

专题介绍 Special Topics

NBS Profiling: 一种有效寻找植物抗性基因的分子标记

裴冬丽^{1,2}, 李成伟^{2,3,*}

¹河南农业大学农学院, 郑州450002; ²商丘师范学院生命科学系植物与微生物互作重点实验室, 河南商丘476000; ³周口师范学院生命科学系, 河南周口466001

An Effective Molecular Marker of Mining Plant Resistance Gene—NBS Profiling

PEI Dong-Li^{1,2}, LI Cheng-Wei^{2,3,*}

¹College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions, Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 476000, China; ³Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466001, China

摘要: 核苷酸结合位点-富含亮氨酸重复(NBS-LRR)类的抗病基因是植物抗病基因中最大的一类,也是近年来植物抗病分子育种研究的一大热点。NBS profiling是一种新型的寻找NBS-LRR类R基因和R基因同源序列(RGA)的分子标记。本文介绍这一分子标记技术的基本原理、方法步骤、优点及其在寻找植物抗性基因中的作用。

关键词: R基因; 同源序列克隆; NBS profiling

植物抗病基因(resistance, *R*)介导的抗性反应是植物对病原物的防御机制之一。迄今为止,大约有50多个植物抗性基因已得到克隆(Coaker等2005),根据1971年Flor提出的著名的基因对基因学说(Flor 1971),过敏反应相关的抗性反应依赖于寄主中*R*基因和病菌中无毒基因(avirulence, *Avr*)的匹配。*R*基因介导的抗病过程涉及病原无毒基因产物或次生代谢产物与寄主*R*基因产物的相互识别、下游信号传递系统的激活与传递、植物防卫及相关抗病反应,如活性氧的释放、过敏反应、病程相关基因的表达、系统获得性抗性等过程。植物*R*基因的克隆是了解*R*基因的结构特征、研究*R*基因与*Avr*基因互作机制、*R*基因的进化机制、持久抗性及其兼抗抗性机制的重要基础,同时也为植物抗性分子育种提供可直接利用的基因资源。因此,植物*R*基因的寻找有一定的理论意义和应用前景。

1 R基因及同源序列的克隆

1.1 R基因的分类 分析已知的植物抗病基因编码的蛋白质结构,发现它们具有相当高的保守性。根据预测结构域,这些基因可以分为5个主要类别(Baker等1997): (1)含有核苷酸结合位点(nucleotide binding site, NBS)和富含亮氨酸重复序列(leucine-

rich repeats, LRR)的胞内受体蛋白基因; (2)丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, STK); (3)含有胞外LRR结构的跨膜受体蛋白基因; (4)同时含有胞外LRR和胞内STK结构的跨膜受体蛋白基因; (5)编码毒素还原酶的*HMI*基因。依据保守序列设计引物寻找*R*基因同源序列(resistance gene analog, RGA),从而克隆*R*基因的方法被称为*R*基因同源克隆法,具有简便快速的优点。小麦抗叶锈基因*Lr10*的克隆就是利用这一方法克隆的第一个*R*基因(Feuillet等1997)。

1.2 NBS-LRR类R基因和同源序列的克隆 在已经克隆的*R*基因中,NBS-LRR类是已分离*R*基因中最大的一类,占抗病基因的60%左右,广泛存在于植物的基因组中(Hammond-Kosack和Parker 2003; McDowell和Woffenden 2003),并且覆盖整个基因组(Meyers等2002, 2003; Monosi等2004)。NBS结构域存在于大量的ATP和GTP结合蛋白,如ATP

收稿 2009-08-20 修定 2009-10-20

资助 国家自然科学基金(30600413)、教育部科学技术研究重点项目(207064)和河南省科技厅基础与前沿技术项目(082300430320)。

* 通讯作者(E-mail: lichengweiwau@hotmail.com; Tel: 0394-8178010)。

合成酶、鸟苷三磷酸酶等中,表明R基因需要ATP或GTP的参与来完成其功能(Traut 1994)。依据NBS-LRR类R基因N端结构域的不同又分为两大亚类:TIR类,与果蝇及哺乳动物的白细胞介素1的受体蛋白(TIR)具有同源性;non-TIR类,具有一个卷曲螺旋基序(Meyers等1999;Pan等2000)。

