

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 5 月 22 日 (22.05.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/075401 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/070487
- (22) 国际申请日: 2013 年 1 月 15 日 (15.01.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210453400.9 2012 年 11 月 13 日 (13.11.2012) CN
- (71) 申请人: 南京大学 (NANJING UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。
- (72) 发明人: 田大成 (TIAN, Dacheng); 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 杨四海 (YANG, Sihai); 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 张小辉 (ZHANG, Xiaohui); 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 王娇 (WANG, Jiao); 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 谭生军 (TAN, Shengjun); 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 仲岩

(ZHONG, Yan); 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。

(74) 代理人: 江苏银创律师事务所 (JIANGSU YIN-CHUANG LAW FIRM); 中国江苏省南京市鼓楼区中央路 323 号利奥大厦 21 楼 2120 房间, Jiangsu 210009 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[见续页]

(54) Title: METHOD FOR CLONING PLANT DISEASE RESISTANCE GENES IN HIGH-THROUGHPUT MANNER

(54) 发明名称: 高通量克隆植物抗病基因的方法

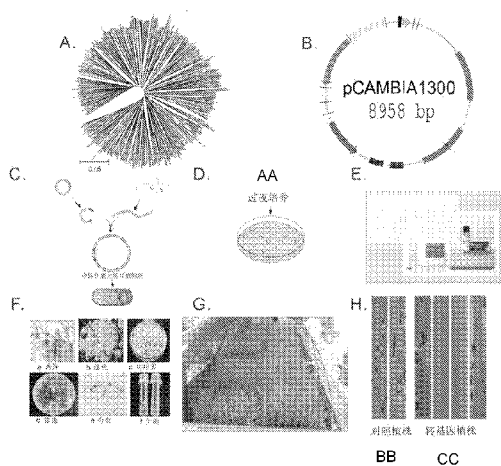


图 1 / Fig.1

AA Overnight culture
BB Check plant
CC Transgenic plant

(57) Abstract: Disclosed is a method for cloning plant disease resistance genes in a high-throughput manner. In the method, candidate disease resistance genes are obtained by means of bioinformatics; the candidate disease resistance genes are cloned in a high-throughput manner by using a high resistance variety or a relative species as a resistant gene source, and are transferred into a infected variety; and disease resistance capabilities of the genes are evaluated by using a method of pathogen infection, so as to ultimately find a broad-spectrum plant disease high resistance genes having importance production value. Further disclosed is a rice blast resistance gene obtained by using the method.

(57) 摘要: 本发明公开了一种高通量克隆植物抗病基因的方法。该方法通过生物信息学手段筛选候选抗病基因; 然后利用高抗品种或近缘物种作为抗性基因源, 大量克隆并转化这些候选基因到感病品种中, 利用病原菌侵染的方法对其抗病能力做评估, 从而最终找到在生产上具有重要价值的广谱高抗的植物抗病基因。本发明还公开了用该方法筛选到的稻瘟病抗性基因。



RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, — 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

高通量克隆植物抗病基因的方法

技术领域

本发明属于植物功能性基因的克隆与利用领域，特别是涉及以抗病基因的分子遗传与进化分析为基础，进行植物抗病基因高通量克隆的新方法。

背景技术

植物抗病基因是植物与病原菌长期相互作用的结果，在植物的进化过程中扮演着十分重要的角色。自从第一个植物抗病基因 Hm1 在 1992 年被 Johal 和 Briggs 从玉米中分离以来 (Tanksley et al. 2007; 董玉琛, 2001)，到目前为止，已经接近 100 个植物抗病基因从不同的植物中得以克隆和分离，其中主要类型的抗病基因为 NBS-LRR 结构类型 (Nucleotide-binding site and leucine-rich-repeat, 即核苷酸结合位点和富亮氨酸重复蛋白) 的抗病基因；另外还有少部分抗病基因主要为 eLRR-TM-pkinase、eLRR-TM、STK 等类型。这些抗病基因分别编码对病毒、细菌、真菌、卵菌、甚至线虫和昆虫等的抗性蛋白。

由于植物病害每年给农、林生产带来巨大的损失，合理有效地防治植物病害是保障农、林可持续发展所必须解决的关键问题之一。大量实践证明，开发和利用已有的植物抗病种质资源是防治植物病害的最为有效的方法之一 (Tanksley et al. 2007; 董玉琛, 2001)。传统的抗病品种培育，通常是将优质高产的品种与抗病性强的材料杂交，然后通过不断的回交选育，最后得到抗病且优质的新品种。尽管这一方法十分有效，但极其耗时，当新品种培育出来之后，可能对病原菌新进化产生的株系或小种表现为感病 (Tanksley et al. 2007)；经典的图位克隆方法利用抗病和感病的品种杂交，然后对大量的分离后代接种病菌、鉴定抗性、遗传作图等，最后在精确遗传定位的基础上进行克隆。这种方法取得了很好的效果，在植物抗病基因的克隆中起到了非常重要的作用 (如抗白叶枯病基因 Xa21 的分离和利用, Song et al. 1995)，但因其周期长、费时费力、分离和等位性检测较难等原因，不适合大量克隆抗病基因的需要。同时，但抗病基因独特的遗传方式，也使该方法的应用受到了很大的限制。以水稻抗稻瘟病基因为例，该类基因在基因组中通常成簇 (gene cluster) 分布 (Wang et al. 1999; Liu et al. 2002; Lin et al. 2007)，在不同品种的同源染色体间的位置和结构也多呈不对称分布，等位关系

