



## 研究报告

### Research Report

# 三七及屏边三七病程相关基因克隆的新策略

李瑞博<sup>1,2</sup> 申业<sup>1</sup> 文国松<sup>3</sup> 冯光泉<sup>4</sup> 曲媛<sup>2</sup> 崔秀明<sup>2</sup> 黄璐琦<sup>1</sup>

1. 中国中医科学院中药资源中心, 北京, 100070
2. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明, 650000
3. 云南农业大学中药材研究所, 昆明, 650201
4. 文山学院文山三七研究院, 文山, 663000

✉ 通讯作者: [sanqi37@vip.sina.com](mailto:sanqi37@vip.sina.com); [huangluqi@263.net](mailto:huangluqi@263.net); ✉ 作者

植物药与药理学杂志, 2014 年, 第 3 卷, 第 1 篇 doi: [10.5376/jpmpp.cn.2014.03.0001](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2014.03.0001)

收稿日期: 2014 年 06 月 01 日

接受日期: 2014 年 06 月 14 日

发表日期: 2014 年 06 月 28 日

本文首次发表在《基因组学与生物应用学》2014 年 33 卷第 3 期上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

李瑞博等, 2012, 三七及屏边三七病程相关基因克隆的新策略, 植物药与药理学杂志(online) Vol.3 No.1 pp.1-4 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2014.03.0001](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2014.03.0001))

引用格式(英文):

Li et al., 2012, A new strategy of cloning of resistance genes in *Panax notoginseng* and *Panax stipuleanatus*, Zhiwuyao Yu Yaolixue Zazhi (online) Vol.3 No.1 pp.1-4 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2014.03.0001](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2014.03.0001))

**摘要** 三七[*Panax notoginseng* (Burk) F.H.Chen]是我国传统名贵中药材之一。近年来, 三七的病虫灾害问题变得越来越严峻, 现已成为限制三七产业可持续发展的一个重要因素。观察发现, 作为三七的近缘物种屏边三七[*Panax stipuleanatus* H. T. Tsai et K. M. Feng]在其相同的生长环境下抗病性状表现优异。如何从分子角度挖掘利用植物本身所具备的抗病基因必将成为三七未来研究其中的一个热点问题。本研究利用人参、西洋参的 EST 数据库, 通过基因注释、KEGG 作图找到病原与植物识别代谢途径上有关植物病程相关的基因。然后经 RT-PCR 和 TA 克隆分别获得了若干个三七和屏边三七病程相关基因, 该技术的应用为三七抗病基因的研究和克隆开辟了新的技术途径, 同时也对其他药用植物的抗病研究具有参考意义。

**关键词** 三七, 屏边三七, 抗病基因, 电子克隆

## A New Strategy of Cloning of Resistance Genes in *Panax notoginseng* and *Panax stipuleanatus*

Li Ruibo<sup>1,2</sup> Shen Ye<sup>1</sup> Wen Guosong<sup>3</sup> Feng Guangquan<sup>4</sup> Qu Yuan<sup>2</sup> Cui Xiuming<sup>2</sup> Huang Luqi<sup>1</sup>

1. National Resource Center for Chinese Materia of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100070
2. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and technology, Kunming, Yunnan 650000
3. Institute of Chinese Materia Medica of Yunnan Agricultural University Kunming, 650201
4. Institute of Sanqi of Wenshan University, Wenshan, 663000

✉ Corresponding author, [sanqi37@vip.sina.com](mailto:sanqi37@vip.sina.com); [huangluqi@263.net](mailto:huangluqi@263.net); ✉ Authors

**Abstract** *Panax notoginseng* is a traditional Chinese famous medicinal material. It is an undeniable fact that the disease problem becomes increasingly serious. Now the disease has become an important factor to limit industrial sustainable development. It was observed the disease resistant trait of *Panax stipuleanatus* is better than notoginseng in equivalent environment. It would be one of the hot topics to cloning resistant gene. Some resistance genes of plant-pathogens interaction in *Panax notoginseng* and *Panax stipuleanatus* were cloned by homology PCR based on gene annotation and KEGG analysis data of related species. This method is a new way to clone gene of *notoginseng*, meanwhile, the research is also a reference to other medicinal plant of pathological research.

**Keywords** *Panax notoginseng*, *Panax stipuleanatus*, Resistance gene, Electronic cloning

植物病害是农业生产当中所面临的一种主要限制因子, 药用植物在其栽培过程中也同样面临着同样的问题。植物受到病害感染之后, 常常表现为严重的连作障碍问题、产量剧减、药用有效成分降低及品质变劣等一系列问题。三七[*Panax notoginseng* (Burk) F.H.Chen]为五加科人参属植物, 又称“南国神草”、“金不换”等, 是我国重要的名贵中药材之一。三七属于块根入药, 有显著的止血、活血化瘀、消肿定痛之功效, 其使用历史已有近 600 年(崔秀明和王朝梁,2000)。现代医学实践也证明, 三七具有多种生理活性成分, 药理作用十分广泛。能够预防和治疗血液系统、心血管系统、神经系统、免疫系统和代谢系统疾病, 以及在抗炎、抗衰老、抗肿瘤方面都有一定效力(胡勇,2000; 何晶,2004; 刘刚等,2005)。三七属于栽培驯化较早的中药材之一, 至今为止其人工栽培历史已有 400 多年。而这种长期的、规模化的栽培使得三七在自身种植中暴露出很多问题, 主要表现为品质降低、产量不稳定、极易感染病虫害等等(崔秀明等,2003)。屏边三七[*Panax stipuleanatus* H. T. Tsai et K. M.



