

类大麦材料 γ 型高分子量谷蛋白基因不表达的鉴定

颜泽洪* 郭志富 代寿芬 魏育明 郑有良

四川农业大学小麦研究所, 四川都江堰 611830

提要 利用SDS-PAGE检测了2份类大麦属植物的高分子量谷蛋白亚基组成, 在小麦的高分子量区域仅检测到1条蛋白带, 因此怀疑其 γ 型亚基没有表达。根据其它高分子量谷蛋白提取方法的结果以及基因编码区部分序列测定, 确认其 γ 型高分子量谷蛋白基因是沉默的。

关键词 类大麦属; 高分子量谷蛋白基因; 基因沉默

Identification of An Inactive γ -Type High-Molecular-Weight Glutenin Gene in *Crithopsis delileana* (Schult.) Roshev.

YAN Ze-Hong*, GUO Zhi-Fu, DAI Shou-Fen, WEI Yu-Ming, ZHENG You-Liang

Triticaceae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan, Sichuan 611830, China

Abstract Using SDS-PAGE analysis, the high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS) of two *Crithopsis delileana* (Schult.) Roshev. accessions were detected. It was found that the two accessions had the same HMW-GS. Only one HMW-GS with the similar electrophoresis mobility to the γ -type HMW-GS of hexaploid wheat was observed in *C. delileana*. It was not sure whether the γ -type HMW glutenin genes were silenced or not. By using other protein extraction methods and sequencing of partial gene coding region, it was confirmed that, in fact, the γ -type HMW glutenin gene in *C. delileana* accessions was silenced.

Key words *Crithopsis delileana* (Schult.) Roshev.; high-molecular-weight (HMW) glutenin gene; gene silence

作为小麦种子贮藏蛋白之一的高分子量麦谷蛋白含量占种子贮藏蛋白总量的约10%, 其数量和质量对小麦面筋含量及烘烤品质有直接影响^[1~3]。正因为如此, 高分子量谷蛋白基因的表达与沉默备受关注。依基因编码区结构特征, 可分为 x 和 γ 型^[1~4]。在普通小麦中, 由于基因沉默效应, 可正常表达的高分子量谷蛋白基因数目为3~5个^[4]。其中, A_{γ} 经常不表达^[5~7], D_x 、 D_y 和 B_x 经常表达, B_y 和 A_x 有时表达^[4]。

类大麦属材料[*Crithopsis delileana* (Schult.) Roshev., $2n=2x=14$, KK]是小麦族植物中少见的二倍体单种属之一。主要分布在亚洲西南部、非洲北部、中东地区及地中海沿岸, 染色体组为K^[8]。Catalan等^[9]根据叶绿体NADH脱氢酶亚基F部分基因序列的结果, 阐述了类大麦属的系统演化关系; Petersen和Seberg^[10]根据类大麦属叶绿体的 $rpoA$ 基因以及它所编码的RNA聚合酶 α -亚基的序列结构研究的结果, 确立了该属在小麦族中的系统分类地位; Hsiao等^[11]根据rDNA中的内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)的序列差

异, 从分子水平分析了该属与其它小麦族二倍体物种的亲缘关系。迄今, 尚未见对此物种的种子贮藏蛋白的报道。

本文研究类大麦属中不表达的 γ 型高分子量谷蛋白基因, 以期能为认识和利用类大麦属物种的谷蛋白基因提供参考。

材料与方法

以2份类大麦属材料[*Crithopsis delileana* (Schult.) Roshev.]作种子高分子量谷蛋白组成分析。由我所从丹麦引入并收藏。

采用3种方法提取种子蛋白: (1)常规种子蛋白提取方法, 按照我们以前发表的方法^[12]进行。(2)高分子量谷蛋白的选择性沉淀提取, 参照

收稿 2005-04-07 修定 2005-09-26

资助 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金(200458)、教育部重点项目、国家自然科学基金(30370882)、四川省青年基金、四川省科技厅应用基础项目(03TY-029-028-1)。