不明确,拷贝数变异大 (Yang et al. 2007; Ding et al. 2007a; Sun et al. 2008; Li et al. 2010)。这些遗传现象,大大增加了图位克隆的难度,严重影响了抗病基因的克隆效率。

近年来,随着植物抗病及抗病相关基因分子水平研究的突破性的进展,使我们对植物抗病及抗病相关基因的结构、功能、起源、变异及保存的认识有了根本性的变化。即植物抗病基因,主要是一类含有 LRR 结构域的基因,其中又以 NBS-LRR (核酸结合-富含亮氨酸) 类型抗病基因为主。由于这些基因在结构与功能上都具有高度的相似性,结合其独特的遗传与进化特征,为快速的克隆与鉴定这些基因提供了便利,也为高效地利用抗病种质资源提供了新的机遇。

本发明的主要目的就是充分利用植物抗病基因结构上的相似性及独特的遗传变异与进化特征,提供一种高效、快速的植物抗病基因的克隆方法。另外,虽然植物的种类繁多,但基本规律都非常一致。因此,本发明主要以水稻抗稻瘟病基因的高通量克隆为实例进行阐述。

水稻 (*Oryza sativa*) 是世界上最重要的粮食作物之一,同时也是我国最主要的栽培作物之一,但其每年都遭受到严重的病虫害的侵扰,给农业生产带来了巨大的损失。其中,稻瘟病是分布最广、危害水稻最严重的病害之一,严重影响到水稻的产量,全球每年由稻瘟病引起的水稻产量损失占 11-30% (约合 1.57 亿美元, <http://www.fungalgenomics.ncsu.edu>), 直接威胁到稻农增收和国家的粮食安全。无论在世界还是在我国,解决稻瘟病难题一直也是保障水稻持续生产的一个优先研究的课题。

稻瘟病防治的最大困难之一是病菌本身变异与分化速度快 (凌忠专等, 2004)。新的稻瘟病菌生理小种层出不穷,已有的抗病基因(Plant disease resistance, R 基因)很快丧失抗性,而寻找新的抗病材料越来越难,水稻稻瘟病对水稻生产的威胁也越来越大。对应易变的病原菌,水稻必须拥有很多抗病基因。从已经定位的 70-80 个基因位点来看,水稻抗稻瘟病基因数量众多。但是,到目前为止已经克隆的抗稻瘟病基因仅 15 个。虽然已经定位的基因可以通过分子标记辅助选择的方法加以利用,这一选育过程繁琐、耗时,当新品种培育出来之后,可能对新产生的变异菌株表现为感病,克隆并直接转化抗病基因可能是最直接有效的培育抗病品种的途径。在这样的背景下,使用新的思路,研究开发出能够高通量克

隆抗稻瘟病基因的新技术，就显得尤为重要并且具有难以估量的价值。

发明内容

本发明的目的是建立多对多植物抗病基因的克隆技术体系（多个克隆对应多个病原的检测），并以水稻抗稻瘟病基因的高通量克隆为实例进行阐述。我们的研究表明，植物抗病基因在遗传和演化上主要具有以下几个特点：[1]物种内的高遗传变异性；[2]多以基因家族和基因簇的形式存在，并表现出拷贝数的变化（Copy number variation）；[3]演化过程中多受到正选择作用；（4）同类型抗病基因在系统进化树上具有一定的聚类特性。该方法以这些遗传演化规律为理论基础，采用生物信息学方法，结合系统进化树上的聚类及基因家族的分布特征，挑选物种内及物种间已知抗病功能基因同枝或附近枝基因作为候选的抗病基因；或根据寄主抗病基因与相应病原菌共进化的原则，对进化快的病菌，选取变异多、拷贝数多、进化快的寄主基因作为抗该种病害的候选抗病基因。反之，则选相对保守的寄主基因作候选抗病基因。利用分子生物学技术，大量、快速克隆这些候选基因，并通过转基因来验证其功能的有效性。实验证明，该方法简便，高效，方便鉴定，适合大量克隆抗病基因的需要，可以多、快、好、省的为植物供给新的抗病基因。

本发明技术的解决方案是：利用抗病基因与病原菌之间多对多的原则，建立高通量克隆植物抗病基因的方法，并以高通量克隆水稻抗稻瘟病基因为实施例进行阐明。主要包括以下几个步骤：

（1）以植物抗病基因的遗传变异特点和自然演化规律为基础，在系统进化树的基础上，选取具有以下特征的基因作为抗某种病害的候选基因：（1）挑选物种内及物种间已知抗病功能基因同枝或附近枝基因作为候选的抗病基因；（2）根据寄主抗病基因与相应病原菌共进化的原则，对进化快的病菌，选取变异多、拷贝数多、进化快的寄主基因作为抗该种病害的候选抗病基因。反之，则选相对保守的寄主基因作候选抗病基因。具体到水稻抗稻瘟病基因为，在系统进化树上选取与已知抗稻瘟病基因或抗真菌类基因同枝或附近枝的基因作为候选基因，或水稻基因组内进化速度快的基因家族（如多拷贝且拷贝数变化的、选择作用明显等）

