

小麦品系2004s-47的IDx基因的克隆与序列分析

相微微¹, 王建武¹, 刘宝龙², 张怀刚²

(¹榆林学院生命科学学院, 陕西榆林 719000; ²中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘要:明确2004s-47品系IDx基因的序列,为寻找新的优质HMW-GS类型、实现小麦品质的改良及育种提供理论依据。应用SDS-PAGE对2004s-47品系中HMW-GS的亚基组成进行分析,用PCR技术克隆IDx亚基基因并用DNAMAN软件进行序列分析。结果从2004s-47品系中扩增出了大小为2514 bp的基因。该基因具有典型的小麦HMW-GS x-型基因序列结构特征。又因为1D比1A和1B基因组中的x-型和y-型基因易表达,结合SDS-PAGE的结果,所以2004s-47品系中HMW-GS的亚基组成为(Null, 7+8, ?+10)。序列比对表明,2004s-47品系的IDx?基因与节节麦(*Aegilops tauschii*) IDx2.1t (AF480486)同源性最高。将该序列提交到NCBI,获得序列登陆号为:KP702118。2004s-47品系中IDx?序列的确定,为原核表达确定IDx?是否为新的基因提供了基础,也为品质改良及育种提供了依据。

关键词: HMW-GS; 基因分离; 序列分析; IDx?; 节节麦

中图分类号: S184

文献标志码: A

论文编号: casb15030014

Molecular Cloning and Sequence Analysis of the IDx Gene in Wheat Line 2004s-47

Xiang Weiwei¹, Wang Jianwu¹, Liu Baolong², Zhang Huaigang²

(¹College of Life and Science, Yulin University, Yulin Shaanxi 719000;

²Northwest Institute of Plateau Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

Abstract: Clarifying the sequence of IDx gene in 2004s-47 line would provide a theoretical basis for finding new types of high-quality HMW-GS and achieve wheat quality improvement and breeding. The high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) composition of 2004s-47 line was analyzed by SDS-PAGE. IDx subunit gene was cloned by PCR and sequence analysis was performed by DNAMAN. The results revealed that the gene sequence that cloned from 2004s-47 was 2514 bp and had typical x-type structure of wheat HMW-GS. And because the expressions of x- and y-type genes in the D genome of bread wheat were easier than that in the A and B genomes, together with the results of SDS-PAGE, the composition of 2004s-47 line was (Null, 7+8, ?+10). Sequence alignments showed that the DNA sequence of the IDx? gene from 2004s-47 had the highest similarity to that of previously published IDx2.1t (AF480486) in *Aegilops tauschii*. The sequence was submitted to NCBI and sequence accession number: KP702118 was obtained. The identification of IDx gene sequence in 2004s-47 line provided a theoretical basis for the determination of whether IDx? was a new type of gene by prokaryotic expression, and for wheat quality improvement and breeding.

Key words: HMW-GS; gene isolation; sequence analysis; IDx?; *Aegilops tauschii*

0 引言

小麦属于禾本科(Poaceae)小麦族(Triticeae dumort)小麦属(*Triticum* L.),是世界上最重要的三大粮

食作物(小麦、玉米、水稻)之一。小麦种子贮藏蛋白占种子总蛋白的一半左右,它的结构和特性对面粉加工品质起着重要的作用。多年来,小麦种子贮藏蛋白与

基金项目:榆林学院高层次人才科研启动基金项目“榆林不同区域绿豆品种的加工品质特性研究”(14GK37)。

第一作者简介:相微微,女,1982年出生,山东临沂人,助教,硕士,主要从事作物育种及品质改良研究。通信地址:719000 陕西省榆林市崇文路4号榆林学院生命科学学院, Tel: 0912-3891342, E-mail: wwx2476@163.com。

收稿日期:2015-03-03, **修回日期:**2015-05-04。

面粉加工品质的关系,一直是小麦品质研究的热点^[1]。随着生物技术的迅速发展,人们已经对贮藏蛋白的组成及分类、序列及结构特征、遗传特性、分子生物学特征、对加工品质的影响及转基因等方面的研究都取得了显著进展。

