

野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*) 低分子量谷蛋白亚基基因的克隆与序列分析

李巧云¹, 安学丽¹, 肖英华¹, 张倩¹, 张艳贞¹, 夏先春², 何中虎^{2,3}, 晏月明¹

(¹首都师范大学生命科学学院, 北京 100037; ²中国农业科学院作物科学研究所/国家小麦改良中心, 北京 100081; ³CIMMYT 中国办事处, 北京 100081)

摘要:【目的】旨在从野生二粒小麦中克隆新的低分子量谷蛋白亚基基因。【方法】首先通过 SDS-PAGE 方法对野生二粒小麦 Y5 和 Y13 的低分子量谷蛋白亚基 (LMW-GS) 进行鉴定, 并利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 方法确定其精确分子量。然后采用 AS-PCR 方法, 运用 1 对 LMW-GS 特异的引物, 分别从 Y5 和 Y13 中扩增并克隆了 2 个亚基的编码基因 (命名为 *LMW-Y5* 和 *LMW-Y13*)。【结果】测序结果表明, 所得基因均为完整的基因序列, 包括上游区域、开放阅读框和下游区域, 无内含子存在。由核酸序列所推导出的氨基酸序列表明, 这两个基因的编码蛋白 (命名为 LMW-Y5 和 LMW-Y13) 均属于 LMW-i 型亚基, 分子量分别为 38.9122 kD 和 31.8708 kD。其中 LMW-Y5 的分子量与质谱鉴定的分子量基本一致, 表明该蛋白亚基没有翻译后修饰存在。但 LMW-Y13 的分子量与 SDS-PAGE 和质谱鉴定结果存在较大差异, 其原因可能是在克隆过程中发生了重复区的碱基丢失。【结论】明确了野生二粒小麦两个 LMW-i 型亚基的分子结构特征, 并讨论了 LMW-i 型亚基分子结构与品质的关系以及在小麦品质改良中的应用潜力。

关键词: 野生二粒小麦; LMW-GS; AS-PCR; 基因克隆

Cloning and Molecular Characterization of LMW Glutenin Subunit Genes in *Triticum dicoccoides*

LI Qiao-yun¹, AN Xue-li¹, XIAO Ying-hua¹, ZHANG Qian¹, ZHANG Yan-zhen¹, XIA Xian-chun², HE Zhong-hu^{2,3}, YAN Yue-ming¹

(¹College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037; ²Crop Science Institute / National Wheat Improvement Center, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081; ³CIMMYT-China, C/O, CAAS, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to clone new genes coding for LMW-GS from *Triticum dicoccoides* (AABB, 2n=4x=28). 【Method】First, SDS-PAGE were used to identify low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) in two *Triticum dicoccoides* Y5 and Y13. Then matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was used to determine accurate molecular weights of the LMW-GS. Gene coding for two LMW-GS, named LMW-Y5 and LMW-Y13, were amplified and cloned from Y5 and Y13 respectively, using AS-PCR method and one pair of primers specific to LMW-GS. 【Result】Two complete gene sequences were obtained, which comprised of upstream, open reading frame (ORF) and downstream, and no introns were present. The deduced amino acid sequences showed that both the two protein (named LMW-Y5 and LMW-Y13) coding by LMW-Y5 and LMW-Y13 belonged to the LMW-i type subunits with the estimated molecular weight 38.9122kDa and 31.8708kDa. The molecular weight of LMW-Y5 was consistent with the M_s identified by MALDI-TOF-MS, suggesting that there were no types of protein translational modifications (PTMs) in this subunit. However, the M_rs of LMW-Y13

收稿日期: 2006-03-13; 接受日期: 2006-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571154) 和 “948” 重大国际合作项目 (2003-Q01) 资助

作者简介: 李巧云、安学丽、肖英华同为第一作者。李巧云 (1978-), 女, 山东聊城人, 博士研究生, 研究方向为小麦分子遗传学。安学丽 (1978-), 女, 河南安阳人, 博士研究生, 研究方向为小麦分子遗传学。肖英华 (1977-), 女, 北京人, 硕士研究生, 研究方向为小麦分子遗传学。通讯作者晏月明 (1960-), 男, 四川重庆人, 教授, 博士, 研究方向为植物分子遗传与蛋白质组学。Tel: 010-68902777; Fax: 010-68902777; E-mail: yanyym@hotmail.com

deduced by DNA sequences was 7.6827kDa lower than that from MS, which may result from a single deletion of about 200bp occurred within the repetitive domain of the recombinant clones. 【Conclusion】 Molecular structures of LMW-i type subunits in *Triticum dicoccoides* were first reported in this article. In addition, the relationships between the molecular structures and functions of LMW-i type genes and their potential for wheat quality improvement were also discussed.