Feng]亦是人参属植物,为三七近缘植物物种之一,又名“野三七”、“香刺”、“土三七”等。据三七研究院孙玉琴等老师们长期的观察发现:在同样的生长及栽培环境条件下,发现屏边三七表现为极少感病,基本上对三七叶部病害表现为免疫(孙玉琴等,2009)。杨涛等人对三七的黑斑病抗性进行了研究,实验发现人工接种三七黑斑病致病原菌后,不同植株间的抗病性存在有一定的差异,尽管抗病植株数量很少但还是存在(杨涛等,2006)。这就为三七抗病基因的挖掘、开发利用提供了可能。

近年来,克隆植物抗性基因的研究引起了愈来愈多的植物病理学家和育种学家的关注。1992年, *Hm1* 成为植物中第一个被克隆的 R 基因(Gurmu and Steven,1992),随着研究的进步,越来越多植物中的 R 基因被成功克隆。依据原理,目前基因克隆方法主要有以下四种方法,即基于基因产物的克隆方法;基于基因加标签的克隆方法;基于基因序列的克隆方法和基于基因图谱的克隆方法。其中,图位克隆(positional cloning,map-based cloning)和转座子标签技术(transposon tagging)是植物的抗病基因克隆前期研究工作中最常用的两种技术。如玉米抗圆斑病基因 *Hm1*(Gurmu and Steven,1992);番茄抗叶霉病基因 *Cf-4*、*Cf-5*、*Cf-9*(Mark 等,1996; Clwyn 等,1997)、抗花叶病毒基因 *Tm-2*;烟草抗花叶病毒基因 *N* (Dinesh 等,1995);亚麻抗叶锈基因 *L6*(Gregory 等,1995)和 *M*(Peter 等,1997)等均是利用转座子标记技术克隆到的抗病基因。利用图位克隆技术得到大麦(抗白粉病基因 *Mlo*)、番茄(抗叶霉病基因 *Cf-2*、抗叶斑病基因 *Pto* 和 *Prf* 基因、抗枯萎病基因 *I2*)、拟南芥(抗丁香假单胞杆菌基因 *RPS2*、*RPM1*)和水稻(抗白叶枯病基因 *Xa21*、*Xa1*、抗稻瘟病基因 *Pib*)的各类抗病基因(Dixon 等,1995; Andrew 等,1994; Song 等,1995)。然而,转座子标签法需要筛选并鉴定突变体、工作量较大、插入的位点也具有不确定性;图位克隆法则要求有高密度的分子标记图谱,而药用植物中大都存在有遗传背景不清、分子标记缺失等诸如此类的问题,因此传统方法在药用植物的抗病基因应用中具有一定的限制性。

从已被克隆 R 基因的产物结构来看,这些 R 基因虽针对不同的细菌、真菌、病毒和线虫,但其产物结构具有着令人惊奇的相似性。而且抗性基因常常以基因家族(family)的形式出现,不同植物中的同类基因之间具有着较高的保守性。随着人们对植物抗病基因研究的越来越成熟,大量的抗性基因被成功克隆,人们可以更加详细地、准确地掌握抗病基因家族间的整个进化趋势,同时基因间存在的保守特性也为开展基于基因序列的克隆工作奠定了良好的基础。其中,根据克隆策略不同,基于基因序列的克隆方法又可以分为两种形式:通过分子杂交克隆和通过 PCR 扩增基因法。分子杂交克隆是依据基因序列同源保守性从一种生物中分离获得的基因用于制作分子探针,然后从另一种生物的基因组文库中分离出此生物的同源基因;而 PCR 扩增则是通过设计特异引物,利用 PCR 技术直接从生物基因组或 cDNA 中扩增出目的基因。

与此同时,植物寄主与病原相互作用分子机理的研究也得到了迅速的发展(Keen,1992),一些病原物侵袭生长发育过程中的植物时常使其表现为抗病或感病,植物在长期的相互作用、相互选择、协同进化的过程中逐渐获得了一系列复杂的自我保护防御机制来(Gabrel and Rolfe,1990)。这些机制包括植物细胞对病原菌的识别,胞内信号的转换与传导,防卫反应的开启与系统获得抗性的形成。植物体最终会表现为产生加固并阻止病原生长的细胞壁成分(Gabrel and Rolfe,1990);合成小分子抑菌物质如植保素(phytoalexin)和毒性酚类小分子化合物(Hahlbrock and Scheel,1989);诱导并产生各种病程的相关蛋白(pathogenesis related,PR 蛋白)如几丁质酶和葡聚糖酶等(Dixon and Lamb,1990);生成蛋白酶抑制剂;释放各类活性氧;诱导植产生物内原激素等等一系列复杂的生化过程。其中,寄主植物细胞与病原菌的识别属于防御机制建立的首要步骤,此过程将会涉及到植物与病原之间复杂的信号识别反应。19 世纪 90 年代以来,伴随着生命科学和计算机科学的迅猛发展,生物信息学应运而生。它通过综合利用生物学、计算机科学和信息技术的优势来揭示大量而复杂的生物数据所赋予的生物学奥秘。在越来越多的植物基因组完成了测序的大时代背景下,京都基因与基因组数据库(KEGG)能够对生物体更高层次和更复杂细胞生命活动进行完整的演绎和推算。借助于生物信息学的力量,抗性基因的克隆宣示着进入了一个全新的时代。