作为候选基因群。在抗性品种或近缘物种中克隆这些基因并通过转基因来验证其功能的有效性。

(2) 挑选合适的植物抗性品种作为基因克隆的材料，以抗稻瘟病为例，选取的近缘物种主要为禾本科植物与水稻近缘的物种：如野生稻、玉米、高粱、短柄草、燕麦、黑麦、小麦、大麦等物种，或水稻物种内的高抗品种，如 Tetep、谷梅、地谷、明恢 63 及野生稻等。

(3) 用长片段 PCR 技术 (Long-PCR) 的方法克隆经过挑选的候选基因，通过测序检测基因的完整性；将这些基因构建到双功能载体中。

(4) 选择感病品种作为受体植株，用农杆菌介导等合适的转基因方法，将候选基因转到普感品种中。

(5) 利用自然的病原菌接种感染，筛选鉴定抗病个体，鉴定抗病个体的新的抗病基因。以抗稻瘟病基因的高通量克隆为例，选取不同来源、不同时间收集的或生产上流行的稻瘟病菌株为病原，筛选抗性植株。

(6) 用 Cre-lox 重组酶等体系去除被筛选个体转基因过程中的标记基因，使具有新抗病基因的植株只保留天然的 DNA 序列。

(7) 结合农艺性状的筛选，育成有推广价值的新品种。

本发明的另一个目的是提供实施例一、实施例二和实施例三中稻瘟病抗性基因 (RMg10-RMg36) 的 DNA 序列及编码的蛋白质序列。

本发明的另一个目的是提供含有上述抗性基因的载体。

本发明的另一个目的是提供上述载体转化的转基因植株。

本发明的另一个目的是提供上述蛋白质在制备抗稻瘟病菌药物中的应用。

本发明实施例中涉及克隆和鉴定一种包含抗性基因 (RMg10-RMg36) 的 DNA 片段，这些基因编码的蛋白能使水稻对稻瘟病菌所引起的病害产生特异性的抗病反应。其中所述片段分别如序列表 SEQ ID NO:1- SEQ ID NO:27 所示或者基本上相当于 SEQ ID NO:1- SEQ ID NO:27 所示，或者其功能相当于 SEQ ID NO:1- SEQ ID NO:27 所示序列的亚片段。这些 DNA 序列编码的蛋白都属于 NBS-LRR 类蛋白。其氨基酸序列分别如序列表 SEQ ID NO:28- SEQ ID NO:54 所示。

本发明同样包括将抗性基因 (RMg10-RMg36) 中编码不同结构域的片段 (如

NBS 或 LRR) 与其他核苷酸片段重组, 从而构成嵌合基因或蛋白质, 使之具有新的功能。对抗性基因 (RMg10-RMg36) 进行修饰或改造, 可改变或增加基因的某种功能。例如, 将 LRR 区域替换为其他抗性基因的结构域, 或将 NBS 结构域进行定点突变, 可能会导致基因抗性的丧失或抗谱的改变。

本发明也包括将抗性基因 (RMg10-RMg36) 的主要结构有效地连接上合适的调节序列所形成的嵌合基因, 以及在基因组中包含这种基因的植物。这种基因可以是天然的或嵌合的。

本发明提供的稻瘟病抗性基因 (RMg10-RMg36) 具有重要的应用价值。将所述的抗性基因 (RMg10-RMg36) 序列用任何一种转化方法导入水稻或其他植物细胞, 可获得表达所述基因的转基因抗病品种, 从而应用于生产。本发明所述的基因构建到植物转化载体中, 可以对所述基因或其调控序列适当修饰, 也可以用其它启动子取代所述基因原有的启动子, 从而拓宽抗谱或增强抗性。

本发明具有如下有益效果: 将克隆的抗稻瘟病基因转入感病的植物中, 有助于获得新的抗病植物。克隆的抗病基因能在不同的物种间转移并利用, 从而能够克服传统抗病育种中远缘杂交的困难。此外, 可以用转基因技术在植物中累加多个抗病基因, 缩短育种周期。本发明还能够进一步提供或应用上述 DNA 片段获得的抗病转基因植株和相应的种子, 以及用本发明的基因或基于该基因的重组体转化的植株或由这类植株获得的种子。可以用有性杂交的方式将本发明的基因转入其他植株。

本发明的特点是根据植物抗病基因的遗传进化规律, 采用生物信息学方法筛选潜在的抗病基因, 并利用分子生物学技术大量、快速克隆候选抗病基因。方法简便, 效率高, 方便鉴定, 适合大量克隆抗病基因的需要, 有效克服了传统图位克隆周期长、费时费力、分离和等位性检测较难等缺点, 从而可以多、快、好、省的为水稻生产持续供给新的抗性基因。

附图说明

图 1 为本发明流程示意图。图 1A: 抗稻瘟病候选位点的确定; 图 1B-E: 抗稻瘟病基因的分离与克隆; 图 1F-G: 抗稻瘟病基因的遗传转化; 图 1H: 转化体的鉴定。

