

白菜 -1,3- 葡聚糖酶基因 cDNA 的克隆及序列分析

王彦华^{1,2} 侯喜林^{1*} 史公军¹

(¹ 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; ² 河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

摘要: 以白菜抗霜霉病品种‘雪克青’ cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术, 获得了 1032 bp 的 -1,3- 葡聚糖酶基因的 cDNA 序列。序列分析表明, 克隆的 -1,3- 葡聚糖酶基因 cDNA 序列编码 343 个氨基酸, 与芜菁 *bg1* 基因具有 98 % 的同源性, 与拟南芥 *bg2* 基因具有 84 % 的同源性。在 GenBank 中登录号为 AY395720。

关键词: 白菜; 霜霉病; PR 蛋白; -1,3- 葡聚糖酶基因

中图分类号: S 634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 05-0670-03

Cloning and Sequence Analysis of Beta-1,3-glucanase Gene cDNA in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*

Wang Yanhua^{1,2}, Hou Xilin^{1*}, and Shi Gongjun¹

(¹ National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: The beta-1,3-glucanase gene cDNA sequence were cloned using RT-PCR with cDNA isolated from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* ‘Xuekeqing’, which displayed resistances to downy mildew. Sequencing result indicated that cloned fragment of beta-1,3-glucanase gene encode a peptide containing 343 amino acids. The further comparison to turnip beta-1,3-glucanase (*bg1*) gene and *Arabidopsis thaliana* beta-1,3-glucanase (*bg2*) gene showed that identity was 98 % and 84 %, respectively. As a result, the sequence was accepted and released by GenBank (accession number AY395720).

Key words: *Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino; Downy mildew; Pathogenesis-related proteins; Beta-1,3-glucanase gene

1 目的、材料与方法

植物在受到病原菌侵染后会积累一些新的蛋白质, 被称为病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins), 简称 PR 蛋白。烟草中已报道了 5 大类至少 14 种 PR 蛋白, 部分 PR 蛋白性质已经比较清楚。PR-2 蛋白中已经鉴定出 4 种血清学相关的 PR 蛋白, 具有 -1,3- 葡聚糖酶活性。-1,3- 葡聚糖酶一方面和几丁质酶协同作用抑制真菌生长, 另一方面可以从寄主或病原物细胞壁释放出葡萄糖片段作为信号分子, 激发寄主的防卫反应^[1]。现已从烟草、番茄、拟南芥、水稻、大麦、小麦、玉米、马铃薯等植物中克隆了几十个 -1,3- 葡聚糖酶基因^[2], 成为植物抗性改良基因工程中非常重要的基因资源。

白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 霜霉病是由专性寄生菌 (*Peronospora parasitica* Pers. Fr) 引起的破坏性极强的病害, 选用抗病品种是解决这一病害的最有效途径。本研究参照已发表的芜菁 -1,3- 葡聚糖酶基因序列设计特异引物进行 RT-PCR 扩增, 获得了白菜 -1,3- 葡聚糖酶基因的

收稿日期: 2004-01-12; 修回日期: 2004-04-01

基金项目: 高等学校博士点科研基金项目 (20030307021); 国家“863”计划项目 (2003AA207120)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hxl@njau.edu.cn)

cDNA 序列, 并对其进行序列分析, 为进一步探讨白菜抗霜霉病分子机制奠定基础。

供试材料为白菜抗病品系‘雪克青’, 由南京农业大学白菜课题组提供。将种子播种于装有灭菌基质的穴盘中, 在人工气候箱中培养(光照 12 h, 黑暗 12 h, 20 ~ 25 ℃)。待幼苗长至两片真叶时接种霜霉病菌, 于接种后 48 h 提取叶片 RNA。

