

高分子量麦谷蛋白亚基基因Dx5的PCR检测^{*}

张晓科¹, 魏益民², 王新中¹, 李小军¹, 魏凌基³, 刘 斌¹, 高云村¹, 李 毅⁴

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨陵 712100; 2 西北农林科技大学 食品学院, 陕西 杨陵 712100;

3 石河子大学 农学院, 新疆 石河子 843300; 4 北京大学 生命科学学院, 北京 100871)

[摘 要] 为Dx5基因设计了1对特异引物, 选用HMW-GS在GluDx1位点已知的22个材料对其进行了验证。结果表明, 该引物的准确率达到100%, 完全可以作为Dx5基因的检测引物。利用这1对引物, 通过PCR技术对40种材料的Dx5基因进行了检测, 发现仅有98605, 陕253, 郑州891, 97-2143, 绵阳96171-10, 绵阳19, 中1813-1和绵阳11等8个品种(系)携带Dx5基因, 占待测材料总数的20.0%, 远远低于北美小麦品种中Dx5基因的携带率。研究中还发现, 对检测优质面包烘烤品质基因而言, PCR方法是最简便、快速、准确的方法之一。

[关键词] 小麦品质; PCR技术; Dx5基因

[中图分类号] S512.101

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0034-05

优质已成为目前小麦育种的主要目标之一, 在我国现有的优质小麦品种中, 最缺乏的就是强筋面包小麦品种^[1]。已有研究结果^[2,3]表明, 高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)与面包烘烤品质具有密切关系, Dx5和Dy10是所有HMW-GS中对面包小麦烘烤品质贡献最大的亚基基因^[4,5]。在国外, Dx5和Dy10亚基的检测是面包小麦育种过程中不可缺少的工作之一^[6,7]。因此, 本研究试图利用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)直接检测小麦品种(系)中控制编码HMW-GS Dx5的基因, 达到检测该蛋白亚基的目的。并通过对SDS-PAGE电泳获得的HMW-GS分布结果与PCR检测结果的比较, 研究PCR检测的可靠性, 然后对2000~2001年度参加陕西省中肥组区域试验的17个品系(种)和西北农林科技大学农学院小麦育种的23个骨干亲本进行了检测, 以明确其携带Dx5基因的情况, 为区试材料和骨干亲本的品质评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用3类材料: ①Marquis, Crousty, N SA 99-1417、中国春等1D染色体上HMW-GS组成已知的22个小麦品种(系)(表1, 1~22为电泳序号), 除中

国品种外^[8], 其余材料和资料均由法国利马格兰A lain Bonjean博士提供。②参加2000~2001年度陕西省中肥组区域试验的17个小麦品系(种), 分别为9739(S1)、小偃128(S2)、小偃26(S3)、小偃107(S4)、西杂1号(S5)、陕农28(S6)、高优503(S7)、小偃137(S8)、89605(S9)、军绿4号(S10)、花育8号(S11)、陕229(S12)、秦龙68(S13)、远丰898(S14)、西农163(S15)、西农383(S16)、陕253(S17)(S1~S17为电泳序号)。研究结果为品种审定提供HMW-GS品质评价资料。③西北农林科技大学农学院小麦育种研究所的23个骨干亲本, 即89150(S18)、I43(S19)、郑州891(S20)、陕163(S21)、97-2143(S22)、西农8727(S23)、西农1376(S24)、陕垦444(S25)、陕优225(S26)、陕农78(S27)、绵阳96171-10(S28)、小偃54(S29)、西农2208(S30)、99中35(S31)、长武134(S32)、小偃22(S33)、Gem tat(S34)、西农1718(S35)、WX8911(S36)、绵阳11(S37)、偃展1号(S38)、中8131-1(S39)、绵阳19(S40)(S18~S40为电泳序号)。阴性对照(CK1)为中国春, 阳性对照(CK2)为Marquis。旨在摸清骨干亲本携带Dx5基因的情况, 为以后品质育种亲本的选择提供理论依据。取每种材料种子35粒置于培养皿内, 于22℃生化培养箱培养7d, 收获黄化苗, 提取DNA。

* [收稿日期] 2002-08-16

[基金项目] 杨凌农业生物技术育种中心项目(2001B-5); 北京大学蛋白质工程及植物基因工程实验室开放项目(1999-7); 法国利马格兰小麦合作项目(1999CW-2)

