

从小麦-簇毛麦易位系 TAC 文库中筛选 *Hv-S/TPK* 基因

孙玉磊¹, 曹爱忠¹, 杨学明^{1,2}, 王晓云¹, 陈佩度¹

1 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

2 江苏省农业科学院农业生物技术研究所, 南京 210014

摘要: 本实验室已经通过基因芯片技术筛选到一个白粉菌诱导后上调表达的抗病相关基因 *Hv-S/TPK*, 并获得了它的全长 cDNA 序列。利用 *Hv-S/TPK* 的特异引物筛选小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系基因组可转化人工染色体 (Transformation-competent artificial chromosome, TAC) 文库, 获得了阳性 TAC 单克隆, 并进一步获得了含有 *Hv-S/TPK* cDNA 序列的 5160 bp (GenBank Accession No. EU153366) 的亚克隆。对亚克隆的序列分析结果表明, *Hv-S/TPK* 基因在起始密码子和终止密码子之间有 3 个内含子和 4 个外显子, 4 个外显子序列与簇毛麦上已得到的 *Hv-S/TPK* 的 cDNA 序列 100% 同源。对起始密码子上游序列分析结果表明, 该基因的调控序列中, 含有 W-Box、OCS-element 等与抗病相关的元件。以 TAC 克隆为探针与小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH), 结果表明含有 *Hv-S/TPK* 基因的 TAC 克隆来自于簇毛麦。

关键词: 小麦-簇毛麦易位系, 可转化人工染色体文库, *Hv-S/TPK* 基因, 荧光原位杂交

Screening *Hv-S/TPK* from TAC Library of a *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* Translocation Line

Yulei Sun¹, Aizhong Cao¹, Xueming Yang^{1,2}, Xiaoyun Wang¹, and Peidu Chen¹

1 National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 Institute of Agricultural Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: *Hv-S/TPK* gene, a resistance related gene to powdery mildew, was cloned by using genechip, and its expression was upregulated after the inoculation of *Blumeria graminis* to *Haynaldia villosa*. Using the specific primers of *Hv-S/TPK* to screen a genomic TAC (Transformation-competent artificial chromosome) library of translocation line 6VS/6AL, a positive TAC was screened. A 5-kb fragment containing *Hv-S/TPK* was subcloned and identified. This 5160-bp fragment (GenBank Accession No. EU153366) was determined by specific primer walking. The analysis of *Hv-S/TPK* genomic sequence showed three introns and four exons between start code and stop code. In the promoter region of *Hv-S/TPK*, there were W-box and OCS-like elements which were the elements related to disease resistance. In this study, the positive TAC clone was used to as probe *in situ* hybridized to mitotic metaphase chromosomes of translocation line. The result of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) indicated that the TAC clone containing *Hv-S/TPK* was from *Haynaldia villosa* chromosome.

Keywords: *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* translocation line, transformation-competent artificial chromosome (TAC), *Hv-serine/threonine* protein kinases (*Hv-S/TPK*) gene, fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Received: November 29, 2007; **Accepted:** January 17, 2008

Supported by: the High Tech Program of China (No. 2004AA222140 and 2006AA10A104), Natural Science Foundation of China (No. 30700503), Natural Science Foundation of Jiangsu, China (No. BK2007163), and Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. 10418).

Corresponding author: Peidu Chen. E-mail: pdchen@njau.edu.cn

国家高新技术研究发展计划 (No. 2004AA222140 and 2006AA10A104), 国家自然科学基金 (No. 30700503), 江苏省自然科学基金 (No. BK2007163) 和长江学者和创新团队发展计划项目 (No. 10418) 资助。

白粉病已经成为小麦生产中日趋严重的病害之一, 鉴别新的抗白粉病基因并研究它们的抗性机制变得越来越重要。而抗性机制除了与基因的编码序列有关外, 其调控序列中的信息往往也很重要。