虽然不同NBS-LRR类R基因之间核苷酸序列的差异较大,但是它们的氨基酸序列存在一些保守基序(conserved motif):磷酸结合环P-loop,共有序列为GxGxxGR(T/S);一个疏水性的结构域GLPL,序列为GLPLxL;两个激酶结构域kinase-2和激酶kinase-3a(图1)。NBS结构域的功能主要是参与信号转导,通过激活激酶或G蛋白来诱导一系列的防御反应(Hammond-Kosack和Jones 1997)。LRR结构域由一个重复的富含亮氨酸的基序(平均约24个氨基酸)组成,这一结构域参与蛋白质与蛋白质的相互识别,具有特异性地识别病原菌的功能(Takken和Joosten 2000)。

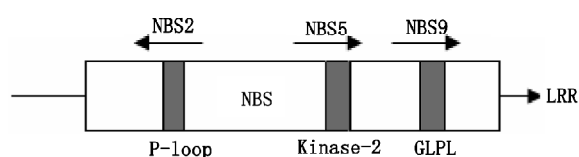


图1 NBS-LRR类R基因的保守基序(van der linden等2004)箭头所指为引物所在位置。

NBS-LRR类R基因的保守基序为基于同源序列的R基因和RGA的直接PCR克隆提供了引物设计的依据。自Kanazin等(1996)和Yu等(1996)报道大豆中采用R基因保守序列设计简并引物扩增得到RGA后,迄今人们已在柑橘(Deng等2000)、棉花(Hinchliffe等2005)、粗燕麦(Irigoyen等2004)、甜瓜(van Leeuwen等2005)、马铃薯(Leister等1996)、草莓(Martinez Zamora等2004)、咖啡树(Noir等2001)、拟南芥(Tan等2007)、甘蔗(Wanderley-Nogueira等2007)、水稻(王世全等2005)、蔷薇(Xu等2005)、扁豆(Yaish等2004)和花生(Yuksel等2005)等多种植物中分离到RGA序列并对其起源、多样性和进化机制进行了研究。

2 NBS profiling 技术及其应用

2.1 NBS profiling技术 近几年来,一种新型的寻找NBS-LRR类R基因和RGA的分子标记技术NBS

profiling被开发和应用(van der Linden等2004)。NBS profiling是一种DNA指纹技术,是依据植物抗性基因的核酸结合域的保守基序的R基因表达谱。

这一方法的基本程序(图2)为:首先准备多种抗病和感病的植物材料,提取植物基因组总DNA。约400 ng每个单株基因组DNA用单个的限制性内切酶MseI(*AluI*、*RsaI*或*HaeIII*)消化4 h以上,产生平均长度为300~400 bp的片段。接着片段的末端与一个接头(adapter)连接,接头具有长臂和短臂,其5'端为单链。接头与接头引物序列如下:接头长臂序列,5' ACTCGATTCTCAACCCGAAAGT-ATAGATCCCA 3';接头短臂序列,5' TGGGATCT-ATACTT 3'(在3'端加入氨基基团);接头引物序列,5' ACTCGATTCTCAACCCGAAAG 3'。依据植物NBS-LRR类抗性基因的保守基序设计简并引物:NBS2、NBS3、NBS5、NBS7、NBS9等用于后面的扩增。随后进行2次PCR。第一次为线性扩增,在反应体系中只使用简并引物,第二次为指数扩增,体系中使用了简并引物及接头引物作为上、下游引物。两次PCR的反应程序相同:95℃变性5 min;95℃变性30 s,55℃或60℃退火1 min 40 s(NBS5、NBS7和NBS9为55℃;NBS2和NBS3为60℃),72℃延伸2 min,共35个循环;72℃延伸20 min。PCR产物采用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)分离。凝胶银染后,于室温自然干燥,照相。将植

