

谷子丝/苏氨酸蛋白激酶类抗病基因 同源序列的克隆与分析

瓮巧云, 宋晋辉, 张爱香

(河北北方学院 农林科技学院, 河北 张家口 075000)

摘要: 根据已知丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(STK)类抗病基因保守结构域设计简并引物, 以抗锈病谷子品种十里香和感锈病谷子品种豫谷 1 号为材料, 利用抗病候选基因(RGA)技术对谷子 STK 类抗病基因同源序列进行克隆和分析, 以期对谷子抗锈病相关基因的克隆及抗锈机制的研究奠定基础。结果表明, 从抗病材料中获得 1 条 STK 类似序列(STK-1), 长度为 474 bp。BLASTP 分析表明, 该序列含有 PKc 保守结构域, 且与小麦抗锈病激酶 Lr10、水稻丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体 PR5K、玉米丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体 1、燕麦激酶受体 LRK10 等同源性在 71%~76%。从谷子抗锈品种十里香中获得的 STK 类抗病基因同源序列可能是候选的谷子抗锈病相关基因。

关键词: 谷子; 抗病候选基因; STK 类抗病基因同源序列; 抗锈机制

中图分类号: S435.15 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0106-03

Cloning and Analysis of STK Disease Resistant Gene Analogs in Millet

WENG Qiao-yun, SONG Jin-hui, ZHANG Ai-xiang

(College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: According to the conserved amino acid domains of STK (serine/threonine kinase) disease resistant genes, the corresponding degenerated primers were synthesized. And then the resistant gene analogs were isolated by PCR amplification from *Setaria italica* Beauv. cultivar Shilixiang and Yugu NO. 1, which were resistant and susceptible to *Uromyces setariae-italicae* infection, respectively. The result showed that a piece of 474 bp STK-like sequence containing PKc conservative domain was obtained from Shilixiang. BLASTP analysis result showed that it had 71% to 76% homology with *Triticum aestivum* rust resistant kinase Lr10, *Oryza sativa* serine/threonine kinase receptor PR5K, *Zea mays* serine/threonine kinase receptor 1, *Avena sativa* kinase receptor LRK10 and so on. The STK disease resistant gene analog obtained from cultivar Shilixiang might be rust-resistant related gene in *S. italica* Beauv.

Key words: *Setaria italica* Beauv.; RGA; STK disease resistant gene analogs; rust-resistant mechanism

抗病候选基因(candidate resistant gene analogs, RGAs)克隆法是依据抗病基因保守结构域设计引物进行 PCR 扩增获得序列的方法。研究表明, RGAs 大多是抗病基因的一部分, 或者与抗病基因连锁^[1], 或者就是潜在的抗病基因^[2]。目前, 利用 RGA 技术从棉花、甜菜、大豆、高粱、辣椒和玉米等植物中分离

到了许多抗病基因同源片段^[3-6]。因此, 利用 RGA 技术克隆抗病基因是一条快捷、简单的途径。

在基因对基因模式的植物抗病机制中, 蛋白激酶介导的信号传导起着核心作用^[7]。迄今为止, 已克隆的抗病基因如水稻抗白叶枯病基因 *Xa21*、小麦抗叶锈基因 *Lr10* 和番茄抗假单胞杆菌基因 *Pto* 等, 都含

有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, STK) 结构域^[8-10]。因此,本研究根据已克隆的蛋白激酶保守结构域序列设计引物,以谷子抗锈病/感锈病品种为材料,利用 RGA 技术从谷子中分离丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类抗病基因同源序列,以期为谷子抗锈病基因的克隆及揭示谷子抗锈机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试植物材料为十里香(抗锈病谷子品种)和豫谷1号(感锈病谷子品种),由河北省农林科学院谷子研究所提供。

1.2 谷子植株总 RNA 的提取及引物设计

按照 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(天根生化科技有限公司)和 M-MLV 反转录酶(大连宝生物技术有限公司)的使用说明,提取植物组织总 RNA 并合成第一链 cDNA。

根据已知的番茄 Fen 和小麦 Lr10 等蛋白激酶序列设计简并引物: STK-L (5'-AGGGWGGATT-TGGRA-3') 和 STK-R (5'-CCAAAMTCWGWRA-TYTTTGG-3') (混合碱基代码 R=A/G, Y=C/T, W=A/T, M=A/C, S=G/C, H=A/T/C, N=A/T/G/C), 由上海生物工程技术有限公司合成。

1.3 谷子抗病基因同源序列的克隆及分析

1.3.1 RGA 法扩增谷子抗病基因同源序列 分别以合成的谷子抗锈病和感锈病植株的第一链 cDNA 为模板,利用上述引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 模板 1.0 μ L (20~50 ng), 10 μ mol/L 引物各 0.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.3 μ L, 补 H₂O 至 25 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 7 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 40~45 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。利用 UNIQ-10 柱式凝胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)回收目的条带,进行克隆、测序。

1.3.2 基因同源性分析 应用 NCBI 网站上的 BLASTP 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 谷子总 RNA 的提取结果

利用 Trizol 试剂提取的总 RNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后,发现总 RNA 的 28S 与 18S 带型比较完整(图 1)。紫外吸收检测表明, OD_{260/280} 均介于 1.8~2.0,完全可用于下一步的研究。