位于簇毛麦(*Haynaldia villosa*, VV, $2n = 14$) 6V 染色体短臂上的抗白粉病基因 *Pm21* 是一个广谱、高效抗性基因^[1,2]。研究 *Pm21* 基因发挥抗病作用过程中所涉及的转录因子和重要的防卫反应基因, 对于运用基因工程手段提高小麦对白粉病的抗性具有重要意义。本实验室利用基因芯片技术, 克隆到了抗白粉病相关基因 *Hv-S/TPK* 的全长 cDNA 序列。*Hv-S/TPK* 是一个推导的丝氨酸/苏氨酸激酶基因^[3], 该类基因是抗病基因的一种重要类型^[4]。*Hv-S/TPK* 在抗病簇毛麦中受白粉菌诱导上调表达, 因此可能是参与抗病过程的重要基因^[3]。根据 *Hv-S/TPK* 的序列, 开发出一个与抗白粉病基因 *Pm21* 连锁的共显性分子标记 CINAU15(即 NAU/xibao15)^[3]。利用扩增 *Hv-S/TPK* 的特异引物(CINAU15F 和 CINAU15R), 已将该基因定位到簇毛麦 6V 染色体短臂, 并进一步明确该基因与 *Pm21* 基因位于断点距着丝粒为 FL0.58 的同一染色体区域。

分离基因的调控序列可以用 Tail-PCR^[5]和筛选基因组文库等方法得到。利用可转化人工染色体(TAC)^[6]载体, 方玉达等^[7]成功构建了含有高抗白粉病基因 *Pm21* 的小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系的基因组 TAC 文库。本研究利用克隆池 PCR(pooled PCR)法^[8]从此 TAC 文库中筛选 *Hv-S/TPK* 的基因组序列。为了研究 *Hv-S/TPK* 基因的调控机制, 进一步对它的启动子区段进行分析。本文还对含有 *Hv-S/TPK* 基因的 TAC 阳性克隆进行了染色体的初步定位研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系 92R137 由南京农业大学细胞遗传研究所选育。小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC 文库由方玉达等构建^[7], 以混合克隆池的形式保存在 22 块 96 孔板中。大肠杆菌 DH10B 和载体 pBluescript 由本实验室保存。

1.2 文库筛选

采用 PCR 法筛选文库, 引物为 CINAU15-F: 5'-AGATCCAACACCAGTTCAAG-3' 和 CINAU15-R: 5'-ATGTTATGGAGGCTTGTGTC-3', PCR 扩增程

序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 32 个循环; 72°C 延伸 10 min; 10°C 保存^[3]。能扩增出来自 *Hv-S/TPK* 基因的 902 bp 特异条带的视为阳性克隆。

从 TAC 文库每块板中的 6 个孔各吸取 1 μ L 菌液进行混合培养提取质粒, 构成 1 个初级克隆池, 每块板构成 $96 \div 6 = 16$ 个初级克隆池, 整个 TAC 文库构成 $22 \times 16 = 352$ 个初级克隆池, 用 PCR 法对初级克隆池进行筛选。筛选到阳性初级克隆池后, 进一步从其对应的 6 个孔中筛选出阳性孔, 提取质粒电激转化到大肠杆菌 DH10B 中, 挑取 40~60 个单克隆组成次级克隆池。用 PCR 法再次筛选阳性次级克隆池, 把阳性次级克隆池混合菌液稀释涂平板后, 挑选单克隆进行 PCR, 筛选出阳性单克隆。

1.3 阳性单克隆的亚克隆

提取阳性 TAC 克隆的质粒, 用限制性内切酶(*Hind* III、*Eco*R I、*Eco*R V、*Bam*H I、*Not* I、*Hpa* II、*Pst* I、*Sal* I、*Sca* I、*Spe* I、*Xba* I、*Xho* I、*Kpn* I)分别酶切。酶切产物用毛细管法转移到尼龙膜上。以 *Hv-S/TPK* 的 cDNA 片段为探针用 [α -³²P] dCTP 标记, 进行 Southern 杂交^[9]。回收产生杂交信号的酶切片段, 连接到 pBluescript 载体上。

1.4 *Hv-S/TPK* 的亚克隆与序列分析

测序由上海博亚公司完成。序列比对采用 DNAMAN 进行分析。启动子顺式作用元件用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/sigscan/>)进行分析。

1.5 TAC 克隆的荧光原位杂交

以阳性 TAC 克隆为探针, 打断的普通小麦基因组 DNA 做封阻, 对小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系的根尖中期有丝分裂制片进行荧光原位杂交。根尖制片、探针标记、原位杂交方法参照 Zhang^[10]的方法。

2 结果

2.1 筛选 TAC 文库

用 CINAU15F 和 CINAU15R 为引物对 352 个初级克隆池进行 PCR 筛选, 从初级克隆池 4-11 中扩增出来自 *Hv-S/TPK* 的 902 bp 特异条带(图 1a)。对组成初级克隆池 4-11 的 6 个孔进行再次筛选, 从 4-11-1 中扩增出 902 bp 的特异条带(图 1b)。