图 2 为实施例中稻瘟病抗性基因的转化体的潮霉素抗性基因和 CaMV 35S 启动子的 PCR 检测电泳图；图 1A 为 CaMV 35S 启动子的 PCR 扩增产物，泳道 1-6 为转化体的 PCR 扩增产物，泳道 7 为载体 pCAMBIA1300-AscI 质粒的 PCR 扩增产物，泳道 8 为受体新 2 号的非转化体的 PCR 扩增产物；图 1B 为潮霉素抗性基因的 PCR 产物，泳道 1-6 为转化体的 PCR 扩增产物，泳道 7 为载体 pCAMBIA1300-AscI 质粒的 PCR 扩增产物，泳道 8 为受体新 2 号的非转化体的 PCR 扩增产物。

图 3 为实施例中植株抗性鉴定图。图 3A：对照植株的抗性鉴定图；图 3B：稻瘟病抗性基因的转化植株的抗性鉴定图。

具体实施方式

候选抗病基因的确定原则：以植物抗病基因的遗传变异特点和自然演化规律为基础，在系统进化树的基础上，挑选物种内及物种间已知抗病功能基因同枝或附近枝基因作为候选的抗病基因；或根据共进化关系及基因家族的分布情况，挑选基因组内候选的抗病基因。

具体到水稻抗稻瘟病候选基因的确定：以禾本科已经完全测序基因组为分析基础，如水稻全基因组测序品种 93-11 和日本晴，玉米、高粱、短柄草等，首先鉴定基因组中所有的 NBS-LRR 类型的抗病基因，并进行系统进化树的构建，在系统进化树的基础上，将已知抗真菌（稻瘟病原菌为真菌）的所有抗病基因定位在系统进化树上，或水稻基因组内变异多、拷贝数多、进化快的基因家族作为候选基因群。根据这一原则，我们共选取了近百个候选的抗稻瘟病基因位点，通过引物设计、在水稻近缘物种，如玉米、高粱、短柄草等，以及抗稻瘟病的水稻品种及野生稻品种中进行长片段 PCR、载体构建、转基因、抗性鉴定等过程，最后通过 30 个来源于中国大陆分布所有水稻主产区的稻瘟病菌系统鉴定，鉴定出 27 个抗稻瘟病基因。

下面通过具体的实施例，对本发明的技术方案作进一步具体的说明。下述实施例中所用方法如无特别说明，均为常规方法。

实施例一：候选抗稻瘟病基因位点 Rp1/Pi37 和 Rp3/Pc 的克隆及鉴定

1、抗稻瘟病候选位点 Rp1/Pi37 和 Rp3/Pc 的确定：在 Rp1/Pi37 基因位点：Rp1

基因为玉米抗锈病（真菌）基因，而 Pi37 为水稻抗稻瘟病（真菌）基因，从系统进化树上看，二者聚在同一进化枝，具有明显的聚类性；同时，在这一进化枝中，玉米和高粱中均存在不同程度的基因扩张且有新近产生的基因簇，表现出进化速度快的特征。在 Rp3/Pc 基因位点：Rp3 基因为玉米抗锈病（真菌）基因，而 Pc 为高粱中抗根腐病（真菌）的基因，从系统进化树上看，二者聚在同一进化枝，具有明显的聚类性；同时，在这一进化枝中，玉米和高粱中均存在不同程度的基因扩张且有新近产生的基因簇，表现出进化速度快的特征。这两个位点均符合抗病基因候选位点的基本特征，因此作为候选位点进行克隆与鉴定。

2、候选抗稻瘟病基因位点 Rp1/Pi37 和 Rp3/Pc 基因的分离与克隆：利用公共数据库测序品种为参考序列（水稻：Nipponbare 和 93-11，高粱：BTx623，玉米：B73，短柄草：Bd21）设计引物。引物序列见序列表 SEQ ID NO:55- SEQ ID NO:68。

分别以各禾本科植物 DNA 为模板，含各种高粱(SSQ, P49, Jinza11, saozhouB, X622, T607)、玉米(B73, Mo17, 齐 319, 414, 黄早四, 齐 205, 沈 317, Bt1, 178)、短柄草(Bd21)及水稻(Tetep, 谷梅 2 号, 明恢 63, Tadukan)等 DNA，利用长片段 PCR 技术(Long-PCR)扩增候选基因片段。PCR 程序如下：95℃预变性 5 分钟，95℃变性 30 秒，60℃复性 45 秒，68℃延伸 6 分钟，共 35 个循环，随后 72℃保温 10 分钟，最后 10℃恒温。随后对 PCR 产物进行割胶纯化，并电泳检测。

3、双功能基础载体的准备：将稀有酶切位点 AscI 导入双功能载体 pCAMBIA1300 的多克隆位点 BamHI 和 SalI 之间，取代酶切位点 XbaI，构成基础载体 pCAMBIA1300-AscI。

设计 5'端分别带有 BamHI 和 AscI 的引物扩增 Pi9 基因的启动子序列，用限制性内切酶 BamHI 和 AscI 同时酶切启动子的 PCR 产物和基础载体 pCAMBIA1300-AscI，连接获得含有 Pi9 启动子的载体 Pi9-pro-vector。再设计引物 5'端分别带有 AscI 和 SalI 的引物扩增 Pi9 基因的终止子序列，用限制性内切酶 AscI 和 SalI 同时酶切终止子的 PCR 产物和载体 Pi9-pro-vector，连接最终获得 Pi9 的基础载体 Pi9- vector。

