

2000, 28(6) 1-5

第28卷 第6期
2000年12月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 28 No. 6
Dec. 2000

[文章编号] 1000-2782(2000)06-0001-05

小偃6号高分子质量麦谷蛋白14和
15亚基来源分析

范三红, 郭蔼光

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 西农校区 712100)

[摘要] 运用 SDS-PAGE 和 PCR 分析了小偃6号及其亲本中高分子质量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)组成。结果表明,小偃6号的2个亲本 ST2424/464 和小偃96 中都存在14和15亚基,而远缘种长穗偃麦草中不存在14和15亚基。从而证明长穗偃麦草并非小偃6号14和15亚基的来源,而 ST2424/464 和小偃96 均有可能是14和15亚基的提供者。通过PCR分析发现了偃麦草中1个不同于普通小麦的麦谷蛋白基因。

[关键词] 小麦;高分子质量麦谷蛋白;SDS-PAGE;PCR
[中图分类号] Q786; S512.10 **[文献标识码]** A

偃麦草

小麦的面包加工品质与小麦的高分子质量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)组成密切相关^[1,2]。国外研究表明5+10亚基是赋予小麦优良面包加工品质的优质亚基,而2+12亚基为劣质亚基。小偃6号和陕225是我国的优质面包小麦^[3,4],它们的亚基组成为1,14+15,2+12,不仅没有5+10亚基,而且存在公认的劣质亚基2+12。国内研究认为^[3,5]14+15亚基具有类似5+10亚基的功能。对于小偃6号中14+15亚基的来源尚未见报道,一些学者倾向于认为小偃6号和陕225中的14+15亚基来源于长穗偃麦草。最近一些学者将研究转向小麦远缘种中的HMW-GS^[6],一方面为了阐明进化关系,另一方面期望寻找新的麦谷蛋白基因。本研究通过SDS-PAGE和PCR从蛋白和基因两个水平对小偃6号及其亲本的HMW-GS进行分析,以阐明14+15亚基的来源,并试图从偃麦草中寻找新的麦谷蛋白基因。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小偃6号、陕225、ST2424/464、小偃96、丰产1号、丹麦1号、西农6028、碧玉麦、长穗偃麦草、中国春、CHEYENNE等种子由陕西省农科院种质所、西北植物研究所提供;提取DNA所用的长穗偃麦草和中间偃麦草叶片取自西北植物研究所。SDS-PAGE和PCR试剂为生物工程公司产品,PCR引物由宝生生物工程公司合成,其他试剂均为分析纯。

1.2 方 法

HMW-GS提取^[6,7] 取单粒种子粉碎后放入1.5 mL离心管,加入700 μ L 体积分数

[收稿日期] 1999-12-24

[基金项目] 国家农业生物技术开放实验室资助项目(HMW-GS14和15研究)

[作者简介] 范三红(1971—),男,讲师,在读硕士。

70%乙醇 40℃提取 1 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 1.4 mL DMSO 混匀过夜, 10 000 r/min 离心 10 min 弃去上清液, 沉淀用体积分数 70%乙醇洗 2 次, 向沉淀中加入 800 μ L 提取液, 室温放置 30 min, 沸水浴加热 5 min, 离心后上清液用于电泳。

SDS-PAGE 采用 Laemmli 电泳系统, 分离胶 10%, 交联度 2.6%, 浓缩胶 3%, 交联度 4.8%。电泳采用恒流, 进入分离胶以前用 10 mA 电流, 进入分离胶后采用 20 mA 电流。

DNA 提取^[8] 采用标准的 CTAB 法。

PCR 根据麦谷蛋白保守的启动子区设计了引物 P1, 根据保守的 N-端序列设计了引物 P2^[9], 根据 C-端保守区设计了引物 P3。PCR 条件为, 94℃预变性 180 s, 94℃变性 60 s, 60℃复性 120 s, 72℃延伸 180 s, 35 个循环, 最后 72℃延伸 600 s。模板 DNA 为 100 ng (100 μ L 反应体系), 电泳采用质量分数 1.2% 的琼脂糖凝胶, 电压为 5 V/cm。

2 结果与分析

要揭示小偃 6 号中 14 和 15 亚基的来源首先应分析小偃 6 号的亲缘关系, 图 1 是小偃 6 号的谱系图。SDS-PAGE 对小偃 6 号及其亲本 HMW-GS 组成分析结果见图 2。从 SDS-PAGE 图谱中可看出, 小偃 6 号的 2 个亲本 ST2424/464 和小偃 96 中都有 14 和 15 亚基, 而长穗偃麦草中不存在 14 和 15 亚基。图 2(b) 显示的是一张改变了分离胶 pH 值的 SDS-PAGE, 将正常条件下分离胶 8.8 的 pH 改为 9.3。图 2(a, b) 对照可发现, 14 亚基在小偃 6 号的亲本西农 6028、碧玉麦、丹麦 1 号等品种中都有出现。

