

# 黄瓜 NBS类型抗病基因同源序列的克隆与分析

丁国华<sup>1,2</sup> 秦智伟<sup>1\*</sup> 刘宏宇<sup>1</sup> 周秀艳<sup>1</sup> 池春玉<sup>2</sup> 王志坤<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; <sup>2</sup>哈尔滨师范大学阿城学院, 阿城 150301)

**摘要:** 简要报道利用简并引物从黄瓜基因组 DNA 中分离得到 15 条 NBS 类型 RGA, 登录 GenBank 获得登录编号分别为 AY555482-AY555495 和 AY545993。其中 10 条为可通读序列, 与已报道的甜瓜 RGA 有较高的同源性。

**关键词:** 黄瓜; RGA; NBS

**中图分类号:** S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 04-0638-05

## Analysis and Cloning of NBS Class Disease Resistant Gene Analog in Cucumber

Ding Guohua<sup>1,2</sup>, Qin Zhiwei<sup>1\*</sup>, Liu Hongyu<sup>1</sup>, Zhou Xiuyan<sup>1</sup>, Chi Chunyu<sup>2</sup>, and Wang Zhikun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Horticulture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; <sup>2</sup>Acheng College, Harbin Normal University, Acheng 150301, China)

**Abstract:** Fifteen R-gene analogs of NBS were isolated from genomic DNA of cucumber using degenerate primer PCR, and obtained accession number from AY555482 to AY555495 and AY545993, respectively, in GenBank. Among these RGAs were translatable and showed high similarity with melon's RGAs reported.

**Key words:** Cucumber; RGA; NBS

抗病基因同源序列 (Resistance gene analog, RGA) 是一种存在于植物基因组当中的与至今已分离出来的 30 多个植物抗病基因的某些保守序列有较高同源性的 DNA 片段<sup>[1]</sup>。许多研究证明, 一些 RGA 与抗病基因密切连锁, 甚至就是抗病基因的一部分<sup>[2]</sup>。此外, RGA 标记还具有容易获得、扩增结果稳定和使用费用低廉等优点<sup>[3]</sup>。因此, 分离和克隆植物的 RGA 成为当前人们比较认同的标记、定位和克隆植物抗病基因的策略之一。分离黄瓜的 RGA 不仅有助于筛选黄瓜各种抗病基因的分子标记, 而且通过对黄瓜 RGA 的结构、表达和调控的研究, 将有助于深入阐释黄瓜的抗病机制。当前在瓜类作物中, 仅从甜瓜 (*Cucumis melon* L.) 中分离了 15 个 RGA 片段<sup>[4]</sup>。本文报道了从黄瓜基因组 DNA 中分离获得的 15 个抗病基因同源序列及其初步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及简并引物的设计

选取抗霜霉病黄瓜品种 '津春 4 号' 和 '649' 为材料, 取嫩叶使用 SDS 方法提取基因组 DNA<sup>[5]</sup>。根据抗病基因产物的 NBS 类型保守域的 4 个亚结构域设计 4 条简并引物<sup>[1,4]</sup>, P1 (F): 5'GG NGGNGTNGNAARACNAC3', P2 (R): 5'NARNGCNARNGGNARNCC3', P3 (R): 5'YCTAGTTGTIRAY DATDAYYYTRC3', P4 (R): 5'CCANACRTCTCNARNAC3'。

### 1.2 PCR 反应条件

25  $\mu$ L 反应体系包含 10  $\times$ buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTP 2.5  $\mu$ L, gDNA 模板 (50 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, Forward primer (20  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Reverse primer (20  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Taq

收稿日期: 2004 - 10 - 18; 修回日期: 2004 - 12 - 21

基金项目: 国家 '863' 计划项目 (2002AA207013)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: qinzv1957@yahoo.com.cn)

DNA聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 重蒸水 15  $\mu$ L。Taq DNA聚合酶为 MB I产品。反应程序: 95 预变性 5 min, 94 变性 1 min, 49 退火 30 s, 72 延伸 90 s, 40次循环, 72 延伸 10 min。

### 1.3 PCR扩增产物的克隆、分类和测序

使用 1.5%琼脂糖凝胶和 8%的聚丙烯酰胺凝胶对 PCR产物电泳分离。使用上海华舜生物工程有限公司小量胶回收试剂盒回收琼脂糖凝胶目的带; 按李卫东等<sup>[6]</sup>方法回收聚丙烯酰胺凝胶目的带, 用作模板重新 PCR扩增, 使用琼脂糖凝胶进行电泳和目的带的回收。

