

研究报告 Original Papers

小麦高分子量麦谷蛋白亚基 *1Dx5* 启动子驱动外源基因的表达

姚琴 丛玲 罗立廷 李三和 何光源*

华中科技大学生命科学与技术学院, 中英 HUST-RRes 基因工程与基因组学联合实验室, 武汉 430074

摘要 将小麦高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)基因的胚乳组织特异性表达启动子驱动的外源突变型 *1Dx5* 基因和 *gus* 基因导入小麦中。对其转基因植株连续3代的跟踪研究表明, 突变型 *1Dx5* 基因的重复序列导致其表达蛋白分子量增大, 并影响其它 *1Bx17+1By18* 亚基基因的表达。组织化学分析观察到 *gus* 基因在 *1Dx5* 基因启动子驱动下的表达表现出胚乳组织特异性, 在开花2周后开始表达, 表达量呈持续上升, 至腊熟期达到最高, 其次为籽粒成熟期。

关键词 突变型; 高分子量麦谷蛋白亚基; 特异性表达

Expression of Foreign Genes in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Driven by HMW-GS *1Dx5* Promoter

YAO Qin, CONG Ling, LUO Li-Ting, LI San-He, HE Guang-Yuan*

China-UK HUST-RRes Genetic Engineering & Genomic Joint Laboratory, College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China

Abstract The foreign genes including *gus* and *1Dx5* mutant engineered to possess more of the repetitive central domain driven by HMW-GS (high molecular weight glutenin subunits) promoter were introduced into wheat, which allows obtaining the stable expression transplant. The consecutive investigation in 3 progenies indicated the repetitive sequence of *1Dx5* mutant improved its molecular weight and influenced expression of *1Bx17+1By18*. To test tissue specificity, the *gus* tests in seeds of transgenic plants exhibited positively, but negatively in leaves, roots, anthers or pollens. Foreign *gus* gene began to express two weeks after flowering, and expression levels kept increased trend to waxy ripening stage.

Key words mutant; high molecular weight glutenin subunits; specific expression

小麦(*Triticum aestivum* L.)高分子量麦谷蛋白亚基(high molecular weight glutenin subunits, HMW-GS)是决定面筋弹性的主要因素, 它是由小麦第一染色体组(1A、1B、1D)长臂端的 *Glu-1* 位点编码的。每个位点有2个基因, 分别编码1个x-型亚基和1个较低分子量的y-型亚基。其中, *1Dx5* 基因是位于1D长臂端的小麦高分子量蛋白5亚基编码基因。从理论上讲, *1Dx5* 基因编码序列的重复加长将导致其表达蛋白分子量增加。研究 *1Dx5* 人工突变型基因表达调控, 可为进一步了解 *1Dx5* 基因的表达调控机制奠定基础, 另外, 启动子是外源基因在受体细胞中表达所必需的, 它决定了基因表达的时间、空间和强度等, 是对生物进行定向改造的限制因素之一。*1Dx5* 基因在小麦胚乳组织中表现出组织特异性^[1], 利用其启动子对下游基因的特异性表达调控, 在小麦的品质

改良有一定意义^[2,3]。本文以 *1Dx5* 基因的启动子, 分别与麦属作物基因人工突变型 *1Dx5-R853*^[4] 以及非麦属作物基因 *gus* 基因构建转基因表达载体, 并转入小麦得到了特异性表达的转基因植株, 同时, 对 *1Dx5* 基因的启动子调控下的外源人工突变 *1Dx5-R853* 基因和 *gus* 基因作了探讨。

材料与amp;方法

以小麦(*Triticum aestivum* L.) L88-31(仅有 *1Bx17* 和 *1By18* 亚基)为转基因受体材料, 转基因的表达载体为 pLRPTDx5-R853, pLRPTDx5-R853

收稿 2004-12-15 修定 2005-07-11

资助 国家高新技术项目“863”计划(2002 AA 224031)。

*通讯作者(E-mail: guang.he@bbsrc.ac.uk, Tel: 027-87556214)。

的启动子为 *1Dx5* 基因的启动子, 目的基因是 *1Dx5* 突变体(它是在野生型 *1Dx5* 的第2 088位核苷酸中间插入一段 *1Dx5* 重复序列片段, 长度为 462 bp, 命名为 *1Dx5-R853*), 获得 2 株小麦转基因植株, 分别命名为 L9 和 L10。受体材料同上, 表达载体为 pLRPTGUS^[5], 启动子同上, 目的基因为 *gus* 基因, 获得的转基因植株命名为 L11。