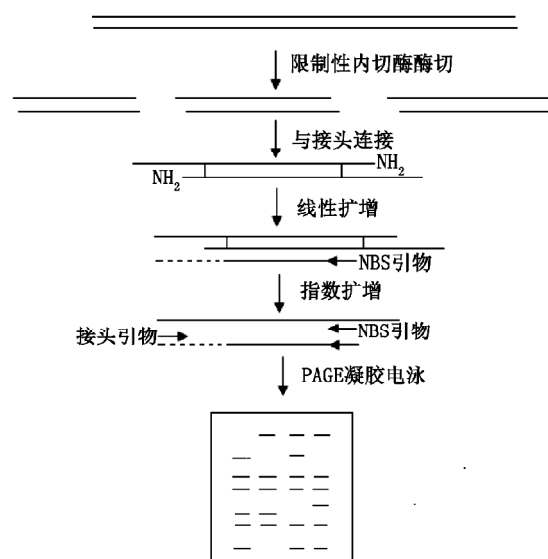


图2 NBS profiling的基本步骤

物的抗病性和分离的RGA进行关联分析,确定与植物抗病性关联的RGA,从而确定R基因候选片段和抗性分子标记,并对目标片段进行克隆测序,采用BLASTN和BLASTX软件与NCBI核酸数据库中的R基因和RGA进行同源比对和聚类分析。

NBS profiling中用于指数PCR的接头引物与接头单链部分的序列是一样的,因此,接头引物的互补完全依赖于其互补链的合成。而在PCR反应中接头短臂3'端的延伸被一个氨基基团有效地阻止。因此接头引物只能在选择性的NBS引物延伸后才能参与PCR反应。结果使得扩增高度依赖于NBS的选择性与特异性。为了提高PCR反应的特异性,在实际的指数PCR之前,先只用NBS特异引物做一线性PCR。实验中不对称的线性扩增对于获得稳定的重复结果很必要。

这项技术不同于常规的同源序列克隆(两端PCR引物都是根据R基因保守序列设计的R基因和RGA分离技术),采用R基因的保守序列设计PCR扩增的一端引物,另一端引物根据与限制性内切酶酶切位点相连的接头设计,可以提高获得R基因和RGA的几率,同时结合了扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)的稳定性和RGA目标性的优点。这一技术类似于序列特异性扩增多态性(sequence-specific amplification polymorphism, SSAP),但有本质的不同点,后者是一种修饰的AFLP技术(Hayes等2000)。

2.2 NBS profiling技术的应用 首先开发并利用NBS profiling技术的van der Linden等(2004)用此技术在基因组水平上分析了马铃薯、大麦、番茄和莴苣的RGA的分布状况。Brugmans等(2008)用NBS profiling方法对马铃薯进行了抗性基因位点的遗传作图及其转录分析,定位了34个RGA位点。并将NBS profiling应用于cDNA,以鉴定那些具有潜在功能的可以转录的R基因簇。Mantovani等(2006)用NBS profiling作为一种分子标记的方法分析硬粒小麦的遗传多样性,通过8种引物和酶的组合产生了691个条带,其中的190个条带具有多态性,NBS profiling分子标记的结果与AFLP、SSR分子标记得到的遗传距离接近一致。Wang等(2008)曾用NBS profiling分析了块茎繁殖的茄属植物的系统分类,并与AFLP分析的结果比较,提出了NBS profiling于植物系统进化构建的潜在功能。

古瑜等(2007)用NBS profiling技术也构建了花椰菜的遗传图谱,并分析了RGA在图谱中的定位。

2.3 NBS profiling与相关技术的比较

2.3.1 成对简并引物的同源序列克隆 为了获得抗病位点的生物多态性也可用成对简并引物的同源序列克隆的方法,即用R基因或RGAs的保守区域设计简并引物对来扩增大量的RGAs的NBS的部分序列。这一方法最初由Leister等(1996)报道,采用高分辨率的电泳技术可以检测RGA的多态性。NBS profiling与此方法的不同点是用了简并RGA引物和一个连接在酶切位点的接头。这可以同时检测到片段的长度多态性和限制性内切酶识别位点的多态性。在鉴定目的R基因或RGAs时,可以采用大量的限制性内切酶来提高发现与有意义的抗性位点连锁的遗传变异的机会。

2.3.2 SSAP NBS profiling技术与Hayes等(2000)的SSAP技术有一定的相似性。DNA用限制性内切酶EcoRI和MseI消化,接头连接在限制性内切酶的末端。第一轮PCR用MseI和EcoRI+1选择性引物扩增获得一亚类消化和连接片段。然后进行第二轮PCR,用第一轮EcoRI+1和标记的简并引物(与抗性基因的P-loop的区域对应)做PCR。但是用SSAP产生的RGAs于指纹中的频率最好只达到20%~25%。相反,用NBS-profiling技术RGAs的频率可以达到40%~90%。

