



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116656702 B

(45) 授权公告日 2024.03.12

(21) 申请号 202310630413.7
 (22) 申请日 2023.05.30
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 116656702 A
 (43) 申请公布日 2023.08.29
 (66) 本国优先权数据
 202310331769.0 2023.03.30 CN
 (73) 专利权人 青岛大学
 地址 266061 山东省青岛市崂山区香港东
 路7号
 (72) 发明人 张廷婷 张宇 李荣贵 冯忠良
 张文靖 董国颂
 (74) 专利代理机构 青岛高晓专利事务所(普通
 合伙) 37104
 专利代理师 贾景然
 (51) Int. Cl.
 C12N 15/54 (2006.01)
 C12N 15/29 (2006.01)
 C12N 9/12 (2006.01)
 C07K 14/415 (2006.01)
 C12Q 1/6895 (2018.01)

(56) 对比文件
 CN 105969776 A, 2016.09.28
 CN 1352680 A, 2002.06.05
 Romanowski A, Garavaglia MJ, Goya ME, Ghiringhelli PD, Golombek DA. .Potential conservation of circadian clock proteins in the phylum Nematoda as revealed by bioinformatic searches. .《PLoS One. 》.2014,e112871.
 Wang M, Du G, Fang J, Wang L, Guo Q, Zhang T, Li R. .UGT440A1 Is Associated With Motility, Reproduction, and Pathogenicity of the Plant-Parasitic Nematode Bursaphelenchus xylophilus. . 《Front Plant Sci.》.2022,862594.
 李文硕,王林松,杜桂彩等.一种松材线虫醛脱氢酶的基因克隆及其生化性质.《生物技术通报》.2022,207-214.
 NCBI.LRK1 [Pinus tabuliformis]. 《Genbank》.2015,AJP06318.1.

审查员 杜凌燕

权利要求书1页 说明书14页
序列表(电子公布) 附图3页

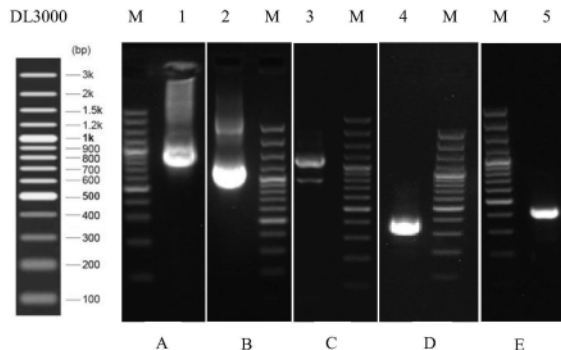
(54) 发明名称

一种编码黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的cDNA序列及其氨基酸序列与应用

(57) 摘要

本发明属于基因工程技术领域,涉及一种编码黑松PthLRK1基因的cDNA序列及其氨基酸序列与应用。通过快速扩增cDNA末端途径从黑松中分离得到并命名为黑松PthLRK1基因,cDNA序列全长为3081bp,含有2679bp的开放阅读框ORF,编码892个氨基酸,理论分子量为99.63kDa,理论等电点(pI)为5.46;当黑松受到松材线虫侵染后,PthLRK1基因的表达水平发生显著变化,PthLRK1基因具有抗病性;该基因的克隆与功能分析,为研究黑松抗松材线虫胁迫的响应机制及其分子水平的调控奠定了基础,对于黑松的基因工程育

种、松材线虫病防治以及检测判断黑松植株是否感染松材线虫病具有重要的意义。



CN 116656702 B

1. 一种编码黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的cDNA序列,其特征在于,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 一种如权利要求1所述编码黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的cDNA序列,其特征在于,全长cDNA序列为3081bp,含有2679bp的开放阅读框,编码892个氨基酸,编码蛋白的理论分子量为99.63kDa,理论等电点为5.46。

3. 一种黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

4. 一种如权利要求1所述编码黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的cDNA序列的应用,其特征在于,用于黑松抗松材线虫胁迫的响应机制及其分子水平的调控研究。

一种编码黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的cDNA 序列及其氨基酸序列与应用

技术领域:

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,涉及一种黑松幼苗抗松材线虫病相关的基因的克隆和功能验证,尤其是涉及一种编码黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶(Leucine-rich-repeat receptor like kinases,LRR-RLKs,LRK)的cDNA序列及其氨基酸序列与应用。

背景技术:

[0002] 松材线虫病(*Bursaphelenchus xylophilus*)是一种世界性的重大检疫性森林病害。松材线虫病在亚洲感染松树后病害发展速度快,危害大,防治难,造成严重的经济损失。松材线虫病在自然情况下可以感染的松属树种有51个,非松属树种16个。

[0003] 富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶(Leucine-rich-repeat receptor like kinases,LRR-RLKs,LRK)是植物中检测到的最大的一类跨膜类受体激酶,包含胞外结构域、单次跨膜域和胞内激酶域,可通过胞外结构域结合病原菌、激素信号与胁迫相关的外界信号分子,激活胞内激酶域的磷酸化/去磷酸化的活性,完成信号的跨膜运输,进而调控植株的生长发育、参与激素信号途径和对外界胁迫的应答过程。在拟南芥中亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的生物合成途径已经有完整的说明,但是在黑松中,对LRK基因尚未有克隆研究。因此,研究黑松抗松材线虫病过程中涉及的关键酶的基因,并对其进行克隆及功能研究,有助于了解黑松抗松材线虫病胁迫的响应机制及其分子水平的调控,对于黑松的基因工程育种、松材线虫病防治以及检测判断黑松植株是否感染松材线虫病具有重要的意义。

发明内容:

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术存在的缺点,提供一种黑松幼苗抗松材线虫病相关的基因(PthLRK1)序列与应用,尤其是一种编码黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶(LRK)的cDNA序列及其氨基酸序列与应用。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供一种编码黑松富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶(LRK)的cDNA序列及其氨基酸序列,按照以下方法操作:

[0006] 一、黑松PthLRK1基因的cDNA部分序列的克隆

[0007] 参照Trizol提取试剂盒(B511321,生工生物工程(上海)股份有限公司)的说明书提取黑松总RNA,取0.5-2 μ g总RNA为模板,利用第一链cDNA合成试剂盒(B532435,生工生物工程(上海)股份有限公司)合成cDNA第一链,冻存于-20 $^{\circ}$ C备用。

[0008] 根据已知的黑松近缘物种海岸松的LRK序列资料及黑松转录组测序数据,设计三对引物分别进行PCR扩增,三对引物如下:

[0009] Y1'-F:5'-GAACCGAACTGCAGAAAACAATAT-3';

[0010] Y1'-R:5'-AACTTGTTTTGATAGCCTCCAG-3'。

[0011] Y2'F:5'-AGATCCTTTTCCGTGAGAATAAATG-3';

[0012] Y2'R:5'-TTAGTTTGAATGATGTGCATTAGG-3'。

[0013] Y3F:5'-CCGTCAAATTGCTCTCACAGTTC-3'；

[0014] Y3R:5'-CCCAAGATTTGACGAGATGGTTAC-3'。

[0015] 以cDNA第一链为模板,进行PCR扩增,反应体系如下:引物F(10 μ M)0.5 μ L,引物R(10 μ M)0.5 μ L,dNTP(10mM)0.2 μ L,cDNA第一链模板1 μ L,Taq酶(5U/ μ L)0.2 μ L,ddH₂O10.1 μ L。PCR程序:95 $^{\circ}$ C预变性3min,94 $^{\circ}$ C30s,58 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C90s,循环33次,72 $^{\circ}$ C延伸10min;得到的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后(如图1A、B、C),利用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(B518131,生工生物工程(上海)股份有限公司)分别回收目的DNA,并分别连接到T-Vector上,构建T-PthLRK,将连接PCR产物的载体分别转化大肠杆菌DH5 α ,挑选阳性克隆并测序;分别以上述三对引物进行PCR扩增分别获得长度为1017bp、1222bp、1099bp的片段,拼接得到黑松PthLRK1基因cDNA序列大片段。

[0016] 二、黑松PthLRK1基因3'端cDNA序列克隆

[0017] 3'端cDNA序列克隆采用3'-RACE方法,按照3'-RACE试剂盒(B605101,生工生物工程(上海)股份有限公司)说明书进行,以适量总RNA为模板,以3'adaptor GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT为引物,在Reverse Transcriptase Mix(RNase H-)逆转录酶的作用下,50 $^{\circ}$ C温育30min,85 $^{\circ}$ C加热1min合成cDNA第一链,-20 $^{\circ}$ C保存;根据黑松PthLRK1基因大片段cDNA序列设计引物(引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成),进行两轮PCR。引物序列如下:

[0018] NF9:5'-TCTCTTTATCTGTGGATTCGACTGC-3'；

[0019] NF10:5'-GAGGAATGGAGTGGAGTGACAAC-3'。

[0020] 5.3'outer:5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC-3'；

[0021] 5.3'inner:5'-GCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'。

[0022] 以3'adaptor为反转录引物得到的cDNA第一链为模板,以两个引物进行两轮PCR扩增,反应体系如下:

