

一个小麦低分子量谷蛋白基因的分离

汪越胜, 覃建兵, 汪长东, 何光源*

(华中科技大学, 中英 HUST-RRes 基因工程和基因组学联合实验室, 武汉 430074)

摘要: 以新疆小麦日喀则基因组 DNA 为模板, 采用 *Glu-D3* 位点特异引物进行 PCR 扩增。PCR 产物插入 pUCm-T 载体, 转化感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 获得阳性克隆。经测序发现该插入片段长度 1 287 bp, 包括了部分启动子序列和完整的编码序列。编码序列推导的蛋白质含有 8 个半胱氨酸残基, 属于 6 类 LMW-GS 中的 Type 1 类, 为以后这类基因的功能研究提供了基因材料。

关键词: 小麦; 低分子量麦谷蛋白; 基因分离

中图分类号: Q78; S512

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)06-0511-03

Isolation of a New Low-molecular-weight Glutenin Subunit Gene in Wheat

WANG Yue-Sheng, QIN Jian-Bing, WANG Chang-Dong, HE Guang-Yuan*

(China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: PCR was used as a rapid alternative method to isolate allelic of wheat low molecular weight subunit (LMW-GS) genes. The primers specific to *Glu-D3* locus were designed based on published LMW-GS gene sequence data. The PCR products were inserted into pUCm-T vector and transferred into *E. coli* DH5 α . The size of PCR product was about 1 287 bp, including partial promoter and whole coding sequences. The LMW-GS encoded by cloned gene in Xinjiang wheat, Rikeze, contained 8 Cys residues, being grouped into Type 1. This gene clone was applied in the gene function research by the method of gene engineering.

Key words: Wheat; Low molecular weight subunit; Gene isolation

小麦籽粒中贮藏蛋白赋予面筋弹性而最终决定小麦加工品质。这类蛋白质分为醇溶蛋白和麦谷蛋白两大类。醇溶蛋白是单体, 只存在分子内二硫键, 而与面筋弹性直接相关的麦谷蛋白是多聚体, 由麦谷蛋白亚基通过分子间二硫键连接而成。麦谷蛋白多聚体经还原反应成为分散的亚基, 根据在 SDS-PAGE 胶上的迁移率, 划分为高分子量麦谷蛋白 (HMW-GS) 和低分子量麦谷蛋白 (LMW-GS) 两类。小麦 HMW-GS 及其编码基因的结构与功能研究一直受到重视, 从特定面包小麦中已分离出整套 HMW-GS 编码基因, 并获得 *1 Dx5* 和 *1 Ax1* 基因的转基因小麦。

编码 LMW-GS 的基因位于 *Glu-3* 座位, 包括

Glu-A3、*Glu-B3* 和 *Glu-D3* 三个位点, 在一个六倍体小麦品种中约有 20~30 个 LMW-GS 的编码基因^[1]。在硬粒小麦中已有实验证明有些亚基出现与否会改变面筋特性。在一个面包小麦 Cheyenne 上分离所有 LMW-GS 成员的研究正在进行, 已分离出 6 个基因, 其中 5 个基因在 *Glu-D3* 位点, 1 个在 *Glu-A3* 位点^[2]。虽然已认识到 LMW-GS 在品质中的重要性, 但获得编码 LMW-GS 的基因数量还很有限, 因而还难以对 LMW-GS 的品质地位做正确评价^[3,4]。研究 LMW-GS 基因功能的思路可归纳为两种, 其一是大量分离基因家族成员, 比较推测的蛋白质序列, 从而预测其品质效应; 其二是对现已获得的基因, 利用现代分子技术手段如转基因技术, 研究

收稿日期: 2005-05-19, 修回日期: 2005-07-21。

基金项目: 国家 973 计划项目资助课题 (2002CB111302)。

作者简介: 汪越胜 (1965-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为植物基因工程; 何光源 (1958-), 男, 教授, 博士后, 博士生导师。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: hegy@hust.edu.cn)。

