

花生 RGA 片段的克隆及初步分析 *

黄湘文^{1,2} 张 冲² 石新国² 陈 华² 郑奕雄^{1,2,△}

(1 仲恺农业工程学院 广东 广州 510225 2 福建农林大学油料作物研究所 福建 福州 350002)

摘要 目的 通过同源克隆获得了花生闽花 6 号的 RGA 片段,为其抗性的研究及抗性育种提供了参考资料。方法 试验分为两组:其一通过利用抗性基因的 NBS 保守区所设计的简并引物对花生品种闽花六号进行了 RGA 片段扩增,其二结合已登录的花生 RGA 片段序列经过多元比对后设计简并引物进行 RGA 片段的扩增及序列分析,分析比较两组克隆方法的效果。结果 测序分析表明,前者 20 条随机测序序列中没有一条与已知 RGA 片段序列相似,后者 20 条随机测序序列中有 18 条为 RGA 片段序列,其登录号为 GenBank EU639668-EU639685。结论 前一种方法克隆扩增 RGA 基因片段的效率很低,而后一种方法克隆扩增效果更好,这为闽花 6 号花生的遗传改良提供了理论基础。

关键词 花生;RGA;同源克隆

中图分类号 S68 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)09-1631-03

Cloning and Primary Analysis for RGA Fragments in Peanut*

HUANG Xiang-wen^{1,2}, ZHANG Chong², SHI Xin-guo², CHEN Hua², ZHENG Yi-xiong^{1,2,△}

(1 Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, 510225;

2 College of oil Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT Objective: RGA fragments were cloned to investigate resistance and provide theoretical guidance for breeding in peanut. **Methods:** In this study, degenerate PCR primers firstly designed to bind to DNA regions encoding conserved motifs within NBS (nucleotide binding site) were used to amplify NBS-encoding regions from A. hypogaea L. Minhua Number 6. At the same time a pair of degenerate primers was designed according to the result of multiple sequence alignment from known RGA sequences in peanut. RGA fragments were amplified using homology cloning on the peanut variety Minhua number 6. **Results:** It was showed that for former there was no sequence obtained in the study homologous to known sequences of RGA according to the sequencing results. While for later there are 18 RGA sequences in 20 clones selected randomly manifested by BLASTN sequence analysis, GenBank numbers of which are EU639668-EU639685. **Conclusion:** It shows that it is more efficiently to amplify corresponding RGA fragments by means of the RGA sequence known to this species, which provides a shortcut for following RGA study and use. For that matter it provides theory basis for genetic improvement in Minhua Number 6.

Key words: Peanut; RGA; homology cloning

Chinese Library Classification: S68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)09-1631-03

前言

花生是世界上五大重要的经济与油料作物之一,尽管在近几年里,花生的分子、功能基因组学等相关方面的研究已取得长足的进步,但和别的物种比起来,进展仍显缓慢,且明显和其在人们生活中的地位不相符。而且随着经济的迅猛发展和人们生活水平的日益提高,人们对食物品质和自身健康日益关注。花生在生产、运输及保存过程中易受到多种病害、虫害的侵袭而影响其品质;通过使用化学农药可以在一定程度上防止病害、虫害的发生,但其容易造成环境污染及食物本身上的农药残留过量。所以试图通过化学药物的使用来控制病虫害的发生是不可行的,需要寻找新的有效的途径来加以防治。生物防治成为了人们的必然选择。生物防治包括生防菌的发现和使用的、

生物本身抗性的改良和提高。本文侧重于抗性的改良和提高方面。目前对作物抗性的改良和提高主要集中在:一是通过传统的遗传育种手段杂交来实现,利用和已知的具有某抗性的品种杂交来提高和改良具有另外优良性状的品种,这是目前取得相当成效的手段,但该方法具有周期长,且具有随机性和结果不确定性;二是通过基因工程的应用来提高,就花生抗性而言,就必须首先获得具有该功能的抗性(相关)基因序列的全长。而不管是通过利用探针来筛选文库获得全长,还是通过 RACE 技术来获得,都必须先获得抗性相关基因的序列片段,即 RGA 片段。本文分析比较了两种不同方法获取闽花 6 号花生 RGA 片段的扩增效果,为其进一步研究打下基础。

1 材料与方法

* 基金项目:国家 863 计划花生抗病基因的克隆与功能研究(2006AA10A115)

