

小偃6号HMW-GS表达动态研究^{*}

巩普遍, 赵会贤, 郭蔼光

(西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 以小偃6号为试验材料, 在其开花至成熟期, 每隔2~4 d采收1次籽粒, 提取籽粒中的麦谷蛋白, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对高分子质量的麦谷蛋白亚基(HMW-GS)进行分离。结果表明: 高分子质量麦谷蛋白在籽粒成熟过程中, 各个亚基大约在花后12 d开始表达, 但不同亚基开始表达时期稍有差异; 在花后16 d之前, 各个亚基蛋白的绝对量增长缓慢; 花后16 d之后, 各个亚基蛋白绝对量迅速增加至一稳定值, 且花后20 d之后各个亚基蛋白的相对含量基本保持不变。

[关键词] 小偃6号; 高分子质量麦谷蛋白亚基; 表达动态

[中图分类号] S512.101

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)01-0115-04

小麦是我国主要粮食作物之一, 随着生活水平的提高, 人们对小麦品质的要求也相应提高。近10年来, 我国育种工作者在小麦品质改良方面已取得巨大的进步, 培育出了一批加工品质优良的小麦^[1,2], 但对于一些抗病、高产、早熟且推广面积较大的小麦新品种来说, 品质水平仍有偏低趋势^[2], 所以研究小麦加工品质优良的机理, 对全面推行小麦的高产、优质育种具有举足轻重的作用。

有研究^[3,4]表明, 小麦籽粒中高分子质量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)的含量及组成与其加工品质有密切关系, 国内外已经公认大多数含有HMW-GS 5+10的小麦粉有较好的面包烘烤品质, 一些学者亦提出HMW-GS 14+15是一些面包小麦中存在的优质亚基^[5,6]。人们对HMW-GS与品质关系的研究已经从简单的聚类分析判断发展到分子水平, 如通过显微技术及免疫技术研究种子储藏蛋白大的聚合体结构对品质的影响^[6], 利用转基因技术^[7,8]、HMW-GS亚基体外重组法^[9]及不同品种间HMW-GS组分比较分析等研究HMW-GS对品质的贡献, 结果表明, HMW-GS在影响小麦加工品质方面起主要作用, 即HMW-GS以长链状存在, 由于其肽链内、肽链间二硫键及其他一些次级键的形成使得该长链构成一个复杂的网络结构, LMW-GS及醇溶蛋白仅是以一定方式镶嵌在其中, 形成一个大的蛋白聚合体^[10]。此外, 又有研究^[11]发现HMW-GS基因是一个较长的没有内含子的基因。

国内外曾对小麦种子中各种蛋白质的表达动态及其受遗传因素与多种外界因素的影响进行过广泛的研究^[12~19], 但对高分子质量麦谷蛋白单个亚基表达动态的研究并不深入^[20,21]。

本研究对小麦高分子质量麦谷蛋白各亚基表达动态进行了研究, 以期了解小麦HMW-GS表达动态规律, 为建立高分子质量麦谷蛋白cDNA文库, 或通过RT-PCR克隆目的HMW-GS基因, 以及研究HMW-GS基因表达活性与品质的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

小偃6号, 1999~2000年度种植于杨凌职业技术学院试验田。

1.2 方 法

1.2.1 花期标志 在小麦开花当天, 选择仅有穗中部1~2个小穗开花的麦穗挂牌标记, 将该时期记作花后0 d。

1.2.2 采 样 自挂牌之日起, 每隔2 d或4 d采取2~10个小麦穗, 在冰浴条件下剥取穗中部的4~8粒小麦籽粒。

1.2.3 小麦籽粒的烘干处理 烤箱110℃, 杀青15 min; 65℃烘至恒重; 置于干燥器中, 待用。

1.2.4 高分子质量麦谷蛋白的提取 将已烘干的成熟过程中各个时期的小麦籽粒研成粉状, 各称取

* [收稿日期] 2001-07-13

[基金项目] 杨凌农业生物技术育种中心资助项目(1994-14)

[作者简介] 巩普遍(1974-), 女, 陕西周至人, 助教, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