2.3.3 连接介导的PCR (ligation-mediated PCR, LM-PCR) LM-PCR是由Hornstra和Yang(1993)提出,并由Trogitz等(2002)用于筛选与防御相关的基因。通过限制性内切酶产生黏性末端,与非磷酸化的人工接头相连,用一条与接头互补的引物和一条与目的基因序列互补的引物扩增目的片段。这可以扩增目的基因两侧的序列。理论上通过这种方法产生的片段数目反映了该基因在基因组中的拷贝数。LM-PCR和NBS profiling的区别是,使用了切割频率不太高的识别6个碱基的限制性内切酶和较少简并性的基因特异性引物。使得结果中每个分析仅包含有一个或几个位点,而不像NBS profiling有多个位点。

3 NBS profiling技术的应用前景

NBS profiling是一个产生R基因和RGAs分子标记的有力工具。在无需改变引物和方法步骤的条件下,它可用于许多物种。因此NBS profiling

在作物改良、种质鉴定和生物多样性研究中是一个有应用前景的工具。

NBS profiling能产生可靠的抗病分子标记,采用分离杂交种可以得到R基因。通过混合分组分析法(bulked segregant analysis, BSA),选择引物和酶的不同组合可以迅速产生多态性条带。那些与抗性共分离的标记可以进一步进行鉴定,并可转变为共显性的标记。已有的初步结果表明采用分离群体可以在很多作物中绘制多态性位点的基因组图谱。通过仔细选择引物序列有可能筛选到一类R基因和特异的基因簇,甚至筛选到与抗病位点紧密连锁的标记,进一步可以鉴定潜在的新的R基因簇或已知基因簇的新成员。

分子标记可用于种质资源鉴定。NBS profiling作为一种分子标记技术可以鉴定抗性位点的遗传多样性。对这一重要性状的鉴定,将促进对种质资源的有效利用。其中,重要农作物的野生型材料可用于寻找新的抗性基因。

NBS profiling的部分标记很有可能处于选择压力之下,因此可用于生态学和系统发育的生物多样性研究。通过将NBS profiling与随机标记系统如AFLP的分子标记进行比较,可以进一步阐明R基因在物种形成中的作用。另外,NBS profiling技术中限制性内切酶引物端可以检测R基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),有助于研究R基因的进化和多样性。

NBS profiling不但可以扩增和产生与R基因和RGAs连锁的分子标记,在NBS profiling技术基础之上,可以扩展出一种适用范围广泛的技术,称之为基序介导的profiling (motif-directed profiling),可以用来寻找其它的基因家族(van der Linden等2005)。采用选择性简并引物扩增基因组中具有足够保守性的序列,目的基因可以是植物或其它包括人类中的基因家族:如蛋白激酶、细胞色素P450基因家族、MADS-box基因家族、NAC转录因子基因家族以及在基因转录中起调控作用的启动子元件等保守的DNA基序。

参考文献

古瑜, 赵前程, 孙德岭, 宋文芹(2007). 花椰菜遗传图谱的构建及NBS-LRR类抗性同源基因在图谱中的定位. 遗传, 29 (6): 751~757

王世全, 张德春, 李平, 汪旭东, 李世贵, 朱立煌, 翟文学(2005). 水稻中一个NBS-LRR抗病同源基因家族的克隆和分析. 遗传

学报, 32 (7): 704~711

Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997). Signaling in plant-microbe interactions. Science, 276: 726~733

Brugmans B, Wouters D, van Os H, Hutten R, van der Linden G, Visser RGF, van Eck HJ, van der Vossen EAG (2008). Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. Theor Appl Genet, 117: 1379~1388

Coaker G, Falick A, Staskawicz B (2005). Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. Science, 308: 548~550

Deng Z, Huang S, Ling P, Chen C, Yu C, Weber CA, Moore GA, Gmitter Jr FG (2000). Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. Theor Appl Genet, 101: 814~822

Feuillet C, Schachermayr G, Keller B (1997). Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat. Plant J, 11 (1): 45~52

Flor HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol, 9: 275~296

Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997). Plant disease resistance genes. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 48: 575~607

Hammond-Kosack KE, Parker JE (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Curr Opin Biotechnol, 14: 177~193

Hayes AJ, Saghai Maroof MA (2000). Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. Theor Appl Genet, 100: 1279~1283