4、候选抗性基因与基础载体的连接：用限制性内切酶 AscI，同时酶切 PCR

产物与基础载体质粒，并纯化。在 T4 连接酶的作用下，将候选基因片段连入基础载体 pCambia1300-AscI，通过菌落 PCR，挑取阳性单克隆，摇菌提取质粒，测序，检测。由此我们一共成功克隆了 30 个基因。

5、候选抗性基因的遗传转化：将携有候选基因的双功能载体导入根癌农杆菌 EHA105，采用农杆菌介导法，将候选基因转化到水稻普感品种新 2 号和 TP309 中。最后一共获得 55 株独立的转化体。

6、PCR 分子检测：以转化体 DNA 为模板，用潮霉素抗性基因及其上游 CaMV35S 启动子的特异性引物对其进行 PCR 反应。潮霉素抗性基因的引物序列见序列表 SEQ ID NO:109 和 SEQ ID NO:110。CaMV35S 启动子的引物序列见序列表 SEQ ID NO:111 和 SEQ ID NO:112。

7、转化体的抗性鉴定：选择 12 个来源地不同，区别力好的独立稻瘟病菌生理小种作为检测的病原菌种。利用稻瘟病菌小种接种感染 T2 代转基因植株和对照品种，筛选抗病性改变的转化体。最后一共鉴定获得了 11 个具有抗性的株系，7 个具有抗性的新基因（RMg10-RMg16）。

8、候选抗稻瘟病基因位点 Rp1/Pi37 和 Rp3/Pc 蛋白结构分析：采用步移法对获得的抗病基因的 DNA 序列进行测序，所述 7 个具有抗性的新基因 RMg10-RMg16 的 DNA 序列分别如 SEQ ID NO:1-7 所示，其编码的蛋白质分别如 SEQ ID NO:28-34 所示。

实施例二：候选抗稻瘟病基因位点 AC134922 的克隆及鉴定

1、抗稻瘟病候选位点 AC134922 的确定：AC134922 位点是水稻基因组含最多拷贝数的抗病基因家族位点之一，该位点在 4 个禾本科近缘物种（水稻，玉米，高粱和短柄草）中拷贝数不同，在水稻和玉米中均存在明显的基因扩张且有新近产生的基因簇；且在水稻不同个体间存在明显的基因拷贝数的变化，表现出进化速度快的特征；符合抗病基因候选位点的基本特征，因此作为候选位点进行克隆与鉴定。

2、候选抗稻瘟病基因位点 AC134922 的分离与克隆：利用公共数据库测序品种日本晴（Nipponbare）和 93-11 为参考序列，设计引物。引物序列见序列表 SEQ ID NO:69-SEQ ID NO:72。

以抗病水稻品种 Tetep, 谷梅 2 号, 明恢 63 及 Tadukan 的基因组 DNA 为模板, 利用长片段 PCR 技术 (Long-PCR) 扩增候选基因片段。PCR 程序如下: 95℃预变性 5 分钟, 95℃变性 30 秒, 60℃复性 45 秒, 68℃延伸 6 分钟, 共 35 个循环, 随后 72℃保温 10 分钟, 最后 10℃恒温。随后对 PCR 产物进行割胶纯化, 并电泳检测。

3、双功能基础载体的准备: 将稀有酶切位点 *AscI* 导入双功能载体 pCAMBIA1300 的多克隆位点 *BamHI* 和 *SalI* 之间, 取代酶切位点 *XbaI*, 构成基础载体 pCAMBIA1300-*AscI*。

4、候选抗性基因与基础载体的连接: 用限制性内切酶 *AscI*, 同时酶切 PCR 产物与基础载体质粒, 并纯化。在 T4 连接酶的作用下, 将候选基因片段连入基础载体 pCAMBIA1300-*AscI*, 通过菌落 PCR, 挑取阳性单克隆, 摇菌提取质粒, 测序, 检测。由此我们一共成功克隆了 8 个基因。

5、候选抗性基因的遗传转化: 将携有候选基因的双功能载体导入根癌农杆菌 EHA105, 采用农杆菌介导法, 将候选基因转化到水稻普感品种新 2 号和 TP309 中。最后一共获得 14 株独立的转化体。

6、PCR 分子检测: 以转化体 DNA 为模板, 用潮霉素抗性基因及其上游 CaMV35S 启动子的特异性引物对其进行 PCR 反应。潮霉素抗性基因的引物序列见序列表 SEQ ID NO:109 和 SEQ ID NO:110。CaMV35S 启动子的引物序列见序列表 SEQ ID NO:111 和 SEQ ID NO:112。

7、转化体的抗性鉴定: 选择 12 个来源地不同, 区别力好的独立稻瘟病菌生理小种作为检测的病原菌种。利用稻瘟病菌小种接种感染 T2 代转基因植株和对照品种, 筛选抗病性改变的转化体。最后一共鉴定获得了 4 个具有抗性的株系, 2 个具有抗性的新基因 (RMg17 和 RMg18)。

8、候选抗稻瘟病基因位点 AC134922 抗病基因蛋白结构分析: 采用步移法对抗病基因的 DNA 序列进行了测序, 所述 2 个具有抗性的新基因 RMg17 和 RMg18 的 DNA 序列分别如 SEQ ID NO:8-9 所示, 其编码的蛋白质分别如 SEQ ID NO:35-36 所示。

