和耐性^[2-3], 保持有作物所不具有或已经消失了的遗传基因。随着基因工程技术的发展, 人们已能够将多种抗植物病虫害的基因转入目的植物中, 从而避免化学农药的大量使用。这使得发掘植物自身的抗性基因(Resistance Gene, R Gene)资源显得越来越重要。近年来, 随着植物基因组研究的深入, 先后克隆出了几十个植物抗病基因^[4]。对这些基因进行研究后发现它们在结构上有着共同的保守序列, 如多数抗病基因编码产物都有核苷酸结合位点(Nucleus Binding Site, NBS)和富含亮氨酸的结合位点(Leucine Rich Repeat, LRR), 少数抗病基因还包含蛋白激酶(Kinase)结构域。抗性基因在结构上的保守性为我们利用候选基因(Candidate Gene, CG)策略筛选新基因提供了可行性^[5-7]。

本实验根据已克隆的水稻抗性基因的保守序列设计引物, 对东乡野生稻总 DNA 进行 PCR 扩增, 回收目的片段制成探针后, 采用菌落杂交的方法对东乡野生稻基因组文库进行筛选, 并将筛选到的部分克隆片段进行了测序和生物信息学分析。

* 收稿日期: 2007- 10- 14

基金项目: 国家 863 重点资助项目(2006AA100101); 中国博士后基金资助项目(2005037696); 湖南省级重点实验室科研项目(05FJ4035)

作者简介: 王正华(1962—), 男, 教授, 博士。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 东乡野生稻总 DNA 及基因组 BIBAC 文库: 由本实验室自行构建和制备^[8]。

(2) 引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

上游引物 s2: 5' ggi ggi gti ggi aa(a/g) aci ac 3'

下游引物 as3: 5' iag igc iag igg iag icc 3'

其中, i 为次黄嘌呤修饰。

(3) Hybond-N+ membranes, 购自 Amersham Biosciences 公司;

Taq DNA polymerase, 购自 Takara 公司;

PCR 产物凝胶回收试剂盒, 购自安比奥公司;

pGEM-T vector, 购自 Promega 公司;

NEBlot Phototope Kit, Phototope-star Detection Kit, 购自 New England Biolabs 公司。

(4) DNA 序列测定由北京华大基因研究中心完成。

1.2 目的片段的扩增与回收

反应体系 (25 μ l): 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, 2.5mmol/l dNTP 2 μ l, 12.5 μ mol/l 上下游引物各 2 μ l, Taq 酶 0.3 μ l (1.5U), 野生稻总 DNA 1 μ l, 加水补至 25 μ l。

反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 40 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 52.9 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

反应产物用 1% 琼脂糖电泳分离, 然后使用凝胶回收试剂盒进行回收, 进一步电泳鉴定并测定其浓度。

1.3 探针的制备及杂交

取 1000ng 回收的 DNA, 根据 NEBlot Phototope Kit 的说明书, 制备生物素标记的探针, 并测定探针的质量及灵敏度。

将 384 孔板上的菌落点到 Hybond-N+ 膜上, 置于涂有 LB+ 卡那霉素的平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12h, 依次使用 10% SDS、变性液、中和液、2 \times SSPE 溶液处理 5min, 在 1000 μ W/cm² 强度的紫外灯下交联 33s, 用 100 μ g/ml 蛋白酶 K 溶液 55 $^{\circ}$ C 处理 1h, 用 1mmol/l 的 PMSF 溶液室温处理 15min, 再用 2 \times SSC 溶液漂洗两次, 晾干后即可用于杂交。

利用上一步制备的探针及膜进行杂交, 68 $^{\circ}$ C 杂交 10h, 用 2 \times SSC, 0.1% SDS 25 $^{\circ}$ C 漂洗 2 次, 各 5 min; 0.1 \times SSC, 0.1% SDS 68 $^{\circ}$ C 漂洗 2 次, 各 15min。按照 Phototope-star Detection Kit 的说明书, 对杂交后的膜进行显色, 将 X 光底片置于膜上, 曝光 4h 后显影定影。

1.4 杂交阳性点的鉴定

在曝光后的底片上取部分阳性点, 在对应的 384 孔板上找到相应的克隆, 挑取适量菌液于 LB+ 卡那霉素的培养基中 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。用碱裂解法提取质粒, 用 s2, as3 引物进行 PCR, 反应条件同 1.2, 退火温度改为 45.5 $^{\circ}$ C, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 扩增片段克隆和测序分析