Key words: *Triticum dicoccoides*; LMW-GS; AS-PCR; Molecular cloning

0 引言

【研究意义】野生二粒小麦(*Triticum dicoccoides*, AABB, $2n=4x=28$)是普通小麦基因组 AABB 的供体,具有较高的蛋白含量和丰富的遗传变异,是小麦品质改良的重要基因资源。克隆与分析野生二粒小麦低分子量谷蛋白亚基基因对于丰富 LMW-GS 基因资源、定向改良小麦品质以及进一步了解贮藏蛋白基因分子结构与进化关系具有重要意义。【前人研究进展】根据十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)迁移率的不同,小麦种子麦谷蛋白可分为高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)和低分子量谷蛋白亚基(LMW-GS)。其中, HMW-GS 由位于第1同源群染色体长臂上的 *Glu-1* 位点(*Glu-1A*、*Glu-1B*和*Glu-1D*位点)基因编码, LMW-GS 由位于该染色体短臂上的 *Glu-3* 位点(*Glu-3A*、*Glu-3B*和*Glu-3D*位点)基因编码^[1,2]。研究表明,不仅 HMW-GS 组成对小麦烘烤品质有重要影响^[3,4], LMW-GS 也对小麦加工品质起着不可忽视的作用^[5-8]。有关小麦 HMW-GS 结构及其编码基因克隆及应用等方面的研究已经较为深入^[9-12]。由于 LMW-GS 组成复杂,分离较为困难,研究相对滞后。近年来国内外加强了对小麦 LMW-GS 的研究,特别是在分离方法的改进、编码基因克隆与分子结构特征及其功能研究等方面都取得了显著的进展^[13]。

【本研究切入点】野生二粒小麦是小麦品质改良的重要基因资源。但迄今为止有关野生二粒小麦 LMW-GS 候选基因鉴定和克隆的研究国内外很少报道。【拟解决的关键问题】本研究首先利用 SDS-PAGE 方法对两个野生二粒小麦材料 Y5 和 Y13 的 LMW-GS 进行分离鉴定,并用质谱技术确定其精确分子量,然后利用一对特异 PCR 引物从这两个小麦材料中克隆新的 LMW-GS 基因 I。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

供试材料为野生二粒小麦 Y5 和 Y13 (原编号分别为 CWI16984 和 CWI17128),从 CIMMYT 引进。

1.2 麦谷蛋白提取和 SDS-PAGE

小麦种子 LMW-GS 蛋白的提取,参考文献^[14, 15]的方法。LMW-GS 的分离采用 SDS-PAGE 方法^[16]。

1.3 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析

LMW-GS 的提取同上,将提取后的样品用 80%预冷的丙酮在 -20°C 下沉淀 2 h,然后,10 000 r/min 离心 10 min。经真空干燥后,沉淀用洗脱液(0.5%三氟乙酸+50%乙腈)溶解,再经 ZIPTip 浓缩后,1 μl 样品用于 MALDI-TOF-MS 分析,所用仪器为日本岛津公司的 AXIMA-CFRTMPlus MS 型基质辅助激光解析电离飞行质谱仪,配有 N_2 激光(337 nm, 3Hz, 脉冲 3 ns)。所用基质为芥子酸胆碱(SA, 3, 5-二甲氧-4-羟基香茅酸),样品介于两层基质之间。光谱的获得采用线性模式,分子量范围 10 000~100 000。

1.4 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

以小麦种子为材料,基因组 DNA 的提取参考 Sun 等^[17]的方法。采用设计的一对特异 LMW-GS 基因引物进行 AS-PCR 扩增,引物序列为 LMW-1: 5'-GCC TTTCTTGTTTACGGCTGA-3', LMW-2: 5'-GATTGACATCCACACAATGCC-3',由上海生工合成。PCR 反应体系为 50 μl ,内含 2.5U La Taq 酶(大连宝生物公司-TaKaRa),100 ng 模板 DNA,25 μl 2 \times GC buffer II (含 MgCl_2^{2+}),0.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP,每条引物 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,反应 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.5 目的基因的克隆、测序与序列分析

PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳分离,用 DNA 快速回收试剂盒(TaKaRa),对目的片段进行回收。然后将纯化的产物连接到 pGEM-T Easy 载体(Promega)上,转化大肠杆菌 DH-5 α 。DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。序列分析软件为 BioEdit7.0。

2 结果与分析

2.1 野生二粒小麦 LMW-GS 的鉴定

Y5 和 Y13 的 LMW-GS 鉴定采用单向一步 SDS

PAGE 法, 结果如图 1 所示。可以看出, 野生二粒小麦 Y5 和 Y13 的 LMW-GS 可分为 B、C 两个区。其中, Y5 含有 3 条 B 亚基, Y13 含有 4 条 B 亚基。C 区的亚基则较多, 分别有 7 条和 5 条。

为了获得 LMW-GS 的精确分子量, 对野生二粒小麦 Y5 和 Y13 的 LMW-GS 进行了 MALDI-TOF-MS 质谱分析 (图 2)。可以看出, 这 2 个材料在分子量 38.6395 kD 和 39.5535 kD 处均出现一个明显的峰, 结合 SDS-PAGE 图谱, 可以确认为 LMW B 区的两个亚基 (图 1 中箭头所示)。

2.2 LMW-GS 基因的 AS-PCR 扩增与克隆

LMW-GS 特异性引物 LMW-1 和 LMW-2 对野生二粒小麦 Y5 和 Y13 的 PCR 扩增结果如图 3, 结果显示两个材料分别扩增出一条约 1 600 bp 和 1 700 bp 左右的特异性条带, 片段大小与过去克隆的 LMW-GS 基因全长大致相当。将目的片段回收纯化后, 连接到 pGEM-T Easy 载体上, 得到重组质粒, 用 *EcoR* I 酶切鉴定, 获得阳性克隆。

2.3 LMW-GS 基因序列分析

两个 PCR 特异扩增产物进行 DNA 测序后, 分别得到 1 649 bp 和 1 472 bp, 包括 385 bp 的上游、1 071 bp 和 894 bp 的编码区, 193 bp 的下游。与已知的 LMW-GS 基因进行序列对比分析后发现同源性较高, 具有相似的结构特征。因此推断所克隆的两个新基因为 LMW-GS 基因, 并命名为 *LMW-Y5* 和 *LMW-Y13*。*LMW-Y13* 所测的基因序列长度较 PCR 扩增片段少了

约 200 bp, 这可能与克隆过程中重复区的缺失有关^[18]。两个基因的上游核苷酸序列具有典型的 LMW-GS 基因启动子序列, 一个 CAAT 框 (-10 到 -6 bp)、两个 TATA 盒 (-79 bp 到 -74 bp 和 -62 bp 到 -57 bp) 以及位于 -305 到 -279 bp 之间的一个“ACATGTAA AGTTAATAAGGTGAGTCAT”胚乳框 (也称为 -300 元件)。基因的编码区无内含子出现, 3'端有两个连续的终止密码子。*LMW-Y5* 和 *LMW-Y13* 分别编码 355 与 296 个氨基酸残基, 两个基因的下游含有 3 个序列为 AATAAA 的多聚腺苷酸信号 (polyadenylation signals)。

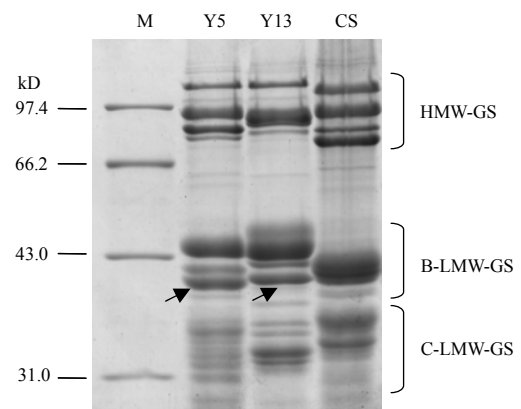


图 1 野生二粒小麦 Y5、Y13 谷蛋白亚基 SDS-PAGE 图

Fig. 1 SDS-PAGE of glutenin subunits from *Triticum dicoccoides* accessions Y5 and Y13

