西北农业学报 2005, 14(1): 1~ 5
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

易变山羊草两个 y-型高分子量谷蛋白新亚基的鉴定及基因编码区分子克隆

颜泽洪, 郑有良, 代寿芬, 刘登才
(四川农业大学小麦研究所,四川都江堰 611830)

摘 要: 利用 SDS-PAGE和分子克隆方法研究了易变山羊草的高分子量谷蛋白亚基及其基因。结果表明,四倍体易变山羊草有 3个可表达的高分子量谷蛋白亚基。其中一个亚基的迁移率很慢,推测其为 Glu-U1x;另外 2个亚基的迁移率分别与中国春的 Bx7和 By8接近或更慢,利用一对特异扩增基因编码区的引物得到的扩增片段长度分别为 2.5 kb和 1.9 kb。分子克隆得到阳性质粒 p2.5和 p1.9。基因测序结果显示二者均为 y型高分子量谷蛋白基因,它们与普通小麦中已经报道的 y型高分子量谷蛋白基因在核苷酸和氨基酸序列上都存在差异,是 2个不同的高分子量谷蛋白新基因。

关键词: 易变山羊草; 高分子量谷蛋白; 基因克隆
中图分类号: Q512+.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2005)01-0001-05

Identification and Molecular Cloning of Two Novel y-type High-molecular-weight Glutenin Subunit Genes from *Aegilops Variables*

YAN Ze-hong, ZHENG You-liang, DAI Shou-fen and LIU Deng-cai
(Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, China)

Abstract The high molecular weight glutenin subunits and their encoding genes in *Aegilops variables* were characterized by SDS-PAGE and molecular cloning. It has been suggested that 3 active high molecular weight glutenin subunits could be separated in *Aegilops variable*. Among them, the putative Glu-1x type subunit, has the slowest mobility in SDS-PAGE, the other two, had much slower or the same migrate mobility as Bx7 and By8, respectively. The PCR amplification fragments of these two subunits genes were 2.5 kb and 1.9kb. Two types of positive clones were obtained by molecular cloning. Sequencing of gene coding regions indicated that they were two y type novel genes.

Key words *Aegilops variables*; High molecular weight glutenin; Gene cloning

谷蛋白(glutenin)和醇溶蛋白(gliadin)是普通小麦种子中的 2大类贮藏蛋白。谷蛋白又分为高分子量谷蛋白(HMW glutenin)和低分子量谷蛋白(LMW glutenin),醇溶蛋白又包括 α、β、γ和 ω四种组分[1,2]。高分子量谷蛋白因对小麦面粉面团的弹性有重要影响而与小麦的加工品质密切相关,从而得到广泛研究[1,2]。在普通小麦中,高分子量谷蛋白亚基分别由位于第一同源群染色体 1A, 1B和 1D长臂上的 Glu-1A, Glu-1B和 Glu-1D位点的多个 x和 y型等位基因编码[3,4],每一基因位点可分别编码一个 x型和一个 y型蛋白亚基[4]。在绝大多数小麦品种中,由于受基因沉默的影响,不同小麦品种的种子中常含有 3~ 5个数量不等和组成各异的高分子量麦谷蛋白亚基。

在小麦及近缘物种中蕴藏着大量的普通小麦栽培品种遗传背景中所不具备的高分子量谷蛋白

⑳收稿日期: 2004-10-08 修回日期: 2004-10-26
基金项目: 国家自然科学基金(30370882);四川省教育厅和科技厅科研项目资助。
作者简介: 颜泽洪(1970-),男,重庆石柱人,副研究员,从事小麦遗传与育种研究。E-mail: zhyan104@163.com

亚基,它们是改良普通小麦品质的潜在基因资源,由于这些物种所具有的高分子量谷蛋白基因在各自染色体上的位置具有相对的保守性,在功能上与普通小麦来源的同类基因具有相似性,因而是可以转移利用的高分子量谷蛋白新基因,极大地丰富了改良普通小麦品质的基因来源。