将 4-11-1 的混合质粒电激转化到大肠杆菌 DH10B 中, 然后把培养皿分 36 个小区挑选混合克隆, 每个小区包含约 40~60 个克隆, 组成 36 个次级克隆

池。从 31 号次级克隆池中可扩增出 902 bp 的特异条带(图 1c)。把 31 号次级克隆池的混合菌液稀释涂平板, 挑选了 256 个单克隆, 进行 PCR 筛选, 发现 31 号单克隆可扩增出 902 bp 的特异条带(图 1d), 该克隆为可能含有 *Hv-S/TPK* 基因的阳性 TAC 单克隆。

2.2 阳性 TAC 单克隆的鉴定和亚克隆

用 13 种限制性内切酶(*Hind* III、*Eco*R I、*Eco*R V、*Bam*H I、*Not* I、*Hpa* II、*Pst* I、*Sal* I、*Sca* I、*Spe* I、*Xba* I、*Xho* I、*Kpn* I)分别酶切阳性 TAC 质粒(图 2)。酶切分析表明阳性 TAC 克隆插入片段约 30 kb。将酶切产物电泳转膜, 用 *Hv-S/TPK* 的 cDNA 片段为探针进行 Southern 杂交(图 2), 该 TAC 单克隆每个泳道都有杂交带, 说明该 TAC 克隆为含有 *Hv-S/TPK* 基因的真正的阳性单克隆。*Eco*R I 酶酶切的阳性 TAC 克隆, 仅在约 5.0 kb 处有一条杂交带。回收此片段, 连接到 pBluescript 载体上, 测序获得 5160 bp 序列(GenBank 登录号 EU153366)。

2.3 亚克隆的序列分析

对该阳性 TAC 亚克隆测序, DNA 序列分析表明

Hv-S/TPK 基因在起始密码子和终止密码子之间有 3 个内含子和 4 个外显子。4 个外显子序列与从簇毛麦上克隆到的 *Hv-S/TPK* 的 cDNA 全长序列 100%同源。内含子依次位于 1922~2033、2275~2643、2793~3246, 长度依次为 112 bp、368 bp 和 454bp。在起始密码子上游有 TATA 盒(1363~1368; 1483~1488), TATA 盒的上游存在 2 个 W-box(136~140; 1201~1205)、2 个 PAL-box(261~270; 1249~1267)和 3 个 OCS 元件(552~565; 874~887; 1276~1289)。

2.4 含 *Hv-S/TPK* 基因的 TAC 克隆的荧光原位杂交以获得的阳性 TAC 克隆为探针, 打断的普通小麦基因组 DNA 做封阻, 与小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系的根尖有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交。结果显示在易位染色体 6V 染色体短臂上有较强的杂交信号(图 4), 表明该 TAC 克隆来自 6V 染色体短臂。