本研究尝试通过使用三七近缘属植物人参、西洋参 EST 数据,经序列拼接、基因功能注释、KEGG 作图,最后成功地克隆出三七和屏边三七中部分病程相关功能基因,这些基因在其他药用植物研究当中还没有相关报道。

## 1 结果与分析

### 1.1 现有人参和西洋参 EST 序列生物信息学分析

截止 2012 年 6 月 5 号,NCBI 数据库网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)共收录人参(*Panax ginseng*)EST 序列 11,412 条、西洋参(*Panax quinquefolium*)EST 序列 5,018 条。首先使用 EGAssembler 工具对这些序列进行拼接,具体如下:人参当中的 6158 条拼接成了 1,304 条更长的 EST,而另外的 5254 条无法拼成更长的 EST,因此最



后总共得到了 6558 条拼接好的序列。这些拼接好的序列用 KAAS 工具进行 KEGG 注释。6558 个拼接好的序列中 1536 个有 KEGG 注释, 分布在 278 条 KEGG 通路上, 其中和代谢相关的通路有 113 条; 西洋参当中的 2147 条拼接成了 539 条更长的 EST, 而另外的 2871 条无法拼成更长的 EST, 因此最后总共得到了 3410 条拼接好的序列。这些拼接好的序列用 KAAS 工具进行 KEGG 注释。3410 个拼接好的序列中 812 个有 KEGG 注释, 分布在 253 条 KEGG 通路上, 其中和代谢相关的通路有 101 条, 具体见图 1。

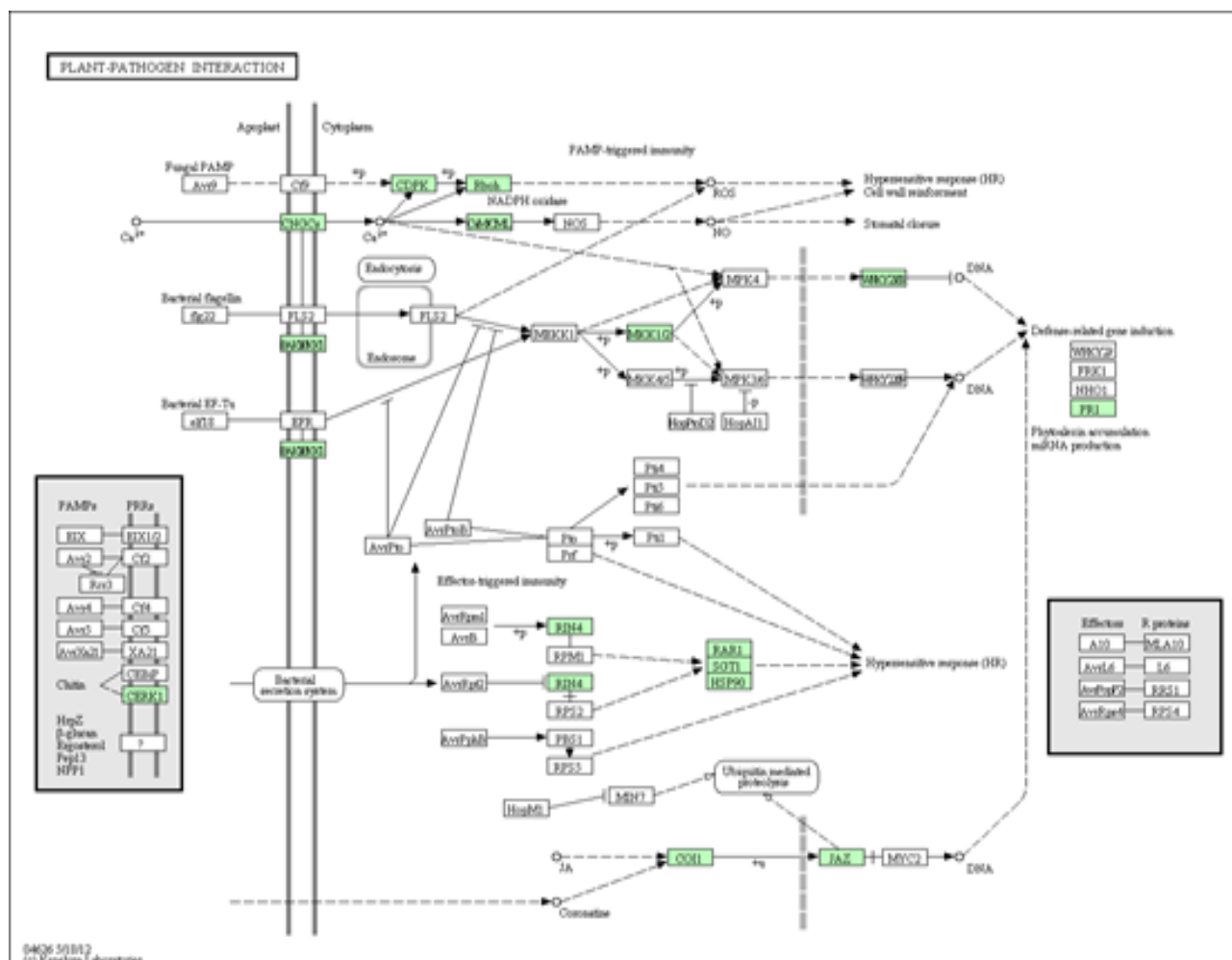


图 1 植物—病原互作 KEGG 图示  
 Figure 1 KEGG for Plant-Pathogen interaction

### 1.2 总 RNA 提取及反转录

三七和屏边三七根组织中均含有大量的酚类、糖类及其他代谢产物, 在进行液氮研磨时, 其中的酚类化合物极易被氧化成醌类物质, 与 RNA 分子发生不可逆结合, 产生褐化效应, 干扰了 RNA 的提取过程, 最终对 RNA 提取的产量和质量均造成很大的影响。