	反应组分	第一轮(μ L)	第二轮(μ L)
[0023]	引物 F (10 μ M)	0.5 (NF9)	0.5 (NF10)
	引物 R (10 μ M)	0.5 (5.3'outer)	0.5 (5.3'inner)
	模板	0.5 (cDNA)	0.5 (第一轮 PCR 稀释产物)
[0024]	Taq 酶混合液	13.5	13.5
	无 RNA 酶的水	补足 20	补足 20
	总体积	20	20

[0025] PCR程序:第一轮为降温PCR:94 $^{\circ}$ C预变性60s,94 $^{\circ}$ C30s,70^{*1} $^{\circ}$ C(*1表示每个循环降1 $^{\circ}$ C)30s,72 $^{\circ}$ C60s,循环10次;第二轮:94 $^{\circ}$ C30s,60 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C60s,循环25次,72 $^{\circ}$ C延伸480s;得到的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后(如图1D),利用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(B518131,生工生物工程(上海)股份有限公司)回收目的DNA,并将其连接到T-Vector上,构

建T-PthLRK,将连接PCR产物的载体转化大肠杆菌DH5 α ,挑选阳性克隆并测序,该序列大小为375bp。

[0026] 三、黑松PthLRK1基因5'端cDNA序列克隆

[0027] 5'端cDNA序列克隆采用5'-RACE方法,按照5'-RACE试剂盒(B605102,上海生工公司产品)说明书进行,以适量总RNA为模板,使用5'-RACE反转录特异性引物(NRT1),在Reverse Transcriptase Mix(RNase H-)逆转录酶的作用下,50℃温育30min,85℃加热1min,合成cDNA第一链,将cDNA第一链进行RNase H消化、cDNA纯化回收、TdT加C尾处理,-20℃保存。

[0028] 根据黑松PthLRK1基因大片段cDNA序列设计克隆5'端cDNA序列所需的引物(引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成),进行两轮PCR。引物序列如下:

[0029] 5'adaptor:GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGGGIIGGGIIGGGIIG。

[0030] NRT1:5'-GTCTCTTGACAATTCACAGGCTG-3'。

[0031] NR1:5'-CAGCAATCTGCCAGAGCTAACC-3'。

[0032] NR2:5'-TTTATCTGAGACCGCTACGTTTCC-3'。

[0033] 5.3'outer:5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC-3'。

[0034] 以上述TdT加C尾处理过的cDNA第一链为模板,以两对引物进行两轮PCR扩增,反应体系如下:

反应组分	第一轮(μ L)	第二轮(μ L)
引物 F (10 μ M)	0.5 (NR1)	0.5 (NR2)
[0035] 引物 R (10 μ M)	0.5 (5' adaptor)	0.5 (5.3' outer)
模板	0.5 (cDNA)	0.5 (第一轮 PCR 稀释产物)
Taq 酶混合液	13.5	13.5
无 RNA 酶的水	补足 20	补足 20
[0036] 总体积	20	20

[0037] PCR程序:第一轮为降温PCR:94℃预变性60s,94℃30s,70^{*1}℃(表示每个循环降1℃)30s,72℃60s,循环10次;第二轮:94℃30s,60℃30s,72℃60s,循环25次,72℃延伸480s;得到的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后(图1E),利用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(B518131,生工生物工程(上海)股份有限公司)回收目的DNA,并将其连接到T-Vector上,构建T-PthLRK,将连接PCR产物的载体转化大肠杆菌DH5 α ,挑选阳性克隆并测序,该序列大小为404bp。

[0038] 四、黑松PthLRK1基因全长cDNA序列测序

[0039] 将上述得到的5个序列(1017bp、1222bp、1099bp、375bp和404bp)进行拼接,推断黑松PthLRK1基因全长cDNA序列,共3081bp。利用ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)对拼接的全长cDNA序列进行开放阅读框的查找,黑松PthLRK1基因ORF区域共2679bp,位于第78-2756bp处,编码892个氨基酸。通过Phyre2程序对

黑松PthLRK1基因编码蛋白进行三维结构预测,结果表明,该蛋白具有清晰的 α -螺旋, β -折叠以及无规则卷曲。

[0040] 序列1:黑松PthLRK1基因的全长cDNA序列

[0041] TAATTTCTGGTCTTGTGGAAGGATTTTTGAGTATCGACTGCGGAGGGAAAACGAACCGAACTGCAGAAA
ACAATATAATGTGGGTCCTGATGATAATTATATAGACGTGGGTACAGAGGAGAGATCGGAAACGCTAGTGCTTAC
GGTTCTTACTTGCACACCTTGCAGTTTTCCCAAAGCCTCTCAACAAGTCTTGCTATCAGTTGCCTGTGGTCCCTGA
TGTGCCTTATCTCTTAAGGTTATGGTTTGAAGTTGAAAATTACAGTGGATTCAAACAACCTCCAAGCTTTGCTTTCT
CTATTGAGACAGAGGGTATGTTAGCTATGGGAAACGTGACGATCTCAGACTGTGACACACCATGTTATGATGAAATA
ATATTTGTTAGTTCTGGCAGAGTCTGTACATTTGCTTGATCAGAACCTCGGAGTCTGATGATCCCTTCGTCTCTGC
TATCGAGTTGAGAACGCTTCAACAAGGCATGTATGGACTGGCTAAGCCAGGAACAATGTTGATGCTAGTATGGAGAT
ATGATGCTGGTGGAAATATTACCATTAGGTATCCTCAAGACATGTTCCGACCGATCTGGGATTACGAATTGAGAGTA
ACTTTTGGCAATCATTATCCTGTACAGCCTGTGAATTGTCGAGAGACCATTTCAACCAGCAATACCACAGAACTTCC
TCCAAGTGTGTGATGCAAACAGCGCGGTTATTATTGACCCGGCACGTGCGTTCGATGTCGGATCGACTAATGGTC
ATAGATTATTATTGCTGTTATATGTTGCAGAGATCGAGCAGCTAAATATGTCTGAACATAGATCCTTTTATGTGACA
ATAAATGATGAGAAACGGTCTGAGGCCATTACTTCTGAGCGATTATTCTACCCGGGAGCTAAAATTTATATCCAA
TCCAACAGATGATTTGATTTTGCCTTGGTCAACACTAGGGATGCAACCAGTATCCCATAATGAACGCCTTTGAGG
CTTACGAAATAATTGACACCCAACC

[0042] GGCAACATATGCGCAAGATAACAAAGCTCTTGAGGCTATCAAAAAGCAGGTTTGGCGTAA
[0043] AGGATTGGATTTCTGATCCTTGTTTTTTGATCCAGTGAATGGAATTGTGTGTGAAAGCA
[0044] GCACTTACCCATAAGAATTTGCGAAATTGATTTGTCAGGAAAGAATCTTACAGGATTGG
[0045] TGCCCCGACGATATTAGACAGTTGACGGCATTAGTTAAAGTGTGCTTTACAATAATCATTT
[0046] GATAGGGCAATTGCCAAATTTGTCCAGTTAACCATGTTGGAGAGATTGTATCTACAAAA
[0047] CAACAACCTGAGCGGTACTCTCCGTCCTGGCTATGTGAACTGAAAAACCTAAAAGAAT
[0048] TGAATATAGAGAATAATAATTTAGCGGTGTAATACCTGTCCAACCTCTCAATGGATCATT
[0049] GAAATTTAGTTACTGTGGAAACCCCTACTTACCTATGCATAAGGGGAAATGCACCCTGCA
[0050] TACTACAAATAAGAATAAATTTGAAGATTATACTCGGAATAAACAAGGCGGAATATTAATC
[0051] ATCGCTTTAGCGCTGATAGTAGCTATTATTATGTATCGCAATAAATTCGGGCGAAAAGAAC
[0052] AGGGTATTGACAGCAGAAGAAGTGGACTGGGAATGGAACCTAGATCTTACTTGTACCAA
[0053] GACTACTCAATGGTTACCGTGCCAAATTTCAACAAAATCCCGTTCCTTCACTCTAGATGAG
[0054] ATGATAGCGCCACACAAGGCTTTAGCCAGGAGATCGGACGAGGAGGTTTTGGAGCGG
[0055] TGTTTTTAGGTAAATTGCCGAAGGAAAATACATAGCCGTCAAATTGCTCTCACAGTTCT
[0056] CCCAACAAGGGTTCAAGAATTTGAATGAGGTTGATCTTCTTTCCAGAATCCATCATA
[0057] AGAACTTGGTATCTTTACTGGGATATTGTAACGAATCAAGAGAAATTATGCTTATCTACGA
[0058] CTATATGGCAGAAGGGTCTTTAAGGGATCATCTTTCTGGTCTTAACGCACATCATTTCAA
[0059] ACTGACTTGGAGAGCCAGACTCAAAATAACTTTAGATGCAGCTCAAGGACTGGAATACC
[0060] TGCACGTTGGTTGCACCCCCAAAATAATTTACAGGGATATCAAGACCGCCAACATCTTGT
[0061] TAGACAGCGATTTGAATGGAAAACCTAGGCGATTTCCGTCTTTCCAAGATGACAACTGAT
[0062] GGGGAGGCTACTCATGTTACCACTGCCGTAAGGAACTGCAGGATACCTGGATCCAGA
[0063] GTATTTCAACACTCAAATGTTGACGGAGAAGAGTGTGTACAGTTTTGGAGTGGTTT

