

黄瓜抗病基因类似序列 (RGA) 的同源性分析和 Southern 鉴定

丁国华^{1,2}, 池春玉², 周秀艳¹, 秦智伟^{1*}

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

摘要: 使用 ClustalW 和 DNAMAN 3.0 分析了本实验室克隆的 15 个黄瓜抗病基因类似序列 (RGA) 之间以及与烟草的 *N* 基因、亚麻的 *L6* 基因和拟南芥的 *RPS2* 基因之间的同源性, 并对这些 RGA 进行了 PCR 和 Southern 验证与分析。结果表明: 15 个黄瓜 RGA 中, 核苷酸序列同源性最高的是 C_sRGA2、C_sRGA4 和 C_sRGA5, 其次是 C_sRGA6、C_sRGA7、C_sRGA8 和 C_sRGA9, C_sRGA1 和 C_sRGA3 也存在较高的同源性; 其余的 RGA 同源性较低。在氨基酸序列上也表现了相同的特征。与 *N*、*L6* 和 *RPS2* 等抗病基因的产物之间同源性最高 46%, 最低 22%。根据核苷酸序列设计了 15 对特异引物, 用 PCR 方法验证了所有黄瓜 RGA 的存在, 其中 C_sRGA3 在黄瓜品种间表现出多态性。利用特异引物 PCR 方法合成了 15 个黄瓜 RGA 的地高辛探针, 与 *EcoR* 酶解的黄瓜 '215'、'129' 和 'L18' 的基因组 DNA 进行 Southern 杂交, 证实了各个 RGA 在基因组上的存在, 同时发现, C_sRGA9、C_sRGA11 ~ C_sRGA15 都是多拷贝, C_sRGA3 是单拷贝, 其余为双拷贝。

关键词: 黄瓜; 抗病基因类似序列; 同源性; Southern 杂交

中图分类号: S 642.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 02-0355-06

Southern Identification and Homology Analysis of the Resistance Gene Analog in *Cucumis sativus* L.

DING Guo-hua^{1,2}, CHI Chun-yu², ZHOU Xiu-yan,¹ and QIN Zhi-wei^{1*}

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

Abstract: The homology among fifteen RGA s of cucumber cloned in authors' laboratory and the homology between the RGA s and *N* gene from tobacco, and *L6* gene from flax, and *RPS2* gene from *Arabidopsis* was analyzed using ClustalW and DNAMAN 3.0 program. The fifteen RGA s were identified by PCR and Southern hybridization. The results showed that the highest homology of nucleotide sequence existed between C_sRGA2, C_sRGA4 and C_sRGA5. Higher homology existed between C_sRGA6, C_sRGA7, C_sRGA8 and C_sRGA9, also existed between C_sRGA1 and C_sRGA3. Less homology existed in the other RGA s. The amino acid sequence homologies of the products translated from the RGA s were also similar to the above. The highest homology, 46%, and the lowest homology, 22%, between the RGA s and three novel disease resistance genes, *N*, *L6* and *RPS2*, were exhibited. The RGA s were identified using PCR with fifteen pairs of special primers based on the nucleotide sequence of the RGA s. C_sRGA3 showed polymorphism in cucumber varieties. The fifteen digoxin (DIG) labeling probe, which produced by performing special primer PCR, hybridized with genomic DNA of 215, 129 and L18, digested by *EcoR*, using Southern blot method. The existence of the RGA s in cucumber genome was certified. C_sRGA9, C_sRGA11 - C_sRGA15 had multi copies, respectively, C_sRGA3 had single copy, the others had two copies.