经过反复摸索, 我们认为优化 Trizol 法比较适合两种材料根组织总 RNA 的提取, 采用该方法能够获得纯度高、完整性好的总 RNA。如图 2 所示, 三七和屏边三七根组织中总 RNA 中具有清晰的 28S 和 18S 特征条带, 亮度比接近 2:1, 说明提取的总 RNA 较为完整, 无基因组 DNA 污染, 无降解, 符合后续功能基因克隆表达的要求。

随后, 用所提取的三七和屏边三七总 RNA 做模板, 进行反转录, 反转录产物置于 -20℃ 冰箱保存, 备用。

### 1.3 RT-PCR 扩增目的基因

据基因注释结果及病原与植物间互作代谢通路图基因分布, 最终挑选出 9 个完整或者相对完整的病程候选基因。其中 7 个候选基因的编码区内具有完整的开放阅读框(ORF), 而另外的 2 个候选基因仅有起始密码子。



使用引物设计软件 primer 5.0 对具有完整开放阅读框的 9 个候选基因分别进行引物设计, 正向引物位于或者包含起始密码子、反向引物位于或者包含终止密码子。另外 2 个相对不完整候选基因引物设计时, 除正向引物包含起始密码子外, 反向引物设计时尽可能靠近 3'末端, 引物相关详细信息见下表 1。

表 1 病程候选基因引物设计详细信息表

Table 1 the details of primer for R candidate genes

编号 number	是否全长 cDNA length	功能注释 Function annotation	来源 sources	引物设计 Primer sequence
Contig552	全长	pathogenesis-related protein 1	人参	Contig552-F: 5'-CTTCACGAAATGGCATTAC-3' Contig552-R: 5'- GATTAATTACTTGGATGAAAC-3'
Contig1030	全长	protein TIFY 10A	人参	Contig1030-F: 5'- CTGGAAAGTATGTCCACCTCG-3' Contig1030-R: 5'- CTATGCCTACAATTCGCTTTC-3'
Contig829	全长	EF hand family protein	人参	Contig829-F: 5'- ACGGTATCAATGGGGAAAGATC-3' Contig829-R: 5'- CACAATCGCCACAAATCACTT-3'
Contig534	全长	heat shock protein 90-1	人参	Contig534-F: 5'- ATCGATAATGGCGGATACAGAG-3' Contig534-R: 5'- GTTTACCAAGGACCACTCATGAG-3'
CN845943	全长	calmodulin 7	人参	CN-F: 5'- GAAGGAATATATGGCGGATC-3' CN-R: 5'- GTAATCACTTGGCCATCATAA-3'
Contig622	全长	calmodulin	人参	Contig622-F: 5'- GATAGATATGGCGGATCAGCTCAC-3' Contig622-R: 5'- GTAATCACTTGGCCATCATAAC-3'
Contig335	全长	calmodulin	西洋参	Contig335-F: 5'- TAGATATGGCGGATCAGCTCAC -3' Contig335-R: 5'- GTGGAGCTCATCACTTGGCCAT-3'
Contig27	部分序列	heat shock protein 90	西洋参	Contig27-F: 5'- GTAATGGCGGATACAGAG-3' Contig27-R: 5'- AGAAGTATCTCTGGTAACTG-3'
Contig156	部分序列	protein TIFY 10A	西洋参	Contig156-F: 5'- AGTATGTCGAGTCTTCGGAG-3' Contig156-R: 5'- CTCTTATTGTTCAAATTTAC-3'

利用 9 对已设计好的病程相关基因引物, 分别以屏边三七和三七反转录合成的 cDNA 为模板, 做 RT-PCR, 具体 PCR 扩增结果详见下图 3。从图 3 中可以看出, 9 对引物在三七中全部能够扩增出目标条带。在屏边三七中除了一对引物无法扩增外, 其他均能够得到有效扩增。说明利用人参属植物的基因相关数据可以进行三七的基因功能研究。

将扩增得到的 PCR 产物做 TA 克隆, 同时以各个病程相关基因所设计的引物进行菌液 PCR 检测后, 选择阳性菌液送华大基因公司测序, 同时保存剩余菌液。测序结果进行后续生物信息学分析, 包括在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行 BLAST 同源比对、功能预测等。



图 3 九个病程相关候选引物在三七及屏边三七中的 PCR 扩增结果 样品编号: M: DL2000 DNA marker ; PN, 三七; PS, 屏边三七; 1, cn; 2, contig27; 3, contig156; 4, contig335; 5, contig534; 6, contig552; 7, contig622; 8, contig829; 9, contig1030

Figure 3 Agarose electrophoresis of product of RT-PCR M: DNA Marker(DL2000)PN:P. Notoginseng PS: P. Stipuleanateus. 1-9: product of RT-PCR