3 讨论

本研究通过筛选基因组文库的方法不仅获得了 *Hv-S/TPK* 的基因组序列, 而且得到了它的启动子区

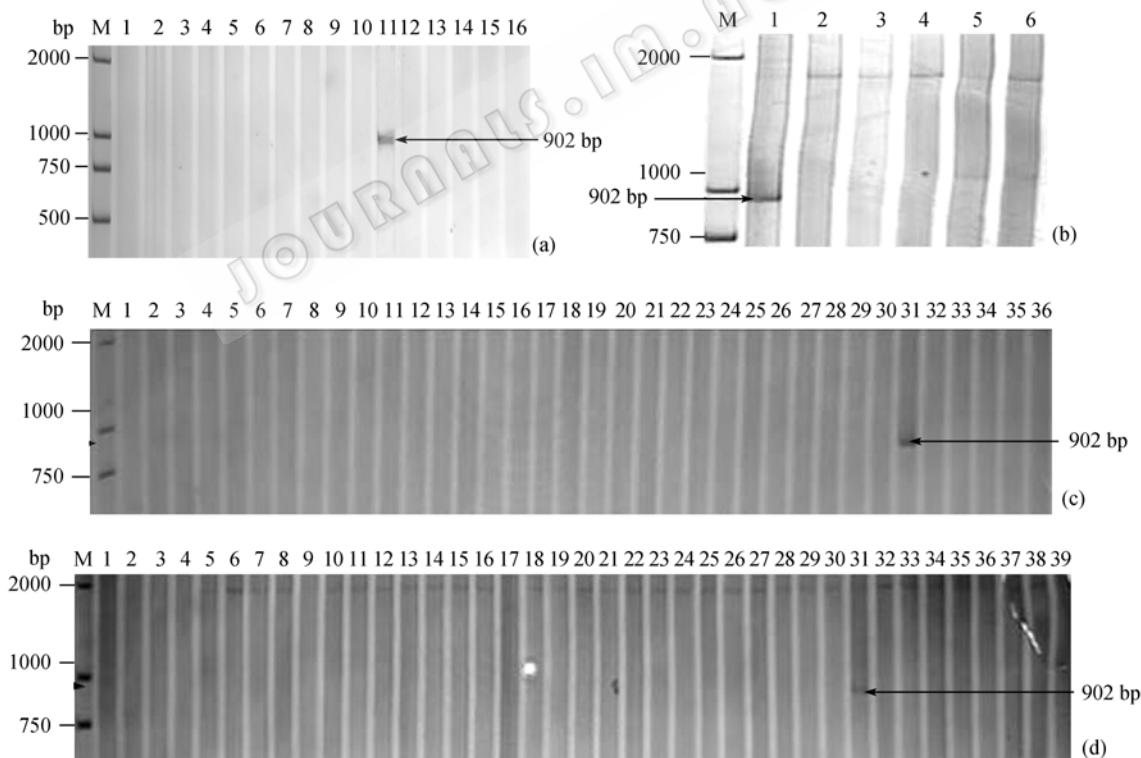


图 1 从 6VS/6AL 基因组 TAC 文库中筛选含有 *Hv-S/TPK* 的 TAC 克隆

Fig. 1 The schematic depiction of the screening of the TAC clone having *Hv-S/TPK* from the translocation line 6VS/6AL genomic TAC library

(a) screening 16 original plasmid clone pools of the fourth plate, 4-11 pool amplified 902 bp specific band; (b) screening the six mixed plasmid of 4-11 pool, 4-11-1 pool amplified 902 bp specific band; (c) screening 36 secondary plasmid clone pools, the 31 pool amplified 902 bp specific band; (d) screening 256 single colony, the 31 single colony amplified 902 bp specific band