Key words: Cucumber; *Cucumis sativus* L.; RGA; Homology; Southern hybridization

收稿日期: 2006 - 11 - 21; 修回日期: 2007 - 01 - 22

基金项目: 黑龙江省博士后项目 (LSZH-04088); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (C200526)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: qzw303@126.com)

抗病基因类似序列 (resistance gene analog, RGA) 是存在于植物基因组中与已分离出来的 30 多个抗病基因某些保守序列存在较高同源性的 DNA 片段 (易图永 等, 2002)。

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。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 (秦跟基 等, 1999)。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。

本实验室利用黄瓜基因组 DNA 克隆了 15 条 NBS 类型的 RGA (GenBank 登录号为 AY555482 ~ AY555495、AY545993) (丁国华 等, 2005), 其中具有 4 个完整 NBS 亚保守域结构的克隆只有 C₈RGA5, 具有 3 个亚保守域的克隆也仅有 C₈RGA2, 其余克隆都只有 kinase1a 和 kinase2 亚保守域, 克隆片段长度为 250 bp 左右。15 个黄瓜 RGA 中, 有 10 个 (C₈RGA1 ~ C₈RGA9、C₈RGA11) 为可翻译序列, 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。

使用 Blastx 在 GenBank 上进行同源比对, C₈RGA1 ~ C₈RGA11 均与甜瓜 (*Cucumis melon* L.) RGA (Broman et al, 2002) 有最高的得分, 说明在 RGA 序列上体现了两者较近的亲缘关系。但全部黄瓜 RGA 与甜瓜 RGA 没有出现 100% 的相同率 (identities), 也说明了两者的同科不同属的关系 (丁国华 等, 2005)。本文报道对该 15 条 RGA 进一步的同源性分析、PCR 验证和 Southern 杂交鉴定的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

取本室选育的黄瓜感霜霉病品种 ‘L18’ 和抗霜霉病品种 ‘129’ 及其二者的杂交 F₁ 代 ‘215’ 为材料, 取嫩叶用 CTAB 法提取基因组 DNA (王关林和方宏筠, 2002)。

1.2 PCR 反应条件

25 μ L 反应体系包含 10 \times buffer 2.5 μ L, 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 2.0 μ L, 2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2.5 μ L, gDNA 模板 (50 ng \cdot μ L⁻¹) 1 μ L, Forward primer (5 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L, Reverse primer (5 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U \cdot μ L⁻¹) 0.2 μ L, 重蒸水 15 μ L。dNTP 和 Taq DNA 聚合酶为 MB 产品, 引物由上海生工生物工程公司合成。反应程序: 95 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 退火 30 s (退火温度见表 1), 72 延伸 1 min, 35 次循环, 72 延伸 7 min。根据测序结果, 使用 Primer Premier 5.0 给每个 RGA 设计一对特异引物 (表 1), 引物设计位置要避开简并引物扩增的序列, 因此扩增产物的长度短于原克隆长度。

表 1 用于 PCR 和地高辛探针合成的黄瓜 RGA 特异引物

Table 1 Special primers of cucumber RGA for PCR and DIG-probe synthesize

引物名称	引物序列	Primer sequence(5 3)	退火温度	产物长度	
Name	正向	Forward	反向 Reverse	Ta()	Product length (bp)
C8RP1	GA TGCTGCTTCTTCTACAA GAT		GTTAATTCCTCTATCACGAC	46.7	131
C8RP2	GGGTCTGTGTA TGA GCGAA T		GCCTTCCA TTGCCAAAA GAGTT	49.7	287
C8RP3	GCTTTATACAACAAAA TCACT		GTCCACA TTGTCAACCTTC	45.2	156
C8RP4	CTA GGGTCTGTGTA TGA GCGA		TCCAGGACGAGAA GTGTCT	49.0	223
C8RP5	GGGGAA GACGACAA TATGC		CTCCCAACACCTTTACAA TC	49.5	494
C8RP6	GGCCAA GATGGTTTTCAA T		CTTTTTCCTTGCA TCTCCTCT	49.4	193
C8RP7	CTGTTTGGGTTTGTGTCTCT		CTTTGGCCA TGCA TCTTC	47.4	145
C8RP8	GGCAAAA GCA GTTTTCAACC		AA TACCTTTTCCCTTCCAGC	49.3	197
C8RP9	ATCATGAGGAGATCAAAA G		TTTTACCTCGCATCACTTT	45.7	174
C8RP10	GCATGTCGTATCAATGGAA		GATCGGGGAA TGA TTCAAA	47.3	193
C8RP11	TCCCAACA TCAACTCCCT		TTTCTGCA TCCGAACGAC	54.8	147
C8RP12	GGCGGTGTGGAAAACTAC		ACGTCGTCGATACCAAC	47.9	164
C8RP13	CTACTAGACGGCCTCACT		CAATGTA GATGGGTTTCC	48.2	191
C8RP14	CGAGTTGGA TCGGACGC		TGGGACGGAA GGA TTTGA	54.1	190
C8RP15	GGTAAGACTACGTTTATGAGT		CGAGGACCA TAA TCAAA TAC	47.6	148