用 L88-31 近等位株系 L88-6 (有 1Ax1、1Bx17、1By18、1Dx5 和 1Dy10 亚基) 为阳性对照^[6]。L88-31 和 L88-6 的内源 HMW-GS 均为野生型。

Taq 酶购自 ABGene 公司, 其他试剂均为国产分析纯。比较已经报道的 *1Dx5* 基因和 *gus* 基因, 根据保守区域, 设计两对简并引物, 即 *1Dx5* 的上游引物为: 5' GCCTAGCAACCTTCACAATC 3', 下游引物为: 5' GAAACCTGCTGCGGACAAG 3'; *gus* 基因的上游引物为: 5' AGTGTACGTATCAC-CGTTTGTGTGAAC 3', 下游引物为: 5' ATCGC-CGCTTTGGACATACCATCCGTA 3'。

取 L9、L10 和 L11 的 T₀、T₁、T₂ 代种植于人工气候室中, 光暗周期 16/8 h, 光照度 700 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度 18/16℃。提取三叶期到五叶期间的叶片基因组 DNA, 进行 PCR 验证。*gus* 的 PCR 反应程序为 94℃ 变性 5 min, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 1 个循环; 94℃ 变性 5 min, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min 3 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 1 个循环。*1Dx5-R853* 的 PCR 扩增程序中的延伸温度为 56℃。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

采用 Shewry 等^[7]的方法提取 L9、L10 以及对照 L88-31 和 L88-6 系的子代胚乳总蛋白: 小麦种子磨成粉末状, 加入 25 μL·mg⁻¹ 蛋白提取缓冲液 [62.5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、2% (V/V) SDS、1.5% 二硫苏糖醇、10% (V/V) 甘油和 0.002% 溴酚蓝]。10% SDS-PAGE 电泳分析小麦 HMW-GS 组分。

用 GUS 缓冲液浸润分析法^[8]分析 L11 子代的各种不同器官 *gus* 表达情况, GUS 显色反应底物为 X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-glucuronide)。将植物的组织器官切成小块, 浸泡在 X-Gluc 缓冲液中, 37℃ 中温育 24 h。70%~100% 乙醇梯度脱色。

实验结果

1 转基因后代鉴定

以 L9 和 L10 的 T₁、T₂、T₃ 的叶片基因组 DNA 为模板, 在 L9、L10 和 L11 的 T₁、T₂、T₃ 代中分别检测到突变型 *1Dx5-R853* 基因和 *gus* 基因(图 1、2)。表明外源基因 *1Dx5-R853* 和 *gus* 基因已经整合入转基因受体材料后代基因组中。

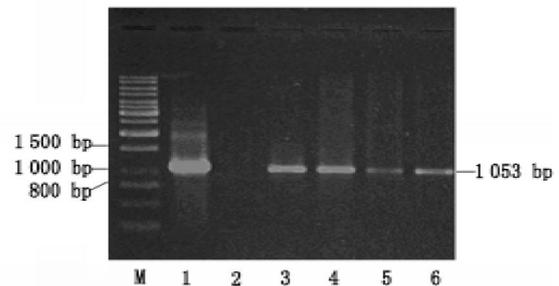


图 1 pLRPTGUS 转基因后代的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR analysis of T₁ progeny of line 1 for the pLRPTGUS transgenes

M: 1 kb DNA 梯度标记; 1: pLRPTGUS 质粒对照; 2: 空白对照; 3~6: T₁ 代转基因材料。

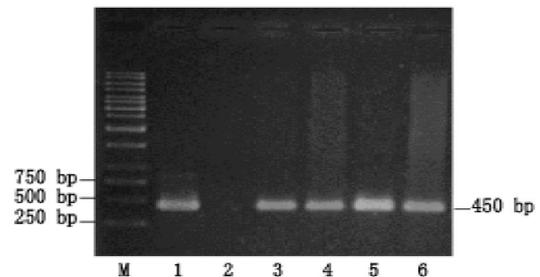


图 2 pLRPTDx5-R853 转基因后代的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR analysis of T₁ progeny of line 1 for the pLRPTDx5-R853 transgenes