作者简介:黄湘文(1979-)男,硕士,花生功能基因组学与遗传育种,Email:huangxiangwen99@163.com

△通讯作者:郑奕雄(1963-)男,教授,油料作物种植资源与遗传育种,Email:gdsscqs@163.com

(收稿日期 2011-01-10 接受日期 2011-01-31)

1.1 材料

1.1.1 植物材料 花生品种闽花 6 号的叶片 ,用于提取 DNA。
1.1.2 引物序列 (1)根据已知抗病基因的蛋白质多元比对设计的引物序列^[1] :

PRGA-fwd 5'GGNGGNGTNGGNAANACNAC3' ;
PRGA-rev 5'ARNGCTARNGGNARNCC3'

由于其测序结果比对后显示均不与已知的抗性相关基因序列具有相似性 ,故在后面的结果中不再显示其相关结果。(2)根据 RGA 片段的多元比对所设计的引物序列 :PRGA :PRGA f-76 5' CAGTTTTGCTTTRAAGGCATTC 3' ,PRGA r-375 5' AT-GCAAGTYCCTTTGTCACG 3' ,PRGA r-476 5' CAATA-GATTGTGTGATGSATTTGAA 3'

I inosine. Degeneracy code :N = A,G,C or T ;R = A or G ;H = A,C or T ;S = C or G ;V = A,C or G ;W = A or T ;Y = C or T ;K = G or T ;B=C or G or T ;D=A or G or T ;M=A or C.

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 本实验采用 CTAB 法提取 DNA ,参照植物基因工程^[2]。

1.2.2 RGA 片段的扩增 PCR 反应成分与程序如下 :

PCR buffer	3.0ul
dNTPs	2.4ul
template	1.0ul (DNA)
primers	1.5ul× 2
Taq	0.5ul
ddH ₂ O	20.1ul
	30ul

94℃ ,3min ;10 cycle (94℃ 45S ,50℃ 30s ,72℃ 90s) 25 (94℃ 45S ,47℃ 30s ,72℃ ,110s) ,72℃ ,10min ,4℃ 终止。值得说明的是这里的 PCR buffer 不同于一般的 PCR buffer ,它的 Mg²⁺ 离子浓度为 2.5mmol/l ,而不是 1.5mmol/l。

1.2.3 重组克隆的提取验证及 DNA 序列分析 用碱裂解的方法进行重组质粒 DNA 的提取 ;测序委托南方人类基因组研究中心进行。序列相似性分析 ,采用 BlastN 进行。阅读框分析采用 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 和手工进行 ;多元比对采用 CLUSTERW 进行 ;系统进化树构建采用 DNAMAN MegAlign 软件分析。

2 结果与分析

2.1 花生叶 DNA 的提取

从图 1 可知 ,DNA 带型清晰 ,无 Smear 带 ,可见 DNA 没有断裂 ,提取结果良好。完全能满足后续实验要求。

2.2 目的片段回收后检测

从图 2 可知扩增效果结果良好 ,可以进行下一步的 TA 克隆。

2.3 RGA 片段的测序结果

送去测序的序列测序结果基本正常 ,去除载体序列 ,经 BlastN 分析 ,20 条序列中有 18 条序列与已登录的 RGA 序列具有很高的相似性 ;经 ClustalW 分析 ,没有两条序列完全相同。标记为 RGA1-RGA10 的序列目的片段大小为 300bp 左右 ,标记为 RGA6 的这条序列 BlastN 分析为载体序列。标记为

RGA11-RGA20 的序列片段大小为 400bp 左右 ,标记为 RGA19 的这条序列前面部分与已登录的 RGA 序列有很高的相似性 ,但后面有载体污染。剩下的序列登录号为 :GenBank EU639668-EU639685 。