✉-mail: zhyan104@163.com, Tel/Fax: 028-87283949

Macike 等^[13]的方法进行, 具体步骤为: 半粒种子磨碎, 悬浮于 625 μL 含 1% (W/V) DTT 的 50% 正丙醇中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 提取 1 h, 其间不断混匀; 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 取 400 μL 上清液置于新管中, 加 100 μL 含 1% (W/V) DTT 的正丙醇进行沉淀, 混匀后于室温放置 30 min; 12 000 $\times g$ 离心 5 min, 收集沉淀, 再用含 1% (W/V) DTT 的 60% 正丙醇洗 1 次, 沉淀物用 100 μL 常规提取方法中所用的提取液溶解, 沸水变性 5 min 后上样。(3) 丙酮沉淀提取法, 参见 Verbruggen 等^[14] 和 Melas 等^[15] 的方法, 具体操作为: 按 300 mg 面粉加 15 mL 70% 乙醇的比例悬浮面粉, 于室温下提取 30 min, 不断摇动, 5 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 重复提取 1 次; 残渣中加 15 mL 50% 异丙醇混匀后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 30 min, 5 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 重复提取 1 次, 并用 7.5 mL 50% 异丙醇洗涤 1 次; 残渣中加 3 mL 含 50% 异丙醇、1% DTT (W/V)、0.08 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0) 的提取液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 30 min (不断摇动), 5 000 $\times g$ 离心 5 min, 保留上清液。残渣中再加 3 mL 相同的提取液混匀, 5 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃去沉淀, 合并上清液。于上清液中加入丙酮至 40% (加 4 mL 左右), 静置 10 min 后, 5 000 $\times g$ 离心 5 min, 此沉淀主要为高分子量谷蛋白亚基 (high molecular weight glutenin subunit, HMW-GS)。

然后, 对以上以 3 种方法提取的蛋白进行 SDS-PAGE 分析。由于以前没有类大麦属高分子量谷蛋白的报道, 故以小麦品种“中国春”和“川育 12”所含有的高分子量谷蛋白作为相对分子量标准 [高分子量谷蛋白组成分别为 (null, 7+8, 2+12) 和 (1, 7+8, 5+10)], 根据迁移率区分类大麦属材料中的高分子量谷蛋白和低分子量谷蛋白以及醇溶蛋白。

参见文献 11 的方法, 采用 2 \times CTAB 法进行基因组 DNA 提取。利用扩增 HMW-GS 基因编码区的特异性引物 P₁ (5' AGCTGCAGAGAGTTCTATCA 3') 和 P₂ (5' ATCACCCACAACACCGAGCA 3'), 对基因组 DNA 进行扩增。PCR 反应体系及扩增条件按照我们以前发表的方法^[11] 进行。扩增产物于 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳检测和回收。

PCR 扩增产物回收纯化后, 与 pMD18-T 载

体连接, 转化并筛选阳性克隆。测定阳性克隆序列。

实验结果

1 类大麦材料的 HMW-GS 的 SDS-PAGE 分析

图 1 显示, 2 份来自于丹麦的材料种子蛋白带型完全一致, 在小麦的高分子量谷蛋白区域, 仅有 1 条带 (图 1, 箭头所示), 电泳迁移率介于普通小麦 By8 和 Dy10 亚基之间, 应为 1 个 HMW-GS。根据每个染色体组可编码 1 个 x 型和 1 个 y 型 HMW-GS, y 型亚基的分子量比 x 型小而电泳迁移率较快, 认为箭头所示应是 x 型高分子量谷蛋白。其中的 y 亚基有两种可能: 一种是 y 型亚基在此材料中沉默; 另一种是 y 亚基比普通小麦中最小的 y 型亚基 Dy12 还小 (即迁移率比 Dy12 还快)。我们发现三角形指示的带纹与箭头所示的带纹的染色强度一致, 它可能是 y 亚基。