1.3 Southern 杂交

使用表 1 引物用 PCR 反应法制备探针。选用在所有黄瓜 RGA 中没有酶切位点的 *EcoR* (购自 TaKaRa 公司) 酶切基因组 DNA。

电泳转膜按分子克隆手册进行。杂交的具体步骤按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 试剂盒 (购自 Roche 公司) 的说明进行。

1.4 同源性比对

使用 DNAMAN 3.0 和 ClustalW 进行序列同源性比对分析。

2 结果与分析

2.1 与抗病基因的同源性分析

使用 DNAMAN 3.0 将 10 个可读黄瓜 RGA 的氨基酸序列与烟草的 *N* 基因、拟南芥的 *RPS2* 基因和亚麻的 *L6* 基因等抗病基因的蛋白质产物进行比对, 相似率都比较低 (表 2)。表现较高的是 CsRGA1、CsRGA3 与 *N* 基因、*L6* 基因之间。从相似率的平均值来看也是黄瓜 RGA 与 *N* 基因和 *L6* 基因较与 *RPS2* 基因有更高的相似率。

使用 ClustalW 分别建立上述序列的氨基酸同源性系统树 (图 1)、核苷酸同源性系统树 (图 2) 和氨基酸序列比对图 (图 3)。

比较两个系统树可以看出, 在氨基酸水平上, 所有序列分为 3 类: CsRGA6、CsRGA7、CsRGA8、CsRGA9 和 *RPS2* 为一类; CsRGA1、CsRGA3 和 *L6* 为一类; CsRGA2、CsRGA4、CsRGA5 和 *N* 为一类。CsRGA11 又可以与后两类归在一大类中, 与第一类平行存在。

在核苷酸水平上, 上述分类仍然存在, 5 个不可翻译 RGA 另立一类, 同时也可归入到所在的第一类中, 当然, 相互之间的同源性依然很低。使用 ClustalW 对上述序列的氨基酸序列进行逐个比较 (图 3), 被归在同一类的序列有较多的相同氨基酸。如 *L6* 与 CsRGA1 和 CsRGA3 的第 9、10、11、13、114、15、16、20、23、24、25、30、37、39、41、42、44、45 位的 20 多个氨基酸完全相同 (不

表 2 黄瓜 10 个 RGA 与 3 个已知抗病基因产物的相似率

Table 2 The similarities between ten cucumber RGAs and 3 known genes (%)

RGA class	<i>N</i>	<i>L6</i>	<i>RPS2</i>
CsRGA1	46	40	26
CsRGA2	33	29	22
CsRGA3	32	47	25
CsRGA4	33	29	23
CsRGA5	31	26	22
CsRGA6	25	19	32
CsRGA7	29	25	30
CsRGA8	31	29	32
CsRGA9	34	32	32
CsRGA11	33	34	25
平均值 Mean	32.7	31	26.9

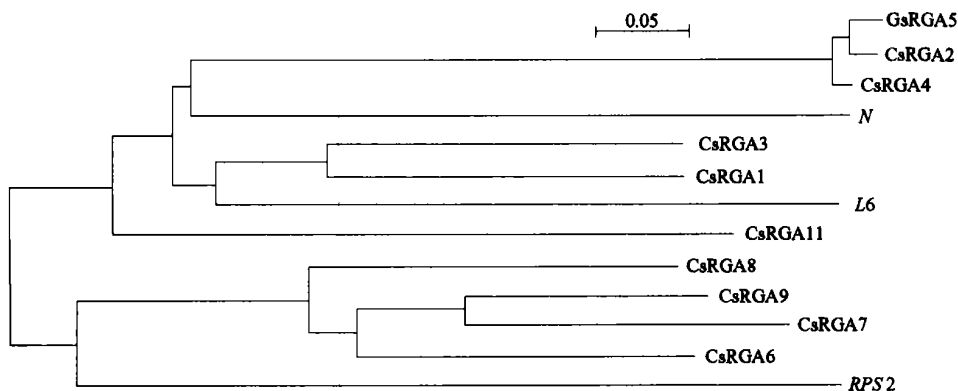


图 1 使用 ClustalW 进行氨基酸序列比对的树型图

Fig 1 The phylogenetic tree of amino acid sequence constructed by ClustalW program

