### 易变山羊草抗禾谷孢囊线虫基因中核苷酸 结合位点区(NBS)的克隆及序列分析

邓洪新, 杨晓娟, 邓光兵, 余懋群

(中国科学院成都生物研究所,成都 610041)

摘要 大部分已克隆的植物抗病基因都包含有核苷酸结合位点区 (NBS) 和富含亮氨酸的重复序列区 (LRR). 利用来自节节麦的抗禾谷孢囊线虫基因 Cre3 位点 NBS 区保守序列设计特异引物,从含有来自易变山羊草的抗禾谷孢囊线虫基因的小麦品系 E-10 的基因组中 PCR 扩增得到一条约 530 bp 的单一条带,将扩增条带克隆和序列分析发现,该克隆 (Rccn4) 的编码区长 528 bp ,含一个不完整的开放读码框,没有起始密码子、终止密码子和内含子结构,它编码一个 176 个氨基酸残基的蛋白质,分子量为 20.4 kD. Rccn4 含有 NBS-LRR 类抗病基因 NBS 区共有的保守模体 I(V)LDD、T(T/S) R、G(L/S) PLA(A/I/L)、RCF(A/L) Y,并且与 Cre3 基因的 NBS 编码区核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.4 %和 98 %. 它是一个新的含 NBS 编码区核苷酸的抗禾谷孢囊线虫基因.

关键词 小麦品系 E-10,抗禾谷孢囊线虫基因,核苷酸结合区,克隆与序列分析中图分类号 Q78,Q754

# Cloning and Sequencing of the Coding Region of Nucleotide-binding Site in Cereal Cyst Nematode Resistance Gene from Ae. variabilis

DENG Hong-xin, YANG Xiao-juan, DENG Guang-bing, YU Mao-qun (Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract Most of plant disease resistance (R) genes cloned so far belong to NBS-LRR group which contains nucleotide-binding sites (NBS) and a leucine -rich repeat (LRR). Specific primers were derived from the conserved motif of NBS sequence at the Cre3 locus, which conferred resistance to cereal cyst nematode (CNN) in the wild wheat (*Triticum tauschii*), and the specific primers were used in isolating a cereal cyst nematode resistance gene through a polymerase chain reaction (PCR) cloning approach. Only one band of approximately 530 bp in size was amplified from wheat E-10 conferring the resistance to cereal cyst nematode from *Ae. variabilis*. This target fragment was cloned and sequenced, and coding region of this clone(Rccn4) was 528 bp in size, which contained an incomplete open reading frame without initiation codon, terminator codon and exon encoding a peptide of 176 amino acid residues. The molecular weight of the protein from the amino acid was 20.4 kD. The amino acid sequence of Rccn4 contained conserved motifs: I(V)LDD, T(T/S)R, G(L/S)PLA(A/I/L) and RCF(A/L)Y, present in known R gene containing-NBS from other plants. Rccn4 shares 99.4 % nucleotide sequence and 98 % amino acid sequence identity with the NBS sequence at the Cre3 locus. It is a novel gene containing-NBS resistance to cereal cyst nematode.

收稿日期:2001-02-19,接受日期:2001-04-24

国家自然科学基金(No. 39370441) 和国家重点科技项目(攻关) 计划资助项目(No. 96-C01-01-06)

本文序列(Rccn4)已被 GenBank 收录,接收号为:AF320845

\*联系人 Tel:(028)5229053,Fax:(028)5222753,E-mail:YuMQ@cib.ac.cn

邓洪新,男,1974年12月生,硕士

Received: February 19,2001; Accepted: April 24,2001

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39370441) and National Key Science and Technology Project of China (No. 96-C01-01-06)

The nucleotide sequences (Rccn4) reported in this paper have been submitted to the CenBank database under the accession number AF320845

<sup>\*</sup>Corresponding author Tel:86-28-5229053; Fax:,86-28-5222753:e-mail:YuMQ @cib.ac.cn