[0064] TGCTGGAGATCATATGTGGTAGACAACCCATAGATCTAAAACCTACCTGCAGAAGAACTG
[0065] AACATCGTTAGATGGGTGAAGCCGTATGTAGTGGAGAATGATAATCCTAGCAGAATATCA
[0066] GAAATCATTGACAAGAGGTTAGGTGGAGATTACGACATGACATCTATCACTAGTGTGGC
[0067] AAAGTAGCGATGAGATGTGTTACGCTGAACCGTGGTCTAGGCCGAACGTGAGCGAGAT
[0068] AGTGGCCGAGCTGAAAGAGGCTATCAAACATGAGGATCATCGTGCTTCTGTTTCAATTC
[0069] AGAGGAAGCTGGTATTCAAAGTAGCGATTTGTCGTCGGGGCCAGTCTCTTTATCTGTGGA
[0070] TTCGACTGCACACGGAGGAATGGAGTGGAGTGACAACCTCCAATATTTCTCAATTGGGAA
[0071] GGTAGGTTGGCACGTTGCTGATATGGATTGAAGGGAAGTTGGCCAAGAAGTCAAACCTA
[0072] CAGGTACTAGTGTGGCATGATTTACAATATGGGTTGATGTCGTGCATTTGACATAATTGT
[0073] GTCGCACACATCTGAAAAAATTGGTGAAACTTAAACTGTAACCATCTCGTCAAATCTTG
[0074] GGGTGGTACGTGGATGTATATACACGATCATAATTATGCTGAAACTAATCTTTATTAATA
[0075] GGTATTGTGATTTTTAAATCTTCATATCAGTTTTAGAATTTCCAGGTTAAAATGTTACAA
[0076] ATTAATAATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:1)

[0077] 序列2:黑松PthLRK1基因ORF编码的氨基酸序列

[0078] MWVTDNYIDVGHARGEIGNASAYGSYLHTRVFPKPLNKSCYQLPVVDPVYLLRLWFEVGNYSQFKQ
LPSFAFSIETEGMLAMGNVTISDCDTPCYDEIFVSSGRVLYICLIRTSSEDDPFVSAIELRTLQQGMYGLAKPGT
MLMLVWRYDAGGNITIRYPQDMFDRIWDYELRVTFGNHYPVQPVNCRETISTSNTELPPSAVMQTAAVIIDPARA
FDVGSTNGHRLLLLLLYVAEIEQLNMSEHRSFYVTINDEKRSEAITSLSDYSTRELKFI SNPTDDDFDFALVNTRDAT
SDPIMNAFEAYEIIDTQPATYAQDNKALEAIKSRFGVKDWISDPCFLIQWNGIVCESSTYPIRISEIDLSGKNLTG
LVPDDIRQLTALVKVSLYNNHLIGQLPNLSSLTMLERLYLQNNLSGTLPSWLCELKNLKNLNIENNFSGVIPVQ
LLNGSLKFSYCGNYPYLPMHKGKCTLHTTNKNLKIILGITLGGILIIALALIVAIIMYRNKFRKEQGISRRSGL
GMEPRSYLYQDYSMVTPVNSTKRSFTLDEMIAATQGFSEQEIGRGGFGAVFLGKLPKGKYLAVKLLSQFSQQGVQE
FLNEVDLLSRIHKNLVSLGVCNESREIMLIYDYMAEGLRDHLSGPNAAHHSKLTWRARLKITLDAAGLEYLHV
GCTPKIIHRDIKTANILLSDLNGLGDFGLSKMTTDEATHVTTAVKGTAGYLDPEYFNTQMLTEKSDVYSFGVV
LLEIICGRQPIDLKLPAEELNIVRWKPYVVENDNPSRISEIIDKRLGGDYDMTSITSVAKVAMRCVHAEPWSRPN
VSEIVAELKEAIKHEDHRASVSISEEAGIQSSDLSSGPVLSVDSTAHHGMEWSDNSNISQLGR (SEQ ID NO:2)

[0079] 本发明涉及的黑松PthLRK1基因的全长cDNA序列是一个完整的cDNA序列,通过快速扩增cDNA末端途径(RACE)从黑松中分离得到并命名为黑松PthLRK1。全长cDNA序列为3081bp,含有2679bp的开放阅读框(ORF),编码892个氨基酸,编码蛋白的理论分子量为99.63kDa,理论等电点(pI)为5.46。

[0080] 利用SignalP-5.0程序(<https://services.healthtech.dtu.dk>)预测信号肽果表明该蛋白不具有信号肽区域。

[0081] 使用TMHMM-2.0程序(<https://services.healthtech.dtu.dk>)进行跨膜结构域预测表明,PthLRK1基因编码蛋白在484-507氨基酸处具有一个单次跨膜区(图2A),由胞外向胞内延伸(图2B),属于一种跨膜蛋白。

[0082] 在InterPro网站上对蛋白的功能结构域进行预测(图3),结果显示,在2-309氨基酸位置存在一个Malctin(Malectin-like domain)结构域,是一种内质网上的膜锚定蛋白;在317-472氨基酸位置包含一个LRR(Leucine-rich repeat domain)超家族结构域,具有抗病特征;在562-386氨基酸位置存在一个丝氨酸-苏氨酸、酪氨酸蛋白激酶(Serine-

threonine/tyrosine-protein kinase) 催化结构域, 与该结构域部分重叠的是位于543-836氨基酸位置与位于560-840氨基酸位置的蛋白激酶 (Protein kinase-like domain) 超家族。这些结构域和同源超家族组成了PthLRK1蛋白的主要功能结构, 共同行使PthLRK1基因的功能。

[0083] 应用BLAST程序, 将黑松PthLRK1基因的核苷酸序列与油松 (*P. tabuliformis*, KI711073.1)、白云杉 (*Picea glauca*, BT118800.1)、火炬松 (*Pinus taeda*, JQ019187.1)、巨云杉 (*Picea sitchensis*, BT123520.1)、姬蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*, XM_020737730.1)、美国山核桃 (*Carya illinoensis*, XM_043109997.1)、莴笋 (*Lactuca sativa*, XM_023908240.3)、油棕 (*Elaeis guineensis*, XM_029268492.1) 进行同源性分析, 结果发现黑松PthLRK1基因序列与油松 (*P. tabuliformis*, KI711073.1) 的核苷酸序列同源性最高, 为89.14%。系统进化树分析结果显示 (图4), 该基因与油松在同一个分支上, 亲缘关系较近, 系统进化树结果与核苷酸序列同源性分析结果保持了较高的一致性。

[0084] PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 预测蛋白二级结构表明, 该蛋白有60.56%的无规则卷曲, 25.08%的 α -螺旋和14.36%的 β -折叠。

[0085] 通过Phyre2程序对PthLRK1基因编码蛋白进行三维结构预测, 结果表明, 该蛋白具有清晰的 α -螺旋, β -折叠以及无规则卷曲 (图5)。

[0086] 富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶 (Leucine-rich-repeat receptor like kinases, LRR-RLKs, LRK) 是植物中检测到的最大的一类跨膜类受体激酶, 包含胞外结构域、单次跨膜域和胞内激酶域, 可通过胞外结构域结合病原菌、激素信号与胁迫相关的外界信号分子, 激活胞内激酶域的磷酸化/去磷酸化的活性, 完成信号的跨膜运输, 进而调控植株的生长发育、参与激素信号途径和对外界胁迫的应答过程。

[0087] 本发明与现有技术相比, 本发明通过研究黑松受松材线虫侵染后表达水平发生显著改变的基因, 发现PthLRK1基因参与了黑松抗病反应, 说明该基因具有抗病性, 并成功对该基因进行了克隆; 有助于了解黑松抗松材线虫胁迫的响应机制及其分子水平的调控, 能够用于黑松的基因工程育种、松材线虫病防治以及检测判断黑松植株是否感染松材线虫病。

[0088] 说明书附图:

[0089] 图1为黑松PthLRK1基因cDNA片段克隆电泳图, 其中A-C为黑松PthLRK1基因cDNA部分序列克隆电泳图, A的引物为Y1'-F/R, B的引物为Y2'F/R, C的引物为Y3F/R; D为3'-RACE扩增产物电泳图; E为5'-RACE扩增产物电泳图; M: 3000bp DNA Marker。

[0090] 图2为黑松PthLRK1基因编码蛋白的跨膜结构域预测图, 其中A为单次跨膜区; B为由胞外向胞内延伸。

[0091] 图3为黑松PthLRK1基因编码蛋白功能结构域预测图。

[0092] 图4为黑松PthLRK1基因核苷酸序列系统发育树。

[0093] 图5为黑松PthLRK1基因编码蛋白的三维结构图。

[0094] 图6为松材线虫侵染后不同时间黑松PthLRK1基因的表达情况示意图。

具体实施方式:

[0095] 下面结合具体实施例和附图对本发明作进一步阐述。

[0096] 实施例1、

[0097] 从黑松中克隆黑松PthLRK1基因。图1A-C是黑松PthLRK1基因cDNA部分序列克隆电泳图；图1D是3'-RACE扩增产物电泳图(M:3000bp DNA Marker)；图1E是5'-RACE扩增产物电泳图(M:3000bp DNA Marker)。