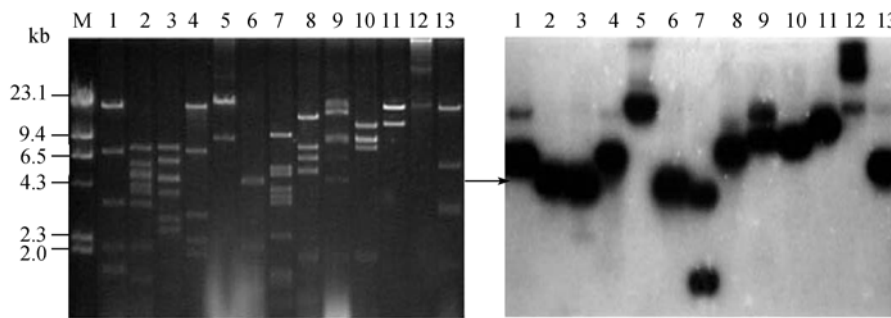


图2 阳性 TAC 克隆 Southern 杂交验证

Fig. 2 The Southern hybridization of positive TAC clone

The left showed the patterns of positive TAC digested by different restriction enzymes (*Hind* III, *Eco*R I, *Eco*R V, *Bam*H I, *Not* I, *Hpa* II, *Pst* I, *Sal* I, *Sca* I, *Spe* I, *Xba* I, *Xho* I and *Kpn* I); The right was the corresponding result of Southern hybridization with the *Hv-S/TPK* cDNA fragment as a probe; M was the λ -DNA/*Hind* III DNA marker; The arrow showed the 5 kb hybridization fragment digested by *Eco*R I

```

1      TTCCAGTGTCTCCATAATAAGAGACTGAAATCGGCTTCGATTTTGCTCGTACGACTATCCGCTGATGAA
71     AATTGTACTAGTTTCGTGCCCTGCCCTGCGGATAGCCTATAATCGTCACAACGTTTGTTCGGTTTGGAC
141    TGGTTTGGATGGGTATTGAGAAATGTTGTACAGCTGAAATGTGCTTTCCTGTGTGAACAGAGATGCTGC
211    TGGGTGGAGTCGTGGACCTTTTGCTATCTATTGCGTGTGACGGTGTGAGATAGGTTAGTTAATTGGTA
281    GCAGAGACACTTAGACTATAAAATCATCTTTGTGAGACAAATACACCACCATTTCCCCTAGATTAGTT
351    GGAAGTCCTAGCAGGCAATCATCCACGAGGTAATGCTTGTCCAAGTGTGGTATCCCGCTGAATAGTTTAT
421    TTGAAATGTTGATAAATATATTGTTGATACCTATGGCAGGGAGCTCTGCCCATTTATTAAGTTGTAGCA
491    GCCGTCGCAGGTGGAGAACTGAGATACTCAACTGCACTTTTAAAAATTAGTACTATTTATGTCATAGTG
561    GACCTAATCTAATTTGTATAGTCGGCTATAAGCTTAAGTTAGTTGCTTTCAGCTGCTGATGTAGTAGTGA
631    GATATGTTTCTCTCATGAGAACTCTATGCATGTTCTGAGCTTGAACAGATCACCTGAAGTACATCAGCAA
701    TTTTGATCTTCTATGCAGAAGATATACTCCCTCCGATCCATATTACTTGTGCTGCTTTAGTACAACCTT
771    TAAAGTTGTACTCCCTCTGTAACTTTTATAATACGTTTAATTATAAGGTAGTAGTGCCTGATTTAGCTG
841    CTGATTGCAAGGCAGAAAGTGTGCATTTTGTGTAGCACCGCACGTAGTCACAGTTTACATAACATAAT
911    ATTACTTCCTCCTCTTGATGGAGAAATATACTAAATCCCAATTAATATAGCTGTTGGACTGAAAAGAAC
981    AGATTGGCCACGTTTCTTTTGTGAACCAAGGGCAGGAGCTCTGCAATTCACCATGGAAGTAGCAG
1051   AGTTGCCCAATTAATTAGGGAATATTGGGCTCAAACCACTAGCTAACCTAGGTTTGAGACCCACCGAC
1121   TGACAACTCAACGGACATGATGGTTCACAGTAATTGGTTGGTACCGTAGAAGGACTCATTCACTATAATT
1191   CTCTTTGTGGTGACCATAAAGTTTCATTTATTTTTCAGGATATGATGGCAGCTGTTTAAAGTTGATGAAATG
1261   TCTCTGTGTATATCGTAAGTGCAAACGTTATTATTGAACTGACAACGGCGAGGCAGATATATTTTGAGAA
1331   TATAAGTAATGGGTTGTTCTCTTTCTTTTGTATATAAGTGGGGCAACACGCCAGCAAATTTCTACACA
1401   TACTGAAGGTAGATATTTCTTATACAGACTGTTCTACACTCTTGTGGACTATGATATGGTCACCTTCTTC
1471   ATGTTGCCATATTTAAATTACTCAAACTAATTTTACAGACCTCCTTGGTGATATTAATACAATAAGATAC
1541   ACTTATAAGGAGCTAGCAAAGGCAACAGAAATTTTAACCCCTCCAACAAGATTGGTGAGGGGGGTTTG
1611   GATCTGTATATAAGGTAGTGTGTGAACCTTCACTAATAAGCCAAATGAAATTCTAATGGAAGAAATGT
1681   ACATGTTTAAAGTTTGATCATGTAATGGTGTAGGGGCGGCTAAGGAATGGAAAACCTATTGCTGTCAAGG
1751   TGTATCTGTAGAATCAAGACAAGGATTAAGGAGTTTCTGAATGAAGTATGTCATTTCCAACATATC
1821   TCATGGCAATCTTGTACGCTTTATGGCTATTGTGTGAAGGAAACAGAGGATCCTTGTTTACAATTAC
1891   CTTGAGAATAATAGCCTAGCACAAACACTTCTAGGTAATTCTTGGTTGGTTCTTTTCATCGTACTGTTCT
1961   TCGAAACTTCTACATATTTGCTTAAAAAGGTCTAATTCTAATGTTCTTAGCTTTTCTCTTCTATTCTT
2031   TATTAGGTTCTGGCCGAGCAATATCCAGTTCAATTGGAGAAGTAGAGTAAATATTTGCCTTGGTATCGC
2101   CCGAGGATTAGCATACCTTCATGATGATGCAATCCCACTTGTTCATCGGGATATCAAAGCAAGCAAT
2171   ATACTTCTTGATAAGGATCTCACCCCAAAATTTCTGATTTCGGTTTAGCAAAGCTTCTACCTCAAATG
2241   CGTCACATATTAGCACACGGGTTGCAGGAACATTGTAAGTTAATTTGTATATGGAAGTATCTACCTAT
2311   AATGAGTTATCATGTGCGCTGCATGTTTACTACTCATATATTACATCCTATATGCTCATATATTGGATGT
2381   AAGTCTTATGTATGGGACGAGGAGTAGTTTCTTTGTTTGTACTGTGTGCCTTCAGAAGCTACTGCT
2451   TATAATTGGCATTTCACTTAATTTGGTTGAATTTAATACACCCCAAAAGAAATCTTTCACATATGATGAA