Hinchliffe DJ, Lu YZ, Potenza C, Segupta-Gopalan C, Cantrell RG, Zhang JF (2005). Resistance gene analogue markers are mapped to homeologous chromosomes in cultivated tetraploid cotton. Theor Appl Genet, 110: 1074~1085

Hornstra IK, Yang TP (1993). *In vivo* footprinting and genomic sequencing by ligation-mediated PCR. Anal Biochem, 213: 179~193

Irigoyen ML, Loarce Y, Fominaya A, Ferrer E (2004). Isolation and mapping of resistance gene analogs from the *Avena strigosa* genome. Theor Appl Genet, 109: 713~724

Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc Natl Acad Sci USA, 93 (21): 11746~11750

Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. Nat Genet, 14: 421~429

Mantovani P, van der Linden G, Maccaferri M, Sanguineti MC, Tuberosa R (2006). Nucleotide-binding site (NBS) profiling of genetic diversity in durum wheat. Genome, 49: 1473~1480

Martinez Zamora MG, Castagnaro AP, Diaz Ricci JC (2004). Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues (RGAs) from cultivated and wild strawberries. Mol Gen Genomics, 272: 480~487

McDowell JM, Woffenden BJ (2003). Plant disease resistance

- genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotechnol*, 21 (4): 178~183
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young ND (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J*, 20 (3): 317~332
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 809~834
- Meyers BC, Morgante M, Michelmore RW (2002). TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *Plant J*, 32: 77~92
- Monosi B, Wisser RJ, Pennill L, Hulbert SH (2004). Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theor Appl Genet*, 109: 1434~1447
- Noir S, Combes MC, Anthony F, Lashermes P (2001). Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea L.*). *Mol Genet Genomics*, 265: 654~662
- Pan Q, Wendel J, Fluhr R (2000). Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J Mol Evol*, 50: 203~213
- Takken FLW, Joosten MHAJ (2000). Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Eur J Plant Pathol*, 106: 699~713
- Tan X, Meyers BC, Kozik A, West MA, Morgante M, St Clair DA, Bent AF, Michelmore RW (2007). Global expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 7: 56
- Traut TW (1994). The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *Eur J Biochem*, 222: 9~19
- Trognitz F, Manosalva P, Gysin R, Nino-Liu D, Simon R, del Herrera MR, Trognitz B, Ghislain M, Nelson R (2002). Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phujera* × dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *MPMI*, 15 (6): 587~597
- van der Linden CG, Smmulders MJM, Vosman B (2005). Motif-directed profiling: a glance at molecular evolution. In: Bakker FT, Chatrou LW, Gravendeel B, Pelser PB (eds). *Plant Species-level Systematics: New Perspectives on Pattern & Process*. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag, 291~303
- van der Linden CG, Wouters DCAE, Mihalka V, Kochieva EZ, Smulders MJM, Vosman B (2004). Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theor Appl Genet*, 109: 384~393
- van Leeuwen H, Garcia-Mas J, Coca M, Puigdomenech P, Monfort A (2005). Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes. *Mol Gen Genomics*, 273: 240~251
- Wanderley-Nogueira AC, Soares-Cavalcanti NM, Morais DAL, Belarmino LC, Barbosa-Silva A, Benko-Iseppon AM (2007). Abundance and diversity of resistance genes in the sugarcane transcriptome revealed by *in silico* analysis. *Genet Mol Res*, 6 (4): 866~889
- Wang MQ, Van den Berg R, Van der Linden G, Vosman B (2008). The utility of NBS profiling for plant systematics: a first study in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Syst Evol*, 276: 137~148
- Xu Q, Wen XP, Deng XX (2005). Isolation of TIR and nonTIR NBS-LRR resistance gene analogues and identification of molecular markers linked to powdery mildew resistance locus in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *Theor Appl Genet*, 111: 819~830
- Yaish MWF, Saenz de Miera LE, Perez de la Vega M (2004). Isolation of a family of resistance gene analogue sequences of the nucleotide binding site (NBS) type from *Lens* species. *Genome*, 47: 650~659
- Yu YG, Buss GR, Saghai Maroof MA (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (21): 11751~11756
- Yuksel B, Estill JC, Schulze S R, Paterson AH (2005). Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut. *Mol Gen Genomics*, 274: 248~263