20 mg, 提取被还原的高分子质量麦谷蛋白。具体方法参见文献[12]。

1.2.5 蛋白定量 考马斯亮蓝 G-250 分光光度法。参见文献[13]。

1.2.6 高分子质量麦谷蛋白亚基的分离 采用 SDS-PA GE, 浓缩胶丙烯酰胺的质量浓度为 30 g/L, 分离胶为 100 g/L; 提样缓冲液为: 0.125 mol/L Tris-HCl, 50 mL/L 巯基乙醇, 20 g/L SDS, 100 mL/L 丙三醇, 痕量溴酚蓝, pH 6.8; 采取恒流电泳, 分离胶中 20 mA, 浓缩胶中 10 mA。用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.7 结果分析 采用 Tanon Gis-1000 凝胶成像

系统及 Gis 凝胶分析软件对试验所得电泳图谱进行分析。

2 结果与讨论

2.1 等干重提样 SDS-PA GE 研究 HMW-GS 表达动态

将提取的高分子质量麦谷蛋白, 等体积点样, 进行 SDS-PA GE, 结果见图 1。图 1 中 9 个泳道从左到右分别是开花后 32, 28, 24, 20, 16, 14, 12, 10, 8 d 小麦样品的电泳图谱。小偃 6 号小麦籽粒中的高分子质量麦谷蛋白亚基有 5 个, 分别为 Ax1, Bx14, By15, Dx2, Dy12。

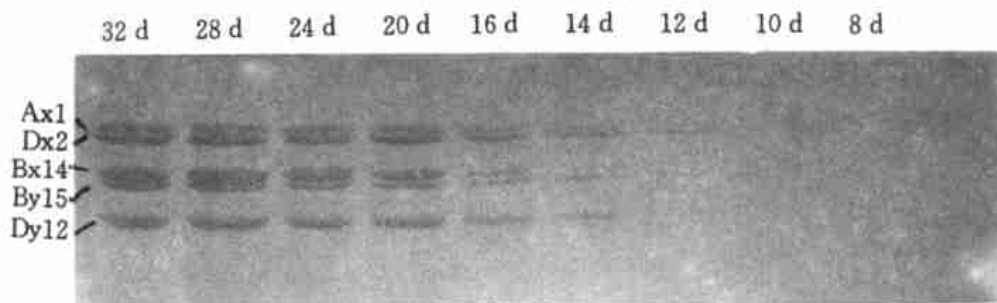


图 1 等干重提样 SDS-PA GE 图谱

Fig 1 SDS-PA GE patterns of glutenin extracted from same dry weight wheat at different mature stage