```

2521 ACCACACCACCTGTTTCGTAGGAGAAGTTAGAGGCAATTACAATTGAAATAAAAAATATTATTCATAAATG
 2591 ATCACTATATTGTGATAAACTGTCGGCATTACTTACTCAGTTTTACTTCACAGAGGTTACTTGGCTCCTG
 2661 AGTATGCCATTTCGAGGACAAGTGACACGGAAGTCAGATGTTTATAGTTTTGGTGTGTTTGCTTCTGAAAT
 2731 AGTCAGTGGGAGATCCAACACCAGTTCAAGATTACCCTATGAAGACCAAATACTTTTGAAAAGGTTAGA
 2801 TGAAGTAGAATACATATTTCTTTCTTTTCCCGTTCCTTATTGGTAAAAAGTAACTATTATGTT
 2871 CTACCATAATGAATGAATTAGTTTTAGCTGAAGTTATTTACAGTTTGAGTTGATGGATGGATAGTACTG
 2941 GCACGTCATAAATTTGGAGTGCATAAAAGCAATCTTGATTCTGGTAAAAAAAAGTACTAGCTAGATGCAT
 3011 ACAACTCTTGCAATTTAGAAATGTAGCCATGCCATGTCCATTTTTCATTATTAAATTTGTAGTACAATA
 3081 CAGAAAAATGATTACTACTATCATGCACCTAAATTTTAGTTGCTTGCTGGCAAGCACATTAGCTGCTTCC
 3151 TTGTCTCTACATAAATGCATAAATCGTGTATAACCTCTTAGCATGACTGGAGGGAGCAAAATATTCTAACT
 3221 CATGGACTTTTGTCTTTACTGTACTAGTCCAGAGGTTACCAATGGGGTTCTCCTCTTGCAGACATGG
 3291 ATGTATTATGAGCAGGGAGATTGGTGAAAATCATAGACAGTTCTGTGGGTGATGATTGGATATTGAAC
 3361 AAGCCTGCAGGTTCTGAAAGTTGGAATCTCTGTACACAAGATGTCACAAGACATCGACCCACCATGTC
 3431 AACTGTCGTGAGCATGTAGCAGGCGAAAAGGATGTTGACTCGGAGAAGATCAGCAAGCCCGTACAATT
 3501 AGCGACTTTATGGACCTCAAGATCAGGAGCATGAGGAGAGAAAAAACATAGCTTTCGCTTCTTCTCCA
 3571 CGTTGCTATCCACTATCATGGCACACTCTTCTCCATTGTTGTCGAAGAGACGACACAAGCCTCCTTAAC
 3641 ATTCACCGCAATATCAGAGTGTGAGTGACCTGAAGTTGGTTGCAAATACGAAGACCATGTAGAGAAGTAG
 3711 CATAGCCAGATACCTTTTCTTTTTCAGAAAATTTCTTCTAGTGTATAGATTCACTTTGTTTATAGTGA
 3781 GACAGCATTGCTGGGACAAAAGAGTTACACAGTTTTACTTTGTGTGATAATACTAGATTGGTGGCGCAG
 3851 TGTCATTGTATAATTTGTGCATGTACATCGTGTCTGTTGTTTGGAGGGTAAGAAAATACAAGTTTG
 3921 AGATCCTGTGAGTACATAGCCTGGCTGTATCAACAAAATCCAGATGAGCTGGTTTGGTTGCCGCTTGAC
 3991 TTGCAGTTCATAAATGGCCAACATTACAAGGGCATGTTCCCCACACGTTGTCATGAACTACCAAAATGCA
 4061 AAACGCATCTTGCGATGATCAGTTCCATCGTCTCCTTTTCCCTGTACACCATCACATATGCTCTCAGCT
 4131 TCAGTGTAAGTTGGATAATGCAGAGACTCCTTTTCTCTGTACACCATCACATATGCTTTCAGCTTCAGTG
 4201 TAACTTGGATAATGCAGAGATTGATGTATTGTCTTTGTCTCGGCAGTCTCCAGCACCATGGCAGGTGTT
 4271 CTACTACTGCTACTGTGCTGCTGCTACCACCACCACCATCACCAAGCAAGCAGCTAGCTGCCATGA
 4341 TGTCTGCATCACCATCATGCGAGTAGTTCCCCGTGGAAGAAGGGACCCAGCAGGTGCTCCTCCGCTCC
 4411 CAGCCAGTGAGGTAATCTCCAACATGGGAACAGGGAATGGCAGTGTCTCCCATCTGCCCTTGCCAAAAT
 4481 TTCGTGTTTTGACCTTTTGTGGTACAAAATCGGAATCTGACCCATGTTTAATTTTTTTTCGACATTTGA
 4551 CCCTTTTCTACCGCGGGCTAGCCTACCGCCAGAAAGTGCAGGCTAGGAACTTATCCATGTCAGC
 4621 AGTGTTAACGGCTCCGTCCCTCCTTCGCCCCACCCTACCGCTATGGTCTGGCGGTAGCTGATGTGGT
 4691 TGCATACTAGGGGTAGGGTCTAGACAAGGCCATATGCCCCACACAAGGATACTAAGACGTGATCTCTT
 4761 TAGGACACCTTATGTACCGACTGATTACGCAAGTTCAAAAAACACTTGGTCTACATAACCTCGGCGGT
 4831 AATCAAGTCACACGGCTGAACTAAACCACTCGGCATGATCCGAGAATCAGTCGGCTAGAAGACGAAGAA
 4901 CTGCAGAGGAGATAAAGAGGTGCTGTAACGGCTGTAGTTATCGCCCTTTTACTTACGTTACCTGCAAC
 4971 ATTACTCTTAACATTCAATTCCTCGAACCTTCATTGCCAACGCATCTATGAGGGGACGCGACTCTATAT
 5041 AAGCCGCCCCCTCACCTCTGGCACAAGGGTTCGACCCCTGTAAACCATTGTTCTCCACACGACAAAGAA
 5111 ACGCTCCGGCGCACTGAGACGTAGGGCTTTTACCTCTCCGCGAGGGGCT