Key words wheat (E 10), cereal cyst nematode resistance gene, nucleotide-binding site (NBS), cloning and sequencing

禾谷孢囊线虫(Heterodea avenea)是危害小麦、大麦、燕麦等禾谷类作物的世界性重要病源线虫.它主要危害作物根部,造成产量严重损失,在澳大利亚、欧洲、印度、中东等地区禾谷孢囊线虫危害相当严重<sup>[1]</sup>.我国自1989年陈品三<sup>[2]</sup>等首次报道禾谷孢囊线虫危害小麦以来,目前已在我国小麦主产区河南、河北、山西、湖北、北京、内蒙古等地区有广泛分布,危害面积达100万公顷以上,成为我国禾谷类作物新的病害.

由于小麦属(Triticum)中抗禾谷孢囊线虫资源十分缺乏,而在小麦近缘种属,如节节麦、易变山羊草、偏凸山羊草等植物中含有一些抗禾谷孢囊线虫基因,如若分离、克隆这些基因,则可通过基因工程手段将它们转入小麦中,有效地防治禾谷孢囊线虫的危害.然而,由于禾谷类作物基因组很大,且重复序列高,克隆它们特别困难,因此到目前为止,只有抗禾谷孢囊线虫基因 Cre3 被克隆[3].分析已克隆的一些植物抗病基因如节节麦的 Cre3 基因、拟南芥的Rpm1、Rps5 基因、蕃茄的 I2-C 基因、亚麻的L6 基因、烟草的 N 基因,发现它们在 NBS-LRR 区都有数个极为保守的模体[4].这一共同特性为设计 PCR 简并引物提供了的基础,利用 NBS-LRR 区保守序列设计引物,已从蕃茄[5]、大豆[6]、小麦和大麦[7]等植物中克隆了多个含 NBS-LRR 区的抗病基因同源基因.

迄今为止,国内外尚无克隆来自易变山羊草抗 禾谷孢囊线虫基因的报道.本文利用已克隆的抗禾 谷孢囊线虫基因 Cre3 的 NBS 区保守序列设计引物, PCR 特异扩增,克隆了来源于易变山羊草的抗禾谷 孢囊线虫基因 NBS 编码区并对目的基因进行了克 隆和序列分析.

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

抗禾谷孢囊线虫的小麦品系 (E-10) 是由余懋群等将抗禾谷孢囊线虫的易变山羊草与小麦寄主品系 Lutin 杂交,杂交后代再与 Lutin 连续多代回交后自交得到的一个抗禾谷孢囊线虫的抗性稳定的近等基因系 (2n = 42),这些材料由本室育成并保存,禾谷孢囊线虫抗性鉴定由中国农科院植物保护研究所完成.大肠杆菌 JM109 购自华美公司,质粒 T-Vector 购自 Promega 公司.

#### 1.2 试剂

PCR 反应所需试剂及各种限制性内切酶,DNA 回收试剂盒分别购自 Boehringer Mannheim 公司和 Promega 公司.

#### 1.3 方法

- 1.3.1 小麦总 DNA 提取 取小麦黄化苗采用 SDS 方法<sup>[8]</sup>提取基因组总 DNA.
- 1.3.2 PCR 扩增 根据已发表的 Cre3 基因 NBS 区保守模体设计并合成以下引物. 正向引物 (forward primer): 5 TGATACTGCATGATGICTGG 3; 反向引物 (reverse primer): 5 GTGCTTCTTATGAACCCTTC 3; PCR 扩增条件:25 µl 反应体系中,正、反向引物各 20 pmol,模板 DNA 40 ng , dNTP 0.2 mmol/L,在 UNO (Biometra) PCR 仪上反应.94 预变性 5 min,94 1 min,52 1min,72 72 s,经 35 个循环后,再 72 延伸 7 min.
- 1.3.3 PCR产物克隆 PCR产物利用 PCR产物纯化试剂盒(Promega公司),低融点琼脂糖纯化回收目的片段. 纯化的 PCR 片段与 T-Vector连接,然后转化JM109感受态细胞,蓝、白斑筛选阳性克隆,碱法小量提取质粒 DNA,酶切鉴定重组子<sup>[9]</sup>.
- 1.3.4 DNA 序列测定和分析 利用 T7 测序引物,在 AB I377 全自动测定仪上进行双链 DNA 测序.序列分析用 DNASIS、BLAST、Protparam motif finder 等软件,所用数据库为 CenBank、Prosite 等.

