

野生茄子 (*Solanum torvum*) 抗黄萎病相关基因 *StoVe1* 的克隆与分析

史仁玖^{1,*} 殷玥^{1,*} 王忠¹ 陈敏¹ 黄权生² 黄乐平² 杨清^{1,**}

¹南京农业大学生命科学院, 南京 210095; ²新疆农业科学院核生物技术研究所, 乌鲁木齐 830000

摘要 采用 RT-PCR 和 RACE 技术从野生茄子中扩增克隆到一个抗黄萎病相关基因, 命名为 *StoVe1*, 其 cDNA 全长 3 400 bp, 含有 3 153 bp 的完整开放阅读框, 编码 1 051 个氨基酸, 该基因编码的蛋白序列与刚果野茄、类番茄和番茄 *Ve1* 编码的氨基酸序列同源性分别为 82%、81% 和 80%, 且有很高的功能区段保守性。将该 cDNA 全长序列提交 GenBank, 登陆号为 DQ020574。半定量 PCR 表明该基因为组成型表达, 在根中表达最多, 叶中最少。

关键词 野生茄子; *StoVe1* 基因; 克隆; 表达

Cloning and Analysis of Full-length cDNA of *StoVe1* Gene from *Solanum torvum*

SHI Ren-Jiu^{1,*}, YIN Yue^{1,*}, WANG Zhong¹, CHEN Min¹, HUANG Quan-Sheng², HUANG Le-Ping², YANG Qing^{1,**}

¹College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Institute of Nuclear Biotechnology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000, China

Abstract The full-length cDNA of a gene associated with verticillium wilt disease resistance, named *StoVe1*, was amplified and cloned from Japanese *Solanum torvum* by RT-PCR and RACE. The cDNA contained 3 400 bp with an open reading frame (ORF) of 3 153 bp and encoded 1 053 amino acid residues. The deduced amino acid sequence showed 82% homology to SaVe1 from *Solanum aethiopicum*, 81% homology to SIVe1 from *Solanum lycopersicoides* and 80% homology to Ve1 from *Lycopersicon peruvianum* and also highly conserved domains of function. This gene has been registered in GenBank with accession number DQ020574. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that *StoVe1* expression was different in roots, stems and leaves, and richer in roots, poor in leaves.

Key words *Solanum torvum*; *StoVe1* gene; cloning; expression

黄萎病 (verticillium wilt) 是一种由大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 和黑白轮枝菌 (*Verticillium albo-atrum*) 引起的植物维管束病害, 在世界各地引起许多重要经济作物如陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)、茄子 (*Solanum melongena*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、甘蓝 (*Brassica oleracea*)、油菜 (*Brassica napus*)、白菜 (*Brassica chinensis*)、辣椒 (*Capsicum frutescens*) 等黄萎病 (张启刚等 1998), 严重影响了这些作物的产量与产品品质, 全球每年因黄萎病危害所造成的经济损失高达 10 亿多美元, 克隆抗黄萎病基因并将之应用于育种可能是解决上述问题的有效途径。

目前, 有关茄科植物抗黄萎病基因克隆的报道很少。在番茄中, Kawchuk 等 (1998, 1994, 2001) 分离到抗黄萎病基因家族的 2 个成员基因 *Ve1* 和 *Ve2*, 将之转化马铃薯后成功提高了其抗黑白轮枝菌的能力。本文所用野生茄子 (*Solanum*

torvum) 来自日本, 对黄萎病具有极强的抗性。试验根据番茄 *Ve1*、刚果野茄 (*Solanum aethiopicum*) *SaVe1* 的 cDNA 全长序列比对结果设计引物, 通过 RT-PCR 及 5'、3'-RACE 扩增得到了野生茄子抗黄萎病基因的 cDNA 序列, 并对该基因进行了组织表达分析。

材料与方法

野生茄子 (*Solanum torvum*) 由我校园艺学院朱月林先生提供。植株栽种于温室中, 于旺盛生长期取幼嫩侧枝茎段用作离体培养, 以再生组培苗为试验材料。