不同小麦品种的高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)的组成图谱中存在着广泛的复等位基因。每个位点都有2个表现为紧密连锁的基因,它们分别控制着x-型亚基(分子量较高)和y-型亚基(分子量较低)^[2-5]。经大量研究^[2-8],目前至少有28个等位基因被鉴定出来,*Glu-A1*位点上3种等位基因变异(Null, 1, 2*),*Glu-B1*位点上有14种等位基因变异(7+8, 17+18, 7, 6+8, 20, 21, 14+15, 13+16, 7+9, 6+8*, 13+19, 22, 7*+8, 7*),*Glu-D1*位点上至少有11种等位基因变异(5+10, 2+12, 3+12, 4+12, 5, 5+12, 2+10, 2, 2+12, 2+11, 2.1+10)。目前,随着新的品种的出现,新的亚基也在不断地被发现。3个位点间存在着对品质的加性效应,具有1, 17+18, 2+12和1, 17+18, 5+10高分子量麦谷蛋白亚基组合的品种综合品质性状显著优于含有N, 14+15, 2+12亚基组合的品种^[9]。以*Glu-D1*位点的作用最大,尤其是在面包烘烤品质方面^[8,10]。

到目前为止,已有大量的*HMW-GS*基因得到分离及克隆。20世纪90年代以来,PCR(聚合酶链式反应)在*HMW-GS*基因的研究中开始发挥重要作用,是对传统的cDNA文库和基因文库基因分离方法的一种有效补充和改进。Mackie等^[11]用PCR的方法从节节麦(*Aegilops tauschii*)中克隆出一个开放阅读框长为1918 bp的*Dy12t*基因。Bustos等^[12]利用AS-PCR(allele-specific primer PCR),根据*Glu-1A*, *Glu-1D*位点基因上的微小差异设计了一系列的引物来扩增*Ax1*, *Ax2**, *Ax-null*, *Dy10*和*Dy12*的编码区,并克隆和测序了*Ax-null*基因。Juhász等^[13]用GS-PCR(gene-specific PCR)方法研究了*HMW-GS*的等位基因,发现了一个新的亚基基因*IAx2*B*,其序列与*IAx2**的差异仅为一个Cys取代了一个Ser。因为小麦的*HMW-GS*基因的重复序列非常多,用常用的测序方法很难完成,定向缺失亚克隆法是对*HMW-GS*亚基基因成功测序的独特方法^[14]。Wan等^[15]用定向缺失亚克隆的方法从节节麦中克隆了*IDx2.1t*和*IDx2t*基因,Yuan等^[16]用此法,克隆了云南铁壳麦和西藏半野生小麦的沉默的*IBy9*亚基基因。

关于*HMW-GS*基因的分子结构,D'Ovidio等^[17]研究证明,正常表达的*HMW-GS*基因的编码区均不含有内含子。*HMW-GS*的编码DNA序列由4个区域组成:(1)信号肽序列,起始密码子开始的一段63 bp的核昔

酸序列;(2)无重复的5'N-末端;(3)中央重复区,基因的DNA序列长度的差异,主要由基因中部重复序列大小及重复次数不同所引起,其变异是由该区域内DNA序列的插入或缺失造成;(4)无重复的3'C-末端区。2个紧密相连的终止密码子TGATAG终止编码。根据*HMW-GS*的DNA序列推导出的氨基酸序列可以看出,成熟高分子量谷蛋白亚基包括3个区域:N-端非重复区,81~104个氨基酸组成;高度重复的中央区,400~670个氨基酸组成;C-端非重复区,42个氨基酸组成。N-端非重复区:x型亚基含有81~89个氨基酸,y型亚基含有104个氨基酸。*HMW-GS*的半胱氨酸主要集中在非重复区C-端和N-端。y-型亚基一般含有6个半胱氨酸,5个在N-端,1个在C-端,第三个和第四个半胱氨酸残基紧密相邻。x-型亚基一般含有4个半胱氨酸,3个在N-端,1个在C-端,与y-型亚基相比x-型亚基中半胱氨酸出现了缺失现象且N-端无相邻的半胱氨酸。而中部重复序列区由多肽单位:六肽、九肽和三肽重复出现构成,在x-型亚基中,六肽(PGQGQQ)串联重复出现或与三肽(GQQ)和九肽(GYYPTSP/LQQ)相连,在y-型亚基中,不含有三肽且分散的九肽也没有一致序列(GYYPTSP/LQQ)。另外,亚基内部或亚基之间这些肽基序也不是完全保守的^[18-19]。这是区分x-型亚基与y-型亚基基因的重要依据。