将从阳性点中扩增所得到的目的片段进行切胶回收、纯化后, 按以下体系连接到 pGEM-T 载体: 3.5 μ l DNA, 0.5 μ l T-vector, 1.0 μ l T4 连接酶, 5 μ l 2 \times buffer。25 $^{\circ}$ C 连接 1h 后 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。

连接产物 1 μ l 加入到 40 μ l DH10B 感受态细胞中, 2.5kV 电击转化, 37 $^{\circ}$ C 恢复培养 1h 后涂布于 LB+ 氨苄青霉素的平板上(预加 IPTG 与 X-gal) 培养过夜。

从平板上随机挑取白斑, 提取质粒后, 用 PstI 与 NcoI 双酶切鉴定。将酶切鉴定正确的白斑穿刺培养后送华大基因研究中心测序。

1.6 生物信息学分析

利用生物信息学软件 DNASTAR 及 ClustalX 1.81 对所得的序列进行同源性分析及进化分析。

2 结果与分析

2.1 目的片段的扩增与回收

用 s2, as3 引物 PCR 扩增东乡野生稻总 DNA, 进行梯度 PCR 来确定适宜的退火温度, 产物电泳结果如图 1 所示, 各泳道为不同退火温度扩增产物, 第 1~9 号管分别对应 44.0℃、44.4℃、45.5℃、47.2℃、49.1℃、51.0℃、52.9℃、54.8℃、56.7℃。由图像可以看出, 7 号管中条带较多, 且集中在 500bp 附近。因为所得的扩增产物将用于制备探针, 为了增加探针的简并性, 我们取 7 号管的温度 52.9℃ 为退火温度, 进行大量扩增, 回收其中的 400~600bp 左右的条带。回收后用分光光度计测定浓度为 36.51ng/μl。

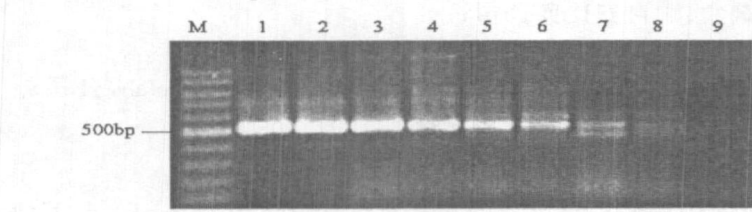


图 1 东乡野生稻总 DNA 温度梯度 PCR

Fig. 1 The temperature gradient PCR of the Dongxiang wild rice whole genomic DNA

2.2 探针制备及杂交

取 2.1 中的回收产物 27.5μl (含 DNA 1000ng), 用 NEBlot Phototope Kit 制备探针。将东乡野生稻基因组文库复制到杂交膜上, 按前述方法处理后用制备的探针杂交过夜, 并用 Phototope-star Detection Kit 显色, 在 X 光底片上成像, 选取部分点进行 PCR 鉴定。

2.3 杂交阳性点的 PCR 鉴定

图 2 中所得的点的亮度不一, 可能是文库中 384 孔板上的各个克隆中, 与探针同源的片段含量不同所致。我们选取 DB19 上的阳性点 H21、DB17 上的阳性点 G9 进行培养鉴定, 并取 DB19 上的阴性点 C5 作对照。挑取文库 384 孔板上对应的克隆培养后, 用碱裂解法提取质粒, 用 s2, as3 引物重新进行 PCR, 结果在阳性点 H21、G9 中扩增出 500bp 左右的目的条带, C5 中未见有 500bp 的目的条带, 阴性对照正常 (图 3)。

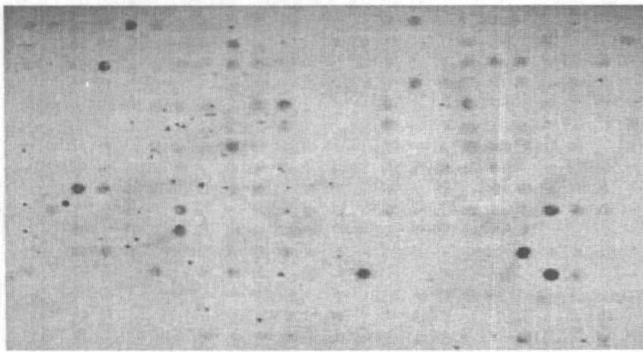


图 2 膜杂交结果

Fig. 2 The southern blotting results of the Dongxiang wild rice genomic library

2.4 TA 克隆质粒的酶切鉴定

对 H21 及 G9 中所扩增得到的 500bp 条带进行回收, 连接 pGEM-T 载体并转化至 DH10B 感受态细胞

后培养过夜, H21 与 G9 平板上分别长出约 700 个和 400 个克隆。从中随机挑取四个白斑, 培养后抽提质粒, 用 PstI 与 NcoI 酶进行双酶切鉴定(图 4), 结果显示, 所选的白色克隆中均有插入片段。