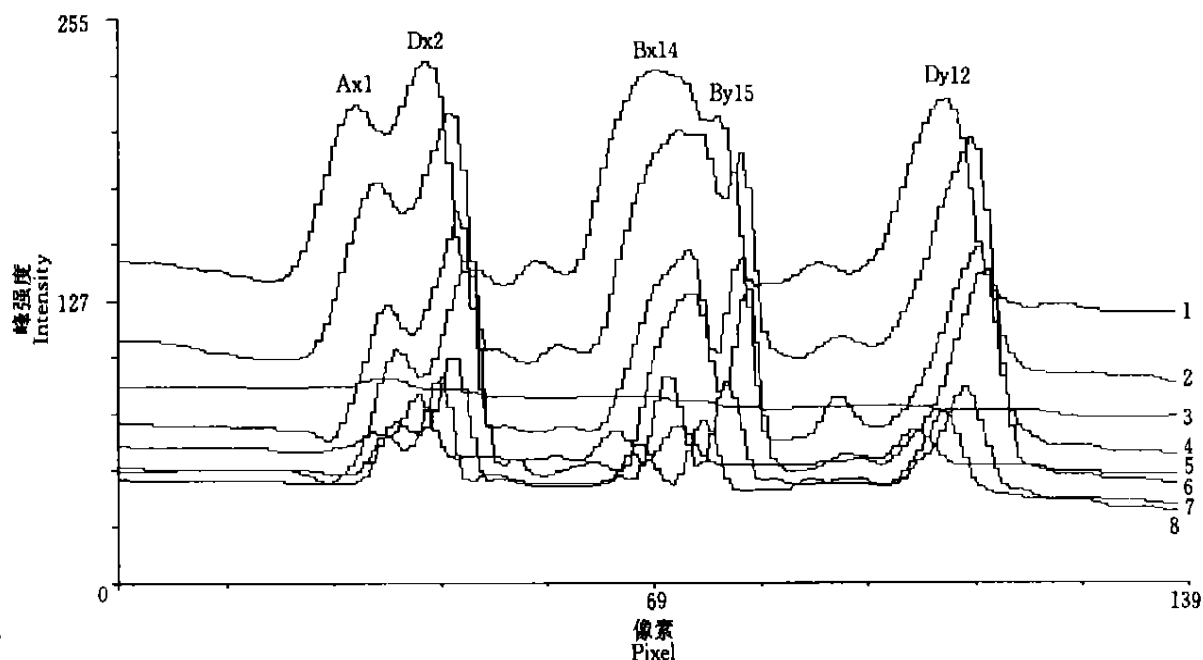


图 2 等干重提样 SDS-PA GE 图谱扫描峰图

Fig 2 Scanning pattern of SDS-PA GE patterns of glutenin extracted from same dry weight wheat at different mature stage with Gis gel analyzing software

1. 32 d; 2. 28 d; 3. 10 d; 4. 24 d; 5. 12 d; 6. 20 d; 7. 14 d; 8. 16 d

经Gis凝胶分析软件对电泳图谱进行扫描分析(图2), 结果表明: ①HMW-GS在籽粒成熟过程中, 不同亚基开始表达的时期不尽相同, 在小偃6号中Dx2亚基及Dy12亚基最早出现, 即花后10d出现(在湿的电泳胶片中隐约可见); 14亚基、15亚基及1亚基在花后12d出现。该结果与赵文明等^[14]报道高分子质量麦谷蛋白在花后13d出现的结论基本一致; 但王忠等^[22]通过甲苯胺蓝染色对小麦籽粒成熟过程中不同阶段的小麦籽粒中蛋白质体出现时期的研究表明, 在花后9~10d就有蛋白质体出现; 这种表达起始时期的差异可能是由于分析过程中所采取的方法灵敏度不同所致或在试验中采用小麦品种不同, 有待进一步研究。②由图1中各条带的颜色深浅及图2中各峰的峰面积比较可见, 在小麦开花后16d之前, 各个亚基的绝对量增长缓慢; 在开花后16~28d, 各亚基的绝对量均有大幅度的增长; 从小麦开花后28d至小麦完熟期, 各亚基的蛋白绝对量基本保持不变。

2.2 等高分子质量麦谷蛋白点样SDS-PAGE研究HMW-GS表达动态

提取被还原的高分子质量麦谷蛋白, 经考马斯亮蓝G-250定量, 等蛋白点样, 进行SDS-PAGE, 结果如图3。图3中从左至右8个泳道分别为开花后32, 28, 24, 20, 16, 14, 12, 10d样品的电泳图谱。

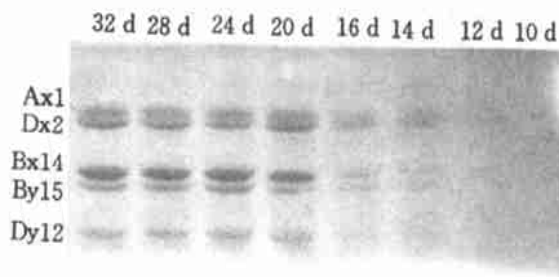


图3 等高分子质量麦谷蛋白点样SDS-PAGE图谱

Fig 3 SDS-PAGE pattern of glutenin with the same high molecular weight at each lane