[0098] 操作步骤如下：

[0099] 一、黑松PthLRK1基因cDNA部分序列克隆

[0100] 参照Trizol提取试剂盒(B511321,生工生物工程(上海)股份有限公司)的说明书提取黑松总RNA,取0.5-2 μ g总RNA为模板,利用第一链cDNA合成试剂盒(B532435,生工生物工程(上海)股份有限公司)合成cDNA第一链,冻存于-20 $^{\circ}$ C备用。

[0101] 根据已知的黑松近缘物种海岸松的LRK序列资料及黑松转录组测序数据,设计三对引物分别进行PCR扩增,三对引物如下：

[0102] Y1'-F:5'-GAACCGAACTGCAGAAAACAATAT-3'；

[0103] Y1'-R:5'-AACTTGGTTTTGATAGCCTCCAG-3'。

[0104] Y2'F:5'-AGATCCTTTTCCGTGAGAATAAATG-3'；

[0105] Y2'R:5'-TTAGTTTGAATGATGTGCATTAGG-3'。

[0106] Y3F:5'-CCGTCAAATTGCTCTCACAGTTC-3'；

[0107] Y3R:5'-CCCAAGATTTGACGAGATGGTTAC-3'。

[0108] 以cDNA第一链为模板,进行PCR扩增,反应体系如下:引物F(10 μ M)0.5 μ L,引物R(10 μ M)0.5 μ L,dNTP(10mM)0.2 μ L,cDNA第一链模板1 μ L,Taq酶(5U/ μ L)0.2 μ L,ddH₂O10.1 μ L。PCR程序:95 $^{\circ}$ C预变性3min,94 $^{\circ}$ C30s,58 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C90s,循环33次,72 $^{\circ}$ C延伸10min;得到的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后(如图1A、B、C),利用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(B518131,生工生物工程(上海)股份有限公司)分别回收目的DNA,并分别连接到T-Vector上,构建T-PthLRK,将连接PCR产物的载体分别转化大肠杆菌DH5 α ,挑选阳性克隆并测序,分别以上述三对引物进行PCR扩增分别获得长度为1017bp、1222bp、1099bp的片段1-3,拼接后得到黑松PthLRK1基因cDNA序列大片段。

[0109] 克隆的部分cDNA序列：

[0110] 片段1：

[0111] GAACCGAACTGCAGAAAACAATATAATGTGGGTCCTGATGATAATTATATAGACGTGGGTCACAGAGGAGAGATCGGAAACGCTAGTGCTTACGGTCTTACTTGCACACCTTGCAGTTTTCCCAAAGCCTCTCAACAAGTCTTGCTATCAGTTGCCTGTGGTCCCTGATGTGCCTTATCTCTTAAGGTTATGGTTTGAAGTTGGAAATTACAGTGGA TTCAAACAACCTCCAAGCTTTGCTTTCTCTATTGAGACAGAGGGTATGTTAGCTATGGGAAACGTGACGATCTCAG ACTGTGACACACCATGTTATGATGAAATAATATTTGTTAGTTCTGGCAGAGTCCTGTACATTTGCTTGATCAGAAC CTCGGAGTCTGATGATCCCTTCGTCTCTGCTATCGAGTTGAGAACGCTTCAAACAAGGCATGTATGGACTGGCTAAG CCAGGAACAATGTTGATGCTAGTATGGAGATATGATGCTGGTGGAAATATTACCATTAGGTATCCTCAAGACATGT TCGACCGGATCTGGGATTACGAATTGAGAGTAACTTTTGGCAATCATTATCCTGTACAGCCTGTGAATTGTCGAGA GACCATTTCAACCAGCAATACCACAGAACTTCCTCCAAGTGCTGTGATGCAAACAGCGGCGTTATTATTGACCCG GCACGTGCGTTGATGTGCGATCGACTAATGGTCATAGATTATTATTGCTGTTATATGTTGCAGAGATCGAGCAGC TAAATATGTCTGAACATAGATCCTTTTATGTGACAATAAATGATGAGAAACGGTCTGAGGCCATTACTTCTCTGAG CGATTATTCTACCCGGGAGCTAAAATTTATATCCAATCCAACAGATGATTTTCGATTTGCCTTGGTCAACACTAGG

GATGCAACCAGTGATCCCATAATGAACGCCTTTGAGGCTTACGAAATAATTGACACCCAACCGGCAACATATGCGC
AAGATAACAAAGCTCTTGAGGCTATCAAAAGCAGGTT (SEQ ID NO:3)

[0112] 片段2:

[0113] AGATCCTTTTATGTGACAATAAATGATGAGAAACGGTCTGAGGCCATTACTTCTCTGAGCGATTATTC
TACCCGGGAGCTAAAATTTATATCCAATCCAACAGATGATTTTCGATTTTGCCTTGGTCAACACTAGGGATGCAACC
AGTGATCCCATAATGAACGCCTTTGAGGCTTACGAAATAATTGACACCCAACCGGCAACATATGCGCAAGATAACA
AAGCTCTTGAGGCTATCAAAAGCAGGTTTGGCGTAAAGGATTGGATTTCTGATCCTTGTTTTTTGATCCAGTGAA
TGGAATTGTGTGTGAAAAGCAGCACTTACCCATAAGAATTTTCGAAAATTGATTTGTCAGGAAAGAATCTTACAGGA
TTGGTGCCCGACGATATTAGACAGTTGACGGCATTAGTTAAAGTGTGCGCTTTACAATAATCATTGATAGGGCAAT
TGCCAAATTTGTCCAGTTTAAACCATGTTGGAGAGATTGTATCTACAAAACAACAACCTGAGCGGTACTCTTCCGTC
CTGGCTATGTGAACTGAAAAACCTAAAAGAATTGAATATAGAGAATAATAATTTTCAGCGGTGTAATACCTGTCCAA
CTTCTCAATGGATCATTGAAATTTAGTTACTGTGAAAACCCCTACTTACCTATGCATAAGGGGAAATGCACCCTGC
ATACTACAAATAAGAATAAATTTGAAGATTATACTCGGAATAACACTAGGCGGAATATTAATCATCGCTTTAGCGCT
GATAGTAGCTATTATTATGTATCGCAATAAATTCGGGCGAAAAGAACAGGGTATTGACAGCAGAAGAAGTGGACTG
GGAATGGAACCTAGATCTTACTTGTACCAAGACTACTCAATGGTTACCGTGCCAAATTCACAAAATCCCGTTCT
TCACTCTAGATGAGATGATAGCGGCCACACAAGGCTTTAGCCAGGAGATCGGACGAGGAGGTTTTGGAGCGGTGTT
TTTAGGTAAATTGCCCGAAGGAAAATACATAGCCGTCAAATTTGCTCTCACAGTTCTCCAACAAGGGGTTCAAGAA
TTCTTGAATGAGGTTGATCTTCTTCCAGAATCCATCATAAGAACTTGGTATCTTACTGGGATATTGTAACGAAT
CAAGAGAAATTATGCTTATCTACACTATATGGCAGAAGGGTCTTTAAGGGATCATCTTCTGGTCTAACGCACA
TCATTCCAAACTGA (SEQ ID NO:4)

[0114] 片段3:

[0115] CCGTCAAATTTGCTCTCACAGTTCTCCAACAAGGGGTTCAAGAATTTCTTGAATGAGGTTGATCTTCTT
TCCAGAATCCATCATAAGAACTTGGTATCTTTACTGGGATATTGTAACGAATCAAGAGAAATTATGCTTATCTACG
ACTATATGGCAGAAGGGTCTTTAAGGGATCATCTTTCTGGTCTTAACGCACATCATTCCAAACTGACTTGGAGAGC
CAGACTCAAAAATAACTTTAGATGCAGCTCAAGGACTGGAATACCTGCACGTTGGTTGCACCCCCAAAATAATTCAC
AGGGATATCAAGACCGCCAACATCTTGTTAGACAGCGATTTGAATGGAAAACCTAGGCGATTTCCGGTCTTTCCAAGA
TGACAACTGATGGGGAGGCTACTCATGTTACCACTGCCGTAAGGAACTGCAGGATACCTGGATCCAGAGTATTT
CAACACTCAAATGTTGACGGAGAAGAGTGATGTGTACAGTTTTGGAGTGGTTTTGCTGGAGATCATATGTGGTAGA
CAACCCATAGATCTAAAACCTACCTGCAGAAGAACTGAACATCGTTAGATGGGTGAAGCCGTATGTAGTGGAGAATG
ATAATCCTAGCAGAATATCAGAAATCATTGACAAGAGGTTAGGTGGAGATTACGACATGACATCTATCACTAGTGT
TGCCAAAGTAGCGATGAGATGTGTTACGCTGAACCGTGGTCTAGGCCGAACGTGAGCGAGATAGTGGCCGAGCTG
AAAGAGGCTATCAAACATGAGGATCATCGTGCTTCTGTTTTCAATTTTCAGAGGAAGCTGGTATTCAAAGTAGCGATT
TGTCGTGGGGCCAGTCTCTTTATCTGTGGATTCGACTGCACACGGAGGAATGGAGTGGAGTGACAACCTCCAATAT
TTCTCAATTTGGGAAGGTAGGTTGGCACGTTGCTGATATGGATTGAAGGGAAGTTGGCCAAGAAGTCAAACCTACAG
GTACTAGTGATGGCATGATTTACAATATGGGTTGATGTCGTGCATTTGACATAATTGTGTGCGCACACATCTGAAAA
AATTGGTGAACCTTAAACTGTAACCATCTCGTCAAATCTTGGG (SEQ ID NO:5)