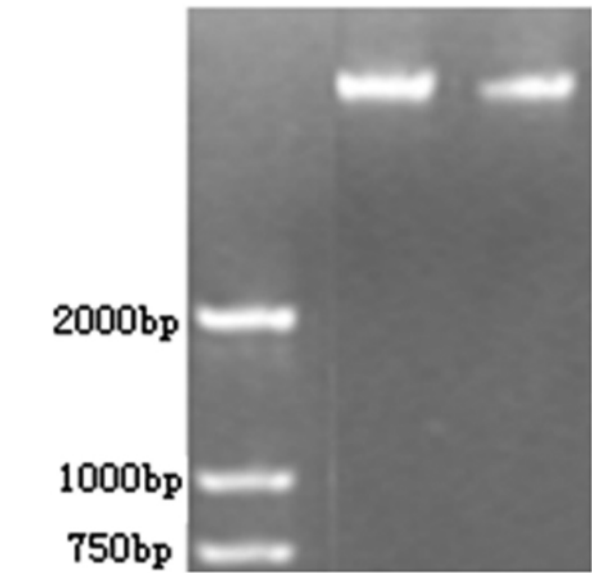


图 1 1% DNA1%非变性琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 1 1% non-denaturing agarose-gel electrophoresis of DNA

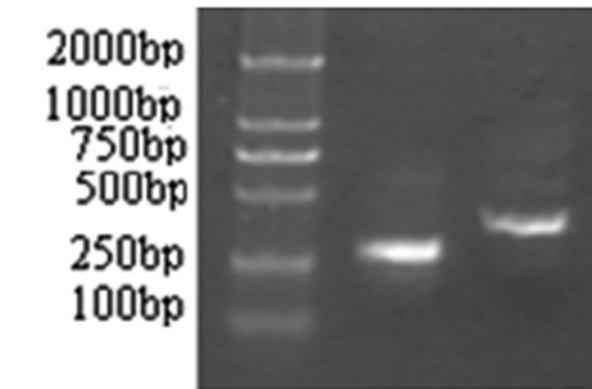


图 2 RGA 片段的胶回收后电泳检测
Fig. 2 1% non-denaturing agarose-gel electrophoresis for recovered RGA fragment

2.4 RGA 序列的 ORF 分析与系统树构建

阅读框分析表明这 18 条序列中只有两条序列含有连续的阅读框 ,其余的 16 条均含有两个及以上的终止子。这个比例和 Bertoli et.al 及 Bayram et.al 的结果相比带连续阅读框的比例明显偏低 ,这可能与选用的材料有关。所构建的系统树如下 ,所得序列明显分为两类 ,即 TIR-NBS-LRR 类和 NON-TIR-NBS-LRR 类。且两类中的序列数目大致相等。与 Bertoli et.al 及 Bayram et.al 的研究结果略有不符 ,这可能是我们所使用的引物后推的原因的所致。其中 rrs1-r 为 RRS1 的对应区域的序列 ,C8D6S4-AX-400、C8S5-AYX-370r 和 GN3-6 为已知的花生 RGA 序列 ,这四条序列均为 TIR-NBS-LRR 类。另外的序列为本次研究所获得并登录的序列。

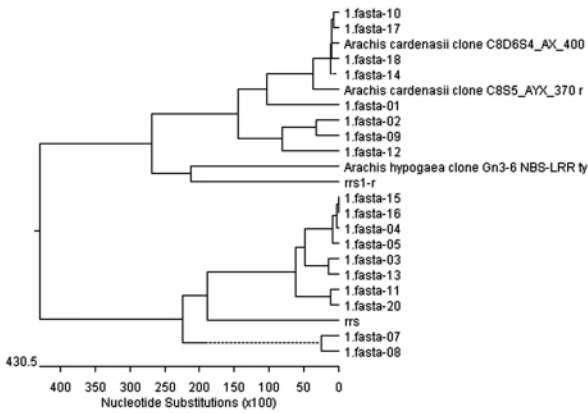


图3 获得序列和已知为 TIR 类的系统分类图

Fig.3 Systemic classification between sequences obtained and sequences known as TIR-NBS-LRR

3 讨论

3.1 关于同源克隆策略的讨论

Bertioli et.al(2003)^[3]利用 6 对简并引物对一个栽培种和四个野生种花生进行了 RGA 片段的扩增,其测序的序列中有 50%(664/1333)为 NBS 编码的;Bayram et.al(2005)^[1]也利用 6 对引物对花生栽培种进行了 RGA 片段的扩增,RGA 这对引物所测序的序列中有 75%(129/171)为 NBS 编码的。我们利用该对引物对花生栽培种闽花 6 号进行了 RGA 片段的扩增,但其所测序的 20 个克隆中没有一条序列是 NBS 编码的。原因可能是该引物在闽花 6 号中不具有可转移性或者是一次偶然的结果。同时我们在 Bertioli et.al 和 Bayram et.al 研究的基础上,利用其已登录的 RGA 序列按类进行多元比对,然后根据保守区设计引物对闽花 6 号进行扩增,其测序的 20 个克隆中有 90%(18/20)是 NBS 编码的,比 Bertioli et.al 和 Bayram et.al 所获得的得率都要高,原因可能是引物简并度相对较低和核苷酸保守区在闽花 6 号中的可转移性好。

