

东乡野生稻 NBS 类抗病基因同源片段的克隆及序列分析

却志群 沈春修 卢其能

(宜春学院 生命科学与资源环境学院 江西 宜春 336000)

摘要: 根据已知的 NBS-LRR 类抗病基因结构中氨基酸的保守区域,设计简并引物,通过 RT-PCR 扩增及克隆,从东乡野生稻(*Dongxiang Oryza rufipogon* Griff.) 中共获得 7 个新的 NBS-LRR 类抗病基因同源片段。所有 7 个抗病基因同源序列均含有 NBS-LRR 类抗病基因的保守序列,如 P-loop、Kinase 2、Kinase 3a 以及跨膜区域等。通过氨基酸同源性比较和分析,发现克隆到的抗病基因同源序列与已克隆的水稻白叶枯抗病基因 *Xa1* 的相应氨基酸序列存在约 40% 的同源性,其中的 3 个 NBS 抗病基因同源序列还与小麦抗叶锈病基因 *Lr1* 存在 40% 的同源性。

关键词: 东乡野生稻; 抗病基因; RT-PCR; NBS-LRR 同源序列

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)01-0078-05

Cloning and Sequence Analysis of NBS Resistance Gene Analogues from Dongxiang *Oryza rufipogon* Griff

QUE Zhi-qun SHEN Chun-xiu LU Qi-neng

(College of Life Sciences, Resources and Environment Sciences, Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract: Degenerate oligonucleotide primers were designed on the basis of nucleotide-binding site (NBS) motifs conserved among the reported disease resistance genes. By reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), seven new NBS-LRR disease resistance gene analogues have been obtained and cloned from Dongxiang *Oryza rufipogon* Griff. Sequencing of the DNA fragments indicated that all of NBS resistance gene analogues contained the conserved motifs of NBS-LRR type resistance genes, such as P-loop (Kinase 1a), Kinase 2, Kinase 3a and transmembrane domain. By comparison analysis of amino acid sequences, it was found that the obtained disease resistance gene analogues have about 40% identity with the reported bacterial blight-resistance gene *Xa1*. Three of them have about 40% identity with the reported wheat leaf rust resistance gene *Lr1*.

Key words: Dongxiang *Oryza rufipogon* Griff; Disease-resistance gene; Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); Nucleotide-binding site (NBS); Leucine-rich repeat (LRR)

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,但也产生了一系列的负面影响,如农药长期使用后病虫害的抗药性、农作物药物残留超标和环境污染等威胁人类健康的严重问题。实践证明,培育和利用抗病品种是解决上述问题最为经济有效的办法。

目前,虽然从不同植物中分离到了一些抗病基因,如 *Xa1*^[2]、*Pib*^[3]、*Prr*^[4]、*L2C-1*^[5]、*cg9*^[6]、*Pto*^[7]、

Xa21^[8]、*Pi36*^[9]、*Pi37*^[10]等,但是,由于致病生物的致病性与品种抗病性具有共进化的关系^[11]。面对这种亘古不变的物种间生存竞争和协同进化,在探索持久抗性可行性的同时,还有相当一段时期要采用基因轮换、多基因聚合以及创造田间生物多样性等合理利用抗性基因的策略^[12],而这都需要在不断发掘和鉴定抗性基因的基础上付诸实施。

随着植物基因组研究的不断深入,科学家们开始着手于已克隆抗性基因结构方面的研究。结果发

收稿日期:2010-12-15

基金项目:江西省教育厅科技项目资助(GJJ10601)