使用 TaKaRa公司 pMD18-T载体对回收产物进行连接, 转化 JM109, 蓝白斑筛选, 挑取所有阳性单菌落 (白斑) 摇菌培养, 醋酸铵方法提取质粒。酶切分类: 使用 *Hinf*I *Asu*I *Mae*I和 *Afa*I等四碱基内切酶对提取的质粒分别酶切, 酶切产物使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 根据电泳谱带是否相同进行归类。每类选取 1~2个克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

使用 Blastn和 Blastx在 GenBank数据库中进行同源性序列搜索, 使用 ClustalW进行序列比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜基因组中 NBS类型的 RGA

图 1显示引物组合 P1 + P2、P1 + P3和 P1 + P4在黄瓜津春 4号上均有较好的扩增, 但 P1 + P2组合扩增带与 P1的单引物对照有一定的重复, 未作回收。P1 + P3组合扩增带被回收、克隆, 由于转化效果不佳, 只得到 13个克隆, 其中克隆 p13-12经测序后含有 NBS保守域, 被确定为 C&RGA2。

P1 + P4组合扩增带被回收、克隆, 得到 48个克隆, 经 PCR-PAGE方法 (按简并引物 PCR反应体系和程序, 模板用 1  $\mu$ L菌液代替, 扩增产物进行 PAGE, 使用凝胶图象分析软件标定扩增产物的 bp数量, 有相同 bp数量扩增带的克隆归为一类) 归类后测序, 其中 18个克隆含有 P-loop和 kinase 2保守域, 根据同源性比对, 核苷酸序列同源性达到 97%归为同一类, 分别被确定为 C&RGA 6~15, 具体特征见表 1。

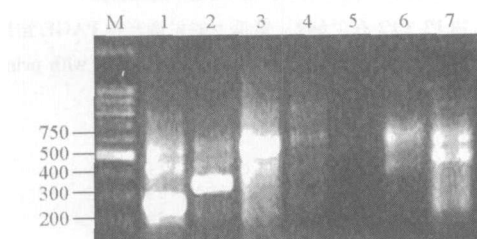


图 1 引物在 '津春 4号' 黄瓜上的扩增结果

Fig. 1 The amplified products with primer on 'Jinchun 4'

1 P1+P4; 2 P1+P3; 3 P1+P2; 4 P4; 5 P3; 6 P2; 7 P1

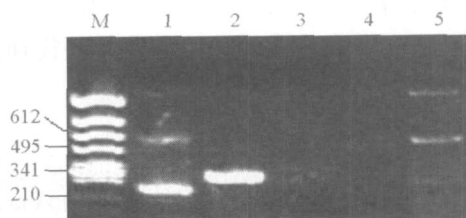


图 2 引物在 '649' 黄瓜上的扩增结果

Fig. 2 The amplified products with primer on '649'

1. P1+P4; 2. P1+P3; 3. P4; 4. P3; 5. P1

图 2显示 P1 + P3和 P1 + P4在黄瓜 '649' 上的扩增结果。其中 P1 + P4组合在 '649' 上有较好的特异扩增, 该带被回收、克隆, 得到 48个克隆, 经酶切和 PCR-PAGE归类后, 选取其中 12个克隆测序, 核苷酸同源性 97%以上为同一类, 分别被确定为 C&RGA1、3和 4, 具体特征见表 1。

为增加分辨率, 将 P1和 P2组合的扩增产物进行 PAGE (图 3), 得到约 530 bp和 870 bp两条双引物扩增带, 回收其中 530 bp带, 使用原引物组合重新扩增、回收并克隆, 获得 72个克隆, 4种四碱基内切酶酶切分类, 共分为 13类, 各取 1个克隆测序, 其中同时含有 P-loop和 HD (即 GLPLAL)保守域结构的克隆 4个, 两端都是 HD结构的 2个, 其余克隆无任何保守域结构。经进一步的序列分析, 发现含有两个保守域结构的克隆序列中没有预想的 kinase 2和 kinase 3a两个特征保守域。重新对 870 bp的条带进行回收克隆, 因转化效果不好, 只得到 11个转化菌落, 其中 p108-7测序后含有所有预想的 NBS保守域, 被确定为 C&RGA5。