从本实验来看,根据蛋白多元比对设计的引物扩增结果不如直接根据已知的 RGA 序列多元比对(和 NCBI 上的 POP 相似)设计的引物扩增的结果。原因有可能是与简并引物的简并度和可转移性有关。而且该结果也和 Bertioli et.al 和 Bayram et.al 结果基本一致:扩增所获得的序列中有很多序列是非 NBS 编码的。这些序列的存在限制了直接利用扩增产物做为探针对方文库进行筛选。因此应尽可能地提高目的序列的含量。

因此笔者认为假如同一物种的 RGA 序列或相近物种的 RGA 序列已知,可考虑直接利用其来进行 RGA 片段的扩增。这样可以大大提高克隆的阳性率,并且也意味着 PCR 产物中含有更大比例的目的片段。为 RGA 的后续研究利用提供了一条捷径。

3.2 RGA 标记及其展望

RGA 标记比一般的分子标记如 RAPD 或 RFLP 要优越,在原理和特征上应该与 SSR 甚至 EST-SSR 大致相同。它不仅可用于揭示品种的遗传差异,而且还可以反映品种的功能,有助于选择品种组合和控制病害。

目前,RGA 分子标记的方法已经在多种植物中广泛应用,

分离得到的 RGA 在 GeneBank 上记录的已达到 200 多种^[4]。随着分子生物学技术的飞速发展,植物的抗病特性逐渐被应用于育种实践中,这样就可以避免化学药物防治对环境和人类造成的破坏和危害。

基于 RGA 方法的克隆抗病基因的策略已为人们公认,其优越性表现在获取 RGA 的技术简便、RGA 与抗病基因直接相关。将 RGA 技术与其它基因操作技术相结合,为抗病基因的克隆和分析提供了简捷的途径。但 RGA 方法也有其局限性,由于 LRR 和 LZ 等结构域并非抗病基因所独有,分离到的 RGA 必须与抗病性状进行连锁鉴定,或者进行突变表达分析。此外,对于那些缺乏现有保守序列的抗病基因,使用该方法进行克隆是无能为力的。

RGA 法作为近些年发展起来的新型分子标记方法,凭借其其与抗病基因的较高相关性,已得到广泛的认可和支持。利用该方法已获得了不同植物的大量 RGA^[5-12],为创造实用价值提供了基础。通过分离 RGA 来克隆 R 基因或得到与 R 基因紧密连锁的分子标记,尤其是对具有复杂基因组的物种来说,是相对简便的一种标记方法^[13]。

可以预见 RGA 在植物抗性甚至是人类疾病防控方面将发挥越来越大的作用,尤其对那些基因组大非模式生物但又具有重要的经济价值或应用价值的作物而言更具有不可估量的应用价值。所以说进行 RGA 片段的克隆与分析对后续的研究和利用是必要的前提工作,且具有重要的理论与现实意义。

参考文献(References)

- [1] Bayram Yuksel James C, Estill Stefan R, Schulze Andrew H. Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut[J]. Mol Gen Genomics, 2005, 274:248-263
- [2] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002
Wang Guanlin, Fang Hongjun. Plant genetic engineering [M]. Beijing, Science Press, 2002
- [3] D. J. Bertioli, S. C. M. Leal-Bertioli, M. B. Lion V. L. et al. A large scale analysis of resistance gene homologues in Arachis. Mol Gen Genomics, (2003) 270: 34-45
- [4] 丁国华,池春玉,王桂玲,秦智伟.植物抗病基因同源序列研究进展[J].中国农学通报,2006,22(1):38-41
Ding Guohua, Chi Chunyu, Wang Guiling, Qin Zhiwei Recent Advances of Studies on Resistance Gene Analogs in Plants [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(1):38-41
- [5] Botela M A, Coleman M J, Hughes D E, et al. Map position of 47 Arabidopsis Sequences with Sequence Similarity to distance resistance genes[J]. The Plant J, 1997,12(5):1197-1211
- [6] Johal G S, and Briggs S P. Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize[J]. Science, 1992, 258:985-987
- [7] Leister D, Kurth J, Laurie D A, et al. RFLP- and physical mapping of resistance gene homologues in rice (O. sativa) and barley (H. Vulgare) [J]. Theor Appl Genet, 1999,98:509-520
- [8] Mago R, Mair S, Mohan M. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping [J]. Theor Appl Genet, 1999,99: 50-57
- [9] Rivkin M I, Vallejos C E, McClean P E. Disease-resistance related sequences in common bean[J]. Genome, 1999, 42:41-47