M: 1 kb DNA 梯度标记; 1: pLRPTDx5-R853 质粒对照; 2: 空白对照; 3~6: T₁ 代转基因材料。

2 突变型 *1Dx5-R853* 基因的表达

SDS-PAGE 结果表明转基因后代一般有 3 条 HMW-GS 条带, 分别是 1Bx17、1By18 和 1Dx5-R853。其中, 亚基分子量明显大于阳性对照系 L88-6 系野生型 1Dx5 亚基, 甚至大于其 1Ax1 亚基的分子量(图 3), 这也说明了 *1Dx5-R853* 能够在 *1Dx5* 启动子的作用下于胚乳组织中表达。

通过 Gel-Doc 分析 SDS-PAGE 中蛋白质点密度

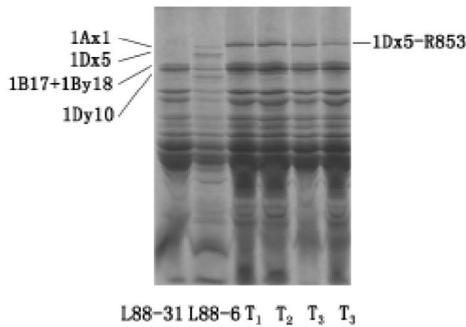


图3 pLRPTDx5-R853 转基因后代L9系的 SDS-PAGE 分析
 Fig.3 SDS-PAGE analysis of T₁/T₂/T₃ progeny of line L9 for the transplant lines L9
 L88-31: 受体材料; L88-6: 阳性对照; T₁: T₁代; T₂: T₂代; T₃: T₃代。

含量, 统计结果(表1)表明: 受体材料L88-31的高分子量蛋白亚基在胚乳总蛋白的含量由3.1%最

高可达6.2%, 在转基因后代胚乳组织中1Dx5-R853亚基占胚乳总蛋白最高可达2.6%, 相对于阳性对照L88-6中高分子量蛋白1Dx5亚基1.7%的平均含量, 在数量上有一定的提高, 说明1Dx5的启动子不仅可以启动1Dx5-R853的表达, 而且在胚乳组织中也有较强的表达信号。

3 外源gus基因的特异性表达

分别取小麦植株分蘖期的根与幼叶、拔节期的根与叶、抽穗期叶与幼穗, 开花期花粉与花药组织以及开花后2周的幼胚组织, 组织化学检测的结果表明, gus基因仅在小麦开花后2周的幼胚组织中开始有表达, 并在腊熟期gus表达活性达到最高。gus基因的表达仅限于T₁、T₂和T₃代转基因植物的胚乳中, 在胚、糊粉层或其它器官(叶、根、花粉和胚芽)中均不见表达(图4)。

表1 小麦转基因后代的 SDS-PAGE 点密度
 Table 1 Densitometric analysis of SDS-PAGE of endosperm protein from transgenic wheat

编号	种子数目	HMW-GS / %	1Dx5-R853 / %	1Bx17+1By18 / %
L88-31	5	3.1±0.02	—	3.1±0.01
L88-6	5	9.2±0.02	1.7±0.01	3.0±0.01
L9	5T ₁	6.5±0.01	2.6±0.01	3.9±0.02
	5T ₂	6.3±0.04	2.3±0.10	4.0±0.02
	10T ₃	6.2±0.05	2.2±0.03	3.8±0.03
L10	5T ₁	5.9±0.20	2.2±0.02	3.6±0.03
	5T ₂	6.3±0.04	2.5±0.01	3.8±0.03
	10T ₃	6.0±0.01	2.2±0.04	3.8±0.01