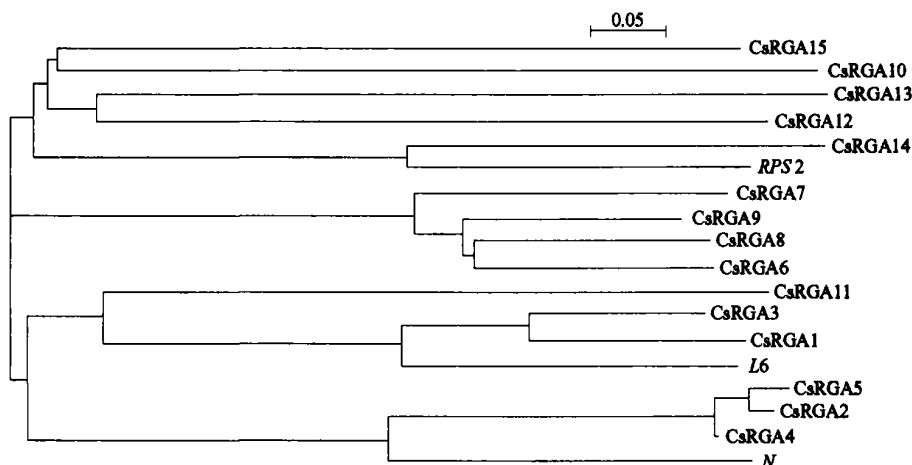


图 2 使用 ClustalW 进行核苷酸序列比对的树型图

Fig 2 The phylogenetic tree of nucleotide sequence constructed by ClustalW program

CsRGA1	GGVGKTTAKALYNKIAT----	QFEGCCFLQDVRREASKH--GLVQLQETLLNEILKE
CsRGA3	GGVGKTTAKALYNKITY----	QFEACCFLSNVRETSEQFN--GLVQLQEKLLNEIFKD
L6	GGIGKTTAKAVYNKISS----	CFDCCCFIDNIRETQEKD--GVVVLQKKLVSEILRI
CsRGA2	GGVGKTTIARVCYERIRD----	EFEAHCFLSNVRENYIRTGLNLSCLQTKLLSSMFS-
CsRGA5	GGVGKTTIARVCYERIRD----	EFEAHCFLSNVRENYIRTGLNLSCLQTKLLSSMFS-
CsRGA4	GGVGKTTIARVCYERIRG----	EFEAHCFLSNVRENYIRTGLNLSCLQTKLLSSMFS-
N	GGVGKTTIARAIFDTLLGRMDSSYQFDGACFLDKIKENKR----	GMHSLQNALSELLR-
CsRGA11	GGVGKTTLSKALFNHFFH----	FFNSRSFLPNINSLSTSSPDGLLRLLQQTLLSLLIA
CsRGA7	GGVGKTTLC-----	DKTVWVCVSEPFIV-----NKILLDILQNLKGT
CsRGA9	GGVGKTTAKTIFNHEEIKRH----	FDETIWICVSEPFIL-----NKILGAILQMIKG-
CsRGA6	GGVGKTTAKMVFNHDAIKGH----	FDKTVWVCVSKPFIV-----MKILEAIFQGLTN-
CsRGA8	GGVGKTTLAKAVFNHELVIH----	FDETIWVCVATFDE-----KKILRAILESILT-
RPS2	GGVGKTTLMQSINNELITKGHQ----	YDVLIIWVTMSREFGE-----CTIQQAVGARLGLS
	** : ****	: : :
CsRGA1	D-LKVI--VSRDRGINIIRSRLCSKKVLIVLDDVW-----	
CsRGA3	N-NLKV--DNVDKGMNIIKDRLCPRKVLMLVDDVW-----	
L6	D-SGSGVGFNDSGGKRTIKERSRFKILVVLDDVDEKFK--FEDMLGSPKDFISQSRFIIT	
CsRGA2	--LKNNHIMDVEEGTAMINKAIFRKKTLVLDDVDSSDQ--IKGLIPDNNSFGNGSKVIVT	
CsRGA5	--LKNNHIMDVEEGTAMINKAIFRKKTLVLDDVDSSDQ--IKGLIPDNNSFGNGSKVIVT	
CsRGA4	--LKNNHIMDVEEGTAMINKAIFRKKTLVLDDVW-----	
N	--EKANYNNE-EDGKHQMASRLRSKKVLIVLDDIDNKHYLELAGDLDFWNGSGRIIIT	
CsRGA11	TNLSRSSTTTDSTVVRMQERLQNKVLVLDDVW-----	
CsRGA7	---ISNGGDSKEVLLRELQKKMHGQRYFLVLDDVW-----	
CsRGA9	---VSSGLDNKEVLLQELQKVMRGKRYFLVLDDVW-----	
CsRGA6	---TSSGLNSREALNRLREEMQKKRYFLVLDDVW-----	
CsRGA8	---FPSGLDSKDAILRRLQKELEGKRYFLVLDDVW-----	
RPS2	---WDEK-ETGEGRAFKIYALKQRRLVLLDDVWEEIDLKTVPRPDRENCKVMFTT	
	: : : : : ****:	
L6	SRSMRVLGTLNENQCKLYEVGSMKPSLELFS-KHAFKKNTPPSYETLANDVDDTTAG	
CsRGA2	TR-----	
CsRGA5	TRNADFL-SNEFGVKRIFEMDELKYEEALQLLS--LSAFMKTCPKEGYLEHSSKIVKVVGG	
N	TRDKHLI-EKN---DIIEYVTALPDHESIQLFK-QHAFGKEVPNENFEKLSLEVNNYAKG	
RPS2	RS--MALCSKMGAECKLRVDFLEKQYAWELFCGKLGRRDLLESPLIRRAETIVTKCGG	
L6	LPLTL	
CsRGA5	LPLAL	
N	LPLAL	
RPS2	LPLAL	