实施例三: 水稻全基因组范围内候选抗稻瘟病基因位点的克隆及鉴定

1、抗稻瘟病候选位点的确定：依据挑选原则，即挑选物种内及物种间已知抗病功能基因同枝或附近枝基因作为候选的抗病基因；或根据基因家族的分布情况，挑选表现出进化速度快特征的基因家族（如变异多、拷贝数多等）作为候选的抗病基因，一共挑选出 90 个候选基因位点，在水稻普抗品种中进行系统的抗病基因克隆。

2、候选抗稻瘟病基因位点的分离与克隆：利用公共数据库测序品种为参考序列（水稻：Nipponbare 和 93-11）设计引物。引物序列见序列表 SEQ ID NO:73-SEQ ID NO:108。

以水稻 Tetep, 谷梅 2 号, 明恢 63 及 Tadukan 的基因组 DNA 为模板, 利用长片段 PCR 技术 (Long-PCR) 扩增候选基因片段。PCR 程序如下: 95℃ 预变性 5 分钟, 95℃ 变性 30 秒, 60℃ 复性 45 秒, 68℃ 延伸 6 分钟, 共 35 个循环, 随后 72℃ 保温 10 分钟, 最后 10℃ 恒温。随后对 PCR 产物进行割胶纯化, 并电泳检测。

3、双功能基础载体的准备：将稀有酶切位点 *AscI* 导入双功能载体 pCAMBIA1300 的多克隆位点 *BamHI* 和 *SalI* 之间, 取代酶切位点 *XbaI*, 构成基础载体 pCAMBIA1300-*AscI*。

4、候选抗性基因与基础载体的连接：用限制性内切酶 *AscI*, 同时酶切 PCR 产物与基础载体质粒, 并纯化。在 T4 连接酶的作用下, 将候选基因片段连入基础载体 pCAMBIA1300-*AscI*, 通过菌落 PCR, 挑取阳性单克隆, 摇菌提取质粒, 测序, 检测。由此我们一共成功克隆了 101 个基因。

5、候选抗性基因的遗传转化：将携有候选基因的双功能载体导入根癌农杆菌 EHA105, 采用农杆菌介导法, 将候选基因转化到水稻普感品种新 2 号和 TP309 中。最后一共获得 180 株独立的转化体。

6、PCR 分子检测：以转化体 DNA 为模板, 用潮霉素抗性基因及其上游 CaMV35S 启动子的特异性引物对其进行 PCR 反应。潮霉素抗性基因的引物序列见序列表 SEQ ID NO:109 和 SEQ ID NO:110。CaMV35S 启动子的引物序列见序列表 SEQ ID NO:111 和 SEQ ID NO:112。

7、转化体的抗性鉴定：选择 12 个来源地不同, 区别力好的独立稻瘟病菌生理小种作为检测的病原菌种。利用稻瘟病菌小种接种感染 T2 代转基因植株和对

照品种,筛选抗病性改变的转化体。最后一共鉴定获得了 33 个具有抗性的株系,18 个具有抗性的新基因 (RMg19-RMg36)。

8、抗稻瘟病基因蛋白结构分析: 采用步移法对抗病基因的 DNA 序列进行了测序。所述 18 个具有抗性的新基因 RMg19-RMg36 的 DNA 序列分别如 SEQ ID NO:10-27 所示, 其编码的蛋白质分别如 SEQ ID NO:37-54 所示。

权利要求

1. 高通量克隆植物抗病基因的方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 借助抗病基因遗传进化规律和生物信息学手段，挑选候选抗病基因：使用生物信息学方法，找出靶标植物基因组或其近缘物种基因组中所有的 NBS-LRR 类型抗病基因；构建系统发育树、划分基因家族，并分析基因簇在染色体上的分布；根据已知功能的抗病基因在系统进化枝上的分布，选取位于已知功能抗病基因枝及邻近枝基因作为候选的抗病基因；以及根据系统进化枝的聚类情况及基因家族分布，选取在同一基因组内存在多拷贝，且拷贝之间蛋白的相似度>70%的基因家族作为候选的抗病基因；

其中所述的靶标植物可以是水稻、玉米、高粱、小麦、大麦、大豆、棉麻、西红柿、马铃薯、烟草，也可以是葡萄、苹果、桔子、杨树等水果或林木；选取的病害是真菌、细菌、病毒或线虫引起的、可被植物抗病基因识别并产生抗病反应的病害；

(2) 挑选合适的植物抗病品种作为基因克隆的材料，该材料可以是同一物种内具有抗性的品种或生态型，也可以是这一物种相关的近缘物种；

(3) 用长片段 PCR 技术的方法克隆经过挑选的候选基因，通过测序检测基因的完整性；将这些基因构建到双功能载体中；

(4) 选择高感且易于转基因品种、或具有优良农艺性状但感病的品种作为受体，用农杆菌介导或其它转基因的方法，将候选基因转入其中；以及

(5) 利用植物特定的病原菌株接种感染，筛选鉴定转基因的植株个体，鉴定候选抗病基因功能。

2. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于挑选抗病的植物品种或其近缘物种作为基因克隆的材料。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于挑选高感的植物品种作为转基因受体材料。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法，其中所述靶标植物为水稻，所述病害为稻瘟病，克隆供体材料为水稻 Tetep、谷梅 2 号、谷梅 4 号、明恢 63 及野生稻及近缘物种玉米、高粱、短柄草。