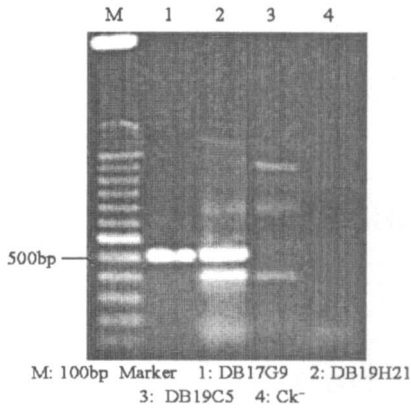


图 3 H21 及 G9 的 PCR 鉴定
Fig.3 The PCR results of H21 and G9

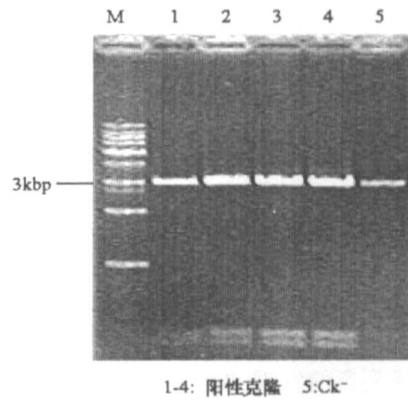


图 4 挑取克隆酶切鉴定
Fig.4 The restriction digest reaction results of the positive clones

2.5 测序结果分析

按照序列的来源, 我们将所得的两条序列命名为 DB19H21 和 DB17G9 (GenBank ID 分别为: EU293163, EU293164)。因为我们的目标是要分析序列中的保守区域, 而从蛋白质序列上更容易反映这一点, 所以我们将 DNA 序列翻译成氨基酸序列进行比对。两条序列翻译后均得到长度为 168 个氨基酸的连续序列。用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上的 blastp 程序进行分析, 显示所得的序列中含有保守的 NB-ARC 结构域。该区域为植物抗病基因产物中的信号转导结构, 含有典型的保守区的 P-loop (GGXGKTT)、Kinase-2 (VLDD)、Kinase-3 (SRXXXITR) 和跨膜区 GLPL 结构, 是 NBS-LRR 类型抗病蛋白编码基因^[9-12]。利用 ClustalX 1.81 对 DB19H21、DB17G9 序列以及 I2G-1、I2G-2、RPS2、RPS-2、RPM1、Pif、RPP13、RPP8、RPP5 等 9 个已知的植物抗病基因的 NB-ARC 保守区域序列之间进行比较, 结果显示它们的保守结构域高度一致(图 5), 都具有抗病基因的 NBS 特征结构域。



图 5 所得的序列与已知抗性基因 NB-ARC 保守结构域比较

Fig.5 Alignments between the obtained sequences and the known resistance genes

将所得的氨基酸序列与 9 个已知抗性基因的序列在氨基酸水平上进行聚类分析(图 6), 结果表明: DB19H21、DB17G9 与 Pif 基因的亲缘关系较近, 与 RPP5 的亲缘关系较远; 同时 DB19H21、DB17G9 被聚为一类, 由此推测这两个序列可能属于同一个基因家族。Pif 基因已经被证明是番茄中的一个抗细菌性斑点病的基因^[13], 故推断我们所得到的序列也是一个抗性基因的片段。

将所得的核酸序列在 NCBI GenBank 数据库中使用 Blast 软件进行序列同源性分析, 结果显示两条序列与水稻基因组中已测序的 BAC 克隆 AC 分别有 86% 和 80% 的相似性。根据中国科学院国家基因研究中心的水稻基因组数据 (<http://www.ricegene.csdb.cn/12chr/11.htm>), 该克隆位于水稻的 11 号染色体上, 遗传距离为 114.4cmol/l。该克隆中有 Y6854L 分子标记, 此标记与 Pi1 基因连锁, 而 Pi1 基因具有稻瘟病的广谱抗性^[14], 据此推断我们所获得的 BAC 克隆含有候选抗病基因。

