

小麦LMW-GS基因PCR初步研究*

赵惠贤, 郭蔼光, 范三红, 郑雪

(西北农林科技大学 生命科学学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 用CTAB法提取小麦材料基因组DNA, 根据基因库中公布的已知LMW-GS基因序列, 设计并合成染色体位点特异的PCR引物1~7; 探索出优化的PCR反应体系, 即20 μL反应体积中, Mg²⁺浓度为2.5 mmol/L, dNTP浓度为200 μmol/L, 模板DNA 30~60 ng, 每种引物50 ng, Taq酶0.5 U。利用特殊小麦材料——六倍体普通小麦(染色体组为 AABBDD)、四倍体小麦(AABB)及二倍体一粒小麦(AA)和节节麦(DD)等的基因组DNA为模版, 在优化的PCR反应体系下进行特异性扩增和引物验证。结果表明, 引物3和引物4为小麦谷蛋白Glu-D3位点LMW-GS基因的特异引物, 用其进行扩增时, 循环反应条件为94 变性1 min, 62 退火1 min, 72 延伸2 min; 扩增产物大小约为1.63 kb, 包括启动子和整个编码区。引物5和7为小麦谷蛋白Glu-B3位点LMW-GS基因的特异引物, 用其进行扩增时, 循环反应条件为94 变性1 min, 64 退火1 min, 72 延伸2 min; 扩增产物大小约为1.45 kb, 包括启动子和整个编码区。

[关键词] 普通小麦; 特异染色体位点; 低分子量麦谷蛋白基因; PCR

[中图分类号] S512.103.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2004)01-0032-05

小麦种子麦谷蛋白由高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)和低分子量麦谷蛋白亚基(LMW-GS)组成。它们分别由第一同源群染色体长臂上Glu-1位点(Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1位点)和短臂上Glu-3位点(Glu-A3, Glu-B3, Glu-D3位点)基因编码, 二者对小麦加工品质均有重要影响。有关小麦HMW-GS结构及其编码基因的研究较为深入, 已从小麦中克隆出多个优质HMW-GS基因^[1,2], 并已开始将这些优质基因用于改良小麦品质的研究^[3,4]。近年来关于小麦LMW-GS结构及其与加工品质关系的研究也取得了一定进展^[5,6], 但是关于普通小麦LMW-GS基因的研究国内外报道很少。

本研究拟根据Genebank, EMBL等库中公布的已知LMW-GS基因序列, 设计合成小麦谷蛋白Glu-B3位点和Glu-D3位点特异LMW-GS基因的PCR引物, 探索优化的PCR反应体系, 并用六倍体、四倍体和二倍体小麦的基因组DNA为模板, 在优化的PCR反应体系下进行特异性扩增, 以验证和筛选所设计的染色体位点特异的LMW-GS基因的PCR引物。旨在为小麦优质LMW-GS基因及其启

动子的克隆奠定基础, 为利用基因工程进行小麦品质改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及来源

供试材料有六倍体小麦(2n=42, AABBDD) Suneca、Cook、小偃6号和陕优225, 四倍体小麦(2n=28, AABB) 墨西黑卡及二倍体一粒小麦(2n=14, AA)和节节麦(2n=14, DD)。其中二倍体材料由中国农科院品种资源研究所张学勇研究员提供, 其他材料由本研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 采用CTAB法提取基因组DNA^[7]。

1.2.2 染色体位点特异的LMW-GS基因PCR引物的设计 根据EMBL, Genbank等库中公布的已知LMW-GS基因序列, 设计了小麦谷蛋白Glu-B3位点和Glu-D3位点特异的LMW-GS基因PCR引物共7个(表1), 由上海生工公司合成。其中, 引物1~4为Glu-D3位点LMW-GS基因设计, 引物1位

* [收稿日期] 2002-12-23

[基金项目] 国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY-03-A-11-01); 杨凌农业生物技术育种中心资助项目(1994-14)

[作者简介] 赵惠贤(1965-), 女, 陕西临潼人, 副教授, 博士, 主要从事生化与分子生物学的教学和研究工作。E-mail: Huixianzhao212@hotmail.com

于- 12~ 8 bp 处, 引物 2 位于编码区末端, 引物 3 大致位于- 600 bp 处, 引物 4 大致位于终止密码子下游 73 bp 处; 引物 5~ 7 为 Glu-B3 位点 LMW-GS 基