单个基因对品质的贡献,为结构相似的同—类基因的品质效应评价提供依据。

我们已开始了分离 LMW-GS 基因的研究工作,在此基础上,试图利用基因工程技术研究这类基因的功能。本文报道了笔者用 PCR 扩增的方法分离的第一个 LMW-GS 基因全序列。

1 材料与方法

供试材料为六倍体新疆小麦日喀则(染色体组为 AABBDD)。小麦基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法。引物同文献[1],是 *Glu-D3* 位点特异引物,包括上游引物 5'GCAACTTTGATGATGAA-TCC 3' 和下游引物 5'AAACAACGGTGATCCA-ACTAT 3';上游引物位于启动子区域,下游引物位于编码区末端的下游。所用 DNA 聚合酶为耐高温 Taq 酶。目的基因扩增的 PCR 条件:95℃预变性 10 min;循环反应:95℃变性 30 s、60℃退火 30 s 和 72℃延伸 2 min,30 个循环;72℃延伸 10 min。目的片段的克隆及重组子的筛选:PCR 产物直接连接到 pUCm-T 载体上,连接试剂盒由上海 Sangon 公司生产;连接产物转化 CaCl₂ 法制备的感受态 *E. coli* DH5 α 细胞;用 α -互补法初步筛选重组子阳性克隆。经质粒酶切鉴定后,阳性克隆由上海 Sangon 公司测序。

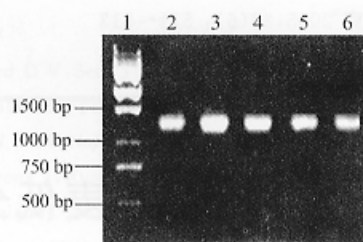
2 结果

2.1 LMW-GS 基因的 PCR 扩增与克隆

以高产优质品种日喀则基因组 DNA 为模板,用文献[1]报道的 *Glu-D3* 位点特异引物进行 PCR 扩增。退火温度设置 58、60、62、64℃等 4 个处理。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,表明在 4 个退火温度下都能扩增出条带,尤其在 60℃退火温度下扩增的条带最清晰、无杂带,位于 1 000~1 500 bp 之间,见图 1 中泳道 2。

在连接反应体系中,由于 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳中呈现唯一、清晰条带,因此 PCR 产物可直接用于连接反应,而无须进一步分离、纯化。PCR 反应中使用了耐高温的 Taq 聚合酶,使得 PCR 产物 3'-OH 端添加了 1 个腺嘌呤(A),因而采用 A-T 连接策略直接将基因连接到 pUCm-T 载体中。

连接反应产物转化感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5 α ,接种入涂布有 IPTG 与 X-gal 的 LB 培养基中,筛选出白色菌落。取白色菌落,煮沸法粗提质粒 DNA^[1],以此为模板,进行 PCR 扩增鉴定。鉴定 20 个白色菌落,发现有 18 个为阳性克隆,图 1 中列出



泳道 1: λ DNA Marker; 泳道 2: 基因组 DNA 的 PCR 产物;
泳道 3~6: 4 个阳性菌落的 PCR 产物
Lane 1: Marker; Lane 2: PCR product from the wheat genome;
Lane 3~6: PCR product from the positive clones

图 1 PCR 扩增产物及其克隆鉴定

Fig. 1 PCR analysis of LMW-glutenin gene in wheat genome and in positive clones

了 4 个阳性菌落的 PCR 鉴定结果。

2.2 基因测序与序列分析

从已鉴定的 18 个阳性克隆中随机取 2 个,送往上海 Sangon 公司对插入序列进行测序,测序结果完全相同。基因和推测蛋白的序列见图 2。

结果表明插入片段长度 1 287 bp,与 GenBank 中 *Glu-D3* 位点的 LMW-GS 基因序列(登录号为 AB062852)同源性最高,identity 值为 94.7%。用 DNAMAN 软件对测定序列进行翻译,结果表明其读码框为 218...1240。该 DNA 片段核苷酸序列及推测的编码氨基酸序列见图 2。该片段包括了完整的编码区及其上游 217 bp,该上游序列应是胚乳特异性表达启动子的部分序列。