[0116] 二、黑松PthLRK1基因3'端cDNA序列克隆

[0117] 3'端cDNA序列克隆采用3'-RACE方法,参照3'-RACE试剂盒(B605101,生工生物工程(上海)股份有限公司)说明书进行,以适量总RNA为模板,以3' adaptor GCTGTCAACGATAC

GCTACGTAACGGCATGACAGTGT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT为引物,在Reverse Transcriptase Mix (RNase H-) 逆转录酶的作用下,50℃温育30min,85℃加热1min合成cDNA第一链,-20℃保存。

[0118] 根据黑松PthLRK1基因大片段cDNA序列设计引物(引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成),进行两轮PCR。引物序列如下:

[0119] NF9:5'-TCTCTTTATCTGTGGATTCGACTGC-3';

[0120] NF10:5'-GAGGAATGGAGTGGAGTGACAAC-3'。

[0121] 5.3'outer:5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC-3';

[0122] 5.3'inner:5'-GCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'。

[0123] 将以3'adaptor为反转录引物得到的cDNA第一链为模板,以两个引物进行两轮PCR扩增,反应体系如下:

反应组分	第一轮 (μL)	第二轮 (μL)
引物 F (10 μM)	0.5 (NF9)	0.5 (NF10)
引物 R (10 μM)	0.5 (5.3'outer)	0.5 (5.3'inner)
[0124] 模板	0.5 (cDNA)	0.5(第一轮 PCR 稀释产物)
Taq 酶混合液	13.5	13.5
无 RNA 酶的水	补足 20	补足 20
总体积	20	20

[0125] 第一轮为降温PCR:94℃预变性60s,94℃30s,70^{*1}℃(*1表示每个循环降1℃)30s,72℃60s,循环10次;第二轮:94℃30s,60℃30s,72℃60s,循环25次,72℃延伸480s;得到的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后(如图1D),利用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(B518131,生工生物工程(上海)股份有限公司)回收目的DNA,并将其连接到T-Vector上,构建T-PthLRK,将连接PCR产物的载体转化大肠杆菌DH5α,挑选阳性克隆并测序,该序列大小为375bp。

[0126] 3'RACE得到的序列:

[0127] GAGGAATGGAGTGGAGTGACAACCTCCAATATTTCTCAATTGGGAAGGTAGGTTGGCACGTTGCTGATA TGGATTGAAGGGAAGTTGGCCAAGAAGTCAAACCTACAGGTACTAGTGATGGCATGATTTACAATATGGGTTGATG TCGTGCATTTGACATAATTGTGTCGCACACATCTGAAAAAATTGGTGAAACTTAACTGTAACCATCTCGTCAAAT CTTGGGGTGGTACGTGGATGTATATACACGATCATAATTATGCTGAAACTAATCTTTATTAATAGGTATTGTGT ATTTTAAATCTTCATATCAGTTTTAGAATTTCCAGGTTAAAATGTTTACAAATTAATAATTTCAAAAAAAAAAAA AAA (SEQ ID NO:6)

[0128] 三、黑松PthLRK1基因5'端cDNA序列克隆

[0129] 5'端cDNA序列克隆采用5'-RACE方法,按照5'-RACE试剂盒(B605102,上海生工公司产品)说明书进行,以适量总RNA为模板,使用5'-RACE反转录特异性引物(NRT1),在Reverse Transcriptase Mix (RNase H-) 逆转录酶的作用下,50℃温育30min,85℃加热1min,合成cDNA第一链,将cDNA第一链进行RNase H消化、cDNA纯化回收、TdT加C尾处理,-20

℃保存。

[0130] 根据黑松PthLRK1基因大片段cDNA序列设计克隆5'端cDNA序列所需的引物(引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成),进行两轮PCR。引物序列如下:

[0131] 5' adaptor: GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGGGIIGGGIIGGGIIGNRT1: 5'-GTCTCTTGACAATTCACAGGCTG-3'。

[0132] NR1: 5'-CAGCAATCTGCCAGAGCTAACC-3';

[0133] NR2: 5'-TTTATCTGAGACCGCTACGTTTCC-3'。

[0134] 5.3' outer: 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC-3'。

[0135] 以上述TdT加C尾处理过的cDNA第一链为模板,以两对引物进行两轮PCR扩增,反应体系如下:

反应组分	第一轮(μL)	第二轮(μL)
引物 F (10 μM)	0.5 (NR1)	0.5 (NR2)
引物 R (10 μM)	0.5 (5' adaptor)	0.5 (5.3' outer)
[0136] 模板	0.5 (cDNA)	0.5(第一轮 PCR 稀释产物)
Taq 酶混合液	13.5	13.5
无 RNA 酶的水	补足 20	补足 20
总体积	20	20

[0137] PCR程序:第一轮:94℃预变性60s,94℃30s,70^{*1}℃30s(*1表示每个循环降1℃),72℃60s,循环10次;第二轮:94℃30s,60℃30s,72℃60s,循环25次,72℃延伸480s;得到的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后(图1E),利用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(B518131,生工生物工程(上海)股份有限公司)回收目的DNA,并将其连接到T-Vector上,构建T-PthLRK,将连接PCR产物的载体转化大肠杆菌DH5α,挑选阳性克隆并测序,该序列大小为404bp。

[0138] 5'RACE得到的序列:

[0139] GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGGGGGGGGGGGGGGTAATTTCTGGTCTTGTGGAAGGATTTTTGAGTATCGACTGCGGAGGGAAAACGAACCGAACTGCAGAAAAACAATATAATGTGGGTCCTGATGATAATTATATAGACGTGGGTCACAGAGGAGAGATCGGAAACGCTAGTGCTTACGGTCTTACTTGCACACCTTGCGAGTTTTCCAAAGCCTCTCAACAAGTCTTGCTATCAGTTGCTGTGGTCCCTGATGTGCCTTATCTCTTAAGGTTATGTTTTGAAGTTGAAAATTACAGTGGATTCAAACAATTCCAAGCTTTGCTTTCTCTATTGAGACAGAGGGTATGTAGCTATGGGAAACGTGACGATCTCAGACTGT (SEQ ID NO:7)

[0140] 四、黑松PthLRK1基因全长cDNA序列测序

[0141] 对上述得到的5个序列(1017bp、1222bp、1099bp、375bp和404bp)进行拼接,推断黑松PthLRK1基因全长cDNA序列,共3081bp。利用ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)对拼接的全长cDNA序列进行开放阅读框的查找,黑松PthLRK1基因ORF区域共2679bp,位于第78-2756bp处,编码892个氨基酸。