因设计, 引物 5 位于- 400~ - 380 bp 处, 引物 6 位于- 10~ 8 bp 处, 引物 7 位于编码区末端

表 1 设计合成的引物及其碱基序列

Table 1 Primers synthesized and their sequences

引物 Primer	碱基序列 Base Sequence	引物 Primer	碱基序列 Base Sequence
1	5 CACCAA TCCA CCA TGAA GAC 3	5	5 TCCTGA GAA GTGCA TGACA TG3
2	5 TA TCA GTA GGCA CCAA CTCC 3	6	5 CCAA TCCA CCA TGAA GACCTTC 3
3	5 TTGTA GAAACTGCCA TCCTT 3	7	5 GTA GGCA CCAA CTCCGGTGC 3
4	5 GTCA CCGCTGCA TCGACA TA 3		

1.2.3 目的基因扩增的 PCR 体系 参考 D'ovidio 等^[8], PCR 反应总体积为 20 μL, 其中含 1 × buffer, 200 μmol/L 4 种 dNTP, 每种引物 50 ng, 2.5 mmol/L MgCl₂, 模板 DNA 30~ 60 ng, 1 U Taq 酶。在 PCR 体系中其他因素保持不变的情况下, 分别对 Mg²⁺ 浓度、模板浓度及退火温度进行以下试验, 以建立优化的 LMW-GS 基因 PCR 体系。

(1) PCR 体系中 Mg²⁺ 浓度试验。设计了 0, 0.625, 1.250, 2.500, 3.125, 3.750 和 4.500 mmol/L 7 个 Mg²⁺ 浓度, 以 Suneca 的基因组为模板, 用引物 5 和 7 进行 PCR 扩增, 以确定 Mg²⁺ 的最佳浓度。

(2) PCR 体系中模板 DNA 浓度试验。通过电泳估测 DNA 原液中 DNA 含量后, 将原液稀释 10 倍。分别取 Suneca DNA 稀释液 1, 3, 5, 7 和 10 μL (即不同 DNA 浓度) 作模板, 用引物 5 和 7 进行 PCR 扩增, 以确定 PCR 反应体系中 DNA 样品稀释液的最佳用量。

(3) 退火温度试验。根据各引物的特征参数, 设置了 62 和 64 两种退火温度 (即反应条件 1 和 2) 进行 PCR 反应。反应条件 1: 95 预变性 1 min; 循环反应为 94 1 min, 62 1 min, 72 2 min, 30 个循环后, 再 72 延伸 7 min。反应条件 2: 95 预变性 1 min; 循环反应为 94 1 min, 64 1 min, 72 2 min, 30 个循环后, 再 72 延伸 7 min。

1.2.4 DNA 的电泳检测 总基因组 DNA 用质量分数 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测; PCR 产物在质量分数 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳。

2 结果与讨论

2.1 基因组 DNA 的提取

用 CTAB 法提取基因组 DNA 时, 可以得到很明显的白色团絮状 DNA 沉淀。经 TE 溶解, 凝胶电泳检测, 所有样品电泳结果良好, 未出现 RNA 污染和 DNA 降解现象 (图 1)。

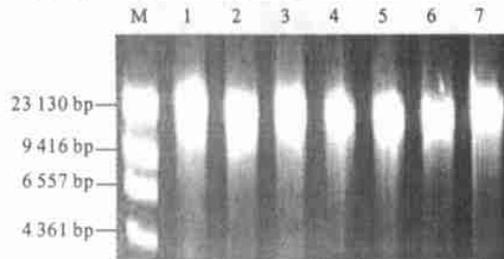


图 1 CTAB 法提取的小麦基因组 DNA 电泳图谱 M. 标准分子质量; 泳道 1~ 7. Suneca, Cook, 小偃 6 号, 陕优 225, 墨西黑卡, 一粒小麦, 节节麦

Fig 1 Electrophoretogram of wheat genomic DNA extracted by CTAB M. Molecule standard; 1- 7. Suneca, Cook, Xiaoyan No. 6, Shaanyou 225, Moxiheika, T. urartu, A. e squarrosa

2.2 LMW-GS 基因优化 PCR 体系的建立

2.2.1 最适 [Mg²⁺] 的确定 [Mg²⁺] 是 PCR 反应中的一个重要因素, Mg²⁺ 浓度不但会影响酶的活性及合成的忠实性, 而且还会影响引物与模板的结合效率, 模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成等^[9]。不同 [Mg²⁺] 下 PCR 结果见图 2。从图 2 可以看出, [Mg²⁺] > 2.5 mmol/L 时可扩增出非常清晰的条带。因此, 在 PCR 反应中 [Mg²⁺] 均采用 2.5 mmol/L。