Ikeda 等通过对小麦 LMW-GS 蛋白序列的比较,发现 LMW-GS 结构中都含有 8 个半胱氨酸残基,其中 2 个半胱氨酸残基参与分子间二硫键的形成,并根据半胱氨酸残基的相对位置,将 LMW-GS 分为 6 类(Type I ~ Type VI)^[3],本文分离的基因所编码的蛋白质中半胱氨酸残(C)的分布(见图 2)属 Type I 类型。

3 讨论

小麦面筋弹性取决于麦谷蛋白多聚体的大小与数量,麦谷蛋白多聚体主要由 HMW-GS 与 LMW-GS 亚基构成。普遍认为 HMW-GS 决定面筋弹性,而 LMW-GS 决定面筋延展性,认为高、低分子量麦谷蛋白亚基对小麦加工品质的形成都有重要作用。HMW-GS 的研究较深入,由普通小麦(*Triticum aestivum* L.) 1A、1B 和 1D 染色体长臂的 *Glu-1* 位点编码,分别记作 *Glu-A1*、*Glu-B1* 和 *Glu-D1*。每个位点由 2 个紧密连锁的基因(*Glu-1-1* 和 *Glu-1-2*)组成,各自编码 1 个分子量高的 x 型亚基

1	GCAACTTTGATGATGAATCCAAAAGTACGCTTATAGCTAGTGAACCTACCATAATGTAC
61	CAAAAATCCATTTCAGAAACATCCAAACACAATTATTAAAGCTGATGCAAGAAAGGAAAG
121	AGGTGGTGCACGGGCTACTATAATAGACATGAAGTATAATGATCATCACAGCACAAGC
181	ATCAAAACCAAGCAACACTAGTTAACACCAATTCACCATGAAGACCTTCCTCATCTTTGC
1	M K T F L I F A
241	CCTCCTCGCCGTTGCGGCGACAAGTGCCATTGCACAAATGGAGACTAGCCACATCCCTGG
9	L L A V A A T S A I A Q M E T S H I P G
301	CTTGGAGAAACCATCGCAACAACCAATTACCACTACAACAAATATTATGGTACCACCA
29	L E K P S Q Q Q P L P L Q Q I L W Y H Q
361	ACAGCAACCCATCCAACAACCAACCAACCATTTCCACAACAGCCACCATGTTACAGCA
49	Q Q P I Q Q Q P Q P F P Q Q P P C S Q Q
421	ACAACAACCAACCATTCGAGCAACAACAACCAACCATTTTCACAGCAACAACCAACCAT
69	Q Q P P L S Q Q Q Q P P F S Q Q Q P P F
481	CTCGCAGCAAGAACTACCACTTCTACCGCAACAACCAACCATTTTCGAGCAACAACAACC
89	S Q Q E L P V L P Q Q P P F S Q Q Q Q Q P
541	ATTCCGCGCAACAACAACCACTTCTACCGCAACAACCAACCATTTTCACAACAACCAACCAT
109	F P Q Q Q Q P L L P Q Q P P F S Q Q R P
601	ACCATTTTCTCAGCAGCAGCAACAACCAAGTTCTACCGCAACAACCAACCATTTTCGCAACA
129	P F S Q Q Q Q Q P V L P Q Q P P F S Q H
661	CCAACAACCGGTTCTGCCGCAACAACAATACCATATGTTACGCATCTATCTTCAGCA
149	Q Q P V L P Q Q Q I P Y V Q P S I L Q Q
721	GCTAAACCCATGCAAGGTATTCCTCCAGCAGCAATGCAGCCCTGTGGCAATGCCACAAG
169	L N P C K V F L Q Q Q C S P V A M P Q S
781	TCTTGCTAGGTACAAATTTGTGGCAGAGCAGTTGCCATGTGGTGCAGCAACATGTTG
189	L A R S Q M L W Q S S C H V V Q Q Q C C
841	CCAGCAGCTGCCGGAATCCCGAACAATCACGCTATGATGCAATCCGTGCCATCATCTA
209	Q Q L P R I P E Q S R Y D A I R A I I Y
901	CTCGATCGTCTACAAGAACAACAACATGGTCAGGGTTTCAACCAACCTCATCAGCAACA
229	S I V L Q E Q Q H G Q G F N Q P H Q Q Q
961	ACCCCAACAGTCGGTCCAAGGTGTCTCCAACCCCAACAACAACAGAAGCAGCTCGGACA
249	P Q Q S V Q G V S Q P Q Q Q Q K Q L G Q
1021	GTGTTTTTCCAACGACCTCAACAACAACAACCTGGGTCAATGGCCTCAACAACAACAGGT
269	C F F Q R P Q Q Q Q L G Q W P Q Q Q Q V
1081	ACCACAGGGTACCTTGTTCAGCCACACCAATAGCTCAACTTGAGTTGATGACTTCCAT
289	P Q G T L L Q P H Q I A Q L E L M T S I
1141	TGCACCTCCGTACCCATGATGTGTCAGTGTCAACGTGCGGTGTCAGGACCAACAC
309	A L R T L P M M C S V N V P V Y G T T T
1201	TAGTGTGCCATTGCGCGTTGGCACCCAGTTGGTGCTACTGATAAGAAATATCTCTAG
329	S V P F G V G T Q V G A Y * *
1261	TAATATATAGTTGGATCACCGTTGTTT