作者简介:却志群(1980-),女,湖北仙桃人,讲师,硕士研究生,主要从事水稻抗性基因的遗传分析、定位及克隆研究。

通讯作者:卢其能(1968-),男,江西宜春人,教授,博士,主要从事植物组织培养与遗传工程研究。

现它们在结构上存在着共同的保守序列,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。这种序列保守性为发掘、鉴定和利用未知抗病基因提供了有效的策略。基于此,近年来,对具有核酸结合位点及富含亮氨酸重复蛋白类(NBS-LRR)抗病基因同源序列的研究已有不少报道,如已从水稻^[13-15]、大麦^[16]、大豆^[17,18]等植物中获得了一些该类抗病基因同源 DNA 片段,且有的已定位到含抗病基因的特定染色体区域,成为抗病基因的候选基因。具有 NBS-LRR 结构的抗病基因是最大的一类抗病基因,在水稻中可能就有大约 750~1 500 个编码 NBS 区域的基因^[19],野生稻是栽培稻的祖先,未经过人工驯化,遗传多样性丰富,很有可能保留了一些栽培稻中遗失了的抗性基因,因此,从野生稻中也许可以得到更多新的 NBS-LRR 类抗病基因同源序列。

东乡野生稻的原产地江西省东乡县,是至今为止发现的分布世界最北端的普通野生稻(N 28°14');长期以来,因其分布范围窄、地理位置的独特性、极强的耐寒性及其在水稻遗传育种和水稻起源进化中的地位,而为世界水稻育种学家和生物学家所重视^[20]。研究表明东乡野生稻蕴藏着丰富的抗性基因,含有抗寒、抗旱、抗病和抗虫等多种有利基因,潜在利用价值极高^[21]。

本研究以江西东乡野生稻为材料,根据已克隆的 NBS-LRR 类抗病基因结构中氨基酸的保守区域,设计简并引物从中克隆 NBS-LRR 类抗病基因同源序列,并对其氨基酸序列进行聚类分析和同源性比

较分析,为进一步克隆新的 NBS-LRR 类抗病基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 东乡野生稻由中国农业科学院作物研究所提供。

1.1.2 试验试剂 *rTaq* 酶、pMD18-T 载体克隆试剂盒、RNAiso Plus 提取试剂盒和 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒均购自 TaKaRa 生物技术有限公司;PCR 产物回收试剂盒购自上海生工生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 采集鲜嫩的东乡野生稻叶片材料,于液氮中研磨成粉后,用 TaKaRa 生物技术有限公司的 RNAiso Plus 提取试剂盒提取东乡野生稻总 RNA。

1.2.2 引物合成和 RT-PCR 扩增 参照杨勤忠等^[22]根据 NBS-LRR 类抗病基因的氨基酸保守区域设计的简并引物序列,委托上海生工生物技术公司合成 4 个简并引物,M13 引物由 TaKaRa 生物技术有限公司合成(引物序列见表 1)。使用 Oligo dT 引物作为反转录的 3'端引物,用 TaKaRa 生物技术有限公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒进行反转录,获得 cDNA 第一链。以此为模板使用简并引物进行 PCR 反应。PCR 反应的总体积为 25 μ L,反应条件为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,54℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 1 min,共进行 35 个循环;最后于 72℃ 延伸 7 min;4℃ 保存。

表 1 试验中使用的 NBS-LRR 类抗病基因简并引物和 M13 引物

Tab. 1 M13 primers and degenerate primers of NBS-LRR type resistance genes used in this study

引物名称 Primers name	上游引物序列 Forward primer sequence	下游引物序列 Down primer sequence
RN 1	5'-GGIGGINTIGGIAARACIAC-3'	5'-A IISHIARIGGIARICC-3'
RN 2	5'-GGIGGIWSIGGI AARACIAC-3	5'-GCIGCIARIGGRTTICC-3'
M13	5'-CGCCAGCGTTTTCCCACTCACGAC-3'	5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'

注:混合碱基代码:R = A/G,W = A/T,S = C/G,H = A/T/C,N = A/T/G/C。

Note: Codes for mixed bases: R = A/G,W = A/T,S = C/G,H = A/T/C and N = A/T/G/C.