#### 2 结果

## 2.1 抗禾谷孢囊线虫基因 DNA 编码区的 PCR 扩增和克隆

以抗禾谷孢囊线虫的小麦近等基因系 (E·10) 基因组 DNA 为模板 ,经 PCR 扩增得到仅一条约 530 bp 条带 ,与预期大小相符 ,不加模板的负对照无扩增产物 ,如 Fig. 1 所示. 该片段克隆到 T-vector 上 ,转化大肠杆菌 JM109 ,然后经 X-gal 平板筛选白色菌落 ,碱 法小量提取白色菌落质粒 DNA ,用 Sac + Sac 双酶切鉴定含有约 530 bp 的目的片段 ,见 Fig. 2. 得到含约 530 bp 的重组子 ,任意挑取 5 个测序.

#### 2.2 抗禾谷孢囊线虫基因 DNA 编码区序列分析

对克隆到的 5 个约 530 bp 的 DNA 进行序列测定,发现克隆 Rccn4, GenBank号: AF320845, 片段长532 bp,其中编码区长528 bp,可编码 1 个 176 个氨

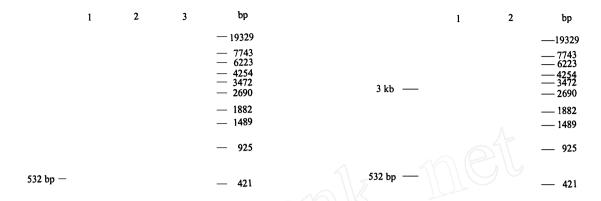


Fig. 1 Target fragment of the PCR

- 1. Negative control; 2. PCR product;
- 3. DNA merker EcoT 4

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant target fragment

- 1. T-vector/Rccn4 Sac + Sac
- 2 DNA marker FcoT14

基酸残基的不完整开放读码框,没有发现内含子结构,也没有启动子和终止子,如 Fig. 3. 编码的蛋白质分子量为 20. 4 kD,等电点为 8. 89,与 Cre3 的 NBS 区

核苷酸同源性 99.4 %(引物区除外),氨基酸同源性 为 98 %(引物区除外),如 Fig. 4 所示.

Fig. 3 Nucleotide sequence and amino acid coding region sequence of Rccn4

```
Rccn4 ILDDVWCNAD VGNQELPKLL SPLKKGKKES KIPVTTRSKY ALPDLCPGVR YTAMPITEVD
Cre3
     VLDDVWCNAD VGNQELPKLL
                             SPLKKGKKGS
                                        KILVTTRSKY
                                                   ALPDLCPGVR
                                                               YTAMPITEVD
Rccn4
     DTAFFELFMH YALEDGQDQS
                             MFQNIGVEIA
                                        KKLKGSPLAA
                                                   RTVGGNLRRO
                                                               ODVDHWRRVG
 Cre3
     DTAFFELFMH YALEDGQDQS
                             MFQNIGVEIA
                                        KKLKGSPLAA
                                                   RTVGGNLRRO
                                                               ODVDHWRRVG
     DQDLFKVWTG PLWWSYYQLG
                             EQARRCFAYC SIFPRRHRLY RDELVRLWMA
     DQDLFKVWTG PLWWSYYQLG EQARRCFAYC SIFPRRHRLY RDELVRLWMA EGFIRN
```

Fig. 4 The comparison between the Rccn4 amino acid coding sequence and the cereal cyst nematode resistance gene Cre3

Rccn4 基因含有已知抗病基因 NBS 区域的几个 ( ) T(T/S) R,( ) G(L/S) PLA (A/I/L) 和 ( ) RCF 保守模体 kinase2a 区的 I(V) LDD 和 Kinase3a 区的 (A/L) Y,如 Fig. 5 所示.