总 RNA 的提取按照北京天为时代公司

收稿 2006-01-26 修订 2006-05-25

资助 新疆农业科学院核生物技术研究所自治区重点实验室基金。
*同为第一作者。

** 通讯作者 (E-mail: qyang19@njau.edu.cn, Tel: 025-84395221)。

TRIZOL 试剂的说明书, 稍加改进。cDNA 第一链的合成按照 Takara RNA PCR Kit (AMV) 使用说明书进行。

根据番茄 *Ve1*、刚果野茄 *SaVe1* 的 cDNA 全长的多重比对结果, 分别设计一对扩增 *StoVe1* 5' cDNA 末端的引物 (P1: 5' - GTTCCTTCG - AACTGCATAACTGAG - 3'; P2: 5' - TGCATT - GCGTAACTCGTCGACTTG - 3') 和一对扩增 *StoVe1* 中间编码区的引物 (P3: 5' - CCTTTCACGTAA - TGGTCTAACTGG - 3'; P4: 5' - GTTCCCAA - GATTCAGCACTCCAAG - 3')。根据 *StoVe1* 中间编码区测序结果, 设计 2 条 *StoVe1* 3' cDNA 末端扩增正向引物 (P5: 5' - GTCTGTGGAGCAGCC - TTACA - 3'; P6: 5' - AGCAATTCATGCCA - CCAGA - 3'); 反向引物采用 Takara RNA PCR Kit (AMV) 提供的 M4 (5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3')。以反转录产物为模板进行 PCR 扩增。反应体积为 50 μL , 10 \times 缓冲液, 5 μL ; 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 1 μL ; P1, 2 μL ; P2, 2 μL ; cDNA 第一链模板, 1 μL ; Tag 酶 (2 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0.626 μL ; 双蒸水, 38.4 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 35 个循环, 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查后, 切下目的条带, 用 PCR 产物纯化试剂盒回收 DNA。与 pMD 18-T Vector 连接, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

根据上面测序得到的 *StoVe1* cDNA 5' 序列、中间编码区序列和 3' 序列拼接, 得到 *StoVe1* cDNA 全长序列。据此, 设计一对扩增 *StoVe1* cDNA 全长的引物 (P7: 5' - ATGAAAATGATGGC - AACTCTGTAG - 3'; P8: 5' - CTCATCATT - ATGCGTTTAAGGATC - 3')。反应体积、反应条件、PCR 产物回收、连接、转化和测序同上。

将 DNA 序列及其对应的氨基酸序列与 GenBank 中已有的相应序列进行比较, 用 DNAMAN 软件对结果进行分析。

分析 *StoVe1* 在各组织中表达时, 分别取野生茄子组培苗的根、茎、叶提取总 RNA, 用中间编码区引物 P3 和 P4 进行 RT-PCR, 分析 *StoVe1*

在各组织中的表达差异。PCR 扩增条件同上, 循环数改为 26。内参采用组成型表达的 *GAPDH* 基因, 引物分别为 *GAPDH1* (5' - CAAGGACT - GGAGAGGTGG - 3'), *GAPDH2* (5' - TTCCT - CGTTGTCGTACC - 3'), 循环数为 26。取全部 PCR 产物点样, 凝胶电泳, 拍照。

实验结果

1 总 RNA 的提取

采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。从图 1 可以清晰地看到 28S 和 18S rRNA 的 2 条主带, 28S/18S 的亮度比大于 2, 最前面的 5S rRNA 隐约可见。这表明总 RNA 纯度较高, 完整性符合试验要求。

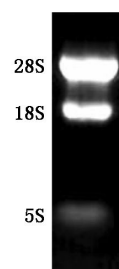
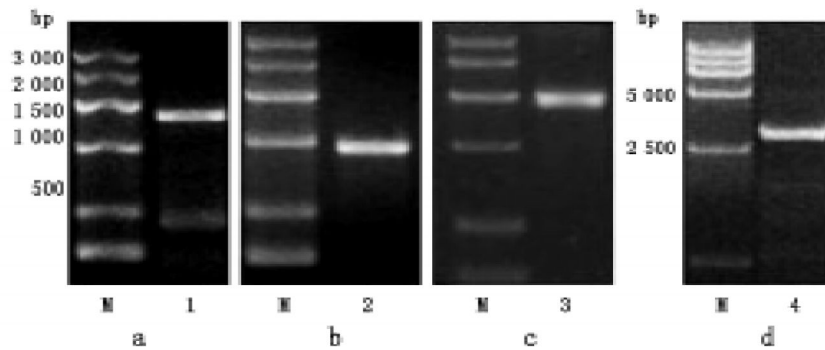


图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

2 *StoVe1* cDNA 的扩增

以野生茄子叶片总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板, 进行 *StoVe1* 的 5'、中间和 3' 片段的引物扩增。P1 和 P2 扩增得到一条约 1 400 bp 的条带 (图 2-a), 测序后准确长度为 1 405 bp。核酸序列比对 (BLASTN) 表明它与 *Ve1* 和 *SaVe1* 的相关区段有 87% 和 89% 的一致性。引物 P3 和 P4 扩增得到一条约 1 000 bp 的条带 (图 2-b), 测序后准确长度为 958 bp。核酸序列比对 (BLASTN) 表明它与 *Ve1* 和 *SaVe1* 的相关区段有 89% 和 91% 的一致性。该片段与 5' 末端 1 405 bp 的片段有 195 bp 的重叠区, 表明来自同一基因。