图 3 黄瓜 10 个 RGAs 与 N、RPS2 和 L6 基因的氨基酸同源性

‘ * ’ 为单个完全保守氨基酸位置；‘ : ’ 为强保守集团的位置；‘ - ’ 为空白。

Fig 3 Homology of amino acids among 10 RGAs of cucumber, N, RPS2 and L6 genes

‘ * ’ indicates positions which have a single, fully conserved residue; ‘ : ’ indicates positions which belong to a strong conserved group; ‘ - ’ means gaps

包括两端保守域), 而在保守域 P-loop 中 L6 的氨基酸序列是 GGIGKTT 而不是 GGVGKTT。RPS2 与黄瓜 RGA 之间的相同氨基酸序列较少, 仅在 6 个表注 ' : ' 位置与 CsRGA6、CsRGA7、CsRGA8 和 CsRGA9 有完全相同的氨基酸。N 基因与 CsRGA2、CsRGA4 和 CsRGA5 之间可以找到较多的相同氨基酸序列, 如不在引物扩增范围内的第 8、9、10 位都是 I (异亮氨酸)、A (丙氨酸) 和 R (精氨酸) 序列, 在 kinase 2 保守域, N 有一个 LDD D 而不是 LDDVD 的单个氨基酸的差异, 在 kinase 3a 保守域, CsRGA2 有一个 MTIR 而不是 IITIR 的单氨基酸差异。值得注意的是, 在 kinase 3a (IITIR) 和 HD (GLPLAL) 两个保守域之间, 被比对的所有序列片段基本没有相同的氨基酸序列, 反映了此区段的高度变异特征。

使用 ClustalW 还进行了黄瓜 RGA 和甜瓜 RGA 之间的氨基酸序列比对 (图 4), 多数甜瓜的 RGA 与黄瓜相应类别的 RGA 有同类关系, 但 AF354504 和 AF354513 有较大的离散距离, AF354515 和 AF354517 也有一定的离散, 反映出克隆的甜瓜 RGA 比较丰富, 或者被克隆出 RGA 比较全面。