5. 根据权利要求 4 所述的的方法，其中选取易感稻瘟病的材料作为转基因受体材料，所述易感稻瘟病的材料包括水稻品种丽江新团黑谷、CO39、新 2 号、台北 309 和苏御糯。
6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的的方法，其特征在于在所述步骤(1)中进一步筛选候选基因，要求基因编码区长度大于 2000bp，基因全长小于 20000 bp，并使用常规软件对其作启动子和终止子预测。
7. 稻瘟病抗性基因，其 DNA 序列分别如 SEQ ID NO:1- SEQ ID NO:27 中的任一个所示。
8. 含有根据权利要求 7 所述的稻瘟病抗性基因的载体。
9. 根据权利要求 8 所述的载体用于转化水稻从而制备转基因抗稻瘟病水稻的用途。
10. 根据权利要求 7 所述的稻瘟病抗性基因所编码的蛋白，其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:28- SEQ ID NO:54 中的任一个所示。
11. 根据权利要求 10 所述的抗稻瘟病基因所编码的蛋白在制备抗稻瘟病菌药物中的应用。

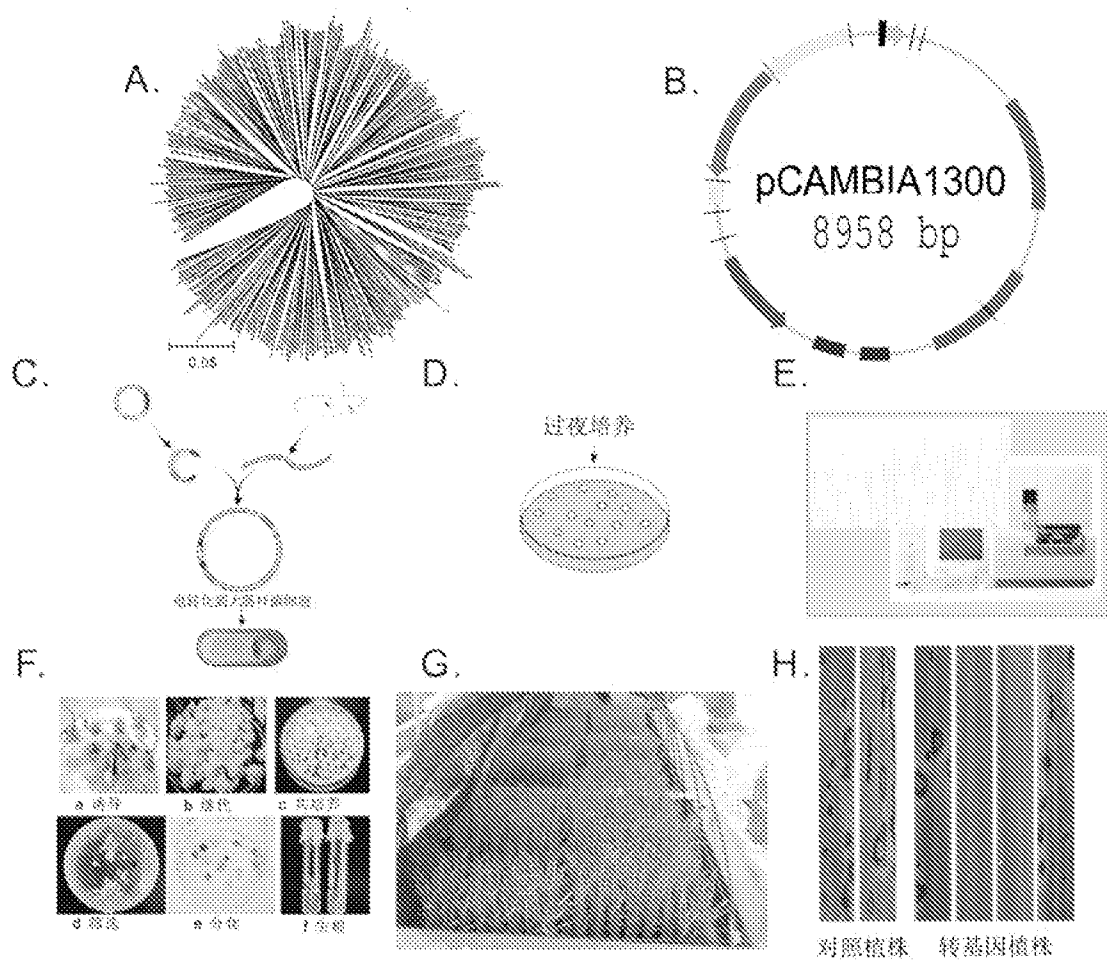


图 1

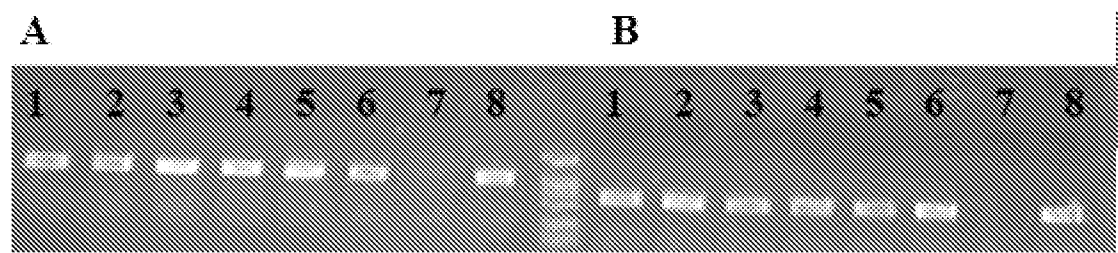


图 2

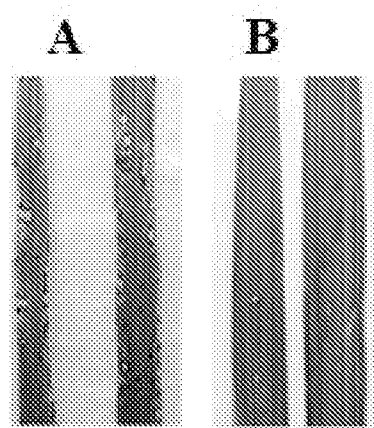


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/070487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12Q, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed:
high-flux, clone, gene, resistance gene, rice

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102732530 A (UNIV NANJING) 17 October 2012 (17.10.2012), description, embodiments 1 to 3	1-6
X	CN 102732531 A (UNIV NANJING) 17 October 2012 (17.10.2012), description, embodiments 1 to 3	1-6
X	CN 102260708 A (HI TECH RES CENT) 30 November 2011 (30.11.2011), description, embodiments 1 to 6	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 10 August 2013 (10.08.2013)	Date of mailing of the international search report 22 August 2013 (22.08.2013)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHAO, Yanhao Telephone No. (86-10) 62411043

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/070487

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:1-6

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/070487

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102732530 A	17.10.2012	None	
CN 102732531 A	17.10.2012	None	
CN 102260708 A	30.11.2011	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/070487

Continuation of Box No. III: Observations where unity of invention is lacking

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group 1: Claims 1-6, relates to a high throughput method for cloning plant disease resistance genes;

Group 2: Claims 7-11 (partially), relates to rice blast resistance gene as shown in SEQ ID NO:1, related gene vector and use thereof, related protein and use thereof;

Group 3: Claims 7-11 (partially), relates to rice blast resistance gene as shown in SEQ ID NO:2, related gene vector and use thereof, related protein and use thereof;

Group 4: Claims 7-11 (partially), relates to rice blast resistance gene as shown in SEQ ID NO:3, related gene vector and use thereof, related protein and use thereof;