本试验拟用从江苏省引进中国科学院西北高原生物研究所的一个区试品系2004s-47作为研究材料,从其中克隆表达的*IDx*亚基基因,研究其组成、序列特征,为以后通过原核表达进一步确定*IDx?*亚基基因是否为新的亚基提供了基础,同时也为以后品质的改良及育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验选用的材料为江苏省扬州市里下河地区农科所(扬州市农科院)提供的小麦品系2004s-47,该品系种植在中科院西北高原生物研究所下红庄试验基地。试验所用的材料均取自该基地。

1.2 试验方法

1.2.1 谷蛋白亚基的提取及SDS-PAGE分析 称取0.09 g左右约1/3粒种子,研碎后装入Enphendrof管中加入提取液[双蒸水4.0 mL, 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 1.0 mL, 10% SDS(w/v) 11.6 mL, 丙三醇0.8 mL, β -巯基乙醇0.4 mL, 0.05% (w/v) 溴酚蓝0.2 mL] 120 μ L, 室温浸提1 h,并不时震荡,然后在100℃水浴保温浸提4 min,冷却后在13000 r/min, 4℃下离心15 min,放入冰箱中备用。点样前再离心5 min。

采用不连续分离系统, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶为 5%。上样量为每孔加 12 μL 于样品槽孔内。上样后稳流 15 mA/胶, 直至染料达到凝胶前沿。固定 30 min 后染色 30 min 左右, 脱色至背景清晰。亚基命名采用 Payne 等^[7]建立的系统。

1.2.2 小麦全基因组 DNA 的提取 取适量叶片 0.1 g 左右加液氮充分研磨后, 采用改良的 CTAB 法提取^[20]。75% 乙醇沉淀后风干加 1 mL 水溶解, 1.0% 琼脂糖凝胶检测。

1.2.3 PCR 扩增 以总 DNA 为模板, 该研究是在比较了 NCBI 提供的已发表的大量 HMW-GS 基因上下游序列和克隆出来的麦谷蛋白基因编码序列的基础上, 设计的一对小麦 HMW-GS 基因的兼并性引物。引物序列如下: P1: 5'-ATCATCACCCACAACACCG-3', P2: 5'-GCTGAGACATGCAGCACATA-3'。上游引物位于起始密码子 ATG 上游 60 个碱基左右, 下游引物位于终止密码子 TGATAG 下游 187 个碱基左右(参照 *IDx5* 亚基基因序列长度, 序列号: x12928)。反应总体积为 20 μL , 其中含模板 1 μL , 2 \times GC buffer 10 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 3.5 μL , P1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , P2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , LA Taq 0.2 μL , dd H₂O 4.5 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min, 38 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。1.0% 琼脂糖凝胶检测。

1.2.4 PCR 产物的克隆 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查后, 切下目的条带, 用 PCR 产物纯化试剂盒回收 DNA, 连接到 PMD18-T 载体上, 转化 DH5 α 感受态细胞, 在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基 [IPTG (1 mol/L) 4 μL 和 X-gal (20 mg/mL) 40 μL] 上进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落培养, 提取质粒用 Kpn1 和 Xba1 进行酶切鉴定。PCR 产物纯化试剂盒为上海华舜生物技术有限公司产品, PMD18-T 载体为大连宝生物(TAKARA)工程有限公司产品。