Gene	Kinase 2a	(i)	(ii)	(iii)
Rccn4	I LDDVW	ESK I P V TTRS K	KGSPLAARTVGG	RRCFAYCS
Cre3 CD2	VLDDVW		KGSPLAARTVGG	
Rpm1			QGLPLA IAS LGS	
Rps2			GGLPLALI T LGG	
N			KGLPLALKVWGS	
L6	VLDDVW	QS R FI I TS RS M	AGLPLTL KV I GS	IACFFI GQ

Fig. 5 Alignment from four conserved regions of similarity between the Rccn4 amino acid sequence and the resistance genes Cre3 CD2, Rpm1, Rps2, N and L6

用 Motif finder 软件搜索发现,Rccn4 基因编码区第  $27\sim30$  位 KKES 氨基酸残基是一个 cAMP 和 c GMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点,第  $35\sim37$  位的 TTR 是一个蛋白激酶 C 磷酸化位点,第  $57\sim60$  位的 TEVD 氨基酸残基是一个酪蛋白激酶 的磷酸化位点,第  $48\sim53$  (GVR YTA)、 $76\sim81$  (GQDQSM)、 $86\sim91$  (GVEIAK)、 $95\sim100$  (GSPLAA) 位氨基酸残基是 N-端豆蔻酰化位点,第  $25\sim28$  位 KGKK是一个酰胺化位点,

#### 3 讨论

根据抗禾谷孢囊线虫基因 Cre3 的 NBS 区保守 模体设计引物,用 PCR 方法从抗禾谷孢囊线虫的小 麦品系(E·10)中扩增得到一个大小为 532 bp 的目的 片段,其编码区含有已知含 NBS 区的抗病基因,如 Cre3、Rpm1、Rps2、N、L6基因等共有的几个保守模体 kinase 2a 和 kinase 3a,见 Fig. 5. 通过 Blast 同源性 (identity) 比较发现,除引物区外, Rccn4 与 Cre3 的 NBS 区核苷酸序列只有 3 个碱基差异,如 Fig. 3 中所 示,其中 Rccn4 的第 69 位,T(Rccn4) G(Cre3),第 86 位 A (Rccn4) G (Cre3),第 98 位 C (Rccn4) (Cre3),同源性达 99.4 %; Rccn4 与 Cre3 的 NBS 区 氨基酸序列只有 2 个氨基酸不同,其中 Rccn4 中第 29 位是谷氨酸(Qu)而 Cre3 是甘氨酸(Qy),第 33 位 Rccn4 上是脯氨酸(Pro),而 Cre3 上是亮氨酸(Leu), 同源性为 98 %. 可以看出,我们所克隆的 Rccn4 基 因属于一个抗禾谷孢囊线虫基因的 NBS 区序列, Cre3 基因来自于小麦近属种属节节麦,而我们克隆 的含 NBS 基因序列 Rccn4 来自于小麦近缘种属易变 山羊草,这两个基因 NBS 区核苷酸差异只有 0.6 %,氨基酸差异只有1%,保守模体完全一致,它们 可能属于抗禾谷孢囊线虫基因家族的不同基因,且 亲缘关系比较近.

Rccn4 这个基因序列,没有发现启动子和终止子,编码的是一个不完整的开放读码框,没有内含子结构,是一个完整的抗禾谷孢囊线虫基因的部分序列. Cre3 基因除含 NBS 区外,还有一个 LRR 区.已克隆的植物抗病基因大多有 LRR 区,这个区域编码的蛋白对病原体特异识别很重要,它作为受体与病原配体特异结合,主要参与病原体的特异识别和抗病信号的形成[10],推测完整的 Rccn4 基因可能也含有LRR 区.