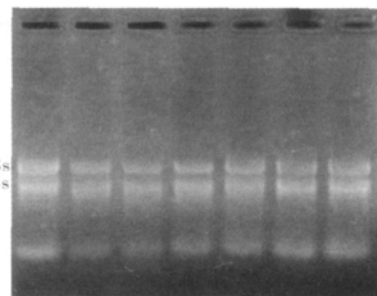
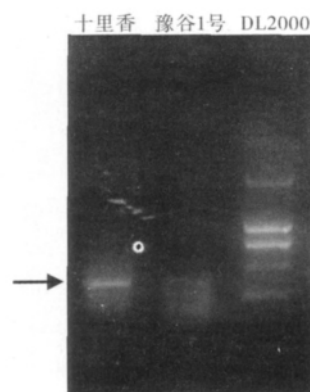


图1 谷子总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

2.2 谷子抗病基因同源序列的克隆

采用设计的简并引物,以合成的谷子十里香和豫谷1号的第一链 cDNA 为模板分别进行扩增。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,在抗锈病植株十里香中扩增获得了长度约为 400 bp 的条带,而感病植株豫谷1号中未扩增到条带(图 2)。回收十里香中扩增到的特有条带,进行克隆、测序。



箭头示抗锈病植株十里香中的特有条带

图2 谷子抗病基因同源序列的扩增结果

2.3 谷子 STK 类抗病基因同源序列分析

经克隆测序发现,抗病材料十里香中获得的 RGA 片段长度为 474 bp (命名为 STK-1)。其氨基酸序列如下:

```

A R L P F D D * G G F G S V Y K G D L S N
                                催化结构 I
G V P V A V K V L E N S K G E G E E F I N E
                                催化结构 II
V A T I G T I H H A N V V R L L G F C S E G
S R R A L I Y E F M P N A S L E K Y I F S R A
S D T C C Q E N L T P N R M L D I A T G I A K
G I E Y L H Q G C N Q R I L H F D I K P S N I
L L D Y S F K P K I S D F G I S G R S A R T E.
  
```

利用 BLASTP 软件,将谷子 STK 类抗病基因同源序列与 GenBank 数据库中已知的氨基酸序列进行比对分析。结果表明,该片段含有 PKc 保守结构域(图 3),且与小麦受体激酶、抗锈病激酶 Lr10、蛋白激酶 LRK33 和 LRK19 同源性在 73%~75%;

与水稻丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体 PR5K 同源性为 76%；与玉米丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体 1 同

源性为 75%；与燕麦激酶受体 LRK10、LRK9、LRK45 同源性在 71%~76%。

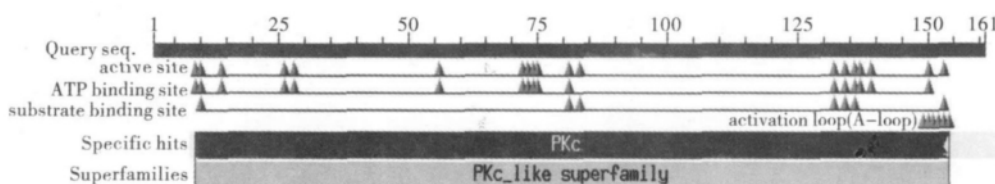


图 3 谷子 STK 类抗病毒基因同源序列保守结构域分析结果

3 结论与讨论

RLK(receptor-like kinases, RLKs)蛋白是重要的蛋白激酶家族之一,直接参与信号的跨膜转移过程,在应答光刺激、病原侵袭、生长调节因子、温度胁迫和营养缺乏等信号传导方面起着重要作用。已报道的大多数植物来源的 RLKs 蛋白都属于 STK 类蛋白激酶家族^[11]。本研究根据 STK 类抗病基因保守结构域设计简并引物,利用 RGA 技术从谷子抗锈病植株十里香中获得了 1 条丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类抗病基因同源序列。经分析发现,该序列含有 STK 类型抗病基因产物的催化结构域 I 和 II 的保守氨基酸序列,具有 PKc 保守结构域。经 BLASTP 分析发现,该序列与小麦、水稻、玉米、燕麦的受体激酶、蛋白激酶、抗锈病激酶等蛋白同源性在 71%~76%。因此,本研究从谷子抗锈品种十里香中获得的 STK 类抗病基因同源序列可能是候选的谷子抗锈病相关基因。下一步将通过 RACE 或 Genome walking 技术获得其 DNA 和 cDNA 全长序列,并进行病害诱导条件下的表达试验,以鉴定其与抗病性的关系,明确其抗病机制。

参考文献:

- [1] Radwan O, Bouzidi M F, Nicolas P, *et al.* Development of PCR markers of the Pl5/Pl8 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(1): 176-185.
- [2] 王彦华, 候喜林, 申书兴, 等. 不结球白菜抗病基因同源序列的克隆及分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2621-2626.
- [3] Totad A S, Fakrudin B, Kuruvinschetti M S. Isolation and characterization of resistance gene analogs(RGAs) from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) [J]. Euphytica, 2005, 143: 179-188.
- [4] 张丽英, 陈儒钢, 张俊红, 等. 辣椒抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 169-175.
- [5] Yi T, Yuan F H, Leister R T, *et al.* Mutational analysis of the *Arabidopsis* nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene RPS2[J]. The Plant Cell, 2000, 12: 2541-2554.
- [6] Xiao W K, Xu M L, Zhao J R, *et al.* Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113: 63-72.
- [7] 史冬燕, 黄兴奇. 东乡野生稻 STK 抗病基因片段的克隆及序列分析[J]. 作物杂志, 2009(2): 26-29.
- [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: 1804-1806.
- [9] 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: 1432-1436.
- [10] Feuillet C, Schachermayr G, Keller B. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat[J]. Plant Journal, 2001, 11: 45-52.
- [11] 孔巍, 刘学义. 植物 R 基因特异性分子进化[J]. 分子植物育种, 2003, 1(1): 89-96.