

# TcLr35 小麦 $\beta(1\ 3;1\ 4)$ 葡聚糖苷酶基因 cDNA 全长的克隆及分析

王海燕,刘大群,杨文香,李在峰,张立荣,李 星

(河北农业大学 植物保护学院,河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,河北 保定 071001)

**摘要:** 根据已发表的植物  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  葡聚糖苷酶基因设计引物,利用 RT-PCR 和 RACE 技术,从被小麦叶锈菌诱导的小麦抗叶锈病基因近等基因系材料 TcLr35 中获得一个  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  葡聚糖苷酶基因 cDNA 全长,命名为 PR34,该基因全长序列为 1 416 bp,具有一个编码 335 个氨基酸的开放阅读框(ORF),其起始密码子 ATG 位于 13 bp 处,终止密码子 TAG 位于 1 015 bp 处,3'末端有 20 bp 的 poly(A) 尾,379 bp 的 3'非翻译区。与 GenBank 中小麦、大麦等多个葡聚糖苷酶基因具有较高同源性;对其推断的氨基酸序列进行分析,含有 Glyco\_hydro\_17 保守结构域,为葡聚糖苷酶基因蛋白结构域。Southern 杂交显示,该基因在 TcLr35 小麦基因组中为低拷贝。

**关键词:** 小麦;  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  葡聚糖苷酶; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q78; S432.44 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0025-05

## Cloning and Characterization of $\beta(1\ 3;1\ 4)$ Beta Glucanase Gene from TcLr35 Wheat

WANG Hai-yan, LIU Da-qun, YANG Wen-xiang, LI Zai-feng, ZHANG Li-rong, LI Xing

(Biological Control Center of Plant Disease and Plant Pests of Hebei Province, College of Plant  
Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** One pair of primer was designed based on the  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  beta glucanase, a full length wheat  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  beta glucanase gene was obtained by RT-PCR and RACE from the RNA of TcLr35 carrying the Lr35 gene conferring resistance against wheat leaf rust induced by the *Puccinia triticina* named PR34, which was 1 416 bp in length, and included one complete open reading frame encoding 335 amino acids, a 379 bp 3' untranslated region(3' UTR) and 29 bp poly(A) tails. The initiation codon and stop codon were found in 13 bp locus and 1 015 bp locus respectively. The deduced amino acid sequence showed close homology to beta glucanase proteins which have been isolated from wheat, barley and many other plants. The deduced amino acids contained Glyco\_hydro\_17 conserved domains which was related to beta glucanase. Southern blot indicated that the TcLr35 genome contained low copies of PR34 gene.

**Key words:** Wheat;  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  beta glucanase; Gene cloning; Sequence analysis

小麦是世界范围内重要的粮食作物。由专性寄生真菌小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)引起的小麦叶锈病严重危害小麦生产,在世界各地均有发生<sup>[1,2]</sup>。因此,深入研究小麦抗叶锈病遗传,尤其是抗叶锈病基因的分析,对于抗病育种及抗病品种合理布局具有十分重要的指导意义。然而,由于小麦基因组庞大,结构复杂,目前仅有 Lr10<sup>[3]</sup>, Lr21<sup>[4]</sup>, Lr1<sup>[5]</sup>, Lr34<sup>[6]</sup>已成功克隆,很少的防卫反应基因被

克隆和分析<sup>[7]</sup>。这极大限制了小麦抗性机制的深入研究和抗性资源的充分利用,因此对小麦抗性相关基因的克隆和分析是十分必要的。病程相关蛋白(Pathogenesis-related protein, PRP)基因是一类参与植物的生长发育,但在抗病性诱发过程中被赋予抗病防卫意义的基因。 $\beta(1\ 3;1\ 4)$  葡聚糖苷酶基因是一种 PR-蛋白,是植物受到病原菌侵染后细胞发生程序性死亡的同时,自身释放出胞液中储存的有

收稿日期: 2010-07-03

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2008000281; 2010000702); 河北省教育厅课题(Z2007408; 2009130); 国家自然科学基金(30700505)