[作者简介] 张晓科(1965-), 男, 陕西岐山人, 副教授, 硕士, 主要从事小麦品质遗传育种研究。

表 1 供试材料 Glu-D1 位点的 HMW -GS 变异表

Table 1 HMW -GS composition at the Glu-D1 locus in materials used

基因型 Genotypes	泳道序号 Lane code	Glu-D1		基因型 Genotypes	泳道序号 Lane code	Glu-D1	
		Dx	Dy			Dx	Dy
Marquis	1	5	10	N SA 99-1058	12	5	10
Crousty	2	5	10	N SA 99-0418	13	5	10
N SA 99-1417	3	5	10	N SA 99-0779	14	5	10
中国春 Chinese spring	4	2	12	N SA -99-1305	15	3	12
N SA 99-1586	5	5	10	N SA 99-2274	16	3	12
N SA 99-1602	6	2	12	N SA 98-1266	17	3	12
小偃 6 号 Xiaoyan 6	7	2	12	N SA 99-0375	18	2	12
N SA 97-2001	8	5	10	N SA 99-1714	19	5	10
浙麦 1 号 Zhen ai 1	9	2 2	12	豫麦 2 号 Yum ai 2	20	4	12
Trem ie	10	3	12	N SA 98-0753	21	5	10
So issons	11	5	10	N SA 97-2012	22	5	10

1.2 小麦基因组DNA 的提取

称取约 100 mg 小麦幼嫩叶片,用剪刀剪成小片段,置于 1.5 mL 离心管,在液氮中冷冻,用预冷的平口镊子研磨成粉状。加入 500 μL 在 80 °C 预热的 DNA 提取 buffer(含 250 μL 的饱和酚和 250 μL 的 100 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris 8.0, 10 mmol/L EDTA, 质量分数 1.0% SDS 的混合液)。混合均匀后,再加入 250 μL 氯仿。上下颠倒 3 次后,在 12 000 r/min 转速下离心 10 min。吸取上清液,加入 1/20 体积 3 mol/L 乙酸钠和 2 倍体积无水乙醇。轻轻混合后,在冰上放置 30 min,然后在 4 °C 12 000 r/min 条件下离心 10 min。倒掉离心管中上清液,用预冷的体积分数 70% 的乙醇洗涤沉淀 1~2 次。将沉淀风干后,溶于 50 μL TE (10 mmol/L Tris 8.0, 1 mmol/L EDTA) 中。

1.3 目标基因扩增与检测

反应体系中加入基因组 DNA 200 ng, 两引物各 250 ng, MgCl₂ 和 dNTP 最终浓度各为 300 μmol/L, Taq 酶 2.5 μmol/min 和 2.5 μL 1×PCR

butter, 补加 ddH₂O 到 25 μL。循环前 94 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 变性 1 min, 63 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。用 12 μL PCR 产物在质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下照像。

2 结果与分析

2.1 Dx5 基因 PCR 引物的设计

研究 Anderson 和 Sugiyama 等^[9,10]公布的 Dx5 和 Dx2 基因序列,可以发现 Dx5 和 Dx2 两基因序列具有高度的同源性和重复性,因此,引物设计在编码肽链 N 端非重复的核苷酸序列及其上游的非编码序列之间^[11]。图 1 为 Dx5 基因两引物的位置和序列,开始于 TATA 的 3 端附近,结束于重复核苷酸序列开头。设计的引物 1 为: GCCTAGCAACCTTCACAATC, 引物 2 为: GAAACCTGCTGCGGACAAAG, 两引物均由上海生工合成。经过 PCR 可扩增出 450 bp 的核苷酸序列。