易变山羊草(*Aegilops variabilis* Eig, 2n= 4x = 28, UUSS)是分布在地中海和中东地区的一个一年生四倍体物种。抗小麦叶锈、秆锈和根腐病以及抗根结线虫等[5,6],是对小麦进行遗传改良的重要资源。在本研究中,笔者对易变山羊草所具有的高分子量谷蛋白进行了 SDS-PAGE分析并对其基因编码区进行了分子克隆和序列测定,以期为认识和利用易变山羊草物种中的高分子量谷蛋白基因来改良普通小麦的品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

易变山羊草(*Aegilops variabilis*, UUSS, 2n = 4x= 28)材料 As28, As27和 As34以及小伞山羊草(*Ae. umbellulata*, UU, 2n= 2x= 14)材料 As2被用作高分子量谷蛋白亚基组成检测,普通小麦(*T. aestivum*, AABBDD, 2n= 6x= 42)品种中国春(亚基组成: 7+ 8, 2+ 12)和川育 12(1, 7+ 8, 5+ 10)被作为高分子量谷蛋白标准对照,它们均由四川农业大学小麦研究所收集保存。其中, As28被用作 DNA提取及基因分子克隆。

1.2 方 法

种子蛋白提取和 SDS-PAGE分析按文献[8]的方法进行;按文献[8]的方法从 As28的黄化苗中提取 DNA PCR反应体系以及 PCR条件均按照以前的方法[9]进行, PCR扩增所用引物序列为 P1: 5′-ATGGCTAA GCGGC/TTA/GGTCC TCTTTG-3′, P2 5′-CTATCACT GGCTA / GGCCGACAA TGCG-3′。

克隆于 pBlueScript SK(+ /-) T载体中。以 *KpnI* 和 *XhoI* 双酶切后再以核酸外切酶Ⅲ处理制备亚克隆。测序由 *TaKaRa* 大连有限公司进行,利用 NCBI网址中的相关软件进行 DNA序列拼接和核酸与氨基酸序列分析。

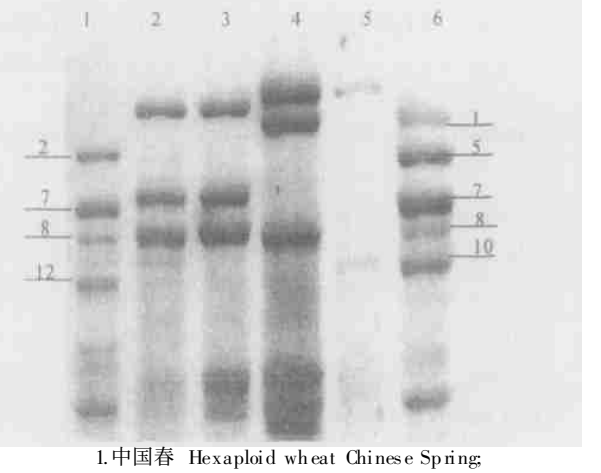
2 结果与分析

2.1 易变山羊草高分子量谷蛋白组成分析

SDS-PAGE分析表明, 3份易变山羊草均可分离出 3个可表达的高分子量谷蛋白亚基(图 1,第 2, 3和 4泳道),其中 As27和 As28两份材料的高分子量谷蛋白带型完全一致(图 1,第 2和 3泳道), 1份小伞山羊草分离出 2个高分子量谷蛋白亚基(图 1,第 5泳道), 3份易变山羊草中迁移率最慢的亚基与小伞山羊草的 *Ux* 略快或相当,但均比普通小麦中国春和川育 12中迁移率最慢亚基的迁移率还慢。

同时,以往的研究也表明由 U染色体组 *Glu-1*位点编码的 x型高分子量麦谷蛋白亚基迁移率很慢[7]。因此,在易变山羊草中迁移率最慢的应为 *Glu-Ux*。易变山羊草中的另外 2个亚基的迁移率分别与中国春和川育 12的 Bx7和 By8的迁移率十分接近或更慢。

由于易变山羊草为四倍体,理论上应该有 4条可表达的高分子量谷蛋白亚基,而实际上仅检测到三个亚基,这表明其中的一个亚基的基因沉默而不编码可表达的蛋白亚基。但至于是 Sx, 还是 Sy或 Uy暂时还不能确定。