[0142] 序列1:黑松PthLRK1基因的全长cDNA

[0143] TAATTTCTGGTCTTGTGGAAGGATTTTTGAGTATCGACTGCGGAGGGAAAACGAACCGAACTGCAGAA

AACAATATAATGTGGGTCACACTGATGATAATTATATAGACGTGGGTCACAGAGGAGAGATCGGAAACGCTAGTGCTT
ACGGTTCTTACTTGCACACCTTGCAGTTTTCCCAAAGCCTCTCAACAAGTCTTGCTATCAGTTGCCTGTGGTCCC
TGATGTGCCTTATCTCTTAAGGTTATGGTTTGAAGTTGGAAATTACAGTGGATTCAAACAACCTCCAAGCTTTGCT
TTCTCTATTGAGACAGAGGGTATGTTAGCTATGGGAAACGTGACGATCTCAGACTGTGACACACCATGTTATGATG
AAATAATATTTGTTAGTTCTGGCAGAGTCTGTACATTTGCTTGATCAGAACCTCGGAGTCTGATGATCCCTTCGT
CTCTGCTATCGAGTTGAGAACGCTTCAACAAGGCATGTATGGACTGGCTAAGCCAGGAACAATGTTGATGCTAGTA
TGGAGATATGATGCTGGTGGAAATATTACCATTAGGTATCCTCAAGACATGTTTCGACCGGATCTGGGATTACGAAT
TGAGAGTAACTTTTGGCAATCATTATCCTGTACAGCCTGTGAATTGTCGAGAGACCATTTCACCAGCAATACCAC
AGAACTTCTCCAAGTGTGTGATGCAAACAGCGCGGTTATTATTGACCCGGCACGTGCGTTCGATGTCGGATCG
ACTAATGGTCATAGATTATTATTGCTGTTATATGTTGCAGAGATCGAGCAGCTAAAATATGTCTGAACATAGATCCT
TTTATGTGACAATAAATGATGAGAAACGGTCTGAGGCCATTACTTCTCTGAGCGATTATTCTACCCGGGAGCTAAA
ATTTATATCCAATCCAACAGATGATTTTCGATTTTGCCTTGGTCAACACTAGGGATGCAACCAGTGATCCATAATG
AACGCCTTTGAGGCTTACGAAATAATTGACACCCAACCGGCAACATATGCGCAAGATAACAAAGCTCTTGAGGCTA
TCAAAAGCAGGTTTGGCGTAAAGGATTGGATTTCTGATCCTTGTTTTTTGATCCAGTGAATGGAATTGTGTGTGA
AAGCAGCACTTACCCATAAGAATTTTCGAAATTGATTTGTCAGGAAAGAATCTTACAGGATTGGTGCCCGACGAT
ATTAGACAGTTGACGGCATTAGTTAAAGTGTGCTTTACAATAATCATTGATAGGGCAATTGCCAAATTTGTCCA
GTTTAACCATGTTGGAGAGATTGTATCTACAAAACAACAACCTGAGCGGTACTCTCCGTCCTGGCTATGTGAACT
GAAAAACCTAAAAGAATTGAATATAGAGAATAATAATTTTCAGCGGTGTAATACCTGTCCAACCTCTCAATGGATCA
TTGAAATTTAGTTACTGTGAAAACCCCTACTTACCTATGCATAAGGGGAAATGCACCCTGCATACTACAAATAAGA
ATAAATTGAAGATTATACTCGGAATAACACTAGGCGGAATATTAATCATCGCTTTAGCGCTGATAGTAGCTATTAT
TATGTATCGCAATAAATTCGGGCGAAAAGAACAGGGTATTGACAGCAGAAGAAGTGGACTGGGAATGGAACCTAGA
TCTTACTTGTACCAAGACTACTCAATGGTTACCGTGCCAAATTCACAAAATCCCGTTCCTTACTCTAGATGAGA
TGATAGCGGCCACACAAGGCTTTAGCCAGGAGATCGGACGAGGAGGTTTTGGAGCGGTGTTTTTAGGTAAATTGCC
CGAAGGAAAATACATAGCCGTCAAATTGCTCTCACAGTTCTCCCAACAAGGGTTCAAGAATCTTGAATGAGGTT
GATCTTCTTTCCAGAATCCATCATAAGAACTTGGTATCTTTACTGGGATATTGTAACGAATCAAGAGAAATTATGC
TTATCTACGACTATATGGCAGAAGGGTCTTTAAGGGATCATCTTTCTGGTCCTAACGCACATCATTCCAAACTGAC
TTGGAGAGCCAGACTCAAATAAATTTAGATGCAGCTCAAGGACTGGAATACCTGCACGTTGGTTGCACCCCAAAA
ATAATTCACAGGGATATCAAGACCGCCAACATCTTGTTAGACAGCGATTTGAATGGAAAACCTAGGCGATTTTCGGTC
TTTCCAAGATGACAACCTGATGGGGAGGCTACTCATGTTACCACTGCCGTAAGGAACTGCAGGATACCTGGATCC
AGAGTATTTCAACACTCAAATGTTGACGGAGAAGAGTGATGTGTACAGTTTTGGAGTGGTTTTGCTGGAGATCATA
TGTGGTAGACAACCCATAGATCTAAAACCTACCTGCAGAAGAACTGAACATCGTTAGATGGGTGAAGCCGTATGTAG
TGGAGAATGATAATCCTAGCAGAATATCAGAAATCATTGACAAGAGGTTAGGTGGAGATTACGACATGACATCTAT
CACTAGTGTGCAAAAGTAGCGATGAGATGTGTTACGCTGAACCGTGGTCTAGGCCGAACGTGAGCGAGATAGTG
GCCGAGCTGAAAGAGGCTATCAAACATGAGGATCATCGTGCTTCTGTTTCAATTTTCAGAGGAAGCTGGTATTCAAA
GTAGCGATTTGTCGTCGGGGCCAGTCTCTTTATCTGTGGATTCGACTGCACACGGAGGAATGGAGTGGAGTGACAA
CTCCAATATTTCTCAATTGGGAAGGTAGGTTGGCACGTTGCTGATATGGATTGAAGGGAAGTTGGCCAAGAAGTCA
AACCTACAGGTACTAGTGATGGCATGATTTACAATATGGGTTGATGTGTCGTCATTTGACATAATTGTGTCGCACAC
ATCTGAAAAAATTGGTGAACCTAAACTGTAACCATCTCGTCAAATCTTGGGGTGGTACGTGGATGTATATACAGC
ATCATAACATTATGCTGAAACTAATCTTTATTAATAGGTATTGTGTATTTAAATCTTCATATCAGTTTTAGAATT

TTCCAGGTTAAATGTTTACAAATTAATAATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:1)

[0144] 序列2:黑松PthLRK1基因ORF编码的氨基酸

[0145] MWVTDDNYIDVGHGEIGNASAYGSYLHTLRVFPKPLNKSCYQLPVVDPVYLLRLWFEVGNYSQFKQ
LPSFAFSIETEGMLAMGNVTISDCDTPCYDEIIFVSSGRVLYICLIRTSESDDPFVSAIELRTLQQGMYGLAKPGT
MLMLVWRYDAGGNITIRYPQDMFDRIWDYELRVTFGNHYVPVQPVNCRETISTSNTELPPSAVMQTAAVIIDPARA
FDVGSTNGHRLLLLLLYVAEIEQLNMSEHRSFYVTINDEKRSEAITSLSDYSTRELKFI SNPTDDDFDFALVNRDAT
SDPIMNAFEAYEIIDTQPATYAQDNKALEAIKSRFGVKDWISDPCFLIQWNGIVCESSTYPIRRISEIDLSGKNLTG
LVPDDIRQLTALVKVSLYNNHLIGQLPNLSSLTMLERLYLQNNLSGTLPSWLCELKNLKNLNIENNNFSGVIPVQ
LLNGSLKFSYCGNPYLPMHK GKCTLHTTNKNKLLKILGITLGGILIIALALIVAIIMYRNKFGKRKEQGIDSRRSGL
GMEPRSYLYQDYSMTVPNSTKSRSFTLDEMIAATQGFSSQEI GRGGFGAVFLGKLPEGKYIAVKLLSQFSQQGVQE
FLNEVDLLSRIHHKNLVSLLYGCNESREIMLIYDYMAEGSLRDHLSGPNAAHHSKLTWRARLKITLDAAGLEYLHV
GCTPKIIHRDIKTANILLSDNLGKLGDFGLSKMTTDEATHVTTAVKGTAGYLDPEYFNTQMLTEKSDVYSFGVV
LLEIICGRQPIDLKLPAAEELNIVRWVKPYVVENDNPSRISEIIDKRLGGDYDMTSITSVAKVAMRCVHAEPWSRPN
VSEIVAELKEAIKHEDHRASVSISEEAGIQSSDLSSGPVSLSDSTAHHGMEWSDNSNISQLGR (SEQ ID NO:2)

[0146] 实施例2、黑松PthLRK1基因序列生物信息学分析与蛋白质结构预测

[0147] 对5个序列的测序结果进行拼接,推断黑松PthLRK1基因全长cDNA序列。采用生物信息学软件测序结果拼接后得到黑松PthLRK1基因完整序列,共3081bp。利用ORF finder在线软件预测黑松PthLRK1基因ORF区域共2679bp,位于第78-2756bp处,编码892个氨基酸。

[0148] 利用ProtParam程序 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测理化性质结果显示,PthLRK1基因编码蛋白的理论分子质量约为99.63KDa,理论等电点(pI)为5.46。利用SignalP-5.0程序 (<https://services.healthtech.dtu.dk>) 预测信号肽结果表明该蛋白不具有信号肽区域。

[0149] 使用TMHMM-2.0程序 (<https://services.healthtech.dtu.dk>) 分析PthLRK1基因编码蛋白的跨膜结构域表明,PthLRK1基因编码蛋白在484-507氨基酸处具有一个单次跨膜区(图2A),由胞外向胞内延伸(图2B),属于一种跨膜蛋白。

[0150] 在InterPro网站上使用程序 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/iprscan5-R20220307-030447-0221-57005514-p2m/>) 对蛋白的功能结构域进行预测(图3),结果显示,在2-309氨基酸位置存在一个Malctin(Malectin-like domain)结构域,是一种内质网上的膜锚定蛋白;在317-472氨基酸位置包含一个LRR(Leucine-rich repeat domain)超家族结构域,具有抗病特征;在562-386氨基酸位置存在一个丝氨酸-苏氨酸、酪氨酸蛋白激酶(Serine-threonine/tyrosine-protein kinase)催化结构域,与该结构域部分重叠的是位于543-836氨基酸位置与位于560-840氨基酸位置的蛋白激酶(Protein kinase-like domain)超家族。这些结构域和同源超家族组成了PthLRK1蛋白的主要功能结构,共同行使PthLRK1基因的功能。

[0151] 应用BLAST程序,将黑松PthLRK1基因的核苷酸序列与油松(*P. tabuliformis*, KI711073.1)、白云杉(*Picea glauca*, BT118800.1)、火炬松(*Pinus taeda*, JQ019187.1)、巨云杉(*Picea sitchensis*, BT123520.1)、姬蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*, XM_020737730.1)、美国山核桃(*Carya illinoensis*, XM_043109997.1)、莴笋(*Lactuca sativa*, XM_023908240.3)、油棕(*Elaeis guineensis*, XM_029268492.1)进行同源性分析,

结果发现该基因序列与油松 (*P. tabulaeformis*, KI711073.1) 的核苷酸序列同源性最高, 为 89.14%。系统发育树分析结果显示 (图4), 该基因与油松在同一个分支上, 亲缘关系较近, 系统进化树结果与核苷酸序列同源性分析结果保持了较高的一致性。