作者简介: 王海燕(1977-),女,河北遵化人,副教授,博士,主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者: 刘大群(1958-),男,河北石家庄人,教授,博士,主要从事分子植物病理学研究。

害物质中的一种。葡聚糖酶可单独或与几丁质酶一起抑制真菌的生长,二者通过降解真菌细胞壁的主要组分 $\beta$ -葡聚糖和几丁质使真菌菌丝体顶端的细胞壁逐渐变薄,从而导致菌丝体顶端膨胀、破碎,最终死亡<sup>[8]</sup>。鉴于 PR 蛋白与植物抗病性的关系,有关 PR 蛋白及其基因表达调控的研究颇受重视。从分子水平研究 PR 蛋白的功能及其编码基因的表达,并与植物抗病育种紧密结合,必将对病原物和植物寄主之间的相互作用机制的认识,以及植物抗病育种都具有十分重要的作用。本研究拟利用 RT-PCR 和 RACE 技术,从被小麦叶锈菌诱导的小麦抗叶锈病基因近等基因系材料 TcLr35 中筛选  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  葡聚糖苷酶基因 cDNA 全长,对基因结构及分布进行分析,以期深入研究寄主-病原物相互作用的分子机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为携带小麦抗叶锈病基因 *Lr35* 的回交 6 代近等基因系材料 TcLr35 及其感病亲本 Thatcher; 供试小麦叶锈菌菌株为 99-5-49-4,该菌株对 Thatcher 表现高毒力,对 TcLr35 表现无毒力。以上材料均由河北农业大学小麦锈病研究室收集保存。

### 1.2 小麦叶片总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

小麦在温室生长至六叶期接菌鉴定,剪取叶片,总 RNA 提取采用上海生工生物工程有限公司的 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒。用紫外分光光度计检测 RNA 浓度,并用琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。以 M-MLV 反转录酶参照说明书反转录获得 cDNA 第一链。

### 1.3 RT-PCR 扩增

以携带小麦抗叶锈病基因 *Lr35* 近等基因系材料 TcLr35 及其感病亲本 Thatcher cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。根据已发表的小麦  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  葡聚糖苷酶基因序列<sup>[9]</sup>,设计合成一对特异引物 PR-3: 5'-TGTCTGCTCTGGCATTGC-3'; PR-4: 5'-CTGTCCTTCTGTTCTCGTTG-3'。反应体系为 25  $\mu$ L 反应体积包含 1  $\times$  PCR Buffer, 200  $\mu$ mol/L dNTP, 200 ng 引物 3  $\mu$ L cDNA 和 1.5  $\mu$  Taq DNA 聚合酶。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,采用 TaKaRa 公司的 PCR fragment recover kit 回收纯化扩增目的片段,连接到 pGEM-T Easy 载体 (Promega),进行克隆测序。

### 1.4 3'RACE

以小麦  $\beta(1\ 3;1\ 4)$  葡聚糖苷酶基因片段 PR34 为靶序列,在其 3'末端设计 2 条正向基因特异引物,用于第一轮 PCR 和巢式 PCR 扩增。引物序列为: PRF3: 5'-TACGGGTACCAGAACCTGTTGCAC-3' (659 ~ 683 bp); PRF4: 5'-AACGCCAGGATCTACAACCAG-TACCT-3' (797 ~ 823 bp)。使用 BD clontech 公司的 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒,进行 3'-cDNA 末端扩增。50  $\mu$ L 反应体系中含有 5  $\mu$ L RACE cDNA 合成产物, 2  $\mu$ L 特异性引物 (10 mmol/L), 5  $\mu$ L UPM, 1  $\mu$ L dNTP Mix (各 10 mmol/L), 5  $\mu$ L 10  $\times$  Advantage 2 PCR Buffer, 1  $\mu$ L Advantage 2 Polymerase Mix, 34.5  $\mu$ L DD-H<sub>2</sub>O。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 30 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。巢式 PCR 以第一轮 PCR 产物 10 倍稀释液为模板,提高退火温度为 68 $^{\circ}$ C,其余同第一轮 PCR 扩增。