#### 1.4 三七和屏边三七扩增序列的生物信息学分析

将克隆所得到的全长或部分 cDNA 序列用 BLAST 程序在 Non-redundant GenBank+ EMBL+DDBJ+PDB 和 Non-redundant GenBank CDS translation +PDB+Swissprot+ Superdate +PIR 数据库中进行核苷酸同源性检索, 其结果如下: 三七 CN 引物克隆得到的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)基因与斑点钝眼蜉(*Amblyomma maculatum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)有 99%的同源性, 因此, 暂命名为 *pnc-1*。三七 contig-27 引物克隆所得到的 heat shock protein 基因与野茶树(*Camellia sinensis*)的热激蛋白 90(heat shock protein 90)具有 98%的同源性, 因此暂命名为 *pnh-1*。三七 contig552 引物克隆得到的发病原相关蛋白 1(pathogenesis-related protein 1)基因与葡萄(*Vitis vinifera*)的病程相关蛋白 1 有 91%的同源性, 因此暂命名为 *pnpr-1*。三七 contig-622 引物克隆所得到的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)基因与斑点钝眼蜉(*Amblyomma maculatum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)有 96%的同源性, 因此, 暂命名为 *pnc-2*; 屏边三七 CN 引物克隆得到的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)基因分别与斑点钝眼蜉(*Amblyomma maculatum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)有 95%和 96%的同源性, 因此, 暂命名为 *psc-1*。屏边三七 contig-27 引物克隆所得到的热激蛋白(heat shock protein)基因与野茶树(*Camellia sinensis*)的热激蛋白(heat shock protein) 90 具有 98%的同源性, 因此暂命名为 *psh-1*。屏边三七 contig-335 引物克隆得到的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)基因与斑点钝眼蜉(*Amblyomma maculatum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)均有 97%的同源性, 因此, 暂命名为 *psc-2*。屏边三七 contig552 引物克隆得到的发病原相关蛋白 1(pathogenesis-related protein 1)基因与葡萄(*Vitis vinifera*)的病程相关蛋白 1 有 80%的同源性, 因此暂命名为 *pspr-1*。屏边三七 contig-622 引物克隆所得到的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)基因与斑点钝眼蜉(*Amblyomma maculatum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)的钙调蛋白相关蛋白(calmodulin-related protein)均有 96%的同源性, 因此, 暂命名为 *psc-3*。屏边三七 contig829 引物克隆得到的 EF 家族蛋白(EF hand family protein)基因与野生马铃薯(*Solanum demissum*)的 EF 家族蛋白(EF hand family protein)有 91%的同源性, 因此暂命名为 *psef-1*。

表 2 三七及屏边三七扩增序列功能蛋白比对详细信息表

Table 2 the details of protein comparison in *P. Stipuleanatus* and *P. Notoginseng*

编号 Number	植物材料 Plant material	基因功能 Gene function	同源物种 Congeneric species	同源性 identity
Contig552	<i>P. Stipuleanatus</i>	pathogenesis-related protein 1	<i>Vitis vinifera</i>	80%
	<i>P. Notoginseng</i>		<i>Vitis vinifera</i>	91%
Contig1030	<i>P. Stipuleanatus</i>	protein TIFY 10A	<i>Vitis vinifera</i>	57%
	<i>P. Notoginseng</i>		<i>Vitis vinifera</i>	57%
Contig829	<i>P. Stipuleanatus</i>	EF hand family protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	91%
	<i>P. Notoginseng</i>		<i>Solanum lycopersicum</i>	93%
Contig534	<i>P. Stipuleanatus</i>	heat shock protein	<i>Prunus persica</i>	96%
	<i>P. Notoginseng</i>		<i>Prunus persica</i>	96%
CN845943	<i>P. Stipuleanatus</i>	calmodulin-related protein	<i>Amblyomma maculatum</i>	95%
	<i>P. Notoginseng</i>		<i>Vitis vinifera</i>	99%
Contig622	<i>P. Stipuleanatus</i>	calmodulin-related protein	<i>Amblyomma maculatum</i>	96%
	<i>P. Notoginseng</i>		<i>Vitis vinifera</i>	96%
Contig335	<i>P. Stipuleanatus</i>	calmodulin-related protein	<i>Vitis vinifera</i>	97%
	<i>P. Notoginseng</i>		<i>Vitis vinifera</i>	97%
Contig27	<i>P. Stipuleanatus</i>	heat shock protein	<i>Camellia sinensis</i>	98%
	<i>P. Notoginseng</i>		<i>Camellia sinensis</i>	98%
Contig156	<i>P. Notoginseng</i>	protein TIFY 10A	<i>Vitis vinifera</i>	53%

从比对结果来看, 9 对引物所扩增得到的基因产物全部和预期结果相符, 且片段大小也基本相似。这也从侧面证实了可以利用人参属其他植物基因组数据开展三七功能基因的相关研究, 此方法简便、可行而且有效。

然而 9 个目的基因中, 大部分为基因均是一些基因的表达调控元件, 如锌指蛋白、钙调蛋白、热激蛋白等。这些目的基因产物可能是特异性地参与植物抗病基因表达调控的复杂网络, 引起植物的一系列的抗性反



应。其中, 9 个目的基因当中有一个为植物病程相关蛋白(PR1)基因, 此蛋白的表达常常作为植物系统获得性抗性存在的一种标志, 其重要程度不言而喻。三七和屏边三七中均克隆了到此基因, 幸运的是所克隆到的两个 *PR1* 基因均具有完整的开放阅读框, 这为研究该基因的功能奠定了基础。