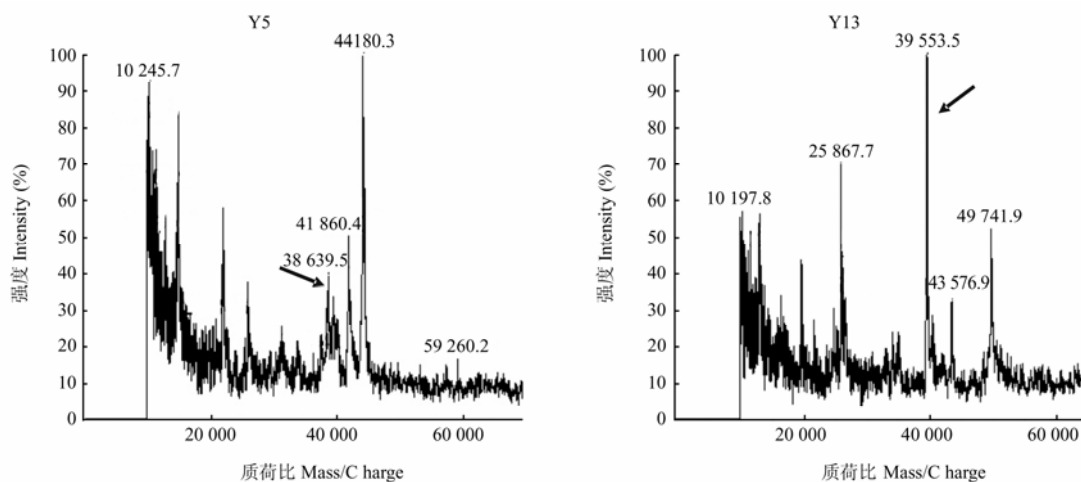
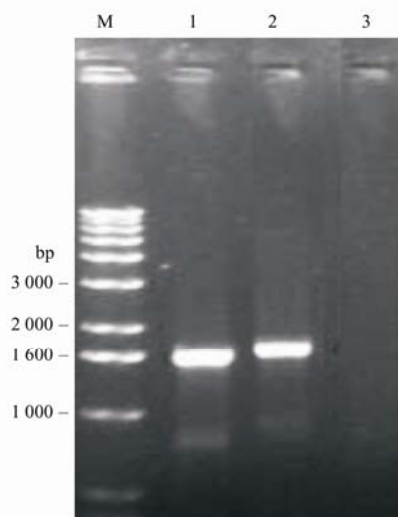


图 2 野生二粒小麦 Y5 和 Y13 中 LMW-GS 的 MALDI-TOF-MS 鉴定

Fig. 2 LMW-GS characterization of Y5 and Y13 accessions by MALDI-TOF-MS



M. 分子量标记; 1. Y5 的 PCR 产物; 2. Y13 的 PCR 产物
M. Marker; 1. PCR production of Y5; 2. PCR production of Y13

图 3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 PCR amplification results on agarose gel

由核苷酸序列推导出的 *LMW-Y5* 和 *LMW-Y13* 的氨基酸序列如图 4 所示。从中可以看出, 前 20 个氨基酸为信号肽, 它在蛋白质向内质网的运输过程中被切除。紧接着是 N-端保守区, 由 13 个氨基酸残基组成, 第一个氨基酸均为异亮氨酸, 根据 *LMW-GS* 的分类方法^[19, 20], *LMW-Y5* 和 *LMW-Y13* 的编码蛋白为 *LMW-i* 型亚基, N-端保守序列为 ISQQQ-。两个基因的重复区主要由 $P_{1-2}FSQ_{2-6}$ 重复序列构成, 重复序列的多少决定了基因的长度。最后为 C-端保守区, 也是半胱氨酸富集区, 两个基因的 8 个半胱氨酸均出现在该区域。根据 *LMW-Y5* 和 *LMW-Y13* 的氨基酸序列推导出的成熟蛋白的分子量分别为 38.9122 kD 和 31.8708 kD, 其中 *LMW-Y5* 与 MALDI-TOF-MS 分析得到的精确分子量 38.6395 kD 相差 272.66 D, 在试验允许误差范围之内^[21], 说明 *LMW-Y5* 亚基不存在翻译后的修饰。而 *LMW-Y13* 亚基由于缺失约 200 bp 的碱基 (大约 67 个氨基酸), 与 MALDI-TOF-MS 测得的分子量少 7.6827 kD, 可以推断质谱分析得到的 39.5535 kD 应该是该亚基的实际分子量 (图 2)。*LMW-Y5* 和 *LMW-Y13* 基因已登录 GenBank, 登录号分别为 DQ217661 和 DQ217662。