正向引物 P5 和 P6, 与 Takara RNA PCR Kit (AMV) 提供的反向引物 M4 进行巢式 PCR。用 P5 与 M4 进行第一轮 PCR, 以第一轮 PCR 产物为模板, 用 P6 与 M4 进行第二轮 PCR 扩增, 得到 1 500 bp 左右的特异条带 (图 2-c), 测序结果与前面扩增

图2 *StoVe1*的RT-PCR扩增结果Fig.2 RT-PCR products of *StoVe1*

1: *StoVe1* 5' RACE 扩增片段; 2: *StoVe1* 中间 958 bp 片段; 3: *StoVe1* 3' RACE 扩增片段; 4: *StoVe1* cDNA 序列; M: 分子量标记。

的 958 bp 片段之间有 212 bp 的重叠区, 表明该序列是 *StoVe1* 的 cDNA 3' 末端。

将测序得到的 *StoVe1* cDNA 5' 末端、中间 958 bp 的编码区和 3' 末端序列拼接, 得到 3 400 bp 的 *StoVe1* cDNA 全长序列。据此设计了一对扩增基因 ORF 序列的引物 P7 和 P8。PCR 扩增到了约 3.2 kb 大小的条带(图2-d)。

3 *StoVe1*的核酸序列分析

拼接后 *StoVe1* 基因 cDNA 序列如图 3。该 cDNA 包含一个长 3 153 bp 的可阅读框, 编码 1 051 个氨基酸, 起始于序列 48 bp, 终止于 3 200 bp, 5' 端非编码区的长度为 47 bp, 3' 端非编码区的长度为 200 bp, 在 poly (A) 上游 77 bp 处有典型的真核生物基因 poly (A) 的信号序列 AATAAA。BLASTN 分析结果表明, 该序列与刚果野茄 *Ve1* cDNA 序列的一致性为 93%, 氨基酸序列的同源性为 82% 与类番茄 (*Solanum lycopersicoides*) *Ve1* cDNA 序列的一致性为 88%, 氨基酸序列的同源性为 81%; 与番茄基因 *Ve1* cDNA 序列的一致性为 90%, 氨基酸序列的同源性为 80% (表 1), 推测其为 *Ve1* 基因家族新成员, 命名为 *StoVe1*。该

cDNA 序列已提交 GenBank, 登陆号 DQ020574。

4 *StoVe1*的蛋白质序列分析

StoVe1 编码一条长 1 051 个氨基酸残基的多肽, 理论分子量为 117 kDa, 等电点为 5.74。用 Smart 分析 *StoVe1* 蛋白, 结果显示在蛋白分子的 1~23 位存在一个 23 个氨基酸残基的疏水信号肽; 在蛋白分子的第 105~967 位存在 23 个富含亮氨酸重复序列 (leucine-rich repeat, LRR), LRR 跨越了整个蛋白分子的主体部分, 它有助于受体蛋白与来自胞外的配体的识别和结合。

用 ScanProsite 分析 *StoVe1* 蛋白时发现, 蛋白分子的第 7~28 位存在一个亮氨酸拉链 (leucine zipper, LZ), 基本上位于 N 端信号肽的内部; 蛋白分子的第 98~986 位存在 28 个潜在的 N-糖基化位点; 在整个蛋白分子内部有 29 个磷酸化位点; 在蛋白分子的第 1 042~1 046 位存在一个由受体蛋白介导的内吞作用信号 (endocytosis signal)。用 TMPRED 对 *StoVe1* 蛋白进行疏水性分析, 发现 7 个可能的跨膜结构域。可以推断, *StoVe1* 基因与番茄 *Ve1* 基因一样, 编码一个具有受体介导的内吞作用信号的细胞表面糖蛋白。

表1 野生茄子抗黄萎病相关基因 *StoVe1* 序列与其他植物 *Ve* 相应序列的同源性比较Table 1 Comparison of *S. torvum StoVe1* sequence with the sequences of *Ve* from other plants

植物来源	核酸序列同源性/%	氨基酸序列同源性/%	基因登录号
刚果野茄	93	82	AY598746
类番茄	88	81	AY262016
番茄	90	80	AF365930