## 2 讨论

一般来讲, 基因克隆的策略可以分为正向遗传学途径和反向遗传学途径两条途径。正向遗传学途径是已知待克隆基因功能表现型, 通过鉴定其产物或某种表型的突变的方式进行克隆, 常见的有功能克隆(Functional Cloning)和表型克隆(Phenotype Cloning); 而反向遗传学途径则以基因本身特定序列或者在基因组中的特定位置为基础进行克隆, 如定位克隆(Positional Cloning)和序列克隆(Sequence Cloning)。其中, 功能克隆是较为经典的一种基因克隆策略, 其优点是能分离出纯度较高的单一蛋白质。Inoue 等(Inoue et al, 1996)利用功能克隆法克隆了闭鞘姜(*Costus speciosus*)咪唑烷 26-O- $\beta$ -葡糖苷酶基因; Grothe 等(Grothe, 2001)也通过此法克隆出罂粟(*Papaver somniferum*)Salutaridinol 乙酰转移酶的全长序列。本研究中分离并纯化得到抗病蛋白具有一定的难度, 因此功能克隆策略并不适合。前人研究显示, 利用表型差异克隆技术可对有明显差异表型的材料相关基因进行克隆, 常用手段有差异显示技术(DD-PCR)(Liang et al, 1992)、cDNA-AFLP 法(Bachemc et al, 1996)、差减扣除杂交(SSH)法(Diatchenko et al, 1996)及微阵列杂交(Chee et al, 1996)等。相同生境条件下, 屏边三七抗性表现明显优于三七(孙玉琴等,2009); 同一块地中, 三七不同植株间对黑斑病的抗病表现亦具有明显差异(杨涛等,2006), 因此, 表型差异克隆策略将会是下一步三七抗病基因克隆研究的主要方向。

克隆得到植物抗病基因是深入了解植物抗病机制的基础, 也是未来进行植物抗病遗传工程研究中重要的基因资源, 目前已经有 70 多个植物抗病基因从不同植物中被克隆鉴定(李智强等,2011)。自 1994 年 Boguski 等学者首次利用生物信息技术克隆新的基因开始, 伴随着基因组计划和 EST 计划的实施, 人们借助于电子计算机的巨大运算能力, 通过 EST 或基因组的序列组装和拼接, 越来越多的新基因利用 RT-PCR 的方法被克隆得到(李鑫等,2004)。例如, 水稻中的耐盐胁迫锌指蛋白基因 *OsZFP*、胞质核糖体蛋白基因 *OsRPS7*、小 GTP 蛋白基因 *Osrab5B* 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *OsG6PDH* 等基因的克隆均是通过电子克隆方法得到(黄骥等,2002; 王东东等,2006; Bianca Habermann, et al.2004)。随着生物信息学的发展和许多药用植物全基因组测序计划的实施, 电子克隆技术将在药用植物基因功能研究领域扮演着重要作用。

与传统基因克隆技术相比, 电子克隆优势主要表现在以下几个方面: (1)基因克隆快速; 同源性比较、序列拼接组装等工作可以在计算机上迅速完成, 然后随即进行 RT-PCR 验证。(2)成本低; 电子克隆技术绝大部分工作在计算机上完成, 只需配备普通 PCR 仪等设备就可以开展工作。(3)针对性强; 借助于计算机的分析, 人们对所克隆基因功能、核酸组成等所有性状大都比较明确, 因此在开展基因克隆或者基因工程应用时具有较强的目的性。从本文研究来看, 我们利用 EST 数据库相对丰富的三七近缘属植物人参和西洋参, 通过对这些序列进行拼接和功能注释, 然后在 KEGG 平台上进行梳理, 专门挑选那些参与植物抗病免疫代谢途径的编码基因, 最后在三七及屏边三七中进行 RT-PCR 实验验证。结果发现, 绝大多数基因均能在三七和屏边三七上得到有效扩增, 且片段大小和预测目的基因大小基本相似。例如三七和屏边三七植物病程相关蛋白 *PR-1* 基因核酸序列与最初拼接而成的 contig 人参病程相关蛋白序列同源性达到为 98%和 96.4%, 其中病程相关蛋白 1 的功能结构 SCP 保守域在三七、屏边三七和拼接而成的人参当中结构组成完全一致。由于植物抗病基因大都属于进化上比较保守的基因, 同一基因在不同植物中或者某个植物中的同一基因家族均存在有很强的保守性, 这可能是电子克隆技术能够成功的根本原因。因此, 电子克隆技术对那些种间保守性差的基因和外显子数目多而且短的基因不适用, 这是该技术所存在的弊端之一(万海伟, 2004)。另外, 电子克隆技术主要依靠电脑和网络资源, 对于那些植物数据库资料缺乏或者资料不完整的植物, 获得 cDNA 全序列的概率小而且难度大, 这也限制了该技术的普遍性应用。

随着许多药用植物 EST 计划与基因组计划的开展和相关数据库的发布, 电子克隆技术将在药用植物相关基因研究中做出巨大的贡献。此外, 电子克隆能够起到大大加速植物基因结构、功能研究的进程, 推动比较基因组学的发展和植物基因的进化、起源、发育方面的研究(Bikram S, 2004)。通过电子克隆获得新基因, 经序列分析和功能验证, 确定为基因功能, 将为功能基因组学与蛋白质组学研究提供新的线索和基础。屏边三七在抗病性状表现上优于三七, 从本文研究结果来看, 9 个病程相关基因核酸序列三七与屏边三七的同源性范围在 83-98%之间, 至于这种抗性差异与基因序列差异有无相关性, 仍需进一步的实验数据支持, 同时这也将会成为我们课题组下一步的研究方向。综上所述, 电子克隆技术以其自身独具的优势能够在很多规模较小的实验室均可以得到应用, 此外还可利用该技术在基因水平上研究某些复杂事件或途径的机制。因此, 我们有理由相