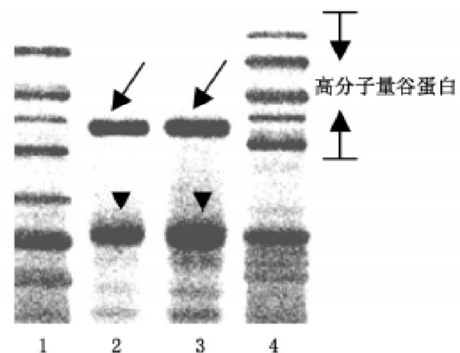


图 1 类大麦属材料的 HMW-GS

Fig. 1 The HMW-GS in *C. delileana*

1: 小麦“中国春”; 2 和 3: 类大麦属材料; 4: 小麦“川育 12”。箭头指示的可能为 x 型亚基; 三角形指示的带纹可能为 y 型亚基。

2 其它蛋白提取方法的验证

如果二倍体类大麦中的 x 和 y 型高分子量谷蛋白基因均可表达, 则特异提取高分子量谷蛋白的选择性沉淀法或丙酮沉淀法提取的高分子量谷蛋白 SDS-PAGE 分析可得到 2 条带; 如果有亚基不表达, 则肯定会少于 2 条。于是, 应用选择性沉淀法和丙酮沉淀法分别提取类大麦材料的高分子量谷蛋白。结果显示, 选择性沉淀高分子量谷蛋白法所得到的蛋白电泳图谱 (图未列出) 除与图 1 结果类似外, 还多出了 1 条带。以往用该方法证明被

认为有3个HMW-GS的节节麦材料中实际只有2个HMW-GS时非常有效^[12]。后经进一步研究,其中的一条被认为是多出的所谓“HMW-GS”实际上是高分子量的醇溶蛋白(也即分子量较大的醇溶蛋白)^[16]。因此,本方法不能排除图1第2泳道三角形指示的蛋白带,揭示它有可能不是醇溶蛋白,也有可能它就是 γ 亚基。于是,丙酮沉淀法又被用于此研究。当丙酮浓度达到80%时,所沉淀出的产物电泳结果便不再包含图1箭头下方的三角形指示的蛋白带,而箭头所示的带纹在两种方法的结果中均存在。因此,该类大麦材料仅包含1个HMW-GS(图2)。

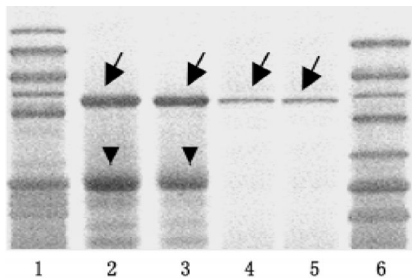


图2 丙酮沉淀法提取的类大麦HMW-GS
Fig.2 The HMW-GS in *C. delileana* extracted by acetone precipitation method

1: 小麦“中国春”; 2和3: 类大麦材料用常规提取方法; 4和5: 类大麦材料用丙酮沉淀法提取; 6: 小麦“川育12”。箭头指示x型HMW-GS; 三角形为图1中指示的可能的 γ 型亚基。

3 PCR扩增和克隆

因2份材料的HMW-GS带型一致,故选取其中1份材料作研究对象。为了验证 γ 型谷蛋白基因的存在,利用特异性扩增高分子量谷蛋白基因的引物 P_1 和 P_2 ,同时扩增出2条DNA片段(图3),分别为2.1和1.7 kb,对应其中的x和 γ 型基因。分别回收2.1和1.7 kb片段,并克隆于pMD18-T载体,获得阳性质粒并测序。