1.2.5 定向缺失制备亚克隆 因为小麦的 HMW-GS 基因的重复序列很多, 用普通的测序方法无法进行, 所以选用定向缺失制备亚克隆的方法, 用载体上的引物完成每一段的测序后, 再进行拼接^[13], 以提高测序的准确度。具体做法如下: 双酶切总反应体系为 60 μL , 其中含质粒 DNA 12 μL /5 μg , Kpn1 60 U/5 μL , Xba1 80U/4 μL , Buffer 6 μL , H₂O 33 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。完全酶切后, 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10~30 min, 使内切酶失活。双酶切产物用外切酶 *Exo III* 酶切, 其中双酶切产物 50 μL , 10 \times *Exo III* Buffer 6 μL , *Exo III* 1 μL (30~40 U/ μg), ddH₂O 3 μL , 23 $^{\circ}\text{C}$ 酶切。酶切 2、4、6、8、10、12、14、16、18 min 后, 各取 5 μL

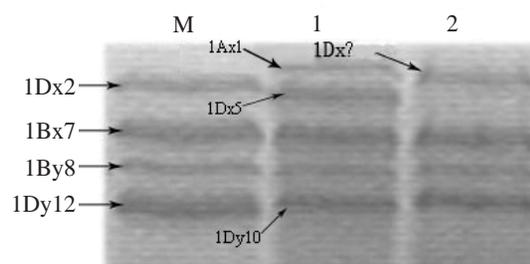
于新的 PCR 小管中, 每次取出后放入 70 $^{\circ}\text{C}$ 失活 10 min。将各管的样品混合在同一 PCR 管内, 按下列条件用 S1 酶切, 以去除单链, 其中样品 50 μL , 10 \times S1 Buffer 10 μL , ddH₂O 39 μL , Solution1 1 μL , 在 23 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 15 min, 加入 5 μL 0.5 mol/L EDTA 至终浓度 10 mmol/L)。再取 10 μL 反应产物在 20 μL 体积中连接过夜, 其中连接酶缓冲液 1 μL , T₄DNA 连接酶 1 μL , 回收 PCR 产物 10 μL , ddH₂O 8 μL , 反应液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 使连接酶失活, 取 10 μL 转化 *E.Coli* DH5 α 感受态。对得到的克隆用测序引物进行 PCR 扩增, 检测插入片段的大小, 选出一个梯度缺失的亚克隆系列, 这些克隆的插入片段长度处在 600 bp 到未缺失的全基因插入长度, 彼此之间相差 300~400 bp。

1.2.6 序列测定与分析 取这一批缺失的序列梯度亚克隆, 用 PMD18-T 中的测序引物 M13-47 和 RV-M, 对每一个缺失亚克隆进行一个测序反应。测序由上海生工生物工程有限公司完成。序列相似性比对由 NCBI 网站 blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 相关软件完成^[21-22], DNA 序列及氨基酸序列的多重序列比对由软件 DNAMAN 完成。

2 结果与分析

2.1 小麦高分子量麦谷蛋白亚基的鉴定

2004s-47 品系的 HMW-GS 在 SDS-PAGE 中被分离, 用中国春(N, 7+8, 2+12)和青海育成品种高原 314 (1, 7+8, 5+10) 作为对照, 结果表明 2004s-47 品系中除了含有 1Bx7+1By8, 1Dy10 亚基外, 2004s-47 品系中有 1 条迁移率大于 1Ax1 小于 1Dx2 的条带, Payne^[8] 研究证明, 与 1A 和 1B 基因组相比, 1D 基因组上 *x*-型和 *y*-型亚基基因通常是表达的, 暂定该未知亚基为 *IDx?*, 见图 1。