LMW-Y5 和 *LMW-Y13* 亚基与其它 3 个来自 GenBank 不同类型 *LMW* 亚基 AY542896 (*LMW-i*)、

Y17845 (*LMW-s*)、AY748826 (*LMW-m*) 的氨基酸序列比较分析 (图 4) 表明, 除 Y17845 由于序列不完全外, 4 个亚基均具有 20 个氨基酸组成的信号肽, N-端区 3 个 *LMW-i* 型亚基相似性较高, *LMWY-5* 与 AY542896 相比仅有 1 个氨基酸的差别, *LMWY-13* 在此区缺失 7 个氨基酸, Y17845 的第 1 个半胱氨酸出现在 N-端区。重复区变异最大, 主要以 $P_{1-2}FSQ_{2-6}$ 重复序列组成, 一般而言, 不同类型 *LMW* 亚基重复次数存在较大差异, 而同一类型亚基差异较小, 即 *LMW-Y5* 13 个, *LMW-Y13* 5 个, AY542896 12 个, Y17845 11 个, AY748826 2 个。由于 *LMW-Y13* 基因在克隆过程中发生了重复区碱基的缺失, 导致基因重复序列数较少。已登录 GenBank 的来自野生二粒 *LMW-m* 型基因 AY748826 的 $P_{1-2}FSQ_{2-6}$ 重复序列数只有 2 个, 也可能是由同样的原因引起的。此外, 在 3 个 *LMW-i* 型亚基中还出现了 P_2ISQ_{3-4} 、 P_2YSQ_4 、 $P_{1-2}FTQ_4$ 等重复序列, 其中 *LMW-Y5* 与 AY542896 和 Y17845 重复序列的数目和类型均较相似。Y17845 在重复区出现第 1 个半胱氨酸残基, C-端保守区富含谷氨酰胺, 3 个 *LMW-i* 型亚基在 8 个保守的位置含有 8 个半胱氨酸残基, 而 Y17845 和 AY748826 含有 7 个半胱氨酸残基。

3 讨论

近年来随着研究的不断深入, 对 *LMW-GS* 的分子结构已有一定的了解^[13]。本文首次报道了野生二粒小麦两个 *LMW-i* 型亚基的分子结构特征, 对进一步了解 *LMW-GS* 基因的系统进化、结构与功能以及丰富小麦品质改良的基因资源具有重要意义。

低分子量谷蛋白亚基根据 N-端第一个氨基酸的不同, 有 *LMW-m*、*LMW-s* 和 *LMW-i* 等 3 种类型亚基^[13]。*LMW-i* 型亚基由 Pitts 等^[22]首次报道, 主要特征是缺乏 N-端区, 信号肽之后都以 ISQQQ 开始重复区。尽管 N-端区丢失, 但 C 端区都存在 8 个半胱氨酸残基。有研究表明, *LMW-i* 型亚基基因可以在小麦胚乳中正常表达^[19, 20]。如图 4 所示, 所有 *LMW* 谷蛋白亚基都含有 8 个保守的半胱氨酸残基。但 *LMW-m* 型和 *LMW-s* 型低分子量谷蛋白亚基的半胱氨酸残基则有在 N-端和重复区域出现的情况。半胱氨酸残基的分布和数量的差异会导致谷蛋白多聚体功能的不同, 尤其是 *LMW-i* 型亚基^[13]。据报道, 第 1 和第 7 个半胱氨酸残基形成分子间二硫键, 其它的则形成分子内二硫键^[16, 18, 22]。因此, 在蛋白质二级结构和三级结构

上, LMW-i 型谷蛋白亚基可能与 LMW-m 型和 LMW-s 型亚基存在很大差异。Cloutier 等^[19]的研究表明, LMW-i 型谷蛋白亚基区别于其它两种亚基的半胱氨酸残基可能位于某一紧密环 (tight loop) 的中间部分, 该环是通过在第 2 和第 3 个半胱氨酸残基之间形成二硫键而形成的, 这种结构可能对谷蛋白多聚体的粘弹性产生重要影响。研究显示, 在面包小麦品种 Glenlea 中, 由 1A 染色体组控制的 LMW-i 型谷蛋白亚基基因