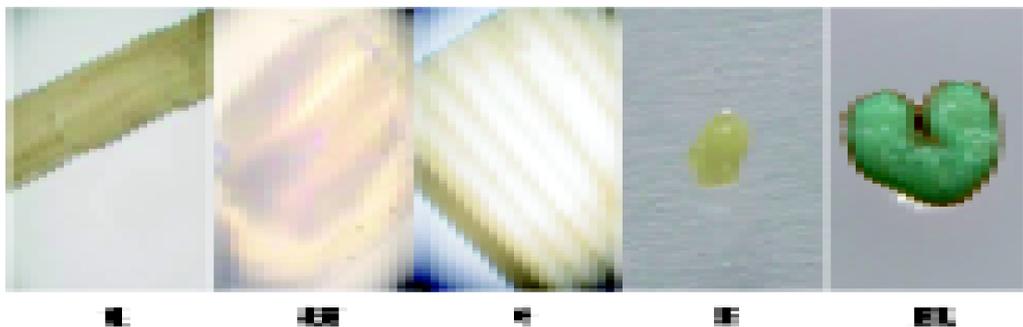


图4 转基因后代不同组织的GUS表达
 Fig.4 GUS expression of different tissues

讨 论

种子蛋白基因的特异性表达在水稻、番茄、玉米等作物中都已有一定的研究, 但在小麦中尚

少。为此, 我们将1Dx5基因启动子驱动的麦属突变基因(1Dx5-R853)和非麦属基因(gus)引入小麦组织中, 得到了稳定表达的转基因后代。本文结果表明, 转基因植株L10种1Dx5-R853突变型转

基因后代中 *1Bx17+1By18* 基因亚基含量最高达 3.8%，比受体材料 L88-31 的 3.1% 含量高出 0.7%。说明在胚乳形成麦谷蛋白聚合体时，不仅表现出加性效应，还存在互作效应^[9]，本文结果支持这一论点。

标记基因 *gus* 仅在胚乳组织中有较强的表达信号，并且在小麦开花 2 周后开始表达，腊熟期表达水平最高。在植物发育过程中，腊熟期是蛋白质与淀粉累积的高峰期，是相关基因表达的高峰。这与前人研究报道的 *1Dx5* 基因在小麦胚乳形成期中表达水平曲线变化^[10] 一致。据此我们认为，外源基因的胚乳组织特异性表达是由 *1Dx5* 启动子调控的。

在 *1Dx5* 的启动子的作用下，两种基因不仅在其 T_0 中表达，而且在其 T_1 、 T_2 和 T_3 中均能稳定地表达，但在其子代中尚未观察到基因沉默的现象。本文中 *1Dx5* 的启动子对两种基因有作用，它不仅作用于麦属基因的表达，而且也作用于非麦属基因的表达，更为重要的是，该启动子能够特异性调控外源基因仅在胚乳细胞中表达。因此，如果想将麦属基因或非麦属基因仅在胚乳细胞中特异性表达，则在寻找表达载体的启动子时，*1Dx5* 的启动子可作为备选启动子，让外源基因在特定时期选定的部位中充分表达。

参考文献

- 1 Tomas TL. Gene expression during plant embryogenesis and germination. *Plant Cell*, 1993, 5: 1401~1410
- 2 Halford NG, Field JM, Blair H et al. Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1a of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 373~378
- 3 Seilmeier W, Belitz H-D, Wiser H. Separation and quantitative determination of high-molecular-weight subunits of glutenin from different wheat varieties and genetic variants of the varieties Sicco. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1991, 192: 124~129
- 4 Bäumlein H, Nagy I, Villaroel R et al. Cis-analysis of a seed protein gene promoter: The conservative RY repeat CATGC-ATG with the legumin box is essential for tissue specific expression of a legumin gene. *Plant J*, 1992, 2: 233~239
- 5 D'Ovidio R, Anderson OD, Masci S et al. Construction of novel wheat high-molecular-weight glutenin gene variability: modification of the repetitive domain and expression in *E. coli*. *J Cereal Sci*, 1997, 25: 1~8
- 6 He GY, Rooke L, Cannell M et al. Current status of transformation in bread and durum wheat and modifications of gluten quality. *Acta Agron Hung*, 1998, 46(4): 449~462
- 7 Shewry PR, Tatham AS, Fido RJ. In: Jones H (ed). *Methods in Molecular Biology—Plant Gene and Expression Protocols*. Totowa: Humana Press, 1995
- 8 Barro F, Cannell ME, Lazzeri PA et al. The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 684~695
- 9 Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F et al. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem*, 2001, 78: 635~646
- 10 Tian C, Liu YF, Deng JX et al. Expression of wheat HMW-GS *1Dx5* gene during different developmental phase. *Chinese Dev Reprod Biol*, 1999, 8: 77~82