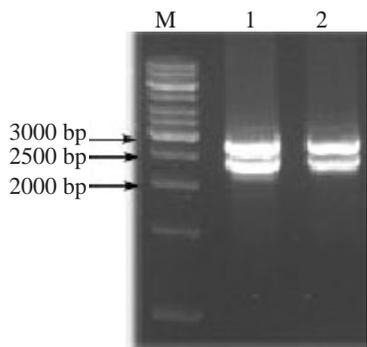
M: 中国春; 1: 高原 314; 2: 2004s-47

图 1 2004s-47 品系的 HMW-GS 组成

2.2 基因分离与序列测定

用方法中提到的引物 P1, P2 分别对 2004s-47 品系总 DNA 进行 PCR 扩增, 结果见图 2。

经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳扩增得 2 条带, 选取大

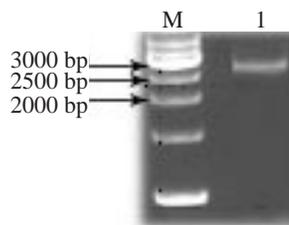


M:Marker; 1:高原314; 2:2004s-47

图2 2004s-47品系 HMW-GS 基因的PCR扩增

小介于2500 bp和3000 bp之间的带回收,结果见图3。

将回收产物克隆到pMD18-T载体中,经梯度亚克隆挑选梯度序列,结果见图4。

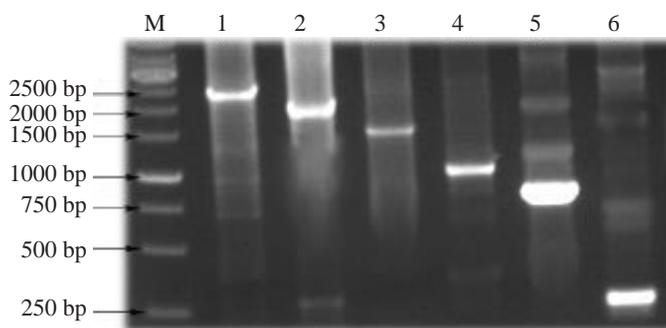


M:Marker; 1:2004s-47

图3 2004s-47品系的IDx?基因的PCR产物回收

2.3 测序及序列分析

测序拼接得到序列长度分别为2758 bp。通过序列分析可知:2004s-47品系的IDx?的编码序列长度为2514 bp,编码836个氨基酸有2个连续的终止密码子(TGATAG)。该基因具有典型的小麦HMW-GS基因序列结构特征,即包括信号肽、N-端、C-端和中央重复



M:DNA marker, 1~6:缺失的亚克隆

图4 2004s-47品系的IDx?缺失亚克隆的PCR结果

区等4个部分。信号肽是21个氨基酸残基组成的短肽,有63 bp的核苷酸编码;在N-端有3个半胱氨酸残基(Cys);C-端有1个Cys;中央重复区未发现Cys,符合x-型亚基的序列特征^[8](引言中已经提到),所以推测该HMW-GS基因为x-型亚基基因。Payne^[8]研究证明,与1A和1B基因组相比,1D基因组上x-型和y-型亚基基因通常是表达的,推断该未知亚基为1Dx亚基。

利用DNAMAN软件进行序列比对,可知:2004s-47品系的IDx?与IDtx1.5(AF594355), IDx2.1t(AF480486), IDx1.5t(EF546438), IDx2.1(A Y517724) 同源性较高。2004s-47品系的IDx?与IDtx1.5的DNA序列同源性为99.56%,与IDx2.1t的DNA序列同源性为99.92%, IDx1.5t的DNA序列同源性为99.56%, IDx2.1的DNA序列同源性为99.68%;2004s-47品系的IDx?与IDtx1.5的氨基酸序列同源性为99.40%,与IDx2.1t的氨基酸序列同源性为99.76%, IDx1.5t的氨基酸序列同源性为99.64%, IDx2.1的氨基酸序列同源性为99.52%;所以2004s-47品系的IDx?与IDx2.1t不论是DNA序列还是氨基酸序列同源性都最高。

针对同源比对结果,将2004s-47品系的IDx的亚基基因及氨基酸序列与相似性最高的IDx2.1t的序列进行比对分析,见图5。

结果显示:2004s-47品系的IDx?的第1855个碱基为A而不是G,编码的氨基酸为Ile(ACA)而不同于IDx2.1t中的Val(GCA),第2203个碱基为C而不是T,编码的氨基酸为Gln(CGG)而不同于IDx2.1t中的Trp(TGG)。因此与节节麦中的IDx2.1t序列相比,2004s-47品系的IDx?有2个碱基的差异,导致有2个氨基酸的差异,且都出现在中部重复序列区。将该序列提交到NCBI,获得序列登陆号为:KP702118。