AY542896 编码的蛋白亚基 (LMW-50) 在决定小麦品种 Glenlea 的优良品质方面起着十分重要的作用, 因此, 推测 AY542896 基因对于改良小麦品质特性有可能具有重要作用^[19]。由于 LMW-Y5 和 LMW-Y13 基因与 AY542896 基因同属于 LMW-i 型亚基, 蛋白质序列与结构特征也具很高相似性, 因此它们有可能是对小麦品质有重要作用的新的候选基因, 进一步的表达与功能鉴定正在进行之中。

LMW-Y5	1	MKTFVLFALL	ALAAASAVAQ	ISQQQQPPLF	SQQQQPPFSQ	QQQ-----	-----PPF	46
LMW-Y13	1	MKTFVLFALL	ALAAASAVAQ	ISQQQQ---	---QPPFSQ	QQQ-----	-----PPF	38
AY542896	1	MKTFVLFALL	ALAAASAVAQ	ISQQQQPPPF	SQQQQPPFSQ	QQQ-----	-----PPF	46
Y17845	1	-----	-VAATSALAQ	MENSHIPGLE	RPSQQQPLFP	QQTLSHHHQ	QPIQQQFQQF	49
AY748826	1	MKTFVLFALL	AVVVTCAIAQ	METSCTPGL	RPWQQQPLQP	Q-----	-----QTF	44
			信号肽 ←	N 端 ←				
LMW-Y5	47	SQQQ-----	QSPFSQQQQ-	PPFSQQQQSP	-----FS	QRFPISQQQQ	PQFLQQQQPP	91
LMW-Y13	39	SQRQ-----	QSPFSQQQQQ	PFFLQQQQFS	-----FS	QRFPISQQQ-	-----	73
AY542896	47	SQQQ-----	QSPFSQQQQQ	PPFSQQQQFP	-----FS	QRFPISQQQQ	LPFSQQQQPQ	92
Y17845	50	PQQQPCSQQQ	QQPFLSQQQQ	PPFSQQQQFP	FSQQQQPVLP	QQPFSFSQQQL	PPFSQQQQPP	109
AY748826	45	FQQ-----	PPFSQQQQ-	PPFSQQQQP	-----FP	QQPFSFSQ-	-----	66
LMW-Y5	92	FSQQQQPPFS	QQQQPPYSQQ	QQPPFSQQQQ	PPFSQQQQPP	FS-----	-----	133
LMW-Y13	73	-----	-----	-----	-----	-----	-----	73
AY542896	93	FSQQQQPPYS	QQQQPPYSQQ	QQPPFSQQQQ	PPFSQQQQPS	FSQQQQQPPF	TQQQQPPFSQ	152
Y17845	110	FSQQQQPVLP	Q--QPFSQQQ	QLPPFSQQLP	PFSQQQQFVL	FQQ-----	-----	150
AY748826	66	-----	---QPFSQQQ	-----	-----	-----	-----	73
LMW-Y5	133	-----Q	QQQQQQPPFT	QQQQPPFSQQ	PPISQQQQPP	FSQQQQF---	---PFSQQQQ	178
LMW-Y13	73	-----Q	QQQQQQPPFT	QQQQPPFSQQ	PPISQQQQPP	FSQQQQF---	---PFSQQQQ	118
AY542896	153	QSPISQQQQQ	QQQQQQPPFT	QQQQPPFSQQ	PPISQQQQPP	FSQQQQF---	---PFSQQQQ	206
Y17845	150	-PPFSQQQLP	PFSQQQLPPFS	QQQQPVLPFQQ	PPFSQQQQQP	ILFQQPPFSQ	QQQPVLQQQQ	209
AY748826	73	-----	-----PLFS	QQQQPVLPFQQ	PAFSQQQYQ-	-----	---QLLQQQ	102
							重复区 ←	
LMW-Y5	179	IPVIHPSVLQ	QLNPKVFLQ	QQCIPVAMQR	CLARSQMLQQ	SICHVMQQQC	CQQLRQIFEQ	238
LMW-Y13	119	IPVIHPSVLQ	QLNPKVFLQ	QQCIPVAMQR	CLARSQMLQQ	SICHVMQQQC	CQQLRQIFEQ	178
AY542896	207	IPVIHPSVLQ	QLNPKVFLQ	QQCIPVAMQR	CLARSQMLQQ	SICHVMQRQC	CQQLRQIFEQ	266
Y17845	210	IPFVHPSILQ	QLNPKVFLQ	QQCSPVAMPQ	SLARSQMLQQ	SSCHVMQQQC	CQQLPQIFPQ	269
AY748826	103	IPIVHPSVLQ	QLNPKVFLQ	QQCSPVAMPQ	RLARSQMRQQ	SSCHVMQQQC	CQQLPRIFEQ	162
LMW-Y5	239	SRHESIRAIIV	YSIILQQQQR	QQQQQG---	-RSIIQYQQQ	QPQLLGQCVS	QPQQQLQQQ-	292
LMW-Y13	179	SRHESIRAIIV	YSIILQQQQQ	QQQQQG---	QSIQYQQQ	QPQLLGQCVS	QPQQQLQQQ-	233
AY542896	267	SRHESIRAIIV	YSIILQQQQQ	QQQQQQQQQQ	QSIQYQQQ	QPQLLGQCVS	QPQQQLQQQ-	325
Y17845	270	SRYEAIRAIIV	YSIILQEQQQ	V-----	-QSIQTQQQ	QPQLLGQCVS	QPQQSQQQ-	318
AY748826	163	SRYEAIRAIIV	YSIILQEQQ-	-----	-QFVQFQQQ	QPQSSVEVVY	QPQQSQQQF	210
LMW-Y5	292	-----	-LRQQFQQQQ	LTHGAFLOPH	QIAQLEVMTS	IALRNLPMMC	SVNVPLYETT	341
LMW-Y13	233	-----	-LQQFPQQQQ	LAHGTFLOPH	QIAQLEVMTS	IALRTLPTMC	SVNVPLYETT	282
AY542896	325	-----	-LQQFPQQQQ	LAHGTFLOPH	QIAQLEVMTS	IALRTLPTMC	SVNVPLYETT	374
Y17845	318	-----	-LQQFPQQQQ	LAQGTFLOPH	QIAQLELMTS	IALRTLPTMC	NVNVPLYRTT	367
AY748826	211	GQCSFQQFPQQ	LLGQQFPQQQ	VQGGTFLOPH	QIARLEVMTS	IALRTLPTMC	SVNVPLYSFI	270
LMW-Y5	342	TSVPLGVGIG	VGVI	355				
LMW-Y13	283	TSVPLGVGIG	VGVI	296				
AY542896	375	TSVPLGVGIG	VGVI	388				
Y17845	368	TRVPCVGTG	VGAY	381				
AY748826	271	TSVPCVGSR	VGAY	284				
			C 端 ←					