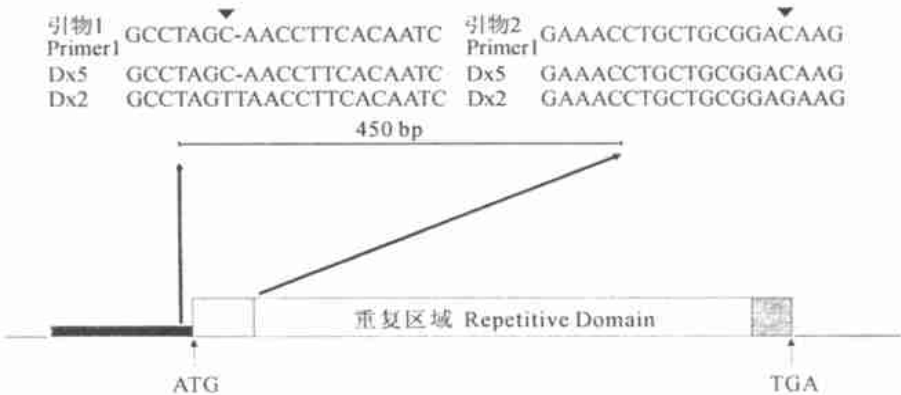


图 1 引物设计图

Fig 1 Design of primers for allele specific amplification of 1Dx genes

2.2 检测结果的可靠性分析

选用的 22 个 HMW-GS 在 Glu-Dx1 位点已知材料中, 包括 2, 2, 2, 3, 4 和 5 亚基的基因。其中, 携带 Dx5 基因的材料有 12 个。如果设计的一对引物正确, 且具有 Dx5 基因材料, 通过 PCR 扩增, 应该产生 450 bp 的核苷酸序列, 通过琼脂糖凝胶电泳, 应在紫外灯下 450 bp 处出现 1 个特定的扩增条带。

图 2 为 HMW-GS 在 Glu-Dx1 位点基因已知的

22 个材料的 PCR 结果。M 为标准分子量。共有 12 个供试材料分别在泳道 1, 2, 3, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 19, 21, 22 的 450 bp 处产生了特定的扩增条带, 而正好是包括 Marquis 等在内的这 12 个材料携带有 Dx5 基因。而中国春等其余 10 个材料无 Dx5 基因, 也未扩增出 450 bp 的条带。这充分说明, 为 Dx5 基因设计的 1 对特定引物是正确的, 完全可用作 Dx5 基因的 PCR 检测。

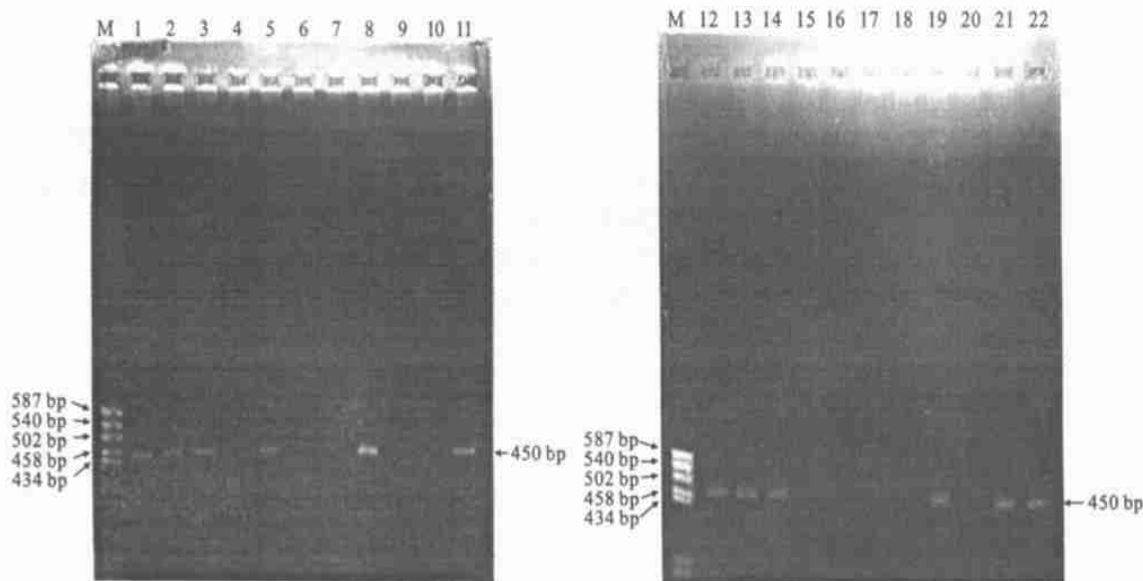


图 2 HMW-GS 基因已知材料的 PCR 扩增结果

M. BR322DNA /BsuR (HaeIII); 1. Marquis; 2. Crousty; 3. N SA 99-1417; 4. 中国春; 5. N SA 99-1586; 6. N SA 99-1602; 7. 小偃 6 号; 8. N SA 97-2001; 9. 浙麦 1 号; 10. Tremie; 11. Soissons; 12. N SA 99-1058; 13. N SA 99-0418; 14. N SA 99-0779; 15. N SA -99-1305; 16. N SA 99-2274; 17. N SA 98-1266; 18. N SA 99-0375; 19. N SA 99-1714; 20. 豫麦 2 号; 21. N SA 98-0753; 22. N SA 97-2012