图 3 来自小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系的 *Hv-S/TPK* 基因序列

Fig. 3 The genomic sequences of *Hv-S/TPK* isolated from *Triticum aestivum-Haynaldia villosa* 6VS/6AL translocation line
 TTGAC and TGACC represented two W-boxes; GTCATAGTGGACCT, GTAGCACCACGACGT and GTAAGTGCAAACGT represented the
 three OCS-like elements; GATAGGTTAG and GGTTGATGAA represented PAL-box; ATG were start code; TAG were stop code; the
 sequences of were introns

序列, 这对研究 *Hv-S/TPK* 的功能会提供帮助。在 *Hv-S/TPK* 的启动子区发现有 2 个 PAL-box(PAL 基因启动子的顺式作用元件)、2 个 W-box 和 3 个 OCS 元件。苯丙氨酸解氨酶(PAL)与植物抗病性密切相关^[12], 是一个重要的防卫反应基因, 在很多植物抗病反应中都大量表达, 所以在其调控区域可能含有与抗病性相关的

调控元件。W-box 是 WRKY 转录因子在启动子区域的结合位点, 大量证据表明, W-box 是被病原物所诱导表达的许多植物基因的顺式作用元件的主要类型, 且 W-box 和类 W-box 在启动子区段多聚集成簇^[13]。OCS(Octopine synthase, OCS)元件是首先在根癌农杆菌 T-DNA 区的章鱼碱合成酶基因启动子上游中发现的一

个 16 bp 的反向重复序列, 在一些防卫反应相关基因的启动子区存在 OCS 元件^[14]。在 *Hv-S/TPK* 序列的上游也存在与抗病反应相关的基因中存在的顺式作用元件, 推测该基因在受到病原菌侵染后, W-box、PAL-box 和 OCS 元件与各自转录因子结合协同作用, 诱导该基因表达, *Hv-S/TPK* 可能是参与抗病过程的重要基因。

利用扩增 *Hv-S/TPK* 的特异引物已将 *Hv-S/TPK* 定位到簇毛麦 6V 染色体短臂上^[3]。本研究以获得的阳性 TAC 克隆为探针, 荧光原位杂交结果显示在易

位染色体 6VS 上有较强的杂交信号, 初步表明含 *Hv-S/TPK* 基因的 TAC 克隆来自于小麦-簇毛麦易位系的 6VS 染色体, 与 PCR 的结果一致。由于含有 *Hv-S/TPK* 的 TAC 克隆的插入片段只有约 30 kb 左右, 但原位杂交发现在 6VS 染色体短臂上几乎都有杂交信号, 所以推测 TAC 克隆除含有 *Hv-S/TPK* 外, 还含有簇毛麦专化的重复序列。下一步我们将采用亚克隆序列作为探针进行原位杂交, 进一步确定 *Hv-S/TPK* 基因在 6VS 染色体上的物理位置。