许多蛋白家族包括 RAS 族、ATPase 延伸因子、G 蛋白都发现有 NBS 位点,这些蛋白家族广泛参与细 胞生长、分化、细胞骨架构成、小泡转运和对病原体 防御反应[11]. NBS 出现在很多 ATP/GIP 结合蛋白 中,虽然这些基因产物本身没有激酶活性,但它们可 能激活激酶或 G蛋白,参与蛋白质磷酸化,从而放 大抗病反应信号,使植物对病原产生过敏反应[12] (hypersensitive response, HR). 通过 motif finder 发现, 在第27~30、35~37、57~60位氨基酸位点上分别有 一个 cAMP 和 c GMP 依赖的蛋白激酶、蛋白激酶 C、 酪蛋白激酶 的磷酸化位点 当病原配体与抗病基 因的受体蛋白特异结合后,就可以使相关蛋白激酶 磷酸化,放大抗病信号,最终引起氧迸发,导致 HR 反应. Rccn4 基因的第 48~53、76~81、86~91、95~ 100 位氨基酸是 N 端豆寇酰化位点,这些部位可与 抗病相关蛋白如 cAMP 依赖的蛋白激酶,酪氨酸激 酶的催化亚基结合、引起蛋白质豆寇酰化、使这些激 酶活化,级联放大抗病信号,从而参与抗病防御信号 的传递, NBS 区域具有结合核苷酸活性,对抗病防御 反应形成很重要,特别是这一区域有些关键氨基酸 残基,与植物抗病信号传递密切相关,Bent 和 Baker 对 Rps2 基因[13]和 N 基因[11] 定点缺失突变实验,发 现有几个关键部位氨基酸残基缺失后,植物不能产 生 HR 反应,这就暗示这一区域对植物抗病防御反 应形成有重要作用.目前研究发现,植物防御反应可 能与哺乳动物巨噬细胞超氧释放传递途径相似:受 体与配体相识别 G蛋白 蛋白激酶 C(PKC) Ca<sup>2+</sup> 进入细胞 蛋白激酶 磷酸化质膜 NAD(P) H 氧化酶 从而激活它的活性 O2 迸发 HR[14].

本研究所克隆到的来自于易变山羊草的抗禾谷孢囊线虫基因 Rccn4 与来自于节节麦抗禾谷孢囊线虫基因 Cre3 具有高度的同源性,这种高度的同源性说明 Rccn4 基因所编码的蛋白应有抗禾谷孢囊线虫的生物学功能.通过基因核苷酸序列比较分析,发现 Rccn4 基因与来自于偏凸山羊草的既抗线虫又抗锈病基因 V6 具有 82 %的同源性,人工接种和田间抗病鉴定发现,小麦品系(E·10)既抗禾谷孢囊线虫又抗锈病,是否 Rccn4 基因所编码的蛋白具有既抗禾谷孢囊线虫又抗锈病的生物学功能,还需作进一步研究.

#### 参考文献 (References)

- 1 Meagher J W. World dissemination of the cereal cyst nematode ( Hetero-dera avenae) and its potential as a pathogen of wheat. J Nematol, 1977,  $9:9\sim15$
- 2 陈品三,王明祖,彭德良. 我国小麦禾谷孢囊线虫(Heterodera