使用 Blastx 在 GenBank 上进行同源搜索, C<sub>s</sub>RGA1~11 均与甜瓜 RGA 有最高的得分 (表 2), 说明在 RGA 序列上体现了两者较近的亲缘关系。但全部 C<sub>s</sub>RGA 与甜瓜 RGA 没有出现 100% 的相同率 (identities), 也说明了两者同科不同属的关系。除甜瓜 RGA 外, 上述黄瓜 C<sub>s</sub>RGA 还搜索出大量得分较高的相关序列。其它 5 个 C<sub>s</sub>RGA 均为不完全翻译序列 (内含终止密码)。其中 C<sub>s</sub>RGA10 与甜瓜假基因 NBS-37-4 有 93% 的相同率 (identities = 243/261), 但与其相关的其它序列多数是某些植物叶绿体基因。C<sub>s</sub>RGA13 与黄瓜 *Cucumis sativus* 的一种卫星 DNA (satellite DNA, type IV) 存在 88% 的相同率 (identities = 129/145), 得分为 161 bits。C<sub>s</sub>RGA12 和 15 的所有搜索结果的得分都在 40 以下, 基本没有相近的序列, 应该是黄瓜的未明功能序列。C<sub>s</sub>RGA14 与黄瓜线粒体基因的一个克隆有 50.1 的得分, 但仅比对了其中 68 个核苷酸, 相同率为 92.6% (identities = 63/68), 其余序列与较多植物的某些序列有部分 (20 个左右核苷酸) 的相同率。

表 2 在 GenBank 上 Blastx 得分最高的搜索结果

Table 2 The highest score results of homologous searching on GenBank with Blastx

被检序列 Query sequence	检出序列 Subject sequences	来源 Organism	得分 Score (bits)	期望值 Expect	其它相关序列数量 Total related sequences
C <sub>s</sub> RGA1	NBS-5	<i>Cucumis melo</i>	116	2e-26	101 (80)
C <sub>s</sub> RGA2	NBS-26-2	<i>Cucumis melo</i>	148	3e-35	100 (68)
C <sub>s</sub> RGA3	Putative resistance gene homologue	<i>Cucumis melo</i>	157	3e-38	100 (82)
C <sub>s</sub> RGA4	NBS-26-2	<i>Cucumis melo</i>	148	3e-35	101 (62)
C <sub>s</sub> RGA5	NBS-26-2	<i>Cucumis melo</i>	131	5e-30	100 (97)
C <sub>s</sub> RGA6	NBS-17-5	<i>Cucumis melo</i>	120	8e-27	100 (72)
C <sub>s</sub> RGA7	NBS-42-12	<i>Cucumis melo</i>	95.9	2e-19	103 (48)
C <sub>s</sub> RGA8	NBS-42-12	<i>Cucumis melo</i>	113	9e-25	100 (73)
C <sub>s</sub> RGA9	NBS-42-12	<i>Cucumis melo</i>	159	2e-38	100 (71)
* C <sub>s</sub> RGA10	NBS-37-4 pseudogene, partial sequence	<i>Cucumis melo</i>	375	e-101	185 (105)
C <sub>s</sub> RGA11	NBS-3	<i>Cucumis melo</i>	41.2	0.004	16 (31)
C <sub>s</sub> RGA12	Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	31.6	3.9	3 (28)
* C <sub>s</sub> RGA13	Satellite DNA, type IV	<i>Cucumis sativus</i>	161	8e-37	31 (44)
* C <sub>s</sub> RGA14	Clone B21F mitochondrial genomic sequence	<i>Cucumis sativus</i>	50.1	0.002	85 (38)
* C <sub>s</sub> RGA15	Unnamed protein product	<i>Oryza sativa</i>	40.1	1.2	21 (40)

注: 带 \* 者进行 Blastn 比对。“其它相关序列数量”中括号内数字为最高得分。“期望值”中 e 为自然对数。

Note: The sequence with “\*” blasted by Blastn; The number in the bracket of “Total related sequences” is the highest score. “e” is the natural logarithm.

### 3 讨论

利用抗病基因同源序列克隆抗病基因是当前人们普遍认同的克隆基因的方法<sup>[7,8]</sup>, 但遗憾的是该方法自 1996 年出现至今还没有成功地克隆出抗病基因。尽管如此, 使用图位克隆方法分离出来的玉米抗锈病基因 *Rp1-D*<sup>[1]</sup> 和拟南芥抗霜霉病基因 *RPP8*<sup>[9]</sup> 被用紧密连锁的 RGA 探针从基因组文库中成功地筛选出来, 说明 RGA 在克隆抗病基因方面所具有的潜在能力。RGA 在植物基因组中大量存在, 与抗病基因相关的 RGA 只是其中一部分。不过就现有的 RGA 的研究来看, NBS 类保守域基本只出现在抗病基因当中, 而 STK (PK) 类和 LRR 类的出现比较复杂。为此, 本试验选择了 NBS 保守域为克隆对象, 分离出大量的 RGA, 分析其存在特点, 并希望从中得到与某些黄瓜抗病基因紧密连锁的 RGA 片段。