### 1.5 全长基因的扩增

根据拼接获得的全长序列,分别在其两端设计引物,扩增全长基因。引物序列为: PPF4: 5'-CGC-CTAACGACGTGCTCTCCAACC-3'; PPR4: 5'-CGCAC-CCCAACCCAAGCCCTGTA-3'。

### 1.6 测序与序列比较

测序委托 TaKaRa 公司完成。将获得的 cDNA 序列与 GenBank 中的序列进行比较和分析,寻找开放阅读框,并推导氨基酸序列。利用 NCBI 和 DNASTAR 等软件进行蛋白结构同源性及功能比较分析。

### 1.7 Southern 杂交

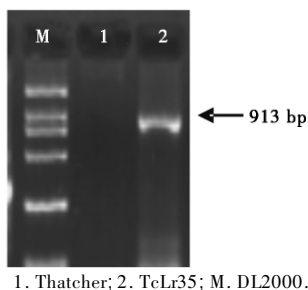
将小麦抗叶锈病近等基因系材料 TcLr35 基因组 DNA 用 2 种限制性内切酶 *Pst* I、*Eco*R I 完全消化,在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离,并转到 Hybond-N + 尼龙膜上,按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit Version I (Roche) 说明书用 DIG-High Prime 标记克隆的 cDNA 片段,以此作为探针,65 $^{\circ}$ C 杂交过夜。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\beta(1\ 3;1\ 4)$ 葡聚糖苷酶基因 RT-PCR 扩增

利用 RT-PCR 技术扩增小麦叶锈菌诱导后的 TcLr35 cDNA,获得了长度约 900 bp 的单一一条带 (图 1),经序列分析、比对,长度为 913 bp,含有一个通读的开放阅读框,编码 279 个氨基酸。BLASTn 分析,与 GenBank 中小麦、大麦等多个葡聚糖苷酶基因具有较高同源性,对其推断的氨基酸序列进行

分析,含有 Glyco\_hydro\_17 保守结构域,为葡聚糖苷酶基因蛋白结构域。BLASTx 分析,与 GenBank 中登录的小麦、大麦、玉米、水稻等病程相关蛋白 1 具有 56% ~ 99% 的同源性。将该片段暂命名为 *PR34*, 序列提交 GenBank, 获得的登录号为 DQ294235。



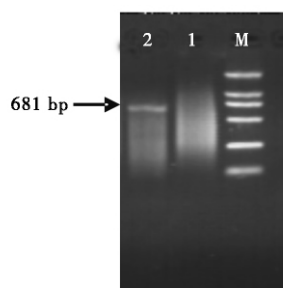
1. Thatcher; 2. TcLr35; M. DL2000.

图 1 引物 PR3:4 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 The RT-PCR product amplified by primer PR3:4

## 2.2 3'RACE

获得的序列含有起始密码子,为了获得全长基因,用试剂盒提供的 UPM( Universal primer A) 引物和特异性引物 PRF3 扩增 3'cDNA 第一链 30 轮后,取 5  $\mu$ L PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,未获得清晰条带,只有弥散现象。将此 PCR 产物稀释 10 倍作为巢式 PCR 的模板,将退火温度升高到 68 $^{\circ}$ C,使用试剂盒提供的 NUP( Nested universal primer A) 引物与 PRF4 进行第二轮扩增,获得一条约 700 bp 单一条带(图 2)。从琼脂糖凝胶中回收该片段,克隆后测序。将测序结果与已知序列进行拼接,并结合测序峰图进行校正。RACE 产物序列长 681 bp,有 254 bp 与 *PR34* 序列重叠,编码框完整。



1. 第一轮 PCR 产物; 2. 巢式 PCR 产物; M. DL2000.