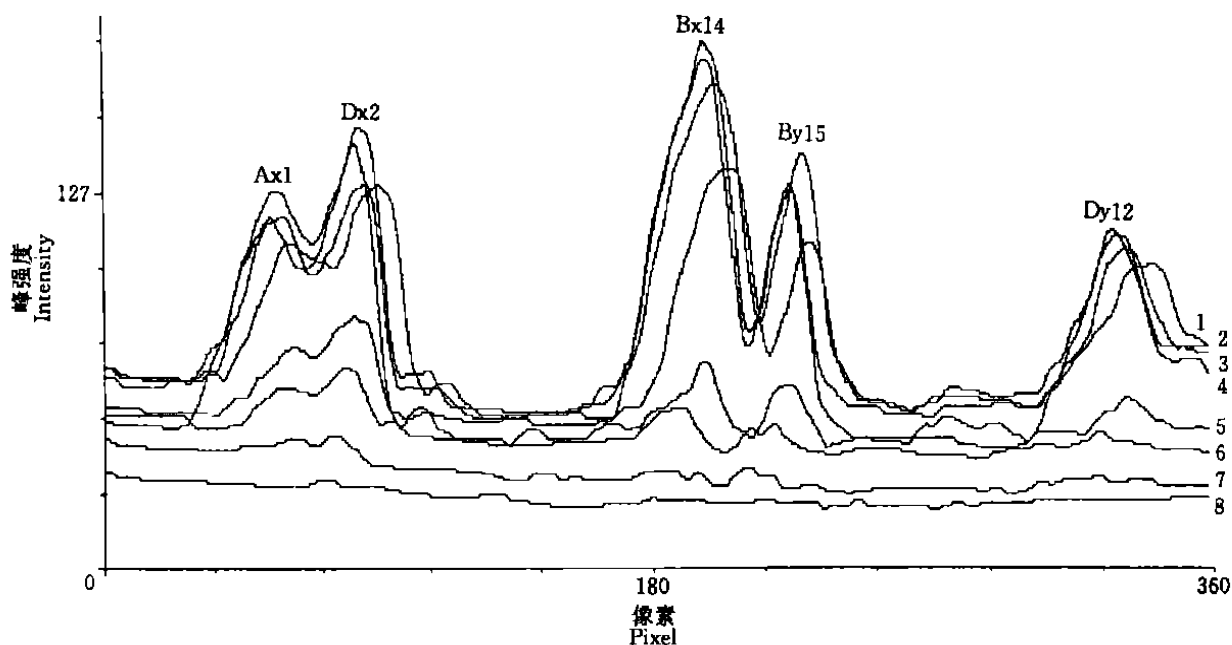


图4 等高分子质量麦谷蛋白点样SDS-PAGE图谱扫描峰图

Fig 4 Scanning pattern of SDS-PAGE pattern of glutenin with the same high molecular weight at each lane with Gis gel analyzing software

1. 22 d; 2. 26 d; 3. 30 d; 4. 32 d; 5. 18 d; 6. 16 d; 7. 14 d; 8. 12 d

Gis凝胶分析软件分析表明(图4), 在花后20d之后的各个时期, 小麦籽粒中高分子质量麦谷蛋白各亚基相对含量保持不变。但各亚基的绝对含量有较大的差异, 14亚基蛋白量最大, 其次是1亚基、2亚基及12亚基, 此3个亚基蛋白量基本相当, 15亚基的蛋白量最小。这可能与各亚基基因的启动子启动

效率有关, 即14亚基的启动子启动效率最高。朱金宝等^[23]研究认为小麦优质除与含有优质HMW-GS有关外, 还与各高分子质量麦谷蛋白亚基的含量有关, 故如能克隆14亚基基因的启动子并将其与其他亚基基因重组导入高产、抗病的小麦中, 对提高小麦的品质将有很大的作用。

[参考文献]