采用 TRIZOL (MD Bio) 法提取总 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

特异引物设计参照已发表的茼蒿 *bg1* 基因序列 (Accession number, X77990), 上游引物位于 +30 ~ +49: 5'-ATGTTAGCATCATCAACCAAT-3', 下游引物为 +1039 ~ +1058 的反向序列: 5'-TTAGTTAAACTTAACACCAT-3', 预期片段为 1029 bp 的 *bg1* 的编码序列 (CDS)。RT 反应参照大连 TaKaRa 生物公司的 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 试剂盒说明书进行。以单链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体积为 20 μ L, 其中含有 1 \times PCR Buffer, 50 ng 模板 cDNA, 200 μ mol L^{-1} dNTPs, 2.0 mmol L^{-1} $MgCl_2$, 0.5 μ mol L^{-1} 特异引物, 1 U Taq 酶, 反应在 PTC-100 PCR 仪上进行。扩增程序为: 94 ℃ 3 min, 1 个循环; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 保存。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳, UVP 凝胶成像分析系统进行拍照及分析。

扩增的特异片段按照 Vitagene DNA 凝胶回收试剂盒 (genebase 公司) 的使用说明进行回收。回收的目的 DNA 片段连接到 pMD 18-T 载体 (TaKaRa) 上。连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109, 涂布于含 Amp (100 μ g L^{-1})、IPTG、X-gal 的 LB 平板上。37 ℃ 培养 12 ~ 14 h 后进行蓝白斑筛选。挑取白斑接种于 3 mL LB (含 100 μ g L^{-1} 氨苄青霉素) 液体培养基中。37 ℃ 200 r \cdot min $^{-1}$ 振荡培养过夜。参照文献 [3] 的方法提取质粒。取纯化质粒 1 μ L (50 ng) 作为模板, 用上述特异引物在相同条件下进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小。

序列测定由上海申能博彩生物科技公司在 ABI 377 测序仪上进行, 相似性比较在 NCBI 站点上用 BLAST 完成。开放阅读框 (ORF) 在 NCBI 站点上用 ORF finder 进行分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。从图 1 可以清晰地看到 28 S 和 18 S rRNA 两条主带, 跑在最前面的 5 S rRNA 也隐约可见。以上结果说明利用 TRIZOL 试剂提取的总 RNA 纯度较高, 无明显降解, 其完整性符合试验要求。

正常情况下, -1,3- 葡聚糖酶在植物体内只有低水平的组成型表达, 植物在病原真菌入侵后 -1,3- 葡聚糖酶在细胞内积累增加^[2]。有报道青花菜在接种霜霉病菌后 3 d, 其体内的 -1,3- 葡聚糖酶活性达到最高^[4], 但编码蛋白的 mRNA 的高峰应早于酶活性高峰, 故接种霜霉病菌后 48 h 提取叶片总 RNA。

2.2 白菜 -1,3- 葡聚糖酶基因 cDNA 的 RT-PCR 扩增

以‘雪克青’白菜接种霜霉病菌后 48 h 的 cDNA 为模板, 利用一对特异引物进行 PCR 扩增, 同时以未转录的 mRNA 为模板设置对照。从图 2 中可见, 接种后 48 h 的材料中扩增出了一条约 1 kb 的条带, 而对照则无扩增产物。

2.3 重组质粒的 PCR 鉴定

PCR 产物纯化后与 pMD 18-T 载体连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109, 蓝白斑筛选后,

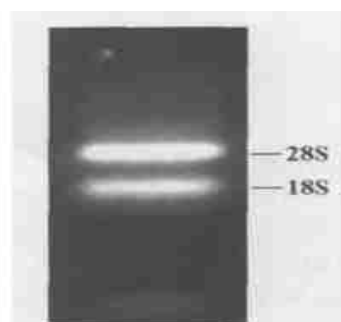


图 1 总 RNA 的琼脂糖电泳

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA

以纯化的阳性重组质粒为模板，以相同的引物在同样的条件下进行 PCR 扩增。从图 3 中可以看出，重组质粒 PCR 产物与目的片段大小完全相同，表明目的片段已克隆成功。