1. The primary PCR product; 2. The nested PCR product; M. DL2000.

图 2 *PR34* 片段 3'RACE 的 PCR 产物

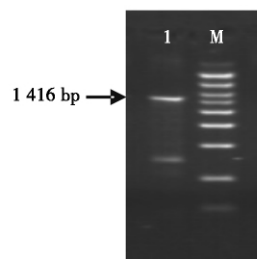
Fig. 2 The 3'RACE-PCR product of *PR34* fragment

## 2.3 序列拼接

运用 CAP3 Sequence Assembly Program( <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) 进行序列聚类,最后整合成一个叠连群( Contig)。以该叠连群为被搜索对象,再到 GenBank Unigene 数据库中运用 BLASTn 程序进行同源性搜索,然后再进行序列拼接,重复这两步,直到拼接不出新序列为止,最终获得拼接序列长度为 1 416 bp。

## 2.4 *PR34* 全长基因的扩增

为了验证拼接获得的基因序列,分别在拼接序列的 5'末端和 3'末端设计引物( PPF4 和 PPR4),以 TcLr35 的 cDNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增,结果获得了 2 条扩增片段,分别为约 1 400 bp 和 400 bp, 1 400 bp 的扩增片段为预期产物(图 3),回收并克隆,测序。



1. PCR 产物; M. DL3000.

1. The PCR product; M. DL3000.

图 3 *PR34* 全长基因的扩增

Fig. 3 The amplification result of complete sequence of the *PR34* gene

## 2.5 *PR34* 基因及推断的蛋白结构同源性比较

*PR34* 基因全长为 1 416 bp,具有一个编码 335 个氨基酸的开放阅读框( ORF)。其起始密码子 ATG 位于 13 bp 处,终止密码子 TAG 位于 1 015 bp 处,3'末端有 20 bp 的 poly( A) 尾,379 bp 的 3'非翻译区。将 *PR34* 的氨基酸进行 BLASTp 分析,与来自小麦、大麦、水稻及玉米等  $\beta(1,3;1,4)$  葡聚糖苷酶基因具有高度同源性,与大麦、小麦  $\beta(1,3;1,4)$  葡聚糖苷酶基因同源性多数达 90% 以上,相对地与水稻、玉米的同源性较低。利用 DNAMAN 软件对获得的小麦 *PR34* 基因进行多序列同源性比较,*PR34* 与已克隆的小麦、大麦及水稻等葡聚糖苷酶基因在多个区域具有相同或者相似的氨基酸序列(图 4)。利用 DNASTar 软件分析小麦  $\beta(1,3;1,4)$  葡聚糖苷酶基因,推导蛋白分子量为 34. 799 kDa,等电点为 6. 853,包括 14 个强碱性氨基酸( K, R),15 个强酸性氨基酸( D, E),130 个疏水氨基酸( A, I, L, F, W, V),103 个极性氨基酸( N, C, Q, S, T, Y),表明该蛋白为酸性蛋白,即为酸性的  $\beta(1,3)$ -葡聚糖苷酶。对其推断的氨基酸序列进行分析,含有 Glyco\_hydro\_17 保守结构域,为葡聚糖苷酶基因蛋白结构域。

## 2.6 *PR34* 基因拷贝数验证

以 TcLr35 小麦基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,将获得的片段回收纯化,并进行探针标记。选取在 *PR34* 基因中无酶切位点的 *Pst* I、*Eco* R I 2 种限制性内切酶分别对 TcLr35 基因组 DNA 进行酶切,按照杂交程序进行杂交分析。*Eco* R I 酶切产物出现了一条强带,*Pst* I 酶切产物中出现了一条强带和