(下转第 1620 页)

- [3] 曹谊林. 组织工程学的研究进展 [J]. 中国美容医学, 2005, 14 (2): 134-135
Cao Yilin. The research progress of tissue engineering. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2005, 14 (2): 134-135
- [4] 付小兵, 程飏. 创伤修复和组织再生几个重要领域研究的进展与展望. 中华创伤杂志, 2005, 21 (1): 40-44
Fu Xiaobing, Cheng Biao. Wound healing and tissue regeneration several important research progress and prospect. Chinese Journal of Traumatology, 2005, 21(1): 40-44
- [5] 孙同柱, 付小兵, 陈伟, 杨银辉, 孙晓庆, 赵志力. 一种小型猪全层皮肤缺损创面模型的制备与应用 [J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19 (9): 466-467
SunTongzhu, Fu Xiaobing, Chen Wei, et al. Establishment and application of wound model of full-thickness skin defect in minipigs [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2002, 19(9):466-467
- [6] 施新猷. 医用实验动物学. 第1版[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 64-67
Shi Xinyou. Medical experiments of zoology, NO.1 [M]. Shaanxi science and technology press, 1989: 64-67
- [7] Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle [J]. J Biomed Mater Res, 1973; 7 (3): 25-42
- [8] 格林斯潘 D C, 维斯特 J K. 加速创伤和烧伤愈合的组合物和方法 [P]. CN Pat No, 1208338A: 1997-09-19
David C Greenspan, Jon K West. Composition and method for acceleration of wound and burn healing [P]. US Pat, No. 1208338A. 1997-09-19
- [9] David C Greenspan, Jon K West. Composition and method for acceleration of wound and burn healing [P]. US Pat, No. 2001/0041186 A12001-11-15
- [10] 陈良, 徐玲玲, 张志宾. 生物活性玻璃的制备、应用及活性机制[J]. 材料导报, 2008, 22: 348-350
Chen Liang, Xu Lingling, Zhang Zhibin. Study on Preparation, Application and Activating Mechanism of Bioactive Glass [J]. Materials Review, 2008, 22: 348-350
- [11] 陆树良. 烧伤创面愈合机制与新技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 100-120
Lu Shuiliang. Mechanism and new technology of burn wound healing [M]. People's military medical press, 2003: 100-120
- [12] 何丽娟, 刘大庆, 白慈贤等. 自体 BMSCs 复合胶原膜修复猪全层皮肤缺损[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 3: 348-352
He Lijuan, Liu Daqing, Bai Cixian et al. Repair of swine full-thickness cutaneous deficiency by autogenic BMSCs compounded with collagen membrane [J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2009, 3: 348-352
- [13] Oonish H, Kushitani S, Yasukawa E, et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as bone graft substitute [J]. Clinorthop, 1997, 334: 316-320
- [14] 谢宗平, 张长青. 生物玻璃及其抗感染应用[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 11: 369-370
Xie Zongping, Zhang Changqing. Bioglass and its anti-infection application [J]. Int J Ortho, 2007, 11: 369-370

(上接第 1633 页)

- [10] Seah S, Sivasithamparam S, Karakouis A, et al. Cloning and characterization of a family of disease gene analogs from wheat and barley [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 937-945
- [11] Speelman E, Bouche Z D, Holub E B, et al. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of Arabidopsis thaliana [J]. The plant J, 1998, 14(4): 467-474
- [12] Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, et al. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene Pm3b from hexaploid wheat [J]. Plant J, 2004, 37(4): 528-538
- [13] 张荣, 陈欧, 王振英. RGA 法标记植物抗病基因的研究进展[J]. 天津农业科学, 2009, 15(1): 10-12
Zhang Rong, Chen Ou, Wang Zhen-ying. Research Advance on Disease-resistant Gene of Plant by RGA Labeling [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2009, 15(1): 10-12