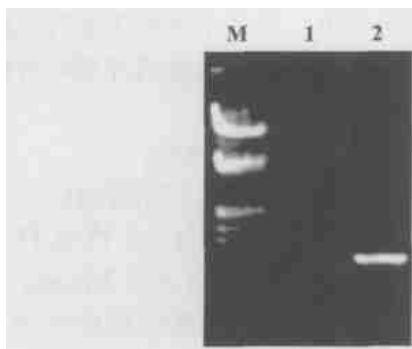


图 2 RT-PCR 产物的电泳结果

M: DNA/ *EcoR* + *Hind* ; 1. 对照;

2. 接种霉病菌后 48 h 总 RNA 的 RT-PCR 产物。

Fig. 2 Electrophoresis analysis of RT-PCR product

M: DNA/ *EcoR* + *Hind* ; 1. Control; 2. RT-PCR product of total RNA isolated at 48 h after inoculation with *P. parasitica*.

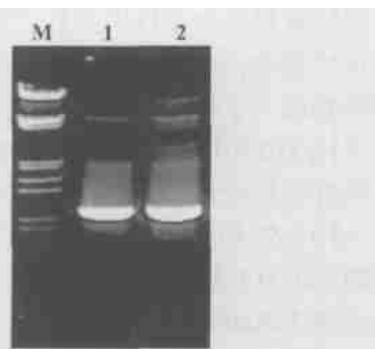


图 3 重组质粒的 PCR 分析

M: DNA/ *EcoR* + *Hind* ; 1, 2. 重组子的 PCR 产物。

Fig. 3 PCR analysis of the recombinant plasmids

M: DNA/ *EcoR* + *Hind* ;

1, 2. PCR products of recombinant plasmids.

2.4 白菜 - 1,3 - 葡聚糖酶基因 cDNA 序列的分析

阳性克隆经过双向测序，得到了一个由 1032 个核苷酸组成的 - 1,3 - 葡聚糖酶基因 cDNA 序列。利用 NCBI 站点的 ORF finder 进行 6 种可能的框架分析发现，该 cDNA 片段包含一个完整的编码序列（1 ~ 1029），编码 343 个氨基酸。BLAST 分析结果，该序列与芜菁 - 1,3 - 葡聚糖酶基因 (*bg1*) cDNA 序列的同源性为 98%，氨基酸序列的同源性为 96%；与拟南芥 - 1,3 - 葡聚糖酶基因 (Accession number M 90509、M58462) cDNA 序列的同源性为 84%，氨基酸序列的同源性为 61%。与甜橙 - 1,3 - 葡聚糖酶基因氨基酸序列的同源性为 56%，与李、大豆、葡萄、烟草的同源性在 50% ~ 55%，而与马铃薯、番茄、水稻的同源性为 48%。将该 cDNA 序列提交 GenBank，登记号为 A Y395720。

参考文献：

- 1 王金生. 分子植物病理学. 北京：中国农业出版社，1999. 217 ~ 219
- 2 邢全华，王 斌. 植物葡聚糖酶基因抗病作用的研究进展. 遗传，2002，24（6）：715 ~ 720
- 3 Gaspero G D, Cipriani G. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). Theor. Appl. Genet., 2002, 106: 163 ~ 172
- 4 Ziadi S, Barbedette S, Godard J F, et al. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) - downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. Plant Pathology, 2001, 50: 579 ~ 586

欢迎订阅 2005 年《植物遗传资源学报》

《植物遗传资源学报》季刊，大 16 开本，2005 年由 96 页扩版至 108 页。定价仍为 10 元，全年 40 元。各地邮局发行，邮发代号：82 - 643。国内刊号 CN11 - 4996/S，国际统一刊号 ISSN1672 - 1810。本刊编辑部常年办理订阅手续，如需邮挂每期另加 2 元。地址：北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部。邮编：100081。联系电话：010 - 62186657，62180257，62180279（兼传真）。电子信箱：zwyczyxb2003@sina.com；zwyczyxb2003@163.com