3 结论与讨论

2004s-47为扬州里下河地区农科所培育的普通六倍体小麦品系,引入中国科学院西北高原生物研究所进行区试。SDS-PAGE分析显示有一条带介于1Ax1和1Dx2中间,其余亚基为7+8,10。Payne^[8]研究证明,与1A和1B基因组相比,1D基因组上x-型和y-型亚基基因通常是表达的。小麦理论上包含6个不同的高分子量麦谷蛋白亚基,但由于基因沉默,普通小麦品种通

1Dx2.1t 1Dx?	GGACAAGGGCAACAAGGCCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCGGGACAAGGGCAACCAGGGTACTAC	1104
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q G Q Q G Q Q P G Q G Q Q P G Q G Q P G Y Y	368
1Dx2.1t 1Dx?	CCAACTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCCAACCTTCTTCGCAGCAGCCAACA	1173
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	P T S P Q Q S G Q G Q P G Y Y P T S S Q Q P T	391
1Dx2.1t 1Dx?	CAATCGCAGCAACCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGGTAGGACAAGGGCAACAAGCTCAGCAGCCA	1242
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Q S Q Q P G Q G Q Q G Q Q V G Q G Q Q A Q Q P	414
1Dx2.1t 1Dx?	GGACAAGGGCAGCAACCGGGACAAGGGCAGCCAGGGTACTACCCAACCTTCTTCGCAGCAGTCAGGACAA	1311
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q G Q Q P G Q G Q P G Y Y P T S P Q Q S G Q	437
1Dx2.1t 1Dx?	GGGCAACCAGGGTACTACCTAACTTCTTCGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAGCAGCCAGGACAATTGCAA	1380
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q P G Y Y L T S P Q Q S G Q G Q Q P G Q L Q	460
1Dx2.1t 1Dx?	CAATCAGCACAAAGGGCAAAAAGGACAGCAACCAGGACAAGGTCAACAGCCAGGGCAAGGGCAACAAGGT	1449
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Q S A Q G Q K G Q Q P G Q G Q Q P G Q G Q Q G	483
1Dx2.1t 1Dx?	CAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAACCGGGCAAGGGCAGCCAGGGTACTACCCAACCTTCT	1518
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Q Q P G Q G Q Q G Q Q P G Q G Q P G Y Y P T S	506
1Dx2.1t 1Dx?	CCGCAGCAATCAGGACAAGGGCAACAGCCAGGACAATGGCAACAACCAGGACAAGGGCAACCAGGATAC	1587
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	P Q Q S G Q G Q Q P G Q W Q Q P G Q G Q P G Y	529
1Dx2.1t 1Dx?	TACCCAACCTTCTCCGTTGCAGCCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACGACCCAACCTTCTCCGCAACAGCCA	1656
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Y P T S P L Q P G Q G Q P G Y D P T S P Q Q P	552
1Dx2.1t 1Dx?	GGACAAGGGCAGCAACCAGGACAATTGCAACAACCAGCACAAGGGCAACAAGGGCAGCAACTAGCACAA	1725
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q G Q Q P G Q L Q Q P A Q G Q Q G Q Q L A Q	575
1Dx2.1t 1Dx?	GGGCAACAAGGGCAGCAACCAGGACAAGTGCACAAGAGCAGCAGCCAGCACAAGGGCAACAAGGTCAG	1794
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q Q G Q Q P A Q V Q Q E Q Q P A Q G Q Q G Q	598
1Dx2.1t 1Dx?	CAGCTAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCAGCAACCAGCACAAGGG	1863
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Q L G Q G Q Q G Q Q P G Q G Q Q G Q Q P A Q G	621
1Dx2.1t 1Dx?	CAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGTCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAACCAGGACAA	1932
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Q Q G Q Q P G Q G Q Q G Q Q P G Q G Q Q P G Q	644
1Dx2.1t 1Dx?	GGGCAGCCATGGTACTACCCAACCTTCTTCGCAGGAGTCAGGACAAGGGCAACAGCCAGGACAATGGCAA	2001
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q P W Y Y P T S P Q E S G Q G Q Q P G Q W Q	667
1Dx2.1t 1Dx?	CAACCAGGACAAGGGCAACCAGGGTACTACCTAACTTCTCCGTTGCAGCTAGGACAAGGGCAACAAGGG	2070
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Q P G Q G Q P G Y Y L T S P L Q L G Q G Q Q G	690