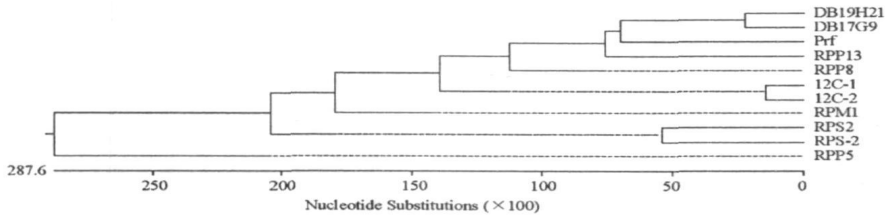


图6 所得序列与9个抗性基因相应片段的聚类分析结果

Fig. 6 The cluster analysis between the obtained sequences and nine resistance gene sequences

3 讨论

NBS 结构域是目前发现的最重要的植物抗病基因保守结构域,有研究者已经证明,据此设计引物可以进行抗病基因同源序列的克隆^[5]。本实验中根据 NBS 保守区所设计的引物,我们成功地扩增到了含有 NBS 保守序列的目的片段,并以该片段作为探针,通过菌落杂交的方法,进一步筛选东乡野生稻可转化大片段基因组文库,得到了阳性的克隆。所得的部分克隆经测序及生物信息学分析,证明其中含有植物抗性基因的 NBS 保守结构域,也说明了此方法的可行性。该方法一次反应即可以筛选一张文库板上的 384 个克隆,可以高通量地筛选克隆数目较多的文库,有效减少文库筛选的工作量。同时,结合所筛选到的点在基因组文库 384 孔板上的坐标,可以直接找到包含有该段 DNA 序列的克隆,此克隆可以直接用于农杆菌介导的水稻转化,这样可以减少育种时间,为我国杂交水稻的分子育种研究提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筭.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学技术出版社,1998.
- [2] 黄运平,覃瑞.野生稻资源的研究与利用[J].湖北农业科学,2002,4:16-19.
- [3] 钟平安,黄英金,陈大洲.东乡野生稻遗传资源的保护及其在育种上的利用[J].江西农业大学学报,2003,25(1):12-16.
- [4] 李春来,张怀渝.植物抗病基因同源序列(RGA)研究进展[J].分子植物育种,2004,2(6):853-860.
- [5] 于澄宇,金平安,薛玮红.候选基因策略在植物遗传学中的应用[J].生物信息学,2004,2(1):25-31.
- [6] 翟文学,王文明,周永力,等.定位克隆水稻抗白叶枯病基因 Xa4 的候选基因[J].云南大学学报(自然科学版),1999,S3:33.
- [7] Zhong D B, Luo L J, Ying C S. Advances on Transferring Elite Gene from Wild Rice Species into Cultivated Rice[J]. Chinese J. Rice Sci., 2000, 14(2):103-106.
- [8] 成志伟,曹筑荣,陈良碧,等.东乡野生稻二元细菌人工染色体(BIBAC)文库的构建[J].生物技术通报,2006,28(2):272-275.
- [9] Ori N, Eshed Y, Paran I, et al. The I2C Family from the Wilt Disease Resistance Locus I2 Belongs to the Nucleotide Binding, Leucine-rich Repeat Super Family of Plant Resistance Genes[J]. The Plant Cell, 1997, 9(4):521-532.
- [10] Gregory J, Lawrence E, Jean F, et al. The L6 Gene for Flax Rust Resistance is Related to the Arabidopsis Bacterial Resistance Gene RPS2 and the Tobacco Viral Resistance Gene N[J]. The Plant Cell, 1995, 7(8):1195-1206.
- [11] Tao Y, Yuan F, Leister R T, et al. Mutational Analysis of the Arabidopsis Nucleotide Binding Site-leucine-rich Repeat Resistance Gene RPS2[J]. The Plant Cell, 2000, 12(12):2541-2554.
- [12] Shanrai S N. Plant Resistance Genes: Molecular and Genetic Organization, Function and Evolution[J]. Zh. Obshch. Biol., 2003, 64(3):195-214.
- [13] Salmeron J M, Oldroyd G E, Rommers C M, et al. Tomato Prf is a Member of the Leucine-rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes and Lies Embedded within the Pto Kinase Gene Cluster[J]. Cell, 1996, 86(1):123-133.
- [14] Liu S P, Li X, Wang C Y, et al. Improvement of Resistance to Rice Blast in Zhenshan 97 by Molecular Marker-aided Selection[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(11):1346-1350.
- [15] 刘继海,程在全,杨明攀,等.云南3种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析[J].中国农业科学,2003,36(3):273-280.