Fig 2 PCR results for Dx5 gene in materials whose HMW-GS genes were known

M. BR322DNA /BsuR (HaeIII); 1. Marquis; 2. Crousty; 3. N SA 99-1417; 4. Chinese Spring; 5. N SA 99-1586; 6. N SA 99-1602; 7. Xiaoyan 6; 8. N SA 97-2001; 9. Zhenai 1; 10. Tremie; 11. Soissons; 12. N SA 99-1058; 13. N SA 99-0418; 14. N SA 99-0779; 15. N SA -99-1305; 16. N SA 99-2274; 17. N SA 98-1266; 18. N SA 99-0375; 19. N SA 99-1714; 20. Yumai 2; 21. N SA 98-0753; 22. N SA 97-2012

2.3 待测材料的检测

本试验对参加陕西省 2000~2001 年度中肥组区试的 17 个品系及 23 个亲本材料应用相同的方法进行了 Dx5 基因检测, 结果见图 3。

为了说明 4 次独立试验重复的正确性, 每次从 DNA 提取、PCR 扩增到凝胶电泳等各个环节, 都增加了阳性对照(CK2)和阴性对照(CK1)。其中阳性对照为 Marquis, 因其携带 Dx5 基因, 应能扩增出 450 bp 条带; 阴性对照为中国春, 未携带 Dx5 基因, 不应扩增出 450 bp 条带。结果显示, 所有的阳性对照都扩增出 450 bp 条带, 而相应的 4 个阴性对照都未能扩增出 450 bp 条带, 试验结果与预测结果相吻

合, 说明图 3 的结果是完全可信的。

图 3 中的泳道 S1~S17 为省区试品系, 除 S9 (98605) 和 S17 (陕 253) 泳道外, 其余泳道未出现 450 bp 的条带。说明省中肥组区试的 17 个材料中, 仅有 2 个材料携带 Dx5 基因, 占总参试品系总数的 11.8%。

图 3 中的泳道 S18~S40 为 23 个骨干亲本。泳道 S20, S22, S28, S37, S39 和 S40 出现了 450 bp 的扩增条带, 说明郑州 891, 97-2143, 绵阳 96171-10, 绵阳 19, 中 8131-1 和绵阳 11 携带 Dx5 基因, 其余 17 个亲本材料未能扩增出 450 bp 条带, 表明没有携带 Dx5 基因。携带 Dx5 基因的骨干亲本数占总参