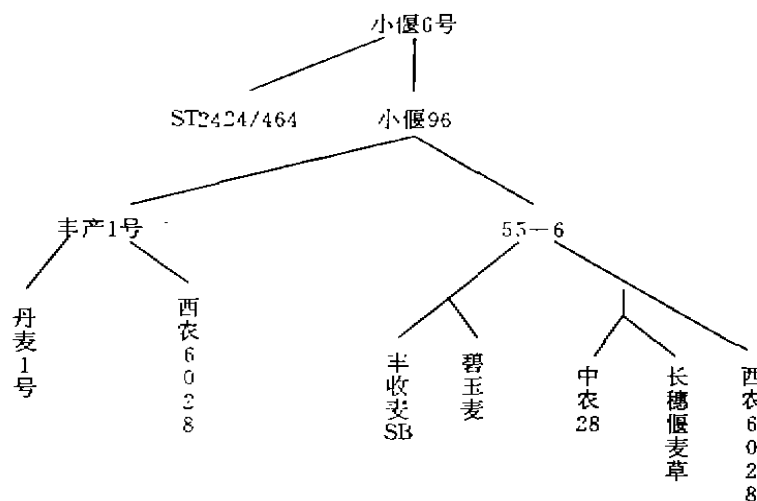


图1 小偃6号系谱图

图 3 是用引物 P2 和 P3 进行 PCR 扩增的结果。从图 3 可以看出, 在小偃 6 号、陕 225、墨西哥黑卡 3 个有 14 和 15 亚基的品种中出现了共同条带(如箭头所示①), 而在其他参照品种中未出现对应条带。在中间偃麦草和长穗偃麦草中也未出现相应的条带。从图 3 可以看出, 长穗偃麦草和中间偃麦草扩增出的条带与所用的其他栽培品种中的条带明显不同

(如箭头所示②)。为了进一步确认出现的条带,用启动子区引物 P1 和 3'保守区引物 P3 进行扩增,结果发现扩增出现了与原来相似的带型(如图 4 箭头所示③),只是迁移率变慢,这一结果进一步确认了从长穗偃麦草和中间偃麦草扩增出来的条带是偃麦草中不同于普通小麦的麦谷蛋白基因。

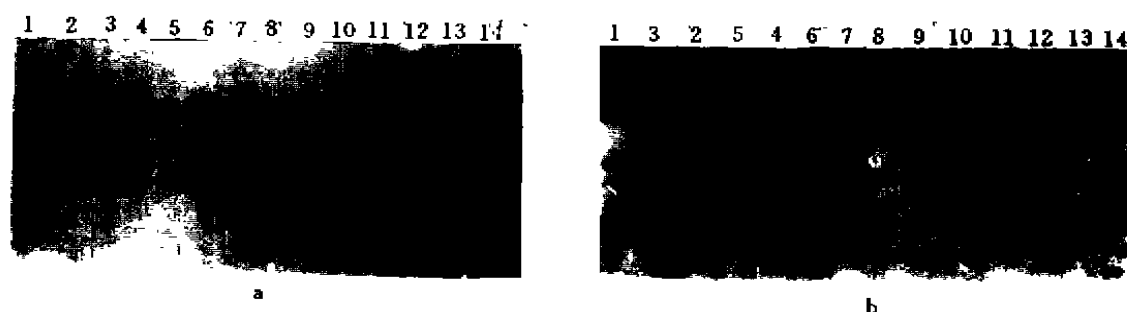


图2 小偃6号及其亲本 HMW-GS 组成 SDS-PAGE 图谱

1. 中国春;2. 墨西哥黑卡;3. CHEYENNE;4. GABO;5. HOPE;6. 陕 225;7. 小偃6号;8. 小偃96;9. ST2424/464;10. 丰产1号;11. 丹麦1号;12. 西农6028;13. 碧玉麦;14. 长穗偃麦草;

a. 分离胶 pH8.8; b. 分离胶 pH9.3; 14 和 15 亚基分别为 6,7 泳道自上而下第 2,3 条谱带

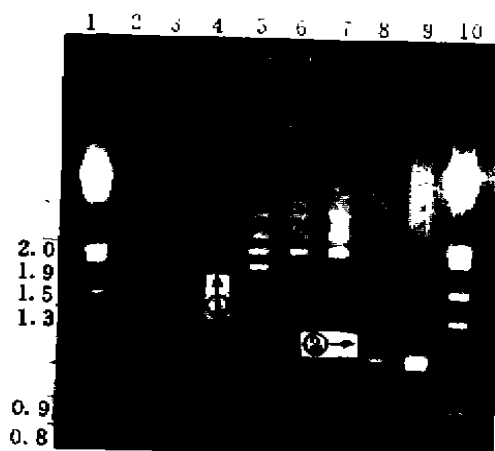


图3 小偃6号、长穗偃麦草及其他品种 PCR 结果
(引物为 P2 和 P3)

1,10. 标准分子质量;2. 陕 225;3. 小偃6号;4. 墨西哥黑卡;5. GABO;6. 中国春;7. CHEYENNE;8. 中间偃麦草;9. 长穗偃麦草