1. 中国春 Hexaploid wheat Chinese Spring;
2. *Aegilops variables* (UUSS) As28;
3. *Aegilops variables* (UUSS) AS27;
4. *Aegilops variables* (UUSS) AS34;
5. *Aegilops umbelluta* (UU) AS2;
6. 川育 12 Hexaploid wheat Chuanyu 12

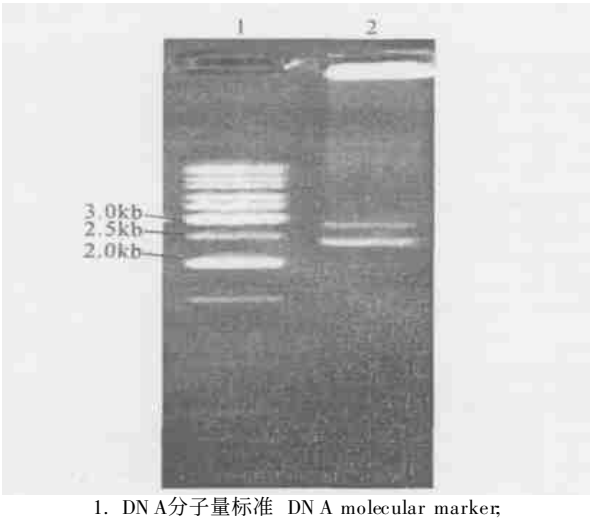
图 1 易变山羊草高分子量谷蛋白亚基组成 SDS-PAGE分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of high molecular glutenin subunit compositions of *Aegilops variabilis*

2.2 PCR扩增和分子克隆

利用兼并性引物 P1/P2,在易变山羊草材料 As28中同时扩增出了 3个 DNA片段(图 2)。大小分别是 3.0 kb, 2.5 kb,和 1.9 kb,将 3个片段分别

回收并克隆到质粒载体后获得阳性克隆 p2. 5和 p1. 9　p3. 0由于扩增和回收操作上的困难,未获得阳性克隆.



1. DNA分子量标准 DNA molecular marker;
2. As28 PCR扩增 PCR amplification of *Aegilops variabilis* accession As28

图 2　PCR扩增易变山羊草 As28的高分子量谷蛋白亚基基因

Fig. 2　PCR amplification of high molecular weight glutenin subunit genes from *Aegilops variabilis* accession As28

2. 3　核苷酸序列分析与比较

将 p2. 5和 p1. 9的 N、C保守端序列分别与小麦 A、B、D染色体组编码的基因进行比较 (表 1),发现它们与所有 y型基因的一致性 (大于 90%)均高于与所有 x型基因的一致性 (小于 90%). 因此, p2. 5和 p1. 9均为 y型高分子量麦谷蛋白基因. 据此推测,四倍体易变山羊草沉默的是 Sx基因.

2. 4　氨基氨基酸序列分析

p2. 5和 p1. 9 N端均为 104个氨基酸, 5个半胱氨酸; C端 42个氨基酸, 1个半胱氨酸. 都有 21个氨基酸的信号肽. 这些都与小麦中已报道的 y型高分子量谷蛋白基因的典型特征符合,进一步证实了它们均为 y型高分子量谷蛋白基因 (图 3).

p2. 5和 p1. 9在 N保守端有 4个氨基酸的差异, C保守端有 9个氨基酸的差异,都为替换,没有缺失. 究竟 p2. 5和 p1. 9是 Uy还是 Sy从目前的测序结果上还不易区分,但可以表明二者是不同的高分子量麦谷蛋白基因.

p2. 5和 p1. 9与普通小麦 A、B和 D基因组编码的 Ay, By9和 Dy10三个 y型基因都存在差异. 在 N保守端, p2. 5和 p1. 9均与 Ay差异最大 (差异氨基酸数目分别是 14和 12个),与 By9都分别有 5个氨基酸的差异,与 Dy10都分别有 4个氨基酸的差异; C保守端的情况是, p2. 5与 Dy10的差异最小 (3个氨基酸),与 Ay和 By9分别有 10和 9个氨基酸的差异. P1. 9与 Dy10的差异最大 (10个氨基酸),与 Ay和 By9分别有 4和 6个氨基酸的差异 (图 3).