5 *StoVe1*在各组织中的表达分析

分别取野生茄子组培苗的根、茎、叶提取总RNA, 用中间 958 bp 编码区代表目的基因, 采用半定量 RT-PCR 的方法分析了 *StoVe1* 在各组织中的表达差异(图 4)。结果显示在正常生长条件下, *StoVe1* 的表达量在根中最高, 茎中次之, 在叶中表达量最低。这说明 *StoVe1* 具有组织表达特异性, 在病原菌未侵染的情况下在根和茎中也有一定的基础表达水平, 这与普遍认为的 *Ve1* 基因是组成型表达基因的观点一致。黄萎病是从根部侵染的维管束病害, 可能是在根中表达量较高的原因。

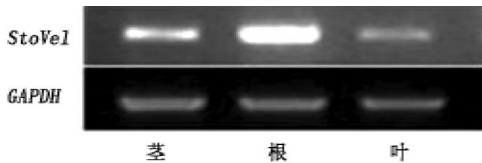


图4 *StoVe1*在野生茄子茎、根和叶中的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *StoVe1* in the stem, root, and leaf of *S. torvum*
GAPDH 为上样量对照。

讨 论

本文通过 RT-PCR 和 RACE 技术从野生茄子中克隆到 *StoVe1* 基因。该基因编码的蛋白序列与刚果野茄、类番茄和番茄 *Ve1* 编码的氨基酸序列同源性分别为 82%、81% 和 80%。在该基因 N 端存在一个疏水的信号肽, 信号肽的内部还发现一个亮氨酸拉链。蛋白主体部分存在 23 个完整或不完整的 LRR 序列, 在 LRR 序列内部存在 28 个潜在的 N-糖基化位点。在 C 末端存在一个明显的跨膜结构域和一个由受体蛋白介导的内吞作用信号。这些特征与番茄 *Ve1* 所编码蛋白极其相似, 据此可以推测 *StoVe1* 与番茄 *Ve1* 一样, 是编码一个具有受体介导的内吞作用信号的细胞表面糖蛋白(Kawchuk 等 2001)。

Ve 基因中的内吞受体可以有选择地结合配基并传递该信号到细胞内, 激活细胞对致病因子的抗性(Remy 等 1999)。与有非常专一抗性传统的 *R* 基因不同, *Ve* 编码的抗性蛋白能抗多种黄萎病菌。番茄 *Ve1* 不仅对大丽轮枝菌 1 和 2 病菌有抗

性, 而且对马铃薯的黑白轮枝菌也有抗性(Kawchuk 等 2001)。有报道指出, 番茄 *Mi* 基因有类似的多抗效应, *Mi* 基因可对线虫和蚜虫产生抗性(Vos 等 1998; Milligan 等 1998)。这种多抗性对农作物的抗病育种可能有潜在的应用价值。

半定量 RT-PCR 分析表明, *StoVe1* 的基础表达量在根中最高, 茎中次之, 叶中最少。黄萎病是根部侵染的维管束病害, 根中 *StoVe1* 起着与抗病相关的自然监控作用, 可能是其在根中表达量高的原因。

植物黄萎病病菌的寄主很广, 可以在不同物种间侵染, 引起黄萎病。这暗示抗黄萎病基因克隆不仅可以应用于寄主所属物种的抗性改良, 而且还可用于转化其它植物增强其抗病性。日本野生茄子对黄萎病有极强的抗性, 因此进一步验证 *StoVe1* 基因的功能和抗性分析, 从而为茄子及其它茄科作物抗黄萎病育种提供有价值的抗性资源无疑是重要的。

参考文献

- 张启刚, 徐明艳, 冷海明, 孙显明, 张涛(1998). 植物轮枝菌萎蔫病的研究进展. 莱阳农学院学报, 15 (1): 48~50
- Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR (1998). Development of sequence characterized DNA markers linked to a dominant verticillium wilt resistance gene in tomato. *Genome*, 41: 91~95
- Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard RJ et al (2001). Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 6511~6515
- Kawchuk LM, Lynch DR, Hachey J, Bains PS, Kulcsar F (1994). Identification of a codominant amplified polymorphic DNA marker linked to the verticillium wilt resistance gene in tomato. *Theor Appl Genet*, 89: 661~664
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM (1998). The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell*, 10 (8): 1307~1319
- Remy I, Wilson IA, Michnick SW (1999). Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, 283 (5404): 990~993
- Vos P, Simons G, Jesse T, Wijbrandt J, Heinen L, Hogers R, Frijters A, Groenendijk J, Diergaarde P, Reijans M et al (1998). The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nat Biotechnol*, 16 (13): 1365~1369