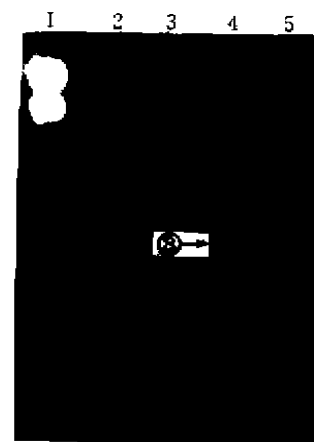


图4 PCR 确认偃麦草特异的 HMW-GS 基因
(引物为 P1 和 P3)

1. 标准分子质量;2. 中国春;3. CHEYENNE;4. 中间偃麦草;5. 长穗偃麦草

3 讨论

从 SDS-PAGE 结果可看出,小偃6号的 14+15 亚基来自其 2 个亲本 ST2424/464 和小偃96,小偃96中 14 亚基可能来自西农 6028,在小偃96的多个亲本中都含有 14 亚基。

SDS-PAGE 结果和 PCR 结果从蛋白和核酸 2 个水平否定了小偃 6 号中 14 和 15 亚基来源于长穗偃麦草的可能性,从而也否定了一些学者认为 14 和 15 亚基来源于长穗偃麦草的推测。在小偃 6 号的亲本中有一些国外的品种,如 ST2424/464、丰产 1 号、丹麦 1 号、碧玉麦等均为国外引进品种,最先认定的含有 14 和 15 亚基的也为国外品种,因而 14 和 15 亚基很可能是在引种过程中从国外品种进入国内品种中。在图 3 和图 4 中,从偃麦草中扩增的条带明显小于从对照品种中扩增出的条带,而且在长穗偃麦草和中间偃麦草中出现了一条相同的带(如图 3 箭头②所示),用 P1 和 P3 扩增的结果进一步确定,从偃麦草中扩增出来的条带不仅具有高分子质量麦谷蛋白的 5' 和 3' 保守区,而且具有麦谷蛋白保守的启动子区,由于 PCR 采用了 60 ℃ 的退火温度,因而可以判定从偃麦草中扩增的片段是偃麦草中的一个不同于普通小麦的麦谷蛋白基因片段。在改变了分离胶 pH 值后 15 亚基等多个条带消失,而标准对照中国春仍得到原来的带型,可能是因为一些 HMW-GS 为碱性蛋白,其电泳行为与普通蛋白不同^[6]。

通过 SDS-PAGE 和 PCR 分析表明,小偃 6 号的 14 和 15 亚基既可能来源于意大利品种 ST2424/464,也可能来源于小偃 96,但可以肯定长穗偃麦草并非 14 和 15 亚基的提供者。长穗偃麦草中的 HMW-GS 和普通小麦明显不同,通过 PCR 扩增到偃麦草中特异的麦谷蛋白基因片段。

致谢:西北植物研究所陈淑阳研究员、大荔农垦中心方震高级农艺师、西北农林科技大学张改生教授为试验提供了部分种子,西北植物研究所田增荣副研究员为试验提供了偃麦草,在此对他们表示衷心感谢。

[参考文献]

- [1] 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[J]. *Cereal Res Commun*, 1983, 11: 29—35.
- [2] 赵会贤, 薛秀庄, Maresyl D, 等. 麦谷蛋白亚基 Glu-1 和 Glu-3 位点基因等位变异对小麦品质特性的影响[J]. *作物学报*, 1997, 23(6): 646—654.
- [3] 王 瑞, 宁 锐. 一些优质小麦及其杂种后代高分子量麦谷蛋白亚基组成与面包品质之关系[J]. *西北农业学报*, 1995, 4: 25—30.
- [4] Wang G, Snape J W, Hu H, et al. The high-molecular-weight glutenin subunit compositions of Chinese bread wheat varieties and their relationship with bread-making quality[J]. *Euphytica*, 1993, 68: 205—212.
- [5] 邓志勇. 小麦高分子量麦谷蛋白 14 和 15 亚基的纯化和部分性质研究[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学, 1999.
- [6] Allaby R G, Banerjee M, Brown T A. Evolution of the high molecular weight glutenin loci of the A, B, D and G genomes of wheat[J]. *Genome*, 1999, 42(2): 296—307.
- [7] 刘香利. 小麦醇溶蛋白和高分子量麦谷蛋白亚基组成与品质关系研究[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学, 1999.
- [8] 奥斯伯(Ausubel F M). 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] Dovidio R, Anderson O D. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with bread making quality[J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 759—763.

A study on the origin of HMW-GS 14 and 15 in Xiaoyan 6

FAN San-hong, GUO Ai-guang

(College of Life Science, Northwest Science & Technology University of
Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Through studying HMW-GS composition of Xiaoyan 6 and it's parents by SDS-PAGE and PCR, it is found that it's two parents ST2424/464 and Xiaoyan 96 have subunits 14 and 15. Although Some researchers believe *elongate Elytrigia* is the origin of them, this study show it is not a right conclusion. Using PCR, we get a specific fragment of HMW-GS in *Elytrigia*.

Key words: wheat; HMW-GS; SDS-PAGE; PCR