.....

.....

Group 28: Claims 7-11 (partially), relates to rice blast resistance gene as shown in SEQ ID NO:27 related gene vector and use thereof, related protein and use thereof;

As the technical features of the method for cloning genes in the invention of group 1 are the steps in proper order, they do not necessarily utilize the sequence structures of related genes, proteins in claims 7-11, at the same time, the related sequence structures in the inventions of groups 2-28 are different from each other. Thus, the inventions of groups 1-28 do not have the same or corresponding special technical features; hence do not meet the requirements of unity of invention as defined in PCT Rules 13.1.

Continuation of Box A:

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

C12Q 1/68 (2006.01) i

C12N 15/10 (2006.01) i

C12N 15/11 (2006.01) i

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12Q, C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed: 高通量, 克隆, 基因, 抗病基因, 稻, high-flux, clone, gene, rice

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN102732530 A (南京大学) 17.10 月 2012 (17.10.2012), 说明书实施例 1-3	1-6
X	CN102732531 A (南京大学) 17.10 月 2012 (17.10.2012), 说明书实施例 1-3	1-6
X	CN102260708 A (山东省农业科学院高新技术研究中心) 30.11 月 2011 (30.11.2011), 说明书实施例 1-6	1-6



其余文件在 C 栏的续页中列出。



见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

10.8 月 2013(10.08.2013)

国际检索报告邮寄日期

22.8 月 2013 (22.08.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

赵彦豪

电话号码: (86-10) 62411043

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

见附加页

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：1-6

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2013/070487

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102732530 A	17.10.2012	无	
CN102732531 A	17.10.2012	无	
CN102260708 A	30.11.2011	无	

第 III 栏续页：缺乏发明单一性的意见

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

第 1 组、权利要求 1-6，涉及高通量克隆植物抗病基因的方法；

第 2 组、权利要求 7-11（部分），涉及 SEQ ID NO:1 所示的稻瘟病抗性基因及其相关载体及其用途、相关蛋白及其应用；

第 3 组、权利要求 7-11（部分），涉及 SEQ ID NO:2 所示的稻瘟病抗性基因及其相关载体及其用途、相关蛋白及其应用；

第 4 组、权利要求 7-11（部分），涉及 SEQ ID NO:3 所示的稻瘟病抗性基因及其相关载体及其用途、相关蛋白及其应用；

.....

.....

第 28 组、权利要求 7-11（部分），涉及 SEQ ID NO:27 所示的稻瘟病抗性基因及其相关载体及其用途、相关蛋白及其应用；

由于第 1 组发明克隆基因的方法，其技术特征是其包括的特定顺序的步骤，它并不必然利用了权利要求 7-11 相关基因、蛋白的序列结构，而第 2-28 组的发明之间涉及的序列结构各不相同，因而第 1-28 组发明之间没有相同或相应的特定技术特征，没有满足单一性的要求，不符合 PCT 细则 13.1 的规定。

A 栏续页：

主题的分类

C12Q 1/68 (2006.01) i

C12N 15/10 (2006.01) i

C12N 15/11 (2006.01) i