1.2.3 RT-PCR 产物的克隆 用 PCR 产物回收试剂盒将 RT-PCR 产物回收后,直接将其连接到 pMD18-T 载体上,然后采用氯化钙法^[23]转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,再将菌液涂于含 IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素的 LB 平板上,37℃ 培养过夜。挑取白色菌落,使用 M13 引物通过 PCR 扩增法鉴定阳性重组克隆用于测序分析。

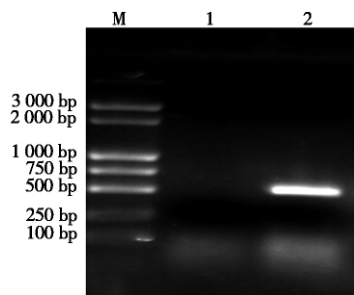
1.2.4 测序及序列分析 所有克隆样品的测序由

北京中美泰和生物技术有限公司完成,测序数据应用 DNASIS 和 DNA SSIST 软件进行聚类分析和序列多重比对,在 NCBI 数据库中通过 Blast 进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 抗病基因同源片段的 PCR 扩增及测序分析 通过 RT-PCR 的方法,本研究中设计的两对不

同的引物,其中引物对 RN2 从东乡野生稻叶片总 cDNA 中扩增出了 500 bp 左右 cDNA 片段,引物对 RN1 没有扩增出目的片段(图 1)。对所获得的 cDNA 片段经 pMD18-T 载体克隆得到 54 个阳性克隆,选择其中的 10 个进行测序,测序结果表明:10 个片段是由 518 bp 和 530 bp 两种片段长度的分子所组成,DNA 序列比对发现 10 个片段中总共包含 7 个不同的 DNA 序列,将这 7 个不同的 DNA 序列在 NCBI 中进行核苷酸的 Blast 没有发现与其 100% 同源的序列,其推定的氨基酸序列,都具有 NBS-LRR 类抗病基因所特有的保守氨基酸结构域,如 NBS-LRR 类的 P-loop, Kinase2, Kinase3a 以及跨膜区域 (Transmembrane domain) 等,表明本研究中获得的是全新的 NBS-LRR 类抗病基因同源序列,本研究中获得的 7 个 NBS-LRR 类同源序列已在美国国立生物信息中心基因库 (GenBank, National Center for Biotechnology Information) 注册。Accession No: HQ005764-HQ005770。



M. DL3000 标准分子量;

1 2. 引物 RN1 和 RN2 的扩增结果。

M. Indicates DL3000 molecule Marker; 1 2. Indicates the amplification results using RN1, RN2 primer respectively.

图 1 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification results of NBS-LRR type resistance genes analogues

2.2 克隆片段的氨基酸序列聚类分析

对所克隆的 NBS-LRR 类抗病基因同源片段所推定的氨基酸序列进行聚类分析表明,7 个不同的 NBS-LRR 类同源片段可分为 5 类,其中 DXNBS5、DXNBS7 和 DXNBS9 虽然核苷酸序列不同,但编码的氨基酸序列一致,所以同属一类,其他抗病基因同源片段各分属一类(图 2),但都属于 P-loop NTPase 超家族的一小亚簇。

2.3 PCR 产物的氨基酸序列同源性比较分析

2.3.1 NBS 类抗性基因同源序列比较 应用 Blast 搜索数据库,将得到的 5 类 NBS-LRR 类抗病基因同源序列与已克隆到 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的氨基酸序列,进行同源比较分析,发现有与编号为 DXNBS6 (HQ005766) 完全一致的同源序列,但并未

发现有与其他 4 类抗病基因同源序列完全一致的已知氨基酸序列,本研究获得的 NBS-LRR 类抗病基因同源系列,都与已克隆的白叶枯病抗性基因 *Xa1* (AB002266) 存在约 40% 的同源性和 60% 的氨基酸类似,其中,与 *Xa1* 同源性最高的是 DXNBS5 (HQ005765)、DXNBS7 (HQ005767) 和 DXNBS9 (HQ005769),达到 45%;最低的是 DXNBS1 (HQ005764),同源性为 39%。另外,DXNBS5 (HQ005765)、DXNBS7 (HQ005767) 和 DXNBS9 (HQ005769) 还与已克隆的小麦抗叶锈病基因 *Lr1* (ABS29034) 具有 40% 的同源性和 62% 的氨基酸类似(图 3)。