图 2 一个新 LMW-GS 基因及推测蛋白的序列(用 C 标出蛋白质序列中半胱氨酸残基)
Fig. 2 Alignment of a new gene and deduced amino acid sequences of LMW glutenin in wheat
(Cys in the protein sequence marked by C)

和 1 个分子量较低的 γ 型亚基。普通小麦品种中,由于某些编码基因的沉默,通常表达只有 3~5 个亚基,经 SDS-PAGE 可以明确鉴别定名,为 HMW-GS 的功能研究带来方便,已确定了优质亚基,并分离基因、通过转基因技术导入缺少优质基因的品种而使其面包加工品质得到改良。但是对于 LMW-GS,在一个六倍体小麦品种中约有 20~30 个编码基因,每个基因都有其复等位基因,可见小麦中 LMW-GS 数量之多,因而难以通过 SDS-PAGE 加以鉴别,给 LMW-GS 分类、功能的研究带来困难。在 D'Ovidio 分离第一个 LMW-GS 基因之后^[1],相继分离出 40 多个基因序列,部分为全部的编码序列。Ikeda 根据已分离基因的序列和推导的蛋白质的一级结构,将 LMW-GS 分为 6 类^[3]。本文分离的基因序列包含全部的编码序列,推导的蛋白质属于 6 类 LMW-GS 中

的 Type I 类,为这类基因的功能研究提供了基因材料。以后的工作是以获得的基因为材料,利用转基因技术研究 Type I 类基因的功能。

参考文献:

[1] D'Ovidio R, Oronzo A, Tanzarella E. Nucleotide sequence of a low-molecular-weight glutenin from *Triticum durum* [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 781-784.
[2] Cassidy B G, Dvorak J, Anderson O D. The wheat low-molecular-weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 743-750.
[3] Ikeda T M, Nagamine T, Fukuoka H, Yano H. Identification of new low molecular weight glutenin subunit genes in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 680-687.
[4] 赵惠贤, 郭嵩光, 胡胜武, 范三红, 张大鹏, 任思霖, 王瑞娟. 小麦 *Glu-D3* 和 *Glu-B3* 位点 LMW-GS 基因特异引物设计与 PCR 扩增 [J]. *作物学报*, 2004, 30(2): 126-130.