本研究克隆到了 15 个同时具有特征保守域结构的黄瓜 RGA, 其中具有 4 个完整 NBS 亚保守域结构的克隆只有 C<sub>s</sub>RGA5, 具有其中 3 个亚保守域的克隆也仅有 C<sub>s</sub>RGA2。其余克隆都只有 kinase 1a 和 kinase 2 亚保守域, 克隆片段长度为 250 bp 左右。有关黄瓜 RGA 的研究未见报道, 本试验克隆出的黄瓜完整 NBS 结构的 RGA 的数量相比其它植物低得多, 还需要进一步的试验对该特点加以确认。事实上黄瓜的同属植物甜瓜也存在类似的问题, Brotman 分离到的 14 个甜瓜 RGA 中, 具有完整 NBS 结

构域的片段只有 2 个, NBS-2 和 NBS-7, 其中后者为假基因, 内含终止密码<sup>[4]</sup>。目前还不能断定该特点是否是 *Cucumis* 的共同特征。

15 个黄瓜 RGA 中, 有 10 个为可翻译序列, 其推定产物在 GenBank 上进行同源性比对后, 可以看出与许多抗病蛋白有较高的同源性。表现同源性最高的是与 Brotman 公布的甜瓜 RGA, 其中核苷酸水平上经 DNAMAN4.0 比对, 同源性都在 50% 以上; 比较高的有 C<sub>8</sub>RGA9 与 NBS-42-12 (94%)、C<sub>8</sub>RGA9 与 NBS-17-5 (81%)、C<sub>8</sub>RGA3 与 NBS-23-2 (93%)、C<sub>8</sub>RGA1 与 NBS-1 (91%) 以及 C<sub>8</sub>RGA2, 4, 5 与 NBS-26-2 (89%), 充分反映了两类同属不同种的近缘的亲缘关系。

另外 5 个 RGA 内部存在终止密码, 为不可或不能完全翻译序列。Blast 比对发现 C<sub>8</sub>RGA10 与甜瓜假基因 NBS-37-4 得分达 375 bits, DNAMAN4.0 比对后发现与烟草 *N* 基因有 66% 的同源性<sup>[10]</sup>, 表明了该克隆片段可被确定为抗病基因同源序列 (RGA)。C<sub>8</sub>RGA13 和 14 均与黄瓜自身序列部分同源 (卫星 DNA 和线粒体基因组序列), 有可能不属于 RGA 类序列。C<sub>8</sub>RGA12 和 15 没有同源性高的已知序列, 可部分翻译序列的产物分别与拟南芥和水稻的未知蛋白同源, 因此这两个片段是否属于 RGA 类序列有待确认。

## 参考文献:

- Collins N C, Webb C A, Seah S, Ellis J G, Hulbert S H Pryor. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, (11): 968 ~ 978
- 秦跟基, 李万隆, 陈佩度. 植物抗病基因结构特征及其类似序列的研究进展. *南京农业大学学报*, 1999, 22 (3): 102 ~ 107  
Qin G J, Li W L, Chen P D. Update of resistance gene sand resistance gene analogs in plants. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1999, 22 (3): 102 ~ 107 (in Chinese)
- 易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 高必达. 植物抗病基因同源序列及其在抗病基因克隆与定位中的应用. *生物技术通报*, 2002, (2): 16 ~ 20  
Yi T Y, Xie B Y, Zhang B X, Gao B D. Application of plant resistance gene analogs in cloning and mapping resistance genes. *Biotechnology Bulletin*, 2002, (2): 16 ~ 20 (in Chinese)
- Brotman Y L, Silberstein I, Kovalski C, Perin C, Dogimont M, Pitrat J, Klingler G A, Thompson R, Perl-Treves. Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 1055 ~ 1063
- 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002. 742 ~ 744  
Wang G L, Fang H J. *Plant genetic engineering* 2nd. Beijing: Science Press, 2002. 742 ~ 744 (in Chinese)
- 李卫东, 孟祥文, 李伟, 刘桂中, 牟巨伟, 吴日文. 一种从银染后聚丙烯酰胺凝胶中回收、克隆 DNA 的方法. *中华医学遗传学杂志*, 1997, 14 (6): 381 ~ 382  
Li W D, Meng X W, Li W, Liu G Z, Mou J W, Wu R W. A method of cloning and extracting DNA in polypropylene gel dyed by silver. *China J. Med Genet*, 1997, 14 (6): 381 ~ 382 (in Chinese)
- Staskawicz B J, Ausubel F M, Baker B J, Ellis J G, Jones J O. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 1995, 268: 661 ~ 667
- Bent A F. Plant disease resistance genes function meets structure. *Plant Cell*, 1996, (8): 1757 ~ 1771
- McDowell J M, Dhandaydham M, Long T A, Aarts M G, Goff S, Holub E B, Dangl J L. Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *A. rabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, (10): 1861 ~ 1874
- Whitham S, Dinesh-Kumar S P, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B. The product of tobacco mosaic virus resistance gene B: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 1994, (78): 1101 ~ 1115