图 4 LMW-Y5 和 LMW-Y13 亚基氨基酸序列及与其它 3 个 LMW 亚基的比较

Fig. 4 The deduced amino acid sequences of LMW-Y5 and LMW-Y13 subunits and comparison with other 3 LMW subunits

另外, 本试验中含有目的基因的重组质粒经过测序后发现, 基因 LMW-Y13 比 PCR 扩增结果短了约 200 个碱基, 以前也有过类似的报道^[18], *E. coli* 不同重组克隆重复区内常常会发生 50~200 bp 的缺失, 其分子机理尚不十分清楚。为了避免碱基的缺失, Masci 等^[18]

认为应采用 PCR 产物直接进行基因测序, 但效果有待进一步探索。

4 结论

从野生二粒小麦材料 Y5 和 Y13 中克隆得到两个

LMW-GS 基因, 分别命名为 *LMW-Y5* 和 *LMW-Y13*, GenBank 登录号分别为 DQ217661 和 DQ217662。两个基因的上游核苷酸序列均具有典型的 LMW-GS 基因特征, 包括 1 个 CAAT 框 (-10 到 -6 bp)、2 个 TATA 盒 (-79 bp 到 -74 bp 和 -62 bp 到 -57 bp) 以及位于 -305 到 -279 bp 之间的 1 个“ACATGTAAA GTTAATAAGGTGAGTCAT” 胚乳框 (也称为 -300 元件)。由核苷酸序列推导出的氨基酸序列也符合典型的 LMW-GS 基因所推导出的氨基酸序列特征, 即信号肽由 20 个氨基酸残基组成, N 端区域含有 13 个氨基酸残基, 重复区富含脯氨酸和谷氨酰胺, C 端区域高度保守, 含有 8 个半胱氨酸残基。因其 N-端保守区第一个氨基酸均为异亮氨酸, 根据 LMW-GS 的分类方法^[19, 20], 这两个基因的编码蛋白均为 LMW-i 型亚基, N-端保守序列为 ISQQQ-。*LMW-Y5* 和 *LMW-Y13* 的编码区长度分别为 1 071 bp 和 894 bp, 可分别编码 355 与 296 个氨基酸。其中, 第一个基因是全长, 第二个基因的重复区约有 200 bp 的缺失。据推测, 这两个 LMW-i 型亚基基因有望成为改良小麦品质的新的候选优质基因。