信, 随着基因组序列信息的日益丰富以及计算方法和数据库的不断完善, 电子克隆技术将在药用植物基因全长 cDNA 克隆和分析中发挥更加重要的作用。

### 3 材料与方法

#### 3.1 实验材料

三七(*P. notoginseng*)及屏边三七(*P. Stipuleanatus*)全株均采自云南省农业科学院药用植物研究所, 经昆明理工大学崔秀明研究员鉴定确认。样品采集后用清水冲洗 3~5 次, 然后用吸水纸吸去水分后立即置于液氮中速冻, 提取 RNA 直接使用或 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

Trizol 试剂购自 Invitrogen 生物技术有限公司; 分子质量标准 DL2000、克隆载体 pGEM-T Easy、反转录试剂盒、DNATaq 聚合酶、 $T_4$  DNA 连接酶、大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  均购自于 Takara 公司; DNA 胶回收试剂盒以及质粒回收试剂盒购于上海生工有限公司; 卡那霉素、 $\beta$ -巯基乙醇、等化学试剂购于 Sigma 公司; 其他生化试剂均为国产分析纯。

#### 3.2 总 RNA 的提取及反转录

三七及屏边三七总 RNA 提取使用 Trizol 优化方法。具体操作: 从 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出 200 mg 根组织, 放入研钵中充分研磨至粉末状, 立刻转移至装有 1 mL Trizol RNA 提取溶液的 1.5 mL 离心管中, 涡旋混匀, 室温放置 10 min 使其组织充分裂解;  $4^{\circ}\text{C}$ 、12000r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 收集上清液至新的离心管中; 加入 200 $\mu\text{L}$  氯仿:异戊醇(24:1)、15 $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇、1% PVP 10  $\mu\text{L}$ , 旋涡混匀, 冰浴 10 min;  $4^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 15 min, 收集上层上清液至新的离心管中; 加入等体积异丙醇, 上下颠倒混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$ 静置沉淀 1 h;  $4^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 用 1 mL 的 75%乙醇洗涤沉淀;  $4^{\circ}\text{C}$ 、12000r/min 离心 5 min, 弃上清液, 空气干燥沉淀 10 min, 加入 20  $\mu\text{L}$  经 DEPC 处理的去离子水溶解 RNA,  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。RNA 完整性通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 其浓度采用 Quawell Q3000 微量核酸蛋白测定仪测定,  $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。以提取的 RNA 为模板, 以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为反转录引物, 按照 Takara 公司的 Prime Script<sup>TM</sup> RT Reagent 试剂盒说明书操作。

#### 3.3 抗病基因编码蛋白的生物信息学分析

以反转录的 cDNA 为模板进行相关基因的 PCR 扩增, 将回收的特异性扩增片段克隆到 pGEM-T Easy 载体中, 挑取阳性克隆进行序列分析。

利用 NCBI 数据库搜索相关植物蛋白及其编码基因, 并在保守结构域数据库(CDD)中进行序列比对; 通过 [www.ExPASy.ProtParamtool.htm](http://www.ExPASy.ProtParamtool.htm) 在线分析各个基因编码氨基酸大小及其等电点, 同时亦可利用 DNAMAN、BioEdit 等生物学软件预测其可能的信号肽区域和跨膜区域, 限于篇幅原因本文未进行各种后续分析。

#### 作者贡献

通讯作者崔秀明和黄璐琦负责实验指导及论文修改; 李瑞博负责实验具体实施和论文撰写; 申业负责引物设计工作和部分数据分析; 文国松参与部分实验并提出建议; 其他作者均参与了本实验的具体实施工作; 全体作者均已阅读并同意提交本稿。

#### 致谢

感谢国家自然科学基金项目(81360617)和云南省应用基础研究计划项目(2013FA031)对本研究的资助。

#### 参考文献

- Anderson P A, Lawrence G J, Morrish B C, Ayliffe M A, Finnegan E J, Ellis J G, 1997, Inactivation of the flax rust resistance gene M associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region, *The Plant Cell*, 9(4):641-651
- Bachem C W, Hoveen R S, Brujin S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G, 1996, Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development, *Plant J*, 9(5):745-749
- Bianca Habermann, Anne Gaelic Bebin, Stephan Herklotz. An Ambystoma mexicanum EST sequencing project: analysis of 17,352 expressed sequence tags from embryonic and regenerating blastema cDNA libraries. *Genome Biol*, 2004,5(9):67
- Bikram S Gill, Rudi Appels, Anna Maria, Botha Oberholster, 2004, A workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium. *Genetics*, 168:1087-1096
- Chee M, Yang R, Hubbell E, Bermo A, Huang X C, Stern D, Fodor S P, 1996, Accessing genetic information with high-density DNA arrays, *Science*, 274(5287): 610-614
- Cui X. M., Wang C.L., 2000, Document library of Sanqi, Wenshan, Wenshan Daily Press:1 (崔秀明,王朝梁, 2000, 三七文献资料汇编, 云南文山, 文山日报社印刷厂:1)
- Cui X. M., Wang C. L., Chen Z. J., 2003, Studies and practice of *Panax notoginseng* (Sanqi) GAP, Kunming, Yunnan Science and Technology Press:64 (崔秀明, 王朝梁, 陈中坚, 2003, 三七 GAP 研究与实践, 昆明, 云南科技出版社: 64)



- Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Siebert P D, 1996, Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(12):6025-6028
- Dinesh-kumar S P, Whitham S, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B, 1995, Transposon tagging of the tobacco mosaic virus resistance gene N: its possible role in TMV-N mediated signal transduction pathway, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (10): 4175 -4180
- Dixon M S, Jones D A, Hatzixanthos K, Ganai M W, Tanksley S D, Jones J D G, 1995, High-resolution mapping of the physical location of the tomato *Cf-2* gene, *Mol Plant Microbe Interact*, 8:200-206
- Dixon M S, Jones D A, Keddie J S, Thomas C M, Harrison K, Jones J D, 1996, The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine rich repeat proteins, *Cell*, 84(9):451-459
- Dixon R A, Lamb C J, 1990, Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens, *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 41:339-367
- Gabrel D W, Rolfe B G, 1990, Working models of specific recognition in plant microbe interaction, *Ann Rev phytopathol*, 28:365-391
- Lawrence G J, Finnegan E J, Ayliffe M A, Ellis J G, 1995, The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *arabiopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene N, *The Plant Cell*, 7(8):1195-1206
- Grothe T, Lenz R, Kutchan T M, 2001, Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *papaver somniferum*, *J Biol Chem*, 276(33):30717-30721
- Gurmu K H S J, Steven P B, 1992, Reductase activity encode by the *Hm1* disease resistance gene in maize, *Science*, 258(6):985-987
- Hahlbrock K, Scheel D, 1989, Physiology and molecular biology of phenyl propanoid metabolism, *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 40:347-369
- He J., 2004, Pharmacological action of *Panax notoginseng*, *Capital Mdecine*, 11(18): 39-40 (何晶, 2004, 三七的药理作用, 首都医药, 11(18):39-40)
- Hu Y., 2000, The curative properties of *Panax notoginseng*, *China pharmaceuticals*, 9(2):44-45(胡勇, 2000, 论三七的功效, 中药天地, 9(2):44-45)
- Huang J., Zhang H.S., Cao Y.J., Wang D., Wang J.F., Yang J.S., 2002, Cloning and sequence analysis of a new novel C2H2 zinc finger cDNA from rice(*Oryza sativa* L.), *Journal of Nanjing Agricultural University*, 25(2):110-112 (黄骥, 张红生, 曹雅君, 王东, 王建飞, 杨金水, 2002, 一个新的水稻 C2H2 型锌指蛋白 cDNA 的克隆与序列分析. 南京农业大学学报, 25(2):110-112)
- Inoue K, Shibuyama Y, Amamoto K, Ebizuka Y, 1996, Molecular cloning and bacterial expression of a cDNA encoding furostanol glycoside 26-O-β-glucosidase of *Costus speciosus*, *FEBS Lett*, 389(3):273-276
- Keen N T, 1992, The molecular biology of disease resistance, *Plant molecular Biology*, 19:109-122
- Liang P, Pardee A B, 1992, Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science*, 257(5072): 967-970
- Liu G., Liu Y.C., Bao J.C., Zhang C.X., 2005, The advancement in pharmacological actions study of *Panax notoginseng*, *Ren Shen Yan Jiu*, 17(3):12-17(刘刚, 刘育辰, 鲍建才, 张崇禧, 2005, 三七的药理作用的研究进展, 人参研究, 17(3):12-17)
- Li Xin, Zhang Tao, 2004, Cloning strategy and method of the new gene, *Strait Pharmaceutical Journal*, 16(3):16-19 (李鑫, 章涛, 2004, 新基因的克隆策略和方法. 海峡药学, 16(3):16-19)
- Li Z.Q., Dai L.Y., Liu X.L., Wang G.L., 2011, Research Progress on Plant Disease Resistance Mechanism and Signaling Transduction Pathways, *Crop Research*, 25(5):526-530 (李智强, 戴良英, 刘雄伦, 王国梁, 2006, 植物抗病机制与信号传导研究进展, 作物研究, 25(5):526-530)
- Sun Y.Q., Chen Z.J., Zhou S.L., Wei M.L., Huang T.W., Flowering biological characteristics of *Panax stipuleanatus*, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 34(20): 2567-2570 (孙玉琴, 陈中坚, 周世良, 韦美丽, 黄天卫, 2009, 屏边三七的开花生物学特性初步研究, 中国中药杂志, 34(20):2567-2570)
- Thomas C M, Jones D A, Parniske M, Harrison K, Balint-Kurti P J, Hatzixanthos K, Jones J D, 1997, Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequence that determine recognition specificity in *Cf-4* and *Cf-9*, *The Plant Cell*, 9(12):2209-2224
- Wai HaiWei, Du LiXin, 2004, Application of EST in the study of genomics, *Biotechnology Bulletin*, (1):35-38 (万海伟, 杜立新, 2004, 表达序列标签(EST)在基因组学研究中的应用. 生物技术通报, (1):35-38)
- Wang D.D., Zhu Y.M., Li Y., Li J., Bai X., 2006, Silicon cloning and its application in plant gene engineering, *Journal of Northeast Agricultural University*, 37(3):403-408 (王东东, 朱延明, 李勇, 李杰, 柏锡, 2006, 电子克隆技术及其在植物基因工程中的应用, 东北农业大学学报, 37(3):403-408)
- Yang T., Chen Y.J., Duan C.L., Xu S.Z., Xiao F.H., Wang Y., Wen G.S., 2006, The methodology for artificial identification of *Panax notoginseng* resistance to black spot disease, *Journal of Yunnan Agricultural University*, 21(5):549-559 (杨涛, 陈昱君, 段承俐, 徐绍忠, 萧凤回, 王勇, 文国松, 2006, 三七黑斑病抗性人工鉴定方法的建立, 云南农业大学学报, 21(5):549-559)