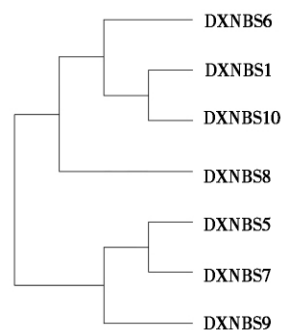


图 2 扩增自东乡野生稻的

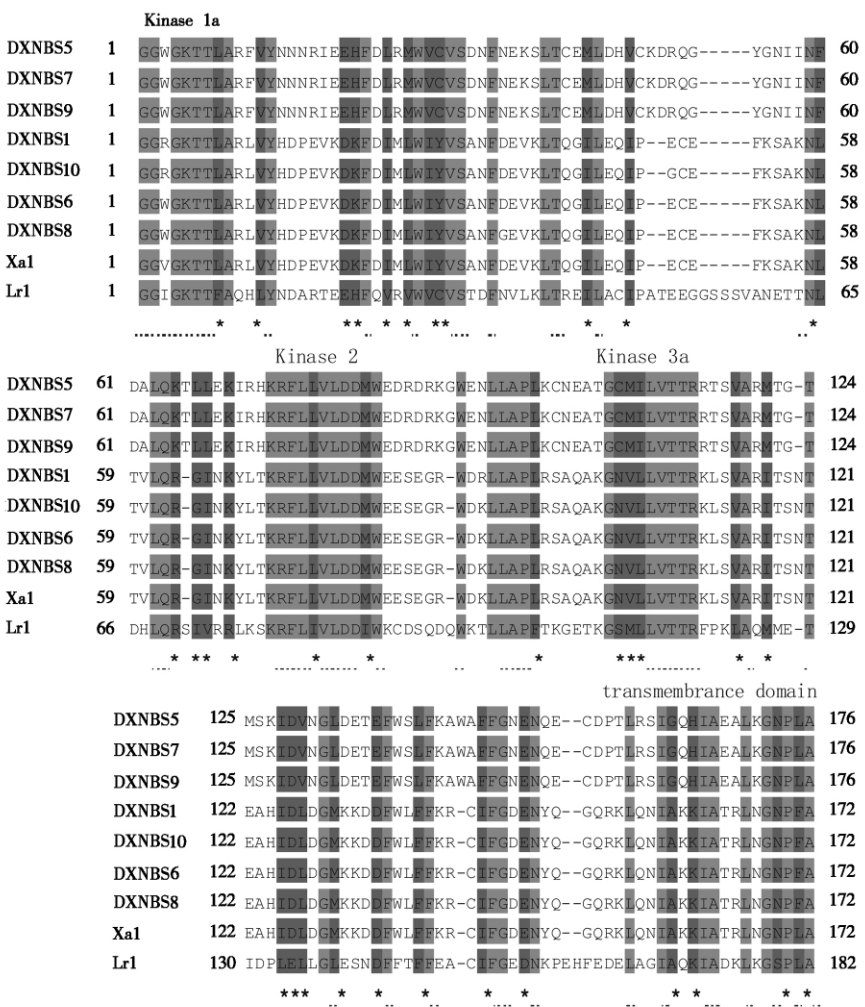
NBS-LRR 类抗病基因同源序列的聚类分析

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the alignment of amino acid sequences of resistance gene analogues (NBS-LRR class of resistance gene) amplified from Dongxiang wild rice