一条弱带(图5),说明 *PR34* 基因在 TcLr35 小麦基 因组中为低拷贝。

```
PR34-AMID.pro SANNLPAASTVVSFMFSKNGINSMLRYAPDQAALQAVGGTGVNVVVGAPNDVLSNLAASPA
AATO1345.pro SANNLPPASSVVGMYRSNGITSMRLYAPDQAALQSVGGTGISVVVGAPNDVLSNLAASPA
ABA33838.pro NGDNLPPASDVVQLYQSNGLNLMRIYFPDANALNLSGTSIGLIMDVPTDLASLASDPS
CAA78834.pro SANNLPAASTVVGFMFSKNGINSMLRYAPDQAALQAVGGTGVNVVVGAPNDVLSALAASPA
CAA80493.pro SANNLPAASTVVSFMFSKNGINSMLRYAPDQAALQAVGGTGVNVVVGAPNDVLSNLAASPA
CAB41402.pro SANNLPAASTVVNMFKSNGINSMLRYAPDQAALQAVGGTGVNVVVGAPNDVLSNLAASPA
*****
PR34-AMID.pro AAASWVRNINQAYPKVSFRYVCVGVNEVAGGATQNLVPAMKNVQGALASAGLG-HIKVTTTS
AATO1345.pro AAASWVRNINQAYPSVSFRYVAVGVNEVAGGATSSLPAMENVRGALVSAGLG-HIKVTTTS
ABA33838.pro AAAAWVQSNVQAFPSVSFRYIAVGVNEVSGGDTGNLPAMQNLNAAALANAGLGSGIKVSTA
CAA78834.pro AAASWVRNINQAYPKVSFRYVCVGVNEVAGGATQNLVPAMQNVQGALASAGLG-HIKVTTTS
CAA80493.pro AAASWVRNINQAYPKVSFRYVCVGVNEVAGGATQNLVPAMKNVQGALASAGLG-HIKVTTTS
CAB41402.pro AAASWVRNINQAYPKVSFRYVCVGVNEVAGGATQNLVPAMKNVQGALASAGLG-HIKVTTTS
*****
PR34-AMID.pro VSQAILGVYSPPSAGSFTGEADAFMGPPVQFLARTGAPLMANIYPYLAWAYNPSAMDMSY
AATO1345.pro VSQALLAVYSPPSAAEFTGESQAFMAPVLSFLARTGAPLLANIYPYFSYTYSQGSVDVSY
ABA33838.pro VQSDVTQGF-PPSQGTFS---QGYMAPIAQYLQSTGAPLLCNVYPYFSYIGNPAQIDLSY
CAA78834.pro VSQAILGVYSPPSAGSFTGEADAFMGPPVQFLARTGAPLMANIYPYLAWAYNPSAMDMSY
CAA80493.pro VSQAILGVYSPPSAGSFTGEADAFMGPPVQFLARTGAPLMANIYPYLAWAYNPSAMDMSY
CAB41402.pro VSQAILGVYSPPSAGSFTGEADAFMGPPVQFLARTGAPLMANIYPYLAWAYNPSAMDMSY
* . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *
PR34-AMID.pro ALFTASGTVVQDGSYGYQNLFDTTVDAFYTAMAKHGGSNVCLKVSESGWPSGGGTAATPA
AATO1345.pro ALFTAAGTVVQDGAYGYQNLFDTTVDAFYAAMAKHGGSGVSLVVSETGWPSAGGMSASPA
ABA33838.pro ALFTSPGTVVQDGSNAYQNLFDALVDTFVSALQAGAGNVPVVVSESGWPSAGGDAATAA
CAA78834.pro ALFTASGTVVQDGAYGYQNLFDTTVDAFYTAMGKHGGAGVCLKVSESGWPSAGGTAATPA
CAA80493.pro ALFTASGTVVQDGSYGYQNLFDTTVDAFYTAMAKHGGSNVCLKVSESGWPSGGGTAATPA
CAB41402.pro ALFTASGTVVQDGSYGYQNLFDTTVDAFYTAMAKHGGSNVCLKVSESGWPSAGGTAATPA
*****
PR34-AMID.pro NARIYNQYLINHVGRGTPRHGPAIETVFSMFNENQND-RRRGAELGTLTPQHAARLPHQ
AATO1345.pro NARIYNQNLINHVGRGTPRHGPAIETVFSMFNENQKD-AGVEQNWGLFYFNMQHVYPIS
ABA33838.pro NAQTYNQNLINHVQGQTPKRPGPIETVIFAMFNEDQKTGAESERHFLFNPDKSPAYPIN
CAA78834.pro NARIYNQYLINHVGRGTPRHGPGIETVVFAMFNENQKD-NGVEQNWGLFYFNMQHVYPIS
CAA80493.pro NARIYNQYLINHVGRGTPRHGPAIETVFSMFNENQKD-SGVEQNWGLFYFNMQHVYPIS
CAB41402.pro NARIYNQYLINHVGRGTPRHGPAIETVFSMFNENQKD-NGVEQNWGLFYFNMQHVYPIS
*****
PR34-AMID.pro LLMS
AATO1345.pro F---
ABA33838.pro FS--
CAA78834.pro F---
CAA80493.pro F---
CAB41402.pro F---
```