试亲本总数的 26.1%。

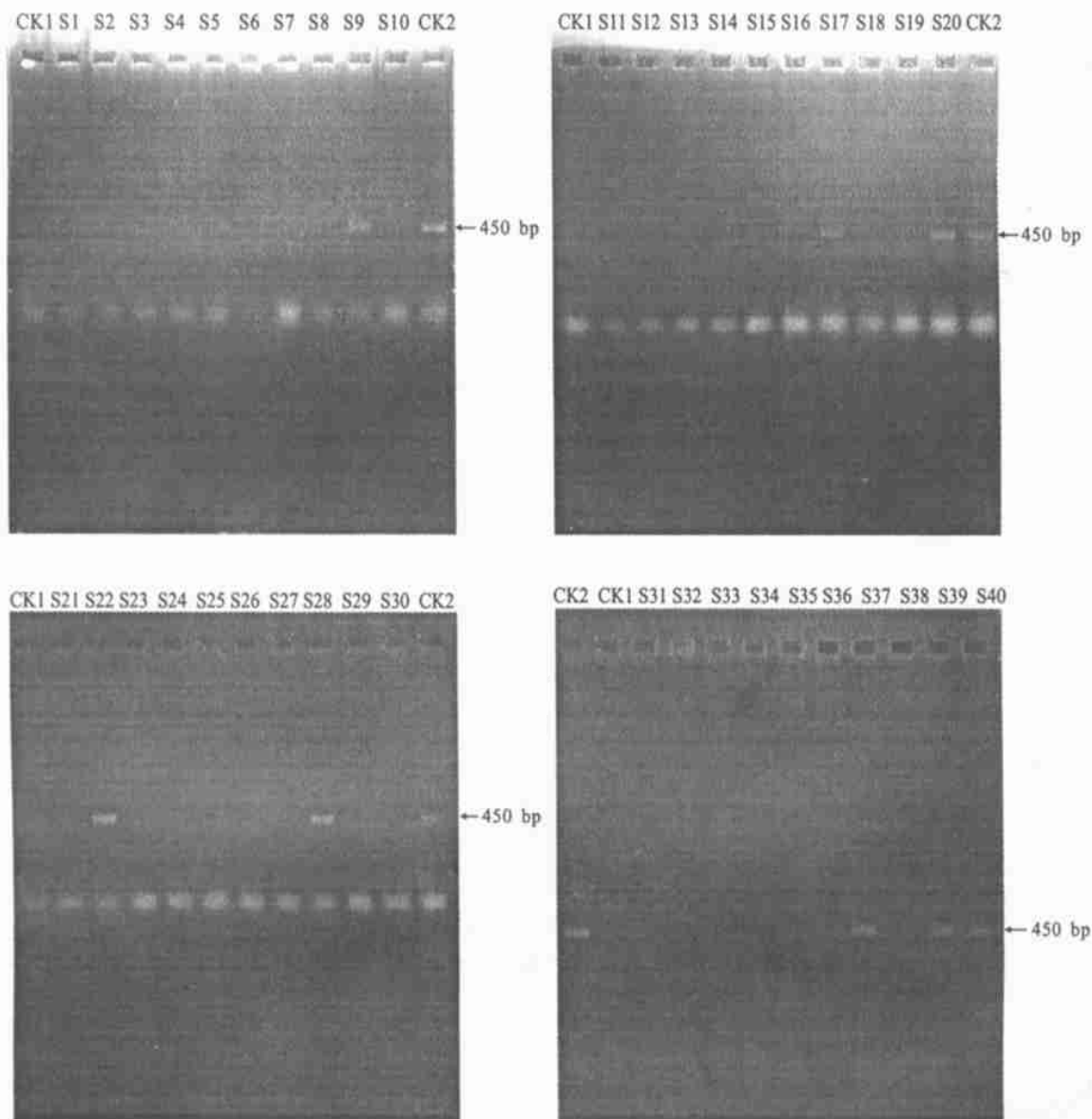


图 3 HMW-GS 未知材料 D_{x5} 基因的扩增结果

CK1. 中国春; CK2 Marquis; S1. 9739; S2. 小偃 128; S3. 小偃 26; S4. 小偃 107; S5. 西杂 1 号; S6. 陕农 28; S7. 高优 503; S8. 小偃 137; S9. 89605; S10. 军绿 4 号; S11. 花育 8 号; S12. 陕 229; S13. 秦龙 68; S14. 远丰 898; S15. 西农 163; S16. 西农 383; S17. 陕 253; S18. 89150; S19. 43; S20. 郑州 891; S21. 陕 163; S22. 97-2143; S23. 西农 8727; S24. 西农 1376; S25. 陕垦 444; S26. 陕优 225; S27. 陕农 78; S28. 绵阳 96171-10; S29. 小偃 54; S30. 西农 2208; S31. 99 中 35; S32. 长武 134; S33. 小偃 22; S34. Gem tat; S35. 西农 1718; S36. WX8911; S37. 绵阳 11; S38. 偃展 1 号; S39. 中 8131-1; S40. 绵阳 19

Fig 3 PCR results for D_{x5} gene in materials whose HMW-GS genes were not known
CK1 Chinese spring; CK2 Marquis; S1. 9737; S2. Xiaoyan 128; S3. Xiaoyan 26; S4. Xiaoyan 107; S5. Xiza 1; S6. Shaannong 28; S7. Gaoyou 503; S8. Xiaoyan 137; S9. 89605; S10. Junlu 4; S11. Huayu 8; S12. Shaan 229; S13. Qinnong 68; S14. Yuanfen 898; S15. Xinong 163; S16. Xinong 383; S17. Shaan 253; S18. 89150; S19. 43; S20. Zhengzhou 891; S21. Shaan 163; S22. 97-2143; S23. Xinong 8727; S24. Xinong 1376; S25. Shaanken 444; S26. Shaanyou 225; S27. Shaannong 78; S28. M iangyang 96171-10; S29. Xiaoyan 54; S30. Xinong 2208; S31. 99 Zhong 35; S32. Chuangwu 134; S33. Xiaoyan 22; S34. Gem tat; S35. Xinong 1718; S36. WX8911; S37. M iangyang 11; S38. Yanzhuang 1; S39. Zhong 8131-1; S40. M iangyang 19