- avenae wollenweber) 的发现与鉴定初报. 中国农业科学,(Chen Pin san, Wang Ming zu, Peng De-liang. Finding and identification of the cereal cyst nematode(Heterodera avenae wollenweber) from wheat in china. China Agri Sci), 1991, 24 (5): 89~91
- 3 Evans S L , Odile M , Rudi A. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide  $\sim$  binding domain and a leucine-rich region at the Cre3 nematode resistance locus of wheat. Genome , 1997 , **40**: 659  $\sim$  665
- 4 胡健,王国英. 植物抗病基因的研究进展. 农业生物技术学报 (Hu Jian, Wang Guorying. Progress of studies on disease-resistant genes in plants. *J Agri Biotechnol*), 1999, **10** (3): 41~47
- 5 Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. Characterization of disease resistance gene-like sequences in near-isogenic lines of tomato. *Thero Appl Genet*, 1998, 96: 331 ~ 338
- 6 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11751~11756
- 7 Seah S, Sivasithamparam K, Karakousis A, Lagudah E S. Cloning and characterisation of a family of disease resistance gene analogs from wheat

- and barley . Thero Appl Genet , 1998 , 97 : 937 ~ 945
- 8 Dellaporta S L , Wood J , Hicks J B. A plant DNA minipreparation version . Plant Mol Biol Rep , 1983 , 1(4): 19 ~ 21
- 9 Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular cloning , A Laboratory Manual ,2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Brian J S, Frederick M A, Barbara J B, Jeffrey G E, Jonathan D GJ. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 1995, 268:661 ~667
- 11 Baker B ,Zambryski P ,Staskawicz B , Dinesh-Kumar S P. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* , 1997 , **276**(2) : 726 ~ 733
- 12 Traut T W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that from different types of nucleotide-binding sites. Eur J Biochem, 1994, 222:  $9 \sim 19$
- 13 Bent A F. Plant disease resistance genes: Function meets structure. Plant Cell , 1996 ,8: 1757 ~ 1771
- 14 余叔文,汤章诚. 植物生理与分子生物学(第2版). 北京:科学 出版社(Yu Shu-wen, Tang Zhang-cheng. *Plant Physiology and Molec-ular Biology*, 2nd ed. Beijing: Science Press), 1998, 796~802

#### 基因变异与体内脂肪贮存的关系

西方世界人们饮食中卡路里偏高,故而肥胖蔓延势头较猛. 研究者现已发现高卡路里饮食导致肥胖的原因.4年前,科学家鉴定了1个基因,称为 UCP2. 该基因的变异,产生1个分子,称为解偶联蛋白,即 UCP2. 它可使吃下去的饮食中的卡路里变成散发热,而不是变成脂肪. 自从鉴定了 UCP2 基因后,研究者便不断在寻找该基因的变异以帮助解释肥胖. 来自澳大利亚及法国的几个研究所的一组研究者在 2001 年 6 月 Nature Genetics 上报道,靠近 UCP2 的编码基因的一个调空区域,称为启动子,若发生变异便似乎会影响肥胖的危险率. 研究者研究了实验室生长的细胞和在过度肥胖以及身体苗条的澳大利亚的人群中该基因的变异情况. 他们发现,在实验室生长的细胞中以及在人群中,脂肪细胞的 UCP2 基因活性在存在该基因的一个变异时要高于存在其他变异时. 而且研究者在该项研究中发现,已证明有该基因较高活性的人,其肥胖的危险率较低,但尚能觉察出来. 研究者指出,每人每年每增加1%能量贮存效率,就能转变成为1 kg 累积的脂肪. 该项研究所检查的澳大利亚志愿者中,有一半人该基因启动子形式与高度脂肪存贮有关:经过计算认为,在无该启动子常见的变体的志愿者中,肥胖的人数要少15%. 研究者说,该项研究中的 UCP2 启动子变体使人贮存更多的脂肪为澳大利亚人的普遍状况,该观察资料反映了该国家的历史. 研究者认为,这种脂肪贮存有时候是有利的,如发生饥荒时. 但由于现在容易得到高脂肪食物,脂肪贮存机制就变得有害了. 现在该研究组正在研究世界上其他地区的 UCP2 启动子变异的作用.

(李潇 摘译自 J. Netting: Scienec News, Vol. 159, June 2, 2001, p 342)