- [1] 王小燕, 卢少源, 荣广哲, 等. 第三次全国面包小麦品种(系)品质分析[J]. 河北农业大学学报, 1997, 20(2): 1- 5
- [2] 魏益民, 张国权, 欧阳韶晖. 陕西关中小麦品种品质改良现状研究[J]. 麦类作物学报, 2000, 20(1): 3- 9
- [3] Branlard G, Dardevet M. Diversity of grain proteins and bread wheat quality II. Correlation between molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics[J]. J Cereal Sci, 1985, 3: 345- 354
- [4] Payne P I, Corfield K G, Blackman J A. Identification of a high molecular weight subunits of glutenin and bread-making quality in wheats of related pedigree[J]. Theor Appl Genet, 1979, 55: 153- 159
- [5] 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
- [6] Brites C, Carrillo J M. Influence of high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) glutenin subunits controlled by Glu-1 and Glu-3 loci on durum wheat quality[J]. Cereal Chem, 2001, 78(1): 59- 63
- [7] 张小东, 李冬梅. 利用基因枪将 HMW 谷蛋白亚基基因与除草剂 Basta 抗性基因导入小麦不同外植体获得转基因植株[J]. 遗传, 1998, 20(增刊): 3- 8
- [8] Blechl A E, Anderson O D. Expression of a novel high molecular weight glutenin gene in transgenic wheat[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(7): 875- 879
- [9] Uthayakumaran S, Stoddard F L. Effects of incorporated glutenins on functional properties of wheat dough[J]. Cereal Chem, 2000, 77(6): 737- 743
- [10] Megan P, Lindsay, John H, et al. Immunocytochemical localization of gluten proteins uncovers structural organization of gluten in macro-polymer[J]. Cereal Chem, 2000, 77(3): 360- 369
- [11] Frank C, Greene. Expression of storage protein genes in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds[J]. Plant Physiol, 1983, 71: 40- 46
- [12] Melas V, Morel M H. Simple and rapid method for purifying low molecular weight subunits of glutenin from wheat[J]. Cereal Chem, 1994, 71(3): 234- 237
- [13] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1999
- [14] 赵文明, 朱新产. 小麦种子发育期麦谷蛋白的累积[J]. 西北农业大学学报, 1991, 19(3): 8- 11
- [15] 马俊虎. 小麦灌浆成熟过程中蛋白质及其组成变化初报[J]. 上海农业学报, 1992, 8(1): 78- 80
- [16] 李九星, 崔金梅. 小麦籽粒蛋白质积累动态研究[J]. 河南农业大学学报, 1991, 25(4): 366- 371
- [17] Khan K, Bushuk W. Studies of glutenin VIII Subunit composition at different stages of grain maturity[J]. Cereal Chem, 1976, 53: 566
- [18] Bushuk W, Wrigley C W. Glutenin in developing wheat grain[J]. Cereal Chem, 1971, 48: 448
- [19] Huebner F R, Kaczowski J, Bietz J C. Quantitative variation of wheat proteins from grain at different stages of maturity and from different spike locations[J]. Cereal Chem, 1990, 67: 464- 470
- [20] Green F C, Anderson O D, Litts J C. Control of wheat protein biosynthesis[J]. Cereal Chem, 1985, 62: 398
- [21] Green F C. Expression of storage protein genes in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds[J]. Plant Physiol, 1983, 71: 40- 46
- [22] 王 忠, 顾蕴洁, 李卫芳, 等. 小麦胚乳发育及其养分输入的途径[J]. 作物学报, 1998, 24(5): 536- 543
- [23] 朱金宝, 刘广田, 张树榛, 等. 小麦籽粒高、低分子量麦谷蛋白亚基及其与品质关系的研究[J]. 中国农业科学, 1996, 29(1): 34- 39

Periodical expression of high molecular weight glutenin subunit gene in developing wheat seeds

GONG Pu-bian, ZHAO Hui-xian, GUO Ai-guang

(College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shaanxi, Yangling 712100, China)

Abstract: The wheat of No. 6 Xiaoyan was used in this study. It was harvested at 2- 4 days intervals during development and they were used to extract high molecular weight glutenin. The high molecular weight glutenin subunit was fractioned and analysed by SDS-PAGE. The subunit composition remained the same from early stages of development to full maturity. The result showed minor differences in the time at which each of subunit start to be expressed. Dx2 and Dy12 was expressed at 10 d after flowering, Bx14, By15 and Ax1 at 12 d after flowering. The quantity of each subunit has increased slowly till 16 d after flowering and it was increased rapidly after 16 d after flowering. After 20 d after flowering the relative quantity remained the same proportion without change.

Key words: No. 6 Xiaoyan; HMW-GS; periodical expression