3 讨 论

根据 D_{x5} 和 D_{x2} 基因序列的特点, 用为 D_{x5}

基因设计的 1 对引物进行 D_{x5} 优质基因的 PCR 检测, 能扩增出 450 bp 核苷酸片段, 结果不受 D_{x3}, D_{x4}, D_{x2}, D_{x2} 2 等基因的影响, 说明设计的引物是

完全正确的。Payne 研究发现^[12],Dx5 和 Dy10 是 1 对紧密连锁的基因,在小麦品种(系)中伴随出现。也就是说,检测出携带 Dx5 基因的纯系品种(系),也携带有 Dy10 基因。因此,本试验测定的 40 个品种(系)中,因 98605,陕 253,郑州 891,97-2143,绵阳 96171-10,绵阳 19,中 1813-1 和绵阳 11 携带有 Dx5 基因,也可能携带 Dy10 基因,占总参试品系总数的 20.0%。马传喜报道^[13],美国硬红冬小麦 Dx5 + Dy10 基因的携带率为 62%,美国硬红春小麦为 91%,加拿大小麦为 80%,而中国冬小麦为 12%。李硕碧研究了国内 143 个品种后^[14],发现其 Dx5 + Dy10 基因的携带率为 11.9%。以上结果均表明,中国材料携带优质烘烤品质 Dx5 + Dy10 基因的概率明显低于北美小麦出口国的水平,这正是我国目前缺乏强筋面包小麦品种的主要原因之一。

SDS-PAGE 电泳操作原理简单,试验费用较低,因此是 HMW-GS 分析的主要方法之一。但是,电泳检测的对象是蛋白质,而 HMW-GS 仅在小麦

开花受精后才在籽粒中出现^[15],使得该方法的取材只能是籽粒;并且该方法工作量大,周期长;在育种材料选育过程中,采用半籽粒法检测后,携带胚的另一半籽粒出苗率低,直接降低了优良单株选育的概率;同时,蛋白质电泳的结果并非总是与其分子量呈正相关,结果有时会出现一些偏差。李硕碧^[16]利用 SDS-PAGE 电泳认为,西农 1376 携带优质面包烘烤品质基因 Dx5 和 Dy10,而魏益民等^[1,17]对小麦面粉品质的研究成果表明,西农 1376 为粉质弱筋小麦品种。在本研究中,利用 PCR 技术未发现该品种携带 Dx5 基因,结果与魏益民等^[1,17]的研究结果相吻合。

PCR 检测的直接对象是编码 Dx5 亚基的基因,由于细胞的全能性,故 PCR 检测的材料既可以是籽粒,也可以是叶片、根等任何组织类型,且检测快速,每天能够检测数百个样品。因此,可将该技术用于分离世代的分子标记聚合育种中。

[参考文献]