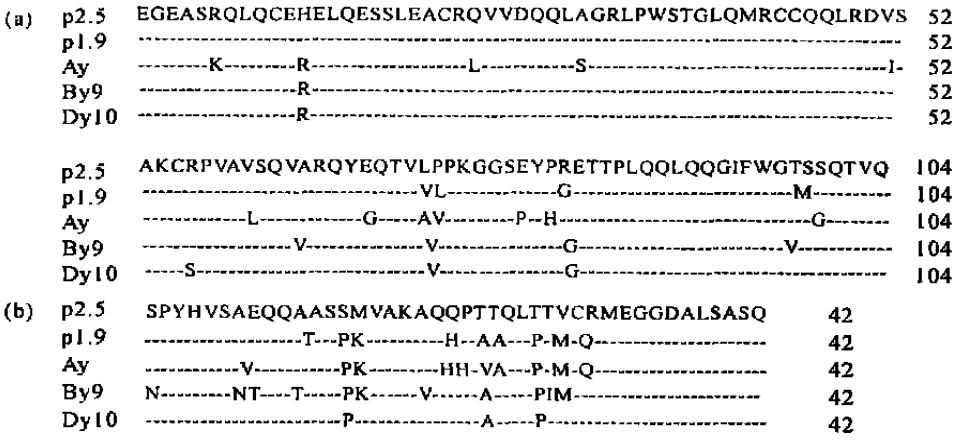
因此, Uy和 Sy是两个不同的高分子量谷蛋白新基因.

表 1　p2. 5和 p1. 9与小麦高分子量麦谷蛋白基因的 N端氨基酸序列一致性比较

Table 1　Identity of p2. 5 and p1. 9 with high molecular glutenin genes derived from wheat in terms of N-terminal amino acid residues

基因序号 Genbank accession number	来源 Source	亚基类型 Type	与 p2. 5一致性 /% Identity with p2. 5	与 p1. 9一致性% Identity with p1. 9
X03042	*Triticum aestivum*	Ay	93	94
X61026	*T. aestivum*	By9	94	95
X12929	*T. aestivum*	Dy10	95	95
X03041	*T. aestivum*	Dy12	96	95
X61009	*T. aestivum*	Ax1	87	82
M22208	*T. aestivum*	Ax2*	88	82
AF145590	*T. aestivum*	AxNull	88	82
X13927	*T. aestivum*	Bx7	81	81
U19774	*T. aestivum*	Dx2	88	82
X12928	*T. aestivum*	Dx5	83	84

1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



* Ay, By9, Dy10在 Genbank中的序号分别为 X03042, X61026, X12929,有差异的氨基酸部位直接以氨基酸标出,无差异部位则以横线表示

* The sequences of Ay, By9 and Dy10 deposited in Genbank are X03042, X61026 and X12929, respectively. The amino acids differences at the same site among 5 sequences are indicted by amino acids residues, while the same are indicted by short bars.

图 3 p2.5和 p1.9与小麦 Ay, By9和 Dy10在 N端(a)和 C端(b)的比较

Fig. 3 Comparisons of amino acid of p2.5 and p1.9 with wheat high molecular weight glutenin genes Ay, By and Dy10 in N (a) and C (b) terminal