4 序列分析

通过测定2.1和1.7 kb片段的部分DNA序列,发现2.1和1.7 kb片段分别对应其中的x和 γ 型高分子量谷蛋白基因。对2.1 kb片段进行了体外表达,发现其所表达的蛋白与种子来源的蛋白带(图中的箭头指示带)有一致的迁移率,这证实了x型基因是表达的(另文报道)。对1.7 kb片段的N端

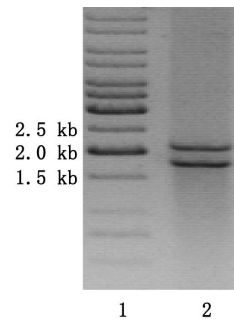


图3 PCR扩增高分子量谷蛋白基因编码区
Fig.3 Amplification of the complete coding regions of HMW glutenin by PCR method
1: DNA分子量标准; 2: PCR扩增产物。

序列进行部分测序,发现有 γ 型高分子量谷蛋白基因特有的5个半胱氨酸(图4)。而对C端部分DNA序列测定后发现,在重复区的倒数第2个六肽重复单元PGGQQQ中的第2位氨基酸甘氨酸(Gly, G)的密码子由于G/A突变,使编码甘氨酸的密码子GGA变为TGA(图4)而成为一编码区内的提前终止密码,导致了 γ 型谷蛋白基因不能编码任何蛋白。

讨论

类大麦材料的SDS-PAGE分析结果显示,在小麦的高分子量区域仅检测到1条可能的HMW-GS的蛋白带。分别通过3种提取高分子量谷蛋白的方法,最终确认在该材料中仅表达1个高分子量谷蛋白基因。用高分子量谷蛋白基因编码区特异引物对其进行扩增,得到2个对应于x和 γ 型谷蛋白基因的DNA片段。对大片段测序显示其为x型亚基,在细菌表达系统中所表达的x型亚基与种子来源的迁移率一致,这表明表达的是x型基因(另文报道)。由于在普通小麦中存在单个亚基独自出现的情况^[4],所以为了明确 γ 型基因是沉默还是缺失(不存在此基因位点),又对1.7 kb片段进行了部分测序。结果显示,其N端含有 γ 型高分子量谷蛋白基因特有的5个半胱氨酸,C端存在编码区内的提前终止密码子。这说明 γ 型基因是存在的,但不表达蛋白。

关于 γ 型谷蛋白基因不表达以 $A\gamma$ 研究最多^[5,7,17,18]。在普通小麦“Cheyenne”中, $A\gamma$ 不表达可能是由于编码区内的提前终止密码子^[5],也可能是由于启动子区域接近转录起始位置的特殊

```

N端  1  AAAGGTGAGGCCTCTAGGCAACTACACTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGAGCTCGTCTGAG
      1  K G E A S R Q L Q C E R E L Q E S S L E

      61  GCGTGCCGGCAGGTCGTGGACCAACAGTTGGCCGGCCAGCTGCCATGGAGCACGGGGCTC
      21  A C R Q V V D Q Q L A G Q L P W S T G L

      121  CAGATGCGGTGCTGCCAGCAGCTCCGAGATGTTAGCGCCAAGTGTGCCCCCGTCCGCGTC
      41  Q M R C C Q Q L R D V S A K C R P V A V

C端  1  CAACCATGACAAGGGCAGCAATCAGGACAAGAGCAACAAGGCTACGACAACCCATATCAC
      1  Q P * Q G Q Q S G Q E Q Q G Y D N P Y H

      61  GTTAGTGTGGGCAGCAAGCGGCCGTCTAAAGGTGGCAAAGGCGCAGCAACCCGTGGCA
      21  V S V G Q Q A A G L K V A K A Q Q P V A

      121  CAGCTGCCGGCAATGTGCCGGCTCGAGGGGGCGACGCGTTGTGCTCCGCCAGTGATAG
      41  Q L P A M C R L E G G D A L S V R Q * *