1Dx2.1t 1Dx?	TACTACCCAACTTCTCTGCAACAACCAAGGACAAAGGGCAGCAACCAAGGACAATGGCAACAATCGGGACAA	2139
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Y Y P T S L Q Q P G Q G Q Q P G Q W Q Q S G Q =	713
1Dx2.1t 1Dx?	GGGCAACATGAGTACTACCCAACTTCTCCGCAGCTGTCAGGACAAGGGCAACGGCCAGGACAATGGCTG	2208
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q H E Y Y P T S P Q L S G Q G Q R P G Q W L =	736
1Dx2.1t 1Dx?	CAACCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACTTCTCCGCACAGTCAGGACAAGGGCAACAACCTA	2277
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	Q P G Q G Q Q G Y Y P T S P Q Q S G Q G Q Q L =	759
1Dx2.1t 1Dx?	GGACAATGGCTGCAACCAAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAACTTCTCTGCAACAGACAGGACAA	2346
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q W L Q P G Q G Q Q G Y Y P T S L Q Q T G Q =	782
1Dx2.1t 1Dx?	GGGCAGCAATCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACAGCTCATACCATGTTAGCGTGGAGCACCCAGGCG	2415
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G Q Q S G Q G Q Q G Y Y (S S Y H V S V E H Q A =	805
1Dx2.1t 1Dx?	GCCAGCCTAAAGGTGGCAAAAGGCGCAGCAGCTCGCGGCACAGCTGCCGGCAATGTGCCGGCTGGAGGGC	2484
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	A S L K V A K A Q Q L A A Q L P A M C R L E G =	828
1Dx2.1t 1Dx?	GGCGACGCATTGTCCGGCCAGCCAGTGATAG	2514
1Dx2.1t(P) 1Dx? (P)	G D A L S A S Q) * * =	838

“[]”表示信号肽区域;“{}”表示N-端区域;“()”表示C-端区域;在中部重复序列区,

表示的区域为九肽(多以GYPTSL/PQQ的形式), 表示的区域为六肽(多以PGQQQQ的形式),

表示的区域为三肽(多以GQQ的形式), 表示的区域为半胱氨酸,x型亚基有4个半胱氨酸,3个在N-端,1个在C-端

图5 2004s-47品系的 *IDx?* 与 *IDx2.1t* 的DNA及氨基酸序列比对

常具有3~5个 *HMW-GS* 亚基,至少包含1Bx、1Dx和1Dy亚基,有些品种还有1By和1Ax亚基,1Ay亚基通常沉默^[23]。推断该未知亚基为1Dx亚基。

因为小麦的 *HMW-GS* 为位于1号染色体长臂上的复等位基因,基因之间具有很高的同源性,根据已发表的 *HMW-GS* 基因序列,设计一对兼并性引物进行扩增。对扩增的序列挑选长度在2700 bp左右的序列进行纯化(参照 *IDx5* 亚基基因序列长度,序列号:x12928)。小麦的 *HMW-GS* 基因的重复序列很多,用普通的测序方法无法进行,所以选用定向缺失制备亚克隆,用载体上的引物完成每一段的测序后,再进行拼接^[14],获得片段大小为2758 bp,其中编码基因序列为2514 bp。经同源性比对可知:2004s-47品系的 *IDx?* 与 *IDx1.5*, *IDx2.1t*, *IDx1.5t*, *IDx2.1* 同源性较高,用DNAMAN分析软件,进行序列比对可知2004s-47品系的 *IDx?* 与节节麦的 *IDx2.1t* 不论是DNA序列还是氨基酸序列同源性都最高,仅因2个碱基的差异导致有2个氨基酸有差异,且差异都出现在中部重复序列