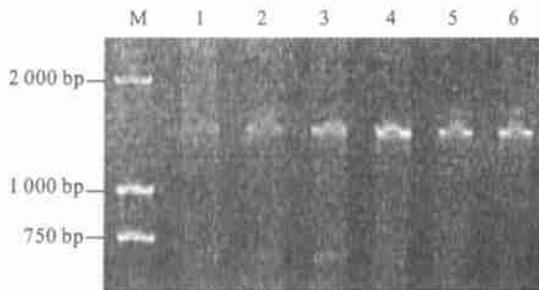


图 2 不同 [Mg²⁺] 下 PCR 扩增产物的电泳图谱 泳道 1~ 6 [Mg²⁺] 分别为 0, 0.625, 1.250, 2.500, 3.125, 3.750 mmol/L; M. 标准分子质量

Fig 2 Electrophoretogram of PCR products under different concentration of Mg²⁺ 1- 6 The concentration of [Mg²⁺] is 0, 0.625, 1.250, 2.500, 3.125, 3.750 mmol/L respectively; M. Molecule standard

2.2.2 模板DNA 最适浓度的确定 不同模板浓度时 PCR 结果(图 3)表明: 20 μL PCR 反应体系中

DNA 稀释液用量为 5 μL 时, 扩增产物带型清晰。故 PCR 反应均按此量加入。

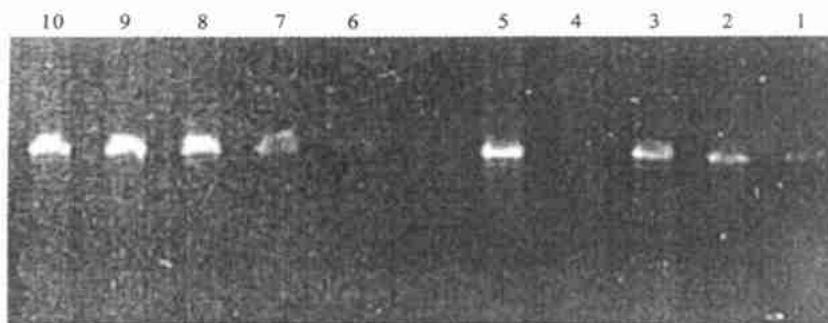


图 3 不同模板浓度和不同循环条件下 PCR 产物电泳图谱

模板浓度(用 DNA 样品稀释液用量表示)分别是 1 和 6 为 1 μL , 2 和 7 为 3 μL , 3 和 8 为 5 μL , 4 和 9 为 7 μL , 5 和 10 为 10 μL ; 1~ 5 按反应条件 1 扩增; 6~ 10 按反应条件 2 扩增

Fig. 3 Electrophoretogram of PCR products under different template DNA concentration

DNA concentration shown as the quantity of diluted extract solution. 1 and 6 1 μL , 2 and 7 3 μL , 3 and 8 5 μL ,

4 and 9 7 μL , 5 and 10 10 μL ; 1- 5 PCR under reaction condition 1; 6- 10 PCR under reaction condition 2

2.2.3 退火温度对 PCR 产物的影响 用同 1 对引物进行 PCR 扩增时, 在不同退火温度下扩增产物有差异。引物 5 和 7 在循环条件 1(62 退火 1 min)扩

增特异性不强, 除了目的基因被扩增外, 还有非特异性扩增产物带; 在循环条件 2(64 退火 1 min)扩增特异性很强(图 4)。

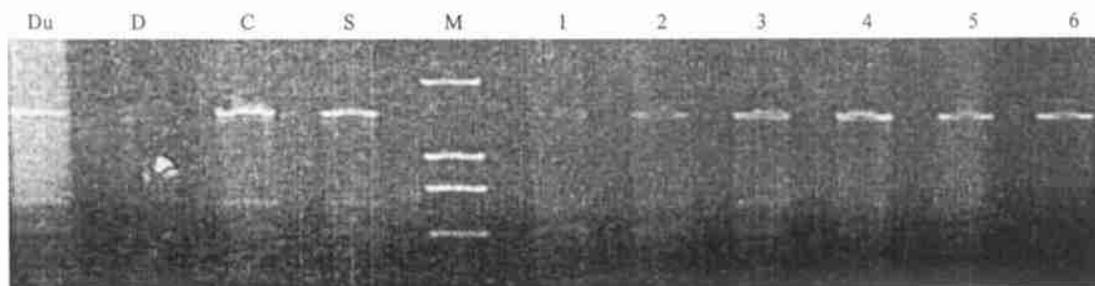


图 4 引物 5 和 7 在不同退火温度下的 PCR 产物

左边 4 个泳道退火温度为 62 $^{\circ}\text{C}$; 右边 6 个泳道退火温度为 64 $^{\circ}\text{C}$;

S, C, D 和 Du 分别为 Suneca, Cook, 节节麦和墨西哥黑卡; M. 标准分子质量; 图 5, 6 同。

Fig. 4 Primer 5 and 7 PCR products under different annealing temperature

Left 4 was under 62 $^{\circ}\text{C}$; Right 6 was under 64 $^{\circ}\text{C}$;

S, C, D and Du was Suneca, Cook, *Ae squarrosa* and moxiheika respectively.