```

图4 y型谷蛋白基因编码区N和C端DNA部分序列

Fig. 4 Partial DNA sequencing of y-type HMW glutenin gene in terms of N and C terminals

下划线指示y型基因特有的5个半胱氨酸, 星号指示终止密码子。

部位核苷酸序列的替换^[17]。“中国春”Ay不表达可能是由于编码区内的转座子类似序列的插入^[7]。“乌拉尔图”小麦Ay的不表达也可能与编码区内的提前终止密码子有关^[18]。根据以上几种情况, 我们认为, 在类大麦材料中, y型谷蛋白基因不表达可能主要是由于编码区内的提前终止密码子造成的。

参考文献

- Payne PI. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. *Annu Rev Plant Physiol*, 1987, 38: 141~153
- Shewry PR, Tatham AS, Barro P et al. Biotechnology of breadmaking: unraveling and manipulating the multiprotein glutenin complex. *Bio/technol*, 1995, 13: 1185~1190
- Shewry PR, Halford NG, Belton PS et al. The structure and properties of glutenin: an elastic protein from wheat grain. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2002, 357: 133~142
- Payne PI, Lawrence GJ. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res Commun*, 1983, 11: 29~35
- Forde J, Malpica JM, Halford NG et al. The nucleotide sequence of a HMW glutenin subunit gene located on chromosome 1A of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Nucleic Acids Res*, 1985, 17: 6187~6832
- Halford NG, Forde J, Anderson OD et al. The nucleotide and deduced amino acid sequence of an HMW glutenin subunit gene from chromosome 1B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and comparison with those of genes from chromosomes 1A and 1D. *Theor Appl Genet*, 1987, 75: 117~126
- Harberd NP, Flavell RB, Thompson RD. Identification of a transposon-like insertion in a *Glu-1* allele of wheat. *Mol Gen Genet*, 1987, 209: 326~332
- 颜济, 杨俊良. 小麦族生物系统学(第二卷). 北京: 中国农业出版社, 2004. 128~132
- Catalan P, Kellogg EA, Olmstead RG et al. Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 1997, 8(2): 150~166
- Petersen G, Seberg O. Phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae) based on *rpoA* sequence data. *Mol Phylogenet Evol*, 1997, 7(2): 217~230
- Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH et al. Phylogenetic relationships of the monogenic species of the wheat tribe, Triticeae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences. *Genome*, 1995, 38(2): 211~231
- Yan ZH, Wan YF, Liu KF et al. Identification of a novel HMW glutenin subunit and comparison of its amino acid sequence with those of homologous subunits. *Chin Sci Bull*, 2002, 47(3): 220~225
- Macike AM, Lagudah ES, Sharp PJ et al. Molecular and biochemical characterisation of HMW glutenin subunits from *Triticum tauschii* and the D genome of hexaploid wheat. *J Cereal Sci*, 1996, 2: 213~215
- Verbruggen IM, Veraverbeke WS, Vandamme A et al. Simultaneous isolation of wheat high molecular weight and low molecular weight glutenin subunits. *J Cereal Sci*, 1998, 28(1): 25~32
- Melas V, Morel MH, Autran JC et al. Simple and rapid method for purifying low molecular weight subunits of glutenin from wheat. *Cereal Chem*, 1999, 71: 227~234
- Gianibelli MC, Lagudah ES, Wrigly CW et al. Biochemical and genetic characterization of a monomeric storage protein (T1) with an unusually high molecular weight in *Triticum tauschii*. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 497~504
- Halford NG, Forde J, Shewry PR et al. Functional analysis of the upstream regions of a silent and an expressed member of a family of wheat seed protein genes in transgenic tobacco. *Plant Sci*, 1989, 62: 207~216
- Bai JR, Jia X, Liu KF et al. Cloning and characterization of the coding sequences of the 1Ay high molecular weight glutenin subunit genes from *Triticum urartu*. *Acta Bot Sin*, 2004, 46(4): 463~471