References

- [1] Payne P I. Genetics of wheat storage protein and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annual Review of Plant Physiology*, 1987, 38: 141-153.
- [2] Singh N K, Shpherd K W. Linkage mapping of the genes controlling endosperm proteins in wheat. I. Genes on the short arms of group 1 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1988, 75: 628-641.
- [3] Payne P I, Corfield K G, Holt L M, Blackman J A. Correlations between the inheritance of certain high molecular weight subunits of glutenin and bread making quality in progenies of six crosses of bread wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1981, 32: 51-60.
- [4] Payne P I, Lawrence G J. 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 Research Communications*, 1983, 11: 29-35.
- [5] Luo C, Griffin W B, Brandlard G, McNeil D L. Comparison of low and high molecular weight wheat glutenin allele effects on flour quality. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 1088-1098.
- [6] Gupta R B, Shepherd K W. Genetic control of LMW glutenin subunits in bread wheat and association with physical dough properties. In: Lasztity R, Bekes F. *3rd Int Workshop on Gluten Proteins*. Singapore: World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 1987: 13-19.
- [7] He Z H, Liu L, Xia X C, Liu J J, Pena R J. Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality of Chinese bread wheats. *Cereal Chemistry*, 2005, 82: 345-350.
- [8] Nieto-Taladriz M T, Perretant M R, Rousset M. Effect of gliadins and HMW and LMW subunits of glutenin on dough properties in the F₆ recombinant inbred lines from a bread wheat cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88: 81-88.
- [9] 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 bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 77: 689-700.
- [10] Yan Y, Zheng J, Xiao Y, Yu J, Hu Y, Cai M, Hsam S L K, Zeller F J. Identification and molecular characterization of a y-type *Glu-1D'* 1 glutenin gene of *Aegilops tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 1349-1358.
- [11] Barro F, Rooke L, Bekes F, Gras P, Tatham A S, Fido R, Lazzeri P A, Shewry P R, Barcelo P. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 1295-1299.
- [12] Alvarez M L, Guelman S, Halford N G, Lustig S, Reggiardo M I, Ryabushkina N, Schewry P, Stein J, Vallejos R H. Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 319-327.
- [13] D'Ovidio R, Masci S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 2004, 39: 321-339.
- [14] Singh N K, Shepherd K W, Cornish G B. A simplified SDS-PAGE procedure for separation LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 1991, 14: 203-208.
- [15] Gupta R B, MacRitchie F. A rapid one-step one-dimensional SDS-PAGE procedure for analysis of subunit composition of glutenin in wheat. *Journal of Cereal Science*, 1991, 14: 105-109.
- [16] Yan Y, Hsam S L K, Yu J Z, Jiang Y, Ohtsuka I, Zeller F J. HMW and LMW glutenin alleles among putative tetraploid and hexaploid European spelt wheat (*Triticum spelta* L.) progenitors. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 1321-1330.
- [17] Sun M, Yan Y, Jiang Y, Xiao Y, Hu Y, Cai M, Li X, Hsam S L K, Zeller F J. Molecular cloning and comparative analysis of a y-type inactive HMW glutenin subunit gene from cultivated emmer wheat (*Triticum dicoccum* L.). *Hereditas*, 2004, 141: 46-54.
- [18] Masci S, D'Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda D D. Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and

- the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiology*, 1998, 118: 1147-1158.
- [19] Cloutier S, Rampitsch C, Penner G A, Lukow O M. Cloning and expression of a LMW-i glutenin gene. *Journal of Cereal Science*, 2001, 33: 143-154.
- [20] Ikeda T M, Nagamine T, Fukuoka H, Yano H. Identification of new low-molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 680-687.
- [21] Hickman D R, Roepstorff P, Shewry P R, Tatham A S. Molecular weights of high molecular weight subunits of glutenin determined by mass spectrometry. *Journal of Cereal Science*, 1995, 22: 99-103.
- [22] Pitts E G, Rafalski J A, Hedgcoth C. Nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of a genomic gene region for a low molecular weight glutenin. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 11376.
- [23] Lew E J L, Kuzmicky D D, Kasarda D D. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chemistry*, 1992, 69: 508-515.

(责任编辑 孙雷心)