由以上结果可知, 循环反应条件不同, 扩增产物就有差异。如果循环条件不合适, 就会出现非特异性扩增产物带或扩增产物带不清晰。图 3 为两组相同体系在不同退火温度下扩增的结果, 从图 3 中可以看出, 1~ 5 泳道的扩增结果不如 6~ 10 泳道清晰。而图 4 表明, 循环条件不合适, 就会出现非特异性扩增产物, 直接影响试验结果。此外, 不同引物的退火温度上、下限有所不同。只有在一定温度范围内提高退火温度才能增加扩增产物的特异性。退火时间不是关键因素, 一般用 1 min 足以使引物与模板充分复性^[4]。

2.3 PCR 引物的验证筛选

根据所设计引物 1~ 7 的位置可预测出, 用引物 1 和 2 扩增出的产物将是 1D 染色体短臂 Glu-D3 位点上 LMW-GS 基因编码区, 用引物 3 和 4 扩增出的产物包括启动子和整个编码区; 用引物 5 和 7 扩增的产物应为 1B 染色体短臂 Glu-B3 位点上 LMW-GS 基因, 包括启动子和整个编码区, 用引物 6 和 7 扩增得到的产物只包含完整的编码区^[6, 8, 10]。

利用六倍体小麦(AABBDD)、四倍体小麦(AABB)和二倍体一粒小麦(AA)及节节麦(DD)等材料的基因组 DNA 为模板, 用不同引物对在上述

优化的 PCR 体系下进行 PCR 扩增, 以验证设计的 PCR 引物是否为染色体位点特异的 LMW-GS 基因。

引物 1 和 2, 引物 6 和 7 扩增产物特异性不强, 有 2~3 条非特异性扩增条带出现。原因可能有两个: 一是 PCR 反应条件不合适, 有待进一步研究; 二是引物设计有误, 并非是 LMW-GS 基因的特异引物。

图 5 表明, 用引物 3 和 4 进行 PCR 扩增时, 含 1D 染色体的六倍体小麦和节节麦均扩增出 1 条带, 该产物约为 1 630 bp, 而不含 1D 染色体的一粒小麦和四倍体小麦墨西哥黑卡都未扩增出该条带, 从而证明了引物 3 和 4 为 Glu-D3 位点 LMW-GS 基因的特异引物。

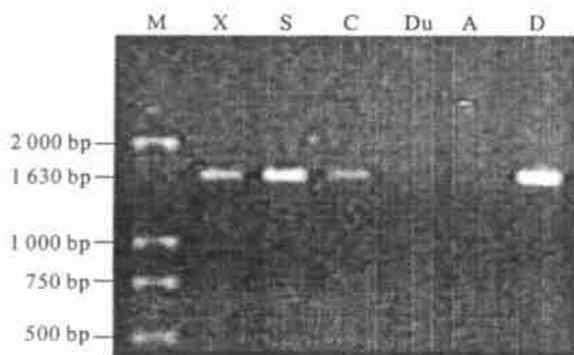


图 5 引物 3 和 4 PCR 扩增产物

A. 一粒小麦; X. 小偃 6 号, 图 6 同。

Fig 5 Primer 3 and 4 PCR products

A. *T. urartu*; X. Xiaoyan 6

3 结 论

(1) 小麦 LMW-GS 基因稳定的 PCR 反应体系: 反应体积为 20 μL , Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L , dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$, 模板 DNA 为 30~60 ng, 引物量为 50 ng, Taq 酶 0.5 U。

(2) 引物 3 和 4 为小麦谷蛋白 Glu-D3 位点 LMW-GS 基因特异引物。用其进行 PCR 扩增时, 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 循环反应为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1

由图 6 可以看出, 用引物 5 和 7 进行 PCR 扩增时, 含 1B 染色体的六倍体小麦和四倍体小麦墨西哥黑卡均扩增出 1 条带, 约为 1 450 bp, 而不含 1B 染色体的一粒小麦和节节麦均未扩增出该条带, 从而说明了引物 5 和 7 为 Glu-B3 位点 LMW-GS 基因的特异引物。