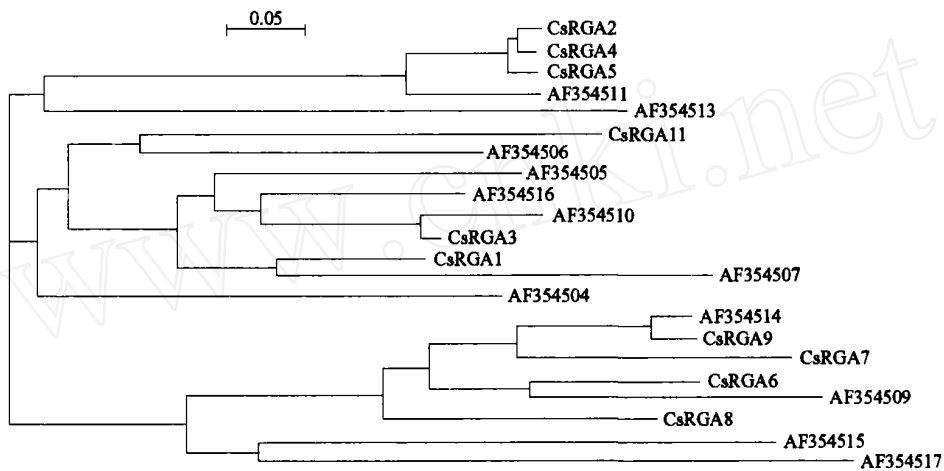


图 4 使用 ClustalW 进行黄瓜和甜瓜 RGA 氨基酸同源性比对的树型图

Fig 4 The phylogenetic tree of RGA amino acid of cucumber and melon constructed by ClustalW program

2.2 黄瓜基因组 DNA 中 RGA 的 PCR 鉴定

用特异引物 (表 1) 在包括克隆供体在内的 11 个主要黄瓜品种的基因组 DNA 中进行 PCR 扩增。

图 5 显示, 15 个被克隆的 RGA 中, 只有 CsRGA3 在 L18 和津春 4 号中没有扩增, 其他品种均出现特定扩增产物, 显示多态性; 其余 CsRGA 在 11 个黄瓜品种均有扩增, 说明其在基因组 DNA 中存在。

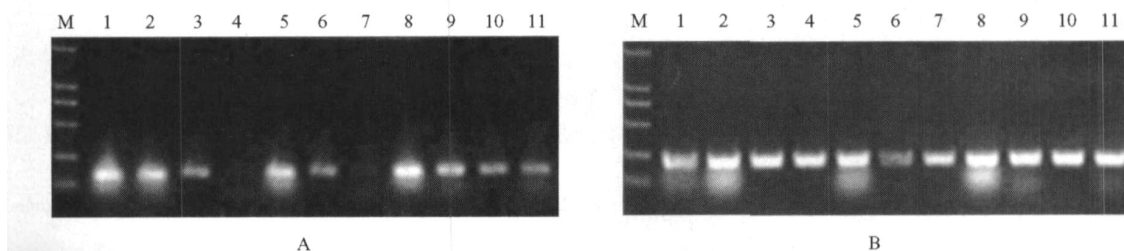


图 5 CsRGA3 (A) 和 CsRGA2 (B) 在 11 个黄瓜品种中 PCR 扩增

M. DL 2000; 1. 长春密刺; 2. D0120; 3. 津绿 5 号; 4. L18; 5. 651;

6. 津春 3 号; 7. 津春 4 号; 8. 中农 208; 9. 649; 10. 129; 11. 1058。

Fig 5 PCR amplified products with CsRGA3 (A) and CsRGA2 (B) on 11 cucumber varieties

M. DL 2000; 1. Changchunmici; 2. D0120; 3. Jinlǚ5; 4. L18; 5. 651;

6. Jinchun 3; 7. Jinchun 4; 8. Zhongnong 208; 9. 649; 10. 129; 11. 1058

2.3 黄瓜 RGA 的 Southern 杂交鉴定

图 6 是黄瓜 RGA 的 Southern 杂交的其中 6 个图谱。根据杂交结果可知, 黄瓜 15 个 RGA 在黄瓜基因组 DNA 上以多拷贝存在的分别是 C_sRGA9、C_sRGA11~C_sRGA15, 以 3 个拷贝存在的是 C_sRGA8, 以双拷贝存在的是 C_sRGA1、C_sRGA2、C_sRGA4~C_sRGA7 和 C_sRGA10, 只有 C_sRGA3 以单拷贝的形式存在 (图中未显示)。