3 讨论

近年来,水稻中已经有不少抗病基因被相继克隆,但综观水稻中已克隆的这些抗病基因,大多来自水稻栽培稻品种,从野生稻中克隆的基因甚少,分析其原因,可能与水稻抗病基因克隆的方法有关。目前,水稻抗病基因的克隆主要通过遗传表型分析如转座子标签技术和以遗传图谱为基础的图位克隆技术获得的,其中以图位克隆技术克隆的基因占大多数^[27]。但无论是转座子标签技术还是图位克隆技术对于普遍具有生命周期长、遗传上高度杂合和遗传背景知之甚少特点的野生稻品种资源来说,应用起来都会遇到许多的困难,这可能也是为什么过去很少有抗病基因从野生稻中被克隆到的原因。

目前已报道大约有 40 个植物抗病基因从拟南芥、番茄、烟草、亚麻、水稻、甜菜、玉米、大麦中被成功克隆^[24]。随着越来越多的植物抗病基因被克隆,对其编码的氨基酸序列结构特点的分析研究发现普遍存在许多高度保守的区域,根据这些抗病基因蛋白的结构可将它们分为 6 种类型,其中最大的一个类群为 NBS-LRR 类 (Nucleotide-binding site, NBS;



Xa1 (AB002266) 为水稻抗白叶枯病基因的氨基酸序列, *Lr1* (ABS29034) 为小麦抗叶锈病基因的氨基酸序列。
虚线表示一致的残基, 星号部分表示保守的氨基酸残基。此比较用 DNASSIST 软件完成。

The regions of homology are shown in dotted(identify) and the asterisk(similarities) . This alignment was generated using DNASSIST program.

图 3 7 个 NBS-LRR 类抗病基因同源序列和已知抗病基因的氨基酸序列比较

Fig.3 A lignment of deduced amino acid sequences of 7 resistance gene analogues of rice for NBS-LRR class with that of other disease resistance genes of rice (*Xa1* accession no: AB002266) and bread wheat (*Lr1* accession no: ABS29034)

Leucine-rich repeat (LRR) ,这类基因编码 1 个核苷酸结合位点(Nucleotide binding Site ,NBS) 和 1 个富含亮氨酸结构域(LRR) 。其中 NBS 具有 ATP 或 GTP 结合的特性 ,NBS 结构域一般具有 P-loop(又称 Kinase-1a) 、kinase-2 、kinase-3a 及跨膜区域(GL-PLAL) 结构 ,且 P-loop 和 GLPLAL 保守性较强 ,它们之间的距离约为 170 个氨基酸(510 bp) 。据报道 ,在水稻中可能就有 750 ~ 1 500 个编码 NBS 区域的基因^[19] ,Wang 等^[25] 分离克隆的第 1 个稻瘟病抗性基因 *Pib*、Pan 等^[9,10] 采用图位克隆法分离克隆的稻瘟病抗性基因 *Pi36* 和 *Pi37* 以及 Yoshimura 等^[26] 克隆的水稻抗白叶枯病的 *Xa1* 基因就属于这种类型的抗病基因。基于水稻的抗病基因大多数也具有 NBS-LRR 保守结构 ,这就为利用保守结构设计引物通过 PCR 扩增的方法从水稻尤其是野生稻中获取 NBS-LRR 类抗病基因同源序列甚至抗病基因的全

长 CDNA 开辟了一条重要途径。这对于克服目前栽培稻品种抗病谱窄 ,抗性不强的弊病具有重要意义。

在本研究中 ,根据已报道的抗病基因氨基酸保守区域设计简并引物扩增分析了东乡野生稻的抗病基因同源序列 ,共获得了 7 个新的 NBS-LRR 类抗病基因同源序列。同源性比较发现本研究中克隆到的抗病基因同源序列与已克隆的水稻抗白叶枯病基因 *Xa1* 的相应氨基酸序列存在大约 40% 的同源性 ,其中有 3 个 NBS 抗病基因同源序列还与小麦抗叶锈病基因 *Lr1* 存在约 40% 的同源性 ,这些抗病基因同源片段的获得将可直接用作探针进行文库筛选或采用 RACE 技术进行扩增 ,从而分离这些基因。目前我们正利用这些片段通过 RACE 技术进行部分抗性基因全长 CDNA 的克隆 ,以期从东乡野生稻中分离到新的 NBS-LRR 类抗病基因。