“\*” , “.”. 代表相同或相近的氨基酸残基。

“\*” and “.”. Indicated the identical or similar residues in amino acid sequence.

图 4 小麦葡聚糖苷酶基因氨基酸序列的比较

Fig. 4 Alignment of the deduced amino acid sequences of the beta glucanase from TcLr35

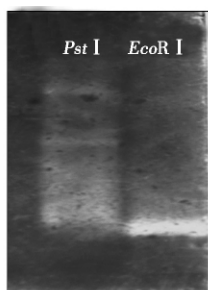


图 5 *PR34* Southern 杂交结果

Fig. 5 The result of *PR34* Southern blotting

### 3 讨论

迄今为止,至少已从 11 个植物品种中分离纯化得到了几十种  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和它们的 cDNA 克隆。对从不同植物中分离到的 cDNA 克隆的研究表明, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的同工酶在物理性质、酶活性和细胞内的位置各不相同。本研究利用 RT-PCR 及 RACE 技术在小麦 TcLr35 中成功地克隆了  $\beta$ (1,3;1,4) 葡聚糖酶基因 *PR34*。全长 cDNA 序列的获得,将有助于 *PR34* 结构和功能的进一步研究,为深入

探讨小麦抗病机制提供有利的信息和依据。本试验获得的 TcLr35 小麦 *PR34* 基因,推导蛋白分子量为 34.799 kDa,等电点为 6.853,表明该蛋白为酸性蛋白,即为酸性的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶。酸性  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶可以由病原菌诱导产生,但在一定程度上其表达量多于碱性  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶<sup>[10]</sup>。郑用琰等<sup>[11]</sup>采用 Northern 杂交技术,对小麦抗、感品系在接种褐斑病菌后  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因表达进行研究,结果表明, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因在接种后 16 h 开始表达,48 h 达到高峰,且抗、感品系均被诱导表达。本研究表明,小麦  $\beta$ (1,3;1,4) 葡聚糖酶基因在接种后 24 h 开始表达,48 h 达到高峰,尚待采用 Northern 杂交或实时定量 RT-PCR 作进一步验证。

cDNA 末端快速扩增技术,是一种从低丰度转录本中快速扩增 cDNA 5'和 3'末端简单而有效的方法,被广泛用于许多已知功能基因片段的进一步延伸和全长 cDNA 的克隆,达到克隆更多全长基因和新基因的目的,在基因结构和功能研究中起到越来越重要的作用。与筛选文库相比,RACE 技术具有

方便省时、能够获得可能的 5'端调控序列和多聚腺苷化信号序列的信息,有助于选择引物以用于转录模型非常复杂的基因中扩增 cDNA 的亚群等优势。在进行 RACE 试验的 PCR 扩增,扩增产物往往会包含一些非特异扩增产物,这些非特异的扩增产物对后续试验会造成很大的干扰。本研究采用的具体方法是:首先,引物设计是 RACE 能否成功的决定性因素。较高  $T_m$  值(70℃以上)的引物是提高产物特异性的必要条件;而且,引物设计应尽量避开同类基因的保守区域<sup>[12]</sup>。本试验设计的引物充分考虑到以上各点。另外,在进行 RACE-PCR 扩增时,采用了两步法进行扩增:先试用较低退火温度,以保证足够的模板数量,第二轮扩增时提高退火温度,增强扩增产物的特异性。然后,在进行 PCR 检测时,先利用正常的 PCR 体系进行扩增,对扩增产物的电泳检测如果出现多条泳带,怀疑有非特异扩增时,就需要进行单引物 PCR 检测。从双引物扩增产物形成的条带里扣除由单引物扩增产生的条带,剩余条带就是双引物共同扩增产生的了,其中绝大多数是需要的特异扩增产物。