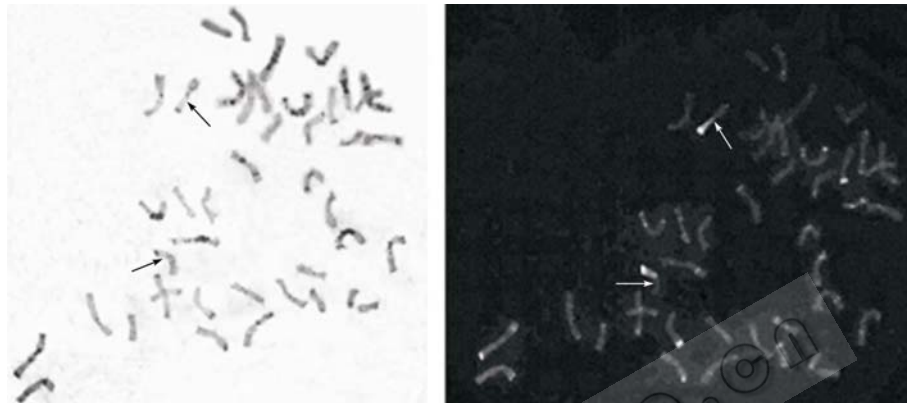


图 4 小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系有丝分裂中期染色体的 C-带和以 TAC 克隆做探针的分子原位杂交图

Fig. 4 The chromosome C-banding and TAC-FISH preparation at meitaphase of RTC in *T.aestivum-H. villosa* 6VS/6AL translocation line
The arrow showed the 6V chromosome short arm from *Haynaldia villosa*

REFERENCES

- [1] Chen PD, Qi LL, Zhou B, *et al.* Development and molecular cytogenetic analysis of wheat-*Haynaldia villosa* 6VS/6AL translocation lines specifying resistance to powdery mildew. *Theor Appl Genet*, 1995, **91** (6-7): 1125-1128.
- [2] Qi LL, Chen PD, Liu DJ, *et al.* The gene *Pm21*—A new source for resistance to wheat powdery mildew. *Acta Agronomica Sinica*, 1995, **21**(3): 257-262.
齐莉莉, 陈佩度, 刘大钧, 等. 小麦白粉病新抗原—基因 *Pm21*. 作物学报, 1995, **21**(3): 257-262.
- [3] Cao AZ, Wang XE, Chen YP, *et al.* A sequence-specific PCR marker linked with *Pm21* distinguishes chromosomes 6AS, 6BS, 6DS of *Triticum aestivum* and 6VS of *Haynaldia villosa*. *Plant Breeding*, 2006, **125**(3): 201-205.
- [4] Qin GJ, Li WL, Chen PD. Update of resistance genes and resistance gene analogs in plants. *J Nanjing Agri Univ*, 1999, **22**(3): 102-107.
秦跟基, 李万隆, 陈佩度. 植物抗病基因结构特征及其类似序列的研究进展. 南京农业大学学报, 1999, **22**(3): 102-107.
- [5] Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995, **25**(3): 674-681.
- [6] Liu YG, Shirano Y, Fukaki H, *et al.* Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(11): 6535-6540.
- [7] Fang YD, Liu YG, Wu H, *et al.* Construction of a transformation-competent artificial chromosome (TAC) library of a wheat-*haynaldia villosa* translocation line. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(4): 433-436.
方玉达, 刘耀光, 吴豪, 等. 小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系可转化人工染色体(TAC)文库的构建. 生物工程学报, 2000, **16**(4): 433-436.
- [8] Liu YG, Nagaki K, Fujita M, *et al.* Development of an efficient maintenance and screening system for large-insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector. *Plant J*, 2000, **23**(5): 687-695.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning* (2nd ed). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Zhang P, Li WL, Fellers J, *et al.* BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma*, 2004, **112**(6): 288-299.
- [11] Rushton PJ, Reinstadler A, Lipka V, *et al.* Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen and wound-induced signaling. *Plant cell*, 2002, **14**: 749-762.
- [12] Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**(5): 199-206.
- [13] Strompen G, Cruner R, Pfitzner UM. An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol Biol*, 1998, **37**(5): 871-883.