3 讨 论

在本研究中,笔者对四倍体易变山羊草的高分子量麦谷蛋白亚基及其基因进行了 SDS-PAGE分析、分子克隆和序列测定,得到的两个克隆均为 y型高分子量谷蛋白亚基。克隆到的 2种类型的高分子量谷蛋白基因在核苷酸和氨基酸序列均不完全相同,与已经发表的 y型亚基也存在较大差异。因此,这是 2个完全不同的高分子量麦谷蛋白基因。这也说明 As28中不表达的高分子量谷蛋白基因是 Sx。然而,在四倍体易变山羊草中具有 U和 S两种基因组,但由于一个染色体组最多编码 2个高分子量麦谷蛋白基因,即一个 x型,一个 y型。所以,这两个 y型亚基基因必然一个来自 U染色体,一个来自 S染色体。但到底哪一个来源于 U组,哪一个来源于 S组,尚没有足够的证据进行推测和判断。易变山羊草中存在的 y型高分子量谷蛋白基因与来源于普通小麦来源的高分子量谷蛋白基因在氨基酸组成上存在一定的差异性但同时又在组成上有一定程度的类似。这为它们具有与栽培小麦中本身所具有的高分子量谷蛋白基因有大致相似的品质功能奠定了基础。某些部位的有差异的氨基酸的存在,为它们具有不同于已经发现的高分子量谷蛋白基因的潜在的品质功能提供了可能。在普通小麦中,已有研究表明,一些关键部位氨基酸的差异将可能导致其品质功能的明显差异,这在 Dx5[13,14], Bx20[12]以及变化的 Ax2* 亚基[15]中有所体现。因此,今后拟对 p2.5和 p1.9亚基进行转基因研究以研究其具有的可能的品质功能。

参考文献:

[1] Kreis M, Shewry P R, Forde B G, *et al*. Structure and evolution of seed storage proteins and their genes with particular reference to those of wheat, barely and rye[J]. Oxford Surv Plant Mol Cell Boil, 1985, 2: 253~317.

[2] Payne P I, Harris P A, Law C N, *et al*. The High molecular-weight subunits of glutenin: Structure, genetics and relationship to bread-making quality [J]. Annl Technol Argi, 1980, 29: 309~320.

[3] Payne P I, Holt L M, Law C N. Structural and genetical studies on the high molecular weight subunits of wheat glutenin . part I, allelic variation in subunits amongst varieties of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Theor Appl. Genet., 1981, 60: 229~236.

[4] Payne P I, Holt L M, Worland A J, *et al*. Structural and genetical studies on the high molecular weight subunits of wheat glutenin . part III, telocentric mapping of the subunits genes on the long arm of homologous group 1 chromosomes[J]. Theor Appl. Genet., 1982, 63: 129~138.

[5] Yu M Q F Person-Dedryver, Jahier J. Resistance to root knot nematode, Meloidogyne naasi (Franklin) transferred from Aegilops variabilis Eig to bread wheat [J]. Agronomic (Paris), 1990, 6: 451~456.

[6] Spetsov P, Ivanov P, Ivanova I. Introgression of powdery

mildew resistance from Aegilops kotschyi into bread wheat. The 9th intern [J]. Wheat Genet. Symp., Canada. 1998 (2): 112~ 113.

[7] Law C N, Payne P I. Genetical aspect of breeding for improved grain protein content and type in wheat Journal of Cereal[J]. Science, 1983, 1: 79~ 93.

[8] Wan Y, Liu K, Wang D, *et al*. High-Molecular-Weight glutenin subunits in the Cylindropyrum and Vertebrata section of the Aegilops genus and identification of subunits related to those encoded by the Dx alleles of common wheat[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 879~ 884.

[9] 颜泽洪, 万永芳, 刘坤凡, 等. 一种新型高分子量麦谷蛋白亚基的鉴定及其与同源蛋白间氨基酸序列的差异 [J]. 科学通报, 2001, 46(17): 1454~ 1459.

[10] Sudhir Kumar, Koichiro Tamura, Ingrid B. Jakobsen, and Masatoshi Nei MEGA2 Molecular Evolutionary Genetics Analysis software [M]. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. 2001.