- [1] 魏益民. 谷物品质与食品品质——小麦籽粒品质与食品品质[M]. 西安:陕西人民出版社,2002.
- [2] 师俊铃,魏益民. 蛋白质与小麦品质关系分析[J]. 粮食与油脂,1999,(4):3-7.
- [3] Peter P S, Halford N G, Tatham A S. High molecular weight subunits of wheat glutenin[J]. J Cereal Sci, 1992, 15: 105-120.
- [4] Payne P I, Lawrence G D. 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: 3-29.
- [5] 张晓科,李耀科,魏益民. 小麦贮藏蛋白特性及其遗传转化[J]. 麦类作物学报, 2002, 22(2): 78-82.
- [6] 刘广田,李保云. 小麦品质性状的遗传及其遗传改良[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(4): 307-314.
- [7] Shewry P R, Tatham A S. Biotechnology of wheat quality[J]. J Sci Food Agric, 1997, 73: 397-406.
- [8] 马传喜,吴兆苏. 我国主要冬小麦推广品种的高分子量麦谷蛋白亚基变异分析[J]. 安徽农业大学学报, 1993, 20(4): 298-302.
- [9] Anderson O D, Greene F C, Yip R E, et al. Nucleotide sequences of the two high molecular weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. cv. Cheyenne[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 461-462.
- [10] Sugiyama T, Rafalski A, Peterson D, et al. A wheat HMW-GS gene reveals a highly repeated structure[J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13: 8729-8737.
- [11] 朱玉贤,李 毅. 现代分子生物学[M]. 北京:高等教育出版社,1998.
- [12] Payne P I. Genetics of wheat storage proteins and the effect allelic variation on breadmaking quality[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1987, 38: 141-153.
- [13] 魏益民. 21 世纪中国食品与农业科学技术研讨会论文集[M]. 西安:陕西人民出版社,1999.
- [13] 马传喜,徐 风,李兴林. 我国面包用小麦品质改良若干问题的探讨[A]. 魏益民主编. 21 世纪中国食品与农业科学技术研讨会论文集[C]. 西安:陕西人民出版社,1999. 40-43.
- [14] 李硕碧,单明珠,李必远. 陕西省小麦资源高分子量谷蛋白亚基组成研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(4): 1-5.
- [15] 丁 勇,吴乃虎,陈春霞,等. 基因工程与农业[M]. 北京:科学技术文献出版社,1994.
- [16] 李硕碧. 小麦高分子量麦谷蛋白亚基与加工品质[M]. 北京:农业出版社,2001.
- [17] 魏益民,朱居中,张国权,等. 陕西关中优质小麦品种品质性状研究[J]. 西北植物学报, 1997, 17(2): 226-232.

(下转第 48 页)

Effects of available carbon and nitrogen concentration on the N_2O flux of the Loessal soil

L IANG Dong-li¹, TONG Yan-an¹, Ove Emteryd², FANG Ri-yao¹, MA L in-ying¹

(1 College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Swedish University of Agricultural Sciences, Umea, 90183, Sweden)

Abstract: By using C_2H_2 inhibition soil cores, these experiments studied the effects of available carbon and nitrogen concentration on the denitrification loss of normal grain field and paddy soil field of loessal soil. The results showed that: the denitrification loss increased with the available carbon concentration increased for both soils under the suitable nitrate nitrogen concentration and moisture content. Whereas the denitrification loss decreased with the $\text{NO}_3^- - \text{N}$ content reaching a certain level under the suitable available carbon and water content, the highest denitrification loss took place when available nitrogen content was N_{300} and N_{150} for the paddy soil and the dryland of grain field, respectively. However, when we used nitrate nitrogen as the nitrogen sources, the denitrification loss raised with the NO_2^- concentration increased.

Key words: loess soil; denitrification; N_2O flux

(上接第 38 页)

PCR-detection of high molecular weight glutenin subunit Dx5 gene in wheat

ZHANG Xiao-ke¹, WEI Yim in², WANG Xin-zhong¹, LI Xiao-jun¹,

WEI Ling-j³, LIU Bin¹, GAO Yun-cun¹, LI Yi⁴

(1 College of Agronomy; 2 College of Food Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 College of Agronomy, Shihezi University, Shihezi City, Xinjiang 843300, China;

4 College of Life Science, Beijing University, Beijing 100871, China)

Abstract: A pair of Dx5 gene primers were designed on the basis of difference between the Dx5 gene and the Dx2 gene. The 22 materials whose HMW-GS Glu-Dx1 locus was known were detected with PCR-based approach in this paper. The results showed that the degree of accuracy was 100% using the primers designed for Dx5 gene. It is useful for the primers designed for the primers of Dx5 gene to detect Dx5 gene in wheat lines. The Dx5 genes of 40 Chinese strains were detected with PCR based on the primers above. The results showed the Dx5 gene was found in 8 strains included 9860-5, Shaan 253, Zhengzhou 891, 97-2143, Mianyang 96171-10, Mianyang 19, Zheng 1813-1, Mianyang 11. The probability of the Dx5 gene that is 20.0% in Chinese wheat lines is far lower than in North America wheat lines. This easy, quick PCR-based approach is proposed as a very efficient and safe alternative to standard procedures for selecting bread wheat genotypes with good breadmaking properties.

Key words: wheat; polymerase chain reaction (PCR); Dx5 gene