[0152] PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 预测蛋白二级结构表明, 该蛋白有 60.56% 的无规则卷曲, 25.08% 的 α -螺旋和 14.36% 的 β -折叠。

[0153] 通过 Phyre2 程序 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi>) 对黑松 PthLRK1 基因编码蛋白进行三维结构建模, 结果表明, 该蛋白具有清晰的 α -螺旋、 β -折叠以及无规则卷曲 (图5)。

[0154] 实施例3、松材线虫侵染黑松幼苗实验

[0155] 将实验室分离保存的松材线虫转接到灰葡萄孢菌丝上, 于 25℃ 暗培养约 7d, 待松材线虫爬满三角瓶壁后, 用无菌水冲洗瓶壁, 收集配制成松材线虫悬浊液。随机吸取 1 μ L 松材线虫悬浊液于显微镜下观察计数, 重复 50 次, 计算每微升的松材线虫数量, 最终制备成每微升含有 25 条松材线虫的悬浊液, 用于松苗侵染实验。

[0156] 黑松植株采用两年生黑松幼苗, 平均株高 50cm 左右。在距离黑松基部 10cm 的主茎的一侧用无菌刀片斜切 1 个长度约 1cm 的伤口, 伤口深至木质部, 继而在伤口内固定一个经灭菌处理的脱脂棉球, 用封口膜将棉球固定形成斜漏斗状, 并往棉球中注入 100 μ L 松材线虫悬浊液, 使得每株黑松接种松材线虫的数量为 2500 条, 最后用石蜡膜封住伤口, 设为处理组 (BL)。其间保湿 24h 以保证松材线虫侵染成功, 同时按上述方法注入等量无菌水, 设为对照组 (CK), 处理组与对照组各 15 株均放置于 30℃ 温室中培养。

[0157] 侵染处理后第 1 天、第 3 天、第 5 天和第 7 天, 分别从 CK 和 BL 组中随机抽取 1 株黑松, 将其切成多段, 进行松材线虫分离实验, 判断松材线虫侵染成功及是否转移。接种后第 5 天成功在 BL 黑松侵染部位以上 10cm 处的茎和侧枝中分离出松材线虫, 表明松材线虫侵染成功, 并发生转移。

[0158] 实施例4、黑松 PthLRK1 基因在染病黑松中的表达及功能验证

[0159] 松材线虫侵染黑松幼苗后 5 天, 10 天, 15 天, 20 天, 分别取松针为样品, 采用 omega 公司 E.Z.N.A.® Plant RNA kit 试剂盒, 提取总 RNA, 具体操作如下:

[0160] 1) 松针经液氮研磨后, 收集 100mg 植物样品至离心管, 加入 500 μ L RCL Buffer (提前加入 β -巯基乙醇), 马上涡旋混匀;

[0161] 2) 55℃ 水浴 1-3min, 最大转速 ($>14000 \times g$) 室温离心 5min;

[0162] 3) 将 gDNA Filter 过滤柱套入 2mL 收集管中, 转移上清液至 gDNA Filter 过滤柱, 室温 $14000 \times g$ 离心 2min;

[0163] 4) 滤液中加入等体积的 RCB Buffer, 上下吸打混匀 5-10 次;

[0164] 5) 将 HiBind® RNA Mini 结合柱套入 2mL 收集管中, 转移一半混合液至 HiBind® RNA Mini 结合柱中, $10000 \times g$ 室温离心 1min, 弃滤液;

[0165] 6) 将 HiBind® RNA Mini 结合柱套入同一 2mL 收集管中, 转移余下混合液至 HiBind® RNA Mini 结合柱中, $10000 \times g$ 室温离心 1min, 弃滤液;

[0166] 7) 将 HiBind® RNA Mini 结合柱套入同一 2mL 收集管中, 往 HiBind® RNA Mini 结合柱加入 400 μ L RWF Buffer, $10000 \times g$ 室温离心 1min, 弃滤液;

[0167] 8) 将HiBind®RNA Mini结合柱套入同一2mL收集管中,往HiBind®RNA Mini结合柱加入500 μ L RNA Wash Buffer II (提前用无水乙醇稀释) 10000 \times g室温离心1min,弃滤液;

[0168] 9) 重复步骤8;

[0169] 10) 将HiBind®RNA Mini结合柱套入同一2mL收集管中,室温10000 \times g离心2min,甩干HiBind®RNA Mini结合柱基质;

[0170] 11) 将HiBind®RNA Mini结合柱套入一个新的1.5mL离心管中,取80 μ L DEPC水,准确添加在HiBind®RNA Mini结合柱膜中央,常温放置2min,10000 \times g室温离心1min,洗脱RNA,-80 $^{\circ}$ C保存以备后续试验。

[0171] 提取的RNA需要经1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品的完整性;再经微量分光光度计检测RNA浓度。经检测RNA质量合格后,参照Vazyme公司HiScript III RT SuperMix for qPCR反转录试剂盒说明书,反转录获得cDNA模板,具体反转录步骤如下:

[0172] 1) 基因组DNA去除:在RNase-free离心管中配置如下混合液:4 \times gDNA Wiper Mix 4 μ L;Total RNA 100ng;RNase Free dH₂O Up to 16 μ L。用移液器轻轻吹打混匀,42 $^{\circ}$ C,2min;

[0173] 2) 逆转录体系:在RNase-free离心管中配置如下混合液,用移液器轻轻吹打混匀:5 \times HiScript III RT SuperMix 4 μ L;上一步的混合液16 μ L;

[0174] 3) 逆转录反应程序:37 $^{\circ}$ C,15min;85 $^{\circ}$ C,5s。

[0175] 为了验证PthLRK1基因在黑松抵抗松材线虫病过程中发挥的作用,设计两条基因特异性引物(41830-Fwd:GACCGATCTGGGATTACG;41830-Rev:CATCACAGCACTTGGAGGAA)进行qRT-PCR分析,以U2af为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对其进行相对定量分析,对黑松感病后不同时间(5天,10天,15天,20天)PthLRK1基因的表达量进行分析,结果如图6所示。在本次研究中,处理组和对照组均包括3个生物学重复和3个技术重复。反应体系总20 μ L:Primer F 0.4 μ L,Primer R 0.4 μ L,SYBR real-time PCR premixture 10 μ L,cDNA 1 μ L,ddH₂O 8.2 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C5min,95 $^{\circ}$ C15s,60 $^{\circ}$ C30s,循环数40。

[0176] 由图6可知,处理组黑松幼苗体内PthLRK1基因的表达量相较于对照组来说,总体呈现先升高后下降的趋势,在第10天达到峰值,后期便低于对照组的表达量。表明黑松PthLRK1基因在黑松感病前期参与黑松抗病反应过程,在第5天到第10天,随着时间推移,松材线虫继续繁殖,抗性基因通过提高表达防御松材线虫侵染。而在黑松感病后期,可能由于侵染严重,黑松抗病过程中产生的次级代谢物质积累导致毒害,从而造成松树萎蔫,使PthLRK1基因表达量下降。

[0177] 因此,通过研究黑松抗松材线虫病过程中涉及的关键酶的基因,并对其进行克隆及功能分析,为研究黑松抗松材线虫胁迫的响应机制及其分子水平的调控奠定了基础,对于黑松的基因工程育种、松材线虫病防治以及检测判断黑松植株是否感染松材线虫病具有重要的意义。

[0178] 本实施例得知黑松PthLRK1基因表达量与黑松染松材线虫病相关,能够用于在松材线虫侵染前期,通过检测黑松中PthLRK1基因的表达量来判断该黑松是否被松材线虫侵染,以便及时做出防御措施。