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998.
- [2] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, et al. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (4): 1663 – 1668.
- [3] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine repeat class of plant disease resistance genes[J]. The Plant Journal, 1999, 19(1): 55 – 64.
- [4] Salmeron J M, Oldroyd G E D, Rommens C M T, 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.
- [5] 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 superfamily of plant resistance genes[J]. Plant Cell, 1997, 9(4): 521 – 532.
- [6] Jones D A, Thomas C M, Hammond-Kosack K E, et al. Isolation of the tomato *C/29* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging[J]. Science, 1994, 266(5186): 789 – 793.
- [7] Martin G B, Brommonschenkel S H, Chunwongse J, et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato[J]. Science, 1993, 262(5138): 1432 – 436.
- [8] Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21* [J]. Science, 1995, 270 (5243): 1804 – 1806.
- [9] Liu X Q, Lin F, Wang L, et al. The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice CC-NBS-LRR gene which confers race-specific resistance to the blast fungus[J]. Genetics, 2007, 176: 2541 – 2549.
- [10] Lin F, Chen S, Que Z, et al. The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site-leucine rich protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1[J]. Genetics, 2007, 177: 1871 – 1880.
- [11] 何光存. 细胞工程与分子生物学相结合-野生稻优异种质资源利用的有效途径[J]. 生物工程进展, 1998, 18(2): 41 – 45.
- [12] 鄂志国, 张丽靖, 焦桂爱, 等. 稻瘟病抗性基因的鉴定及利用进展[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(5): 533 – 540.
- [13] Xue Y B, Tang D Z, Zhang Y S, et al. Isolation of candidate R disease resistance gene from rice[J]. Chinese Science Bulletin, 1998, 43(6): 497 – 500.
- [14] Li Z Y, Chen S Y. Molecular cloning, chromosomal mapping and expression analysis of disease resistance homologues in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(13): 1202 – 1207.
- [15] Mago R, Nair S, Mohann M. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 50 – 57.
- [16] Leister D, Kurth J, Laurie D A, et al. RFLP and physical mapping of resistance gene homologues in rice (*Oryza sativa* L.) and barley (*H. vulgare*) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 509 – 520.
- [17] Kanazin V, Marek L F, Shookmaker R C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 93: 11746 – 11750.
- [18] Yu Y G, Buss G R, Maroof M A S. Isolation of a superfamily of candidate disease resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 11751 – 11756.
- [19] Meyers B C, Dickerman A W, Michelmore R W. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily[J]. Plant J, 1999, 20: 317 – 332.
- [20] 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: 自然科学版, 2003, 25(1): 12 – 16.
- [21] 陈大洲, 陈泰林, 邹宏海, 等. 东乡野生稻的研究与利用[J]. 江西农业学报, 2002, 14(4): 51 – 58.
- [22] 杨勤忠, 杨佩文, 王群, 等. 水稻抗病基因同源序列的克隆及测序分析[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(4): 241 – 247.
- [23] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 22 – 23.
- [24] Hulbert S H, Webb C A, Smith S M, et al. Resistance gene complexes: evolution and utilization [J]. Annu Revl Phytopathol, 2001, 39: 285 – 312.
- [25] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J]. Plant J, 1999, 19(1): 55 – 64.
- [26] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, et al. Expression of *Xa1*, a bacterial blight resistance gene, is induced by bacterial inoculation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 1663 – 1668.
- [27] 刘何, 谢令琴, 赵建军. 植物抗性相关基因的研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(S2): 21 – 24.