区。不同小麦品种的 *HMW-GS* 亚基有很高的同源性,保守型也很强。由目前的结果无法确定2004s-47品系的 *IDx?* 基因为 *IDx2.1t* 还是一个亚基,以后的试验中还要做原核表达对此进行进一步的证明。但2004s-47的 *IDx?* 亚基基因序列的确定,为以后品质的评价及育种提供了理论依据。

参考文献

- [1] Shewry P R, Halford N G, Belton P S, et al. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain[J]. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 2002, 57(3): 133-142.
- [2] Payne P I, Law C N, Mudd E E. Control by homologous group I chromosomes of the high molecular weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1980, 58(3-4): 113-120.
- [3] 王建军, 康志钰, 尚勋武. 相同遗传背景下7+8与17+18亚基对面团流变学特性的影响[J]. 西北农业学报, 2007, 16(3): 68-71, 99.
- [4] 梁静静, 吕德彬, 陈军营, 等. 小麦5+10亚基基因转化研究[J]. 麦类作物学报, 2004, 24(3): 5-8.

- [5] Lawrence G J, MacRitchie F, Wrigley C W. Dough and baking quality of wheat lines deficient in glutenin subunits controlled by the Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1 loci[J]. *Journal of Cereal Science*, 1988, 38(7):109-112.
- [6] Payne P I, Holt L M, Law C N. Structural and genetical studies on the high- molecular- weight subunits of wheat glutenin [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1981, 60(4):229-236.
- [7] 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 Research Commun*, 1983, 11(1):29-35.
- [8] Payne P I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread- making quality[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1987, 38:141-153.
- [9] 程西永, 吴少辉, 李海霞, 等. 小麦高低分子量麦谷蛋白亚基对品质性状的影响[J]. *麦类作物学报*, 2014, 34(4):482-488.
- [10] Payne P I, Corfield K G, Blackman J A. Correlation between the inheritance of certain high- molecular- weight subunits of glutenin and bread- making quality in progenies of six crosses of bread wheat[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1981(32): 51-60.
- [11] Mackie A M, Sharp P J, Lagudah E S. The nucleotide and derived amino acid sequence of a HMW glutenin gene from *Triticum tauschii* and comparison with those from the D genome of bread wheat[J]. *Journal of Cereal Science*, 1996(24):73-78.
- [12] Bustos A D, Rubio P, Jouve N. Molecular characterisation of the inactive allele of the gene Glu-A1 and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenins of wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(7):1085-1094.
- [13] Juhász A, Tamas L, Karsai I, et al. Identification, cloning and characterisation of a HMW- glutenin gene from an old Hungarian wheat variety, Bankuti 1201[J]. *Euphytica*, 2001, 119(1-2):75-79.
- [14] 孙霞. 西尔斯山羊草和双角山羊草高分子量麦谷蛋白亚基基因的分子克隆[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004:1-84.
- [15] Wan Y F, Yan Z H, Liu K F, et al. Comparative analysis of the D genome- encoded high- molecular weight subunits of glutenin[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(6):1183-1190.
- [16] Yuan Z W, Chen Q J, Zhang L Q, et al. Molecular Characterization of Two Silenced y-type Genes for Glu-B1 in *Triticum aestivum* ssp. yunnanese and ssp. Tibetanum[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2009, 51(1):93-99.
- [17] D'Ovidio R, Porceddu E, Lafiandra D. PCR analysis of genes encoding allelic variants of high- molecular- weight glutenin subunits at the Glu-D1 locus[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88(2):175-180.
- [18] Shewry P R, Halford N G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53:947-958.
- [19] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S, et al. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2003(45):219-302.
- [20] 宋艳波, 吴国良, 牛洪斌. 改良 CTAB 法在核桃叶片基因组 DNA 提取中的应用研究[J]. *山西农业大学学报: 自然科学版*. 2011, 31(2): 109-112.
- [21] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3):403-410.
- [22] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [23] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. The high molecular weight subunits of wheat glutenin[J]. *Journal of Cereal Science*, 1992, 15(2): 105-120.