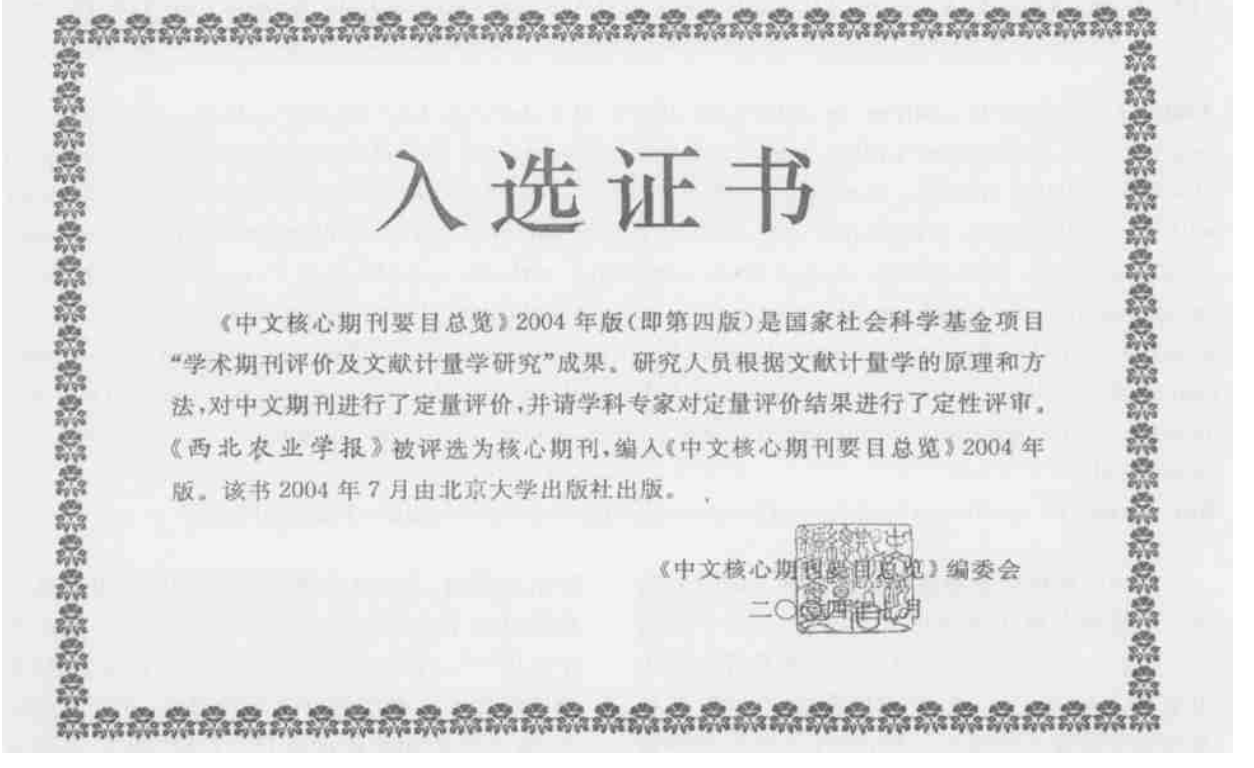
[11] Liu Z, Yan Z, Wan Y, *et al*. Analysis of HMW glutenin subunits and their coding sequences in two diploid Aegilops species[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 1368~ 1378.

[12] Shewry P R, Gilbert S M, Savage A W J, *et al*. Sequence and properties of HMW subunit 1Bx20 from pasta wheat (Triticum durum) which is associated with poor end use properties[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 744~ 750.

[13] Sugiyama T, rafalski A, Peterson D, *et al*. A wheat HMW glutenin subunit gene reveals a highly repeated structure [J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13: 8729~ 8737.

[14] Anderson O D, Greene F C. The characterization and comparative analysis of high molecular weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid wheat [J]. Theor. Appl. Genet, 1989, 77: 689~ 700.

[15] Juhasz A, Tamas L, Karsai I, *et al*. Identification, cloning and characterization of a HMW glutenin gene from an old Hungarian wheat variety, Bankuti 1201[J]. Euphytica, 2001, 119: 75~ 79.



入选证书

《中文核心期刊要目总览》2004年版(即第四版)是国家社会科学基金项目"学术期刊评价及文献计量学研究"成果。研究人员根据文献计量学的原理和方法,对中文期刊进行了定量评价,并请学科专家对定量评价结果进行了定性评审。《西北农业学报》被评选为核心期刊,编入《中文核心期刊要目总览》2004年版。该书2004年7月由北京大学出版社出版。

《中文核心期刊要目总览》编委会

二〇〇四年七月

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net