以上试验结果与预测的结果完全吻合, 充分证明了引物 3 和 4 确是小麦谷蛋白 Glu-D3 位点 LMW-GS 基因的特异引物; 引物 5 和 7 为小麦谷蛋白 Glu-B3 位点 LMW-GS 基因的特异引物。该结果可用于小麦优质低分子量麦谷蛋白基因及其启动子的克隆研究。而引物 1 和 2, 6 和 7 扩增产物不具有特异性, 尚需改变 PCR 反应条件进一步验证。

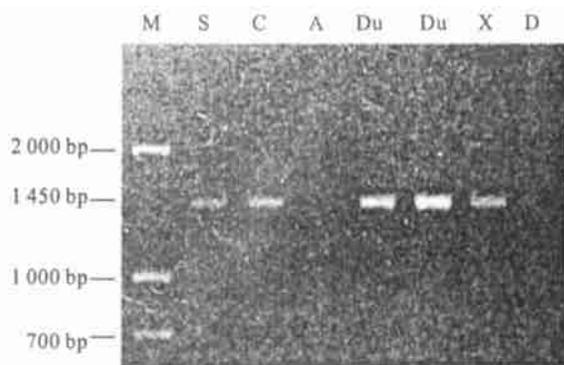


图 6 引物 5 和 7 扩增的产物

Fig 6 Primer 5 and 7 PCR products

m in, 62 $^{\circ}\text{C}$ 1 m in, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 m in, 30 个循环后, 再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 m in。其扩增产物包括启动子和整个编码区。

(3) 引物 5 和 7 为小麦谷蛋白 Glu-B3 位点 LMW-GS 基因特异引物。用其进行 PCR 扩增时, 循环反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 m in; 循环反应为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 m in, 64 $^{\circ}\text{C}$ 1 m in, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 m in, 30 个循环后, 再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 m in。其扩增产物包括启动子和整个编码区。

[参考文献]

- [1] 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[J]. Theor Appl Genet, 1989, 77: 689-700
- [2] Bustos A De, Rubio P, Jouve N, et al Molecular characterization of the inactive allele of the gene Glu-A1 and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenin of wheat[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1085-1094

- [3] Barro F, Rooke L, Bekes F, et al Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(12): 1295- 1299.
- [4] Alvarez M L, Guelman S, Halford N G, et al Silencing of HMW glutenin in transgenic wheat expressing extra HMW Subunits[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 319- 327.
- [5] Nieto-taladriz M T, Ruiz M. Variation and classification of B low-molecular-weight glutenin subunit alleles in durum wheat[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1155- 1160.
- [6] D'Ovidio R, Marchitelli C. Sequence similarity between allelic Glu-B3 genes related to quality properties of durum wheat[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 455- 461.
- [7] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321- 4325.
- [8] D'Ovidio R, Simeone M, Masci S, et al Molecular characterization of a LMW-GS gene located on chromosome 1B and the development of primers specific for the Glu-B3 complex locus in durum wheat[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1119-1126.
- [9] 刘列钊, 陈万全 小麦随机扩增多态性DNA 的反应体系探索[J]. 生物技术, 2000, 10(1): 1- 3.
- [10] Ciaffini M, Lee Y K. The low-molecular-weight glutenin subunit proteins of primitive wheats III The genes from D-denome species[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 135- 148.

Primary study on PCR of LMW-GS genes from wheat

ZHAO Hui-xian, GUO Ai-guang, FAN San-hong, ZHENG Xue

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

Abstract: The genomic DNA was extracted from wheat cultivars Suneca and Cook using CTAB method. Based on the known LMW-GS gene sequences reported in genebank, the primer 1-7 for specific chromosome locus genes was designed and synthesized. An optimal reaction system suitable for LMW-GS PCR was established. By using the genomic DNA from special wheat material-hexaploid (AABBDD), tetraploid (AABB) and diploid (AA or DD) as templates, specific LMW-GS genes in an optimal reaction system was amplified. The result showed that, primer 3 and 4 were specific for LMW-GS genes at Glu-D3 locus in wheat. The size of the PCR products was about 1.63 kb, including promoter and the whole CDS. Primer 5 and 7 were specific for the LMW-GS genes at Glu-B3 locus in wheat. The size of the PCR products was about 1.45 kb, including promoter and the whole CDS. These results will provide some important information for wheat high-quality LMW-GS gene and its promoter cloning.

Key words: *Triticum aestivum*; specific chromosome locus; LMW-GS gene; PCR