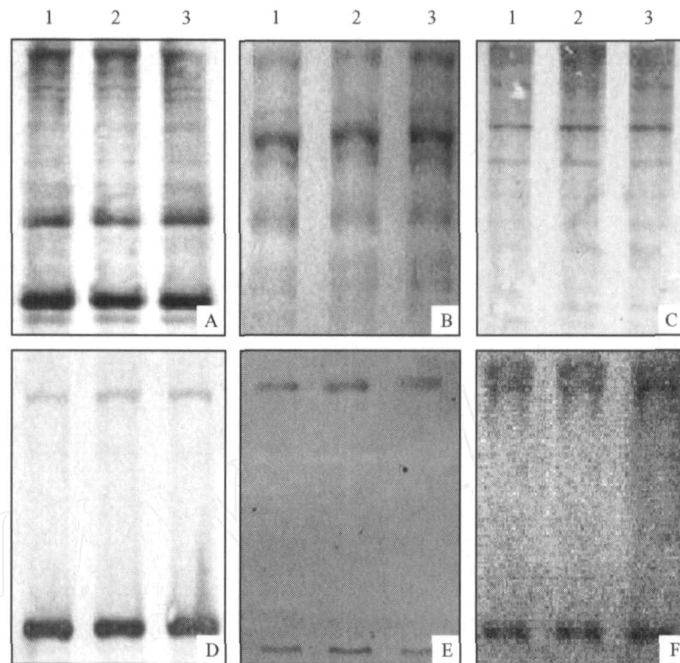


图 6 部分黄瓜 RGA 的 Southern 杂交图谱

1、2、3 泳道分别是 ‘L18’、‘215’ 和 ‘129’ 的 DNA; A~F 分别是 C_sRGA12、C_sRGA11、C_sRGA14、C_sRGA10、C_sRGA5 和 C_sRGA8 的探针杂交图。

Fig. 6 Southern hybridization patterns of the partial RGA of cucumber

Lanes of 1, 2 and 3 represent DNA of variety ‘L18’, ‘215’ and ‘129’, respectively; A - F pictures represent hybridizing results of probes of C_sRGA12, C_sRGA11, C_sRGA14, C_sRGA10, C_sRGA5 and C_sRGA8, respectively.

References

- Broman YL, Silberstein I, Kovalski C, Perin C, Dogimont M, Pitrat J, Klingler GA, Thompson R, Perl-Treves 2002. Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance. *Theor Appl Genet*, 104: 1055 - 1063.
- Ding Guo-hua, Qin Zhi-wei, Liu Hong-yu, Zhou Xiu-yan, Chi Chun-yu, Wang Zhi-kun 2005. Analysis and cloning of NBS class disease resistant gene analog in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 638 - 642. (in Chinese)
- 丁国华, 秦智伟, 刘宏宇, 周秀艳, 池春玉, 王志坤. 2005. 黄瓜 NBS 类型抗病基因同源序列的克隆与分析. *园艺学报*, 32 (4): 638 - 642.
- Qin Gen-ji, Li Wan-long, Chen Pei-du 1999. Update of resistance gene and resistance gene analogs in plants. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 22 (3): 102 - 107. (in Chinese)
- 秦跟基, 李万隆, 陈佩度. 1999. 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*, 22 (3): 102 - 107.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun 2002. *Plant genetic engineering* (2nd). Beijing: Scientific Press: 742 - 744. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2002. *植物基因工程* (第二版). 北京: 科学出版社: 742 - 744.
- Yi Tu-yong, Xie Bing-yan, Zhang Bao-xi, Gao Bi-da 2002. Application of plant resistance gene analogs in cloning and mapping resistance genes. *Biotechnology Bulletin*, (2): 16 - 20. (in Chinese)
- 易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 高必达. 2002. 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*, (2): 16 - 20.