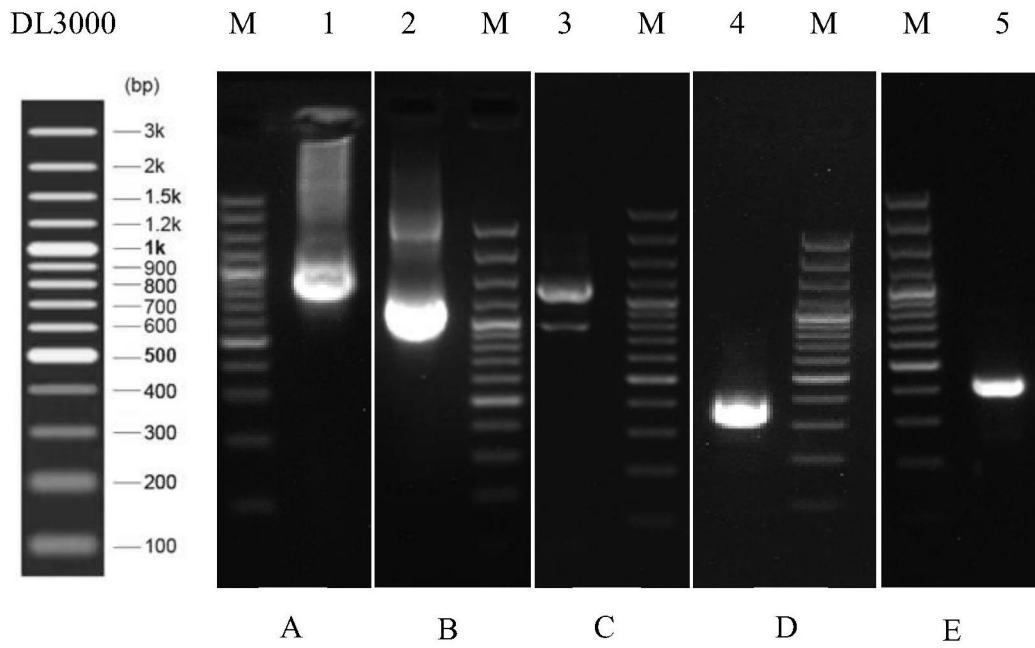


图1

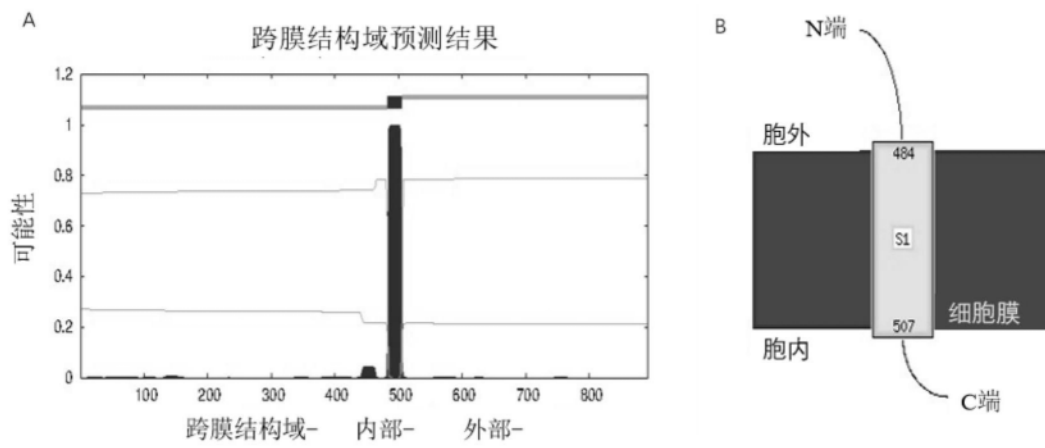


图2

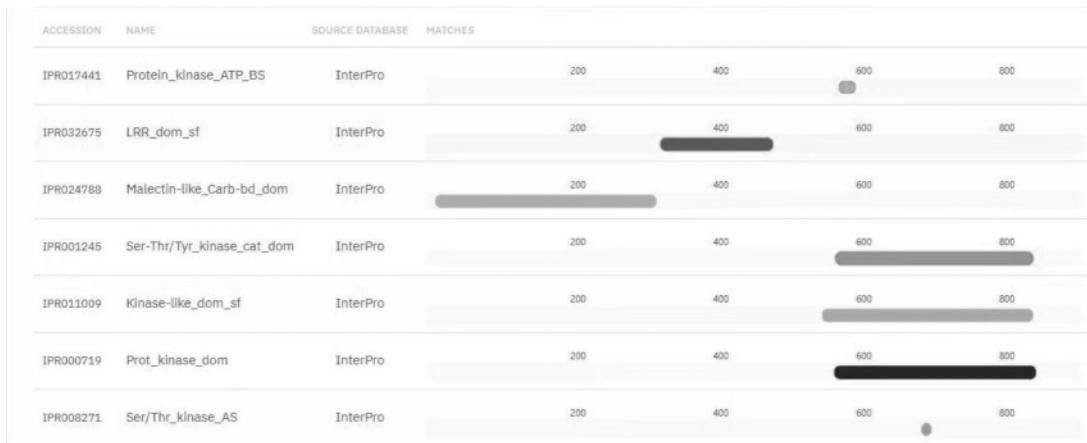


图3

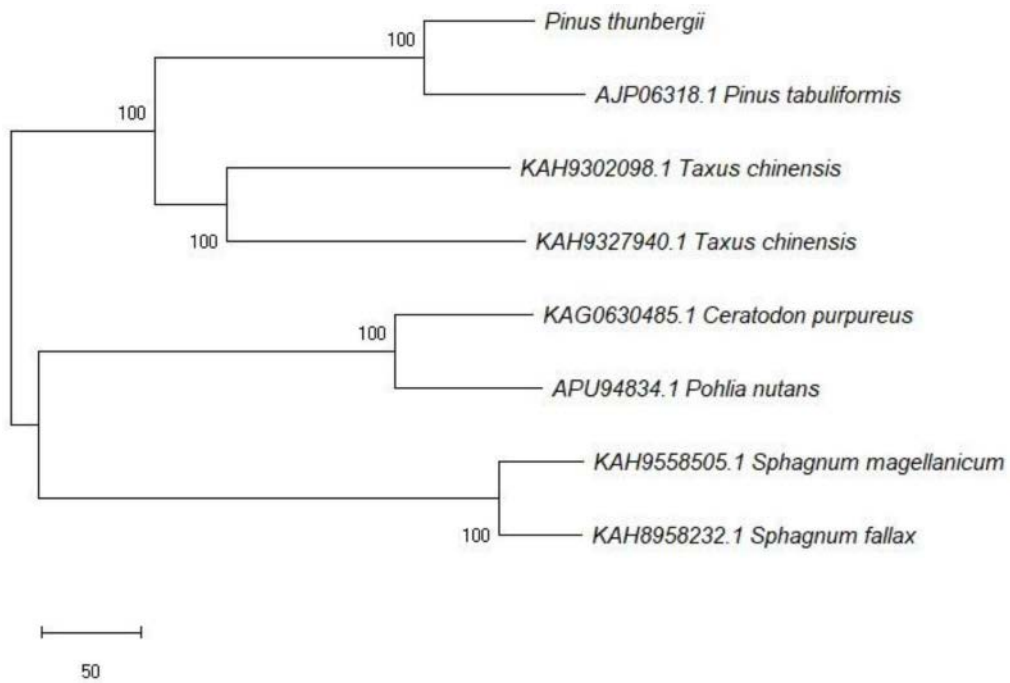


图4

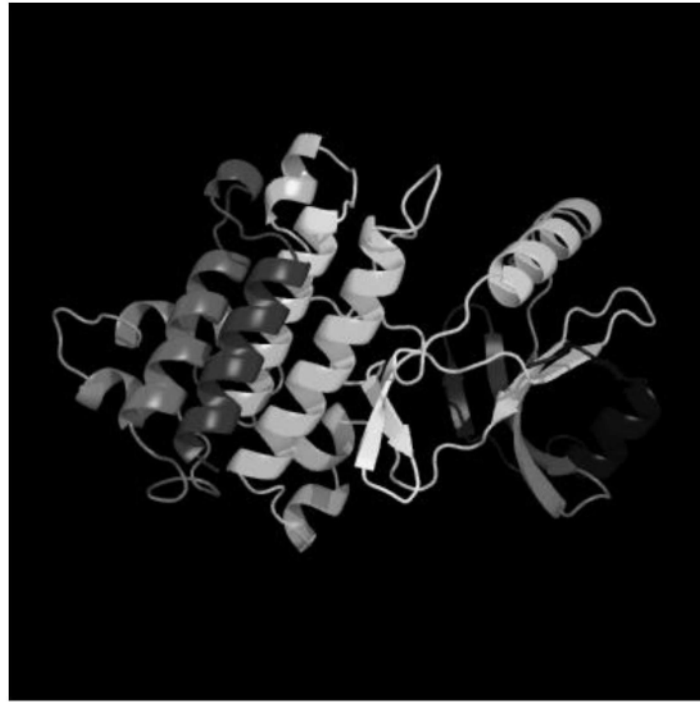


图5

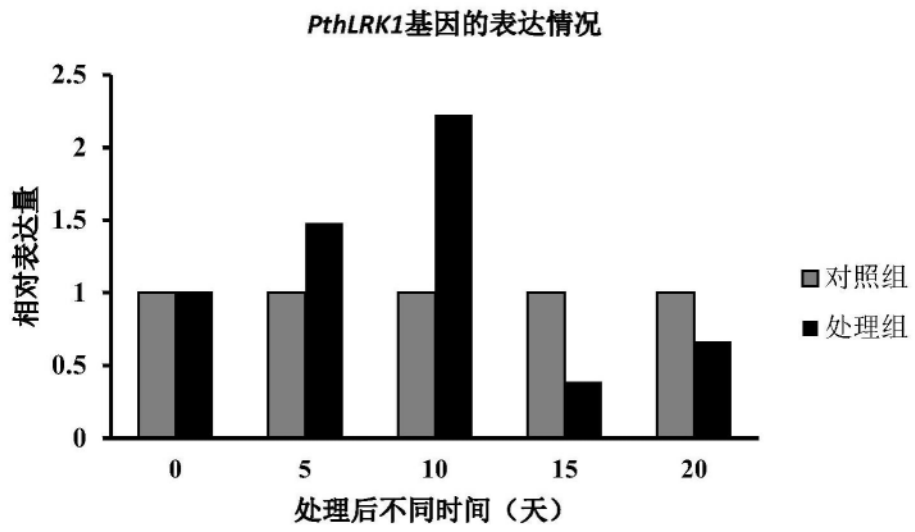


图6