已有研究表明,利用葡聚糖酶基因对植物进行转化,转基因植株对黑胫病、赤星病、根腐病及其他病菌均有一定抗性。邢全华等<sup>[13]</sup>构建了  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的植物表达载体,并将其导入小麦,田间接菌发病检测结果表明,转基因植株比对照的抗病性提高 1~2 级。王华忠等<sup>[14]</sup>利用瞬间表达技术分析小麦几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的抗病性功能,邢莉萍等<sup>[15]</sup>利用基因枪法完成了小麦类甜蛋白基因的转化及转基因植株抗病性的分析。本研究获得的  $\beta$  (1,3; 1,4) 葡聚糖酶基因的 cDNA 全长序列在 TcLr35 和 Thatcher 中表现多态性,由于 Thatcher 是 TcLr35 的亲本材料,它们除了目的基因 *Lr35* 不同,遗传背景基本上是一样的,可以推测 TcLr35 上携带 *PR34* 基因。下一步工作需要在这两个基因进行基因定位及其表达产物进行分离、分析,以明确抗病的 TcLr35 上携带 *PR34* 基因,为进一步分离该基因的启动子序列,以及构建植物表达载体,通过基因工程培育小麦抗病品种奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Komer J A. Genetics of resistance to wheat leaf rust [J]. Annu Revi Phytopathology, 1996, 34: 435 - 455.
- [2] Denissen C J M. Influence of race and post infection temperature on two components of partial resistance to wheat leaf rust in seedlings of wheat [J]. Euphytica, 1991, 58 (1): 13 - 20.
- [3] Catherine F, Silvia T, Nils S. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(25): 15253 - 15258.
- [4] Huang L, Steven A, Wanlong L, et al. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat [J]. Genetics, 2003, 164: 655 - 664.
- [5] Cloutier S, Brent D, Caroline McCallum. Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family [J]. Plant Mol Biol, 2007, 65: 93 - 106.
- [6] Krattinger S G, Lagudah E S, Spielmeier W, et al. A multi-pathogen resistance QTL in wheat is controlled by a single gene [J]. Science, 2009, 323: 1360 - 1363.
- [7] Li W L, Faris J D, Chittoor J M, et al. Genomic mapping of defense response genes in wheat [J]. Theo Appl Genet, 1999, 98: 226 - 233.
- [8] Arlorio M, Ludwig A, Boller T, et al. Inhibition of fungal growth by plant chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases: a morphological study [J]. Pro-toplasma, 1992, 171: 34 - 43.
- [9] Doreen M L, Peter B H, Geoffrey B F. Purification and characterization of  $\beta$ -(1-3,4) glucan endohydrolases from germinated wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Molecular Biology, 1993, 22(5): 847 - 859.
- [10] Linthorst J M, Melchers L S, Mayers A, et al. Analysis of gene families encoding acidic and basic  $\beta$ -1,3-glucanases of tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 8756 - 8760.
- [11] 郑用璁, Balance G M. 小麦与褐斑病菌之间的分子交互 I: 受病原菌诱导的寄主 PR 基因的表达 [J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(3): 213 - 218.
- [12] 郭珺超, 蒋滢. cDNA 末端快速扩增技术的研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(1): 25 - 31.
- [13] 邢全华, 王广金, 石金锋, 等.  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因高效表达载体的构建及对小麦的转化 [J]. 遗传学报, 2003, 30(8): 717 - 722.
- [14] 王华忠, 邢丽萍, 陈佩度. 利用瞬间表达技术分析小麦几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖苷酶基因的抗病性功能 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(1): 7 - 12.
- [15] 邢莉萍, 王华忠, 蒋正宁, 等. 小麦类甜蛋白基因的转化及转基因植株的抗病性分析 [J]. 作物学报, 2008, 34(3): 349 - 354.