

# 高分子量麦谷蛋白亚基基因 *Glu-1Ay* 在小麦中的表达\*

马建华<sup>1,2,3</sup> 白建荣<sup>1\*\*</sup> 孙 毅<sup>2</sup>

(1. 山西省农业科学院作物遗传研究所 太原 030031; 2. 山西省农业科学院生物技术中心 太原 030031;  
3. 晋中学院 榆次 030600)

中图分类号: Q344+.13 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2008)-01-0266-03

## Expression of the high molecular weight glutenin subunit gene *Glu-1Ay* in common wheat

MA Jian-Hua<sup>1,2,3</sup>, BAI Jian-Rong<sup>1</sup>, SUN Yi<sup>2</sup>

(1. Crop Genetics Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;

2. Bio-technique Center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;

3. Jinzhong Institute, Yuci 030600, China)

(Received Dec. 10, 2006; accepted Feb. 10, 2007)

小麦是世界上重要的粮食作物。小麦的品质一直是发达国家小麦生产的重要指标。中国在解决了产量需求的今天,品质已经成为小麦育种的主要目标之一。小麦加工品质主要取决于其高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)数量及亚基组合。一般来说,高分子量麦谷蛋白亚基对加工品质的影响具有加性效应,因此增加普通小麦 HWM-GS 数量可以改良面团品质<sup>[1]</sup>。尽管普通小麦有 6 个高分子量麦谷蛋白基因,但由于等位基因现象和基因沉默效应,只表达其中的 3~5 个。在表达出的亚基中,几乎所有的普通小麦都包含有 1Bx、1Dx 和 1Dy 亚基,有些遗传背景下含有 1By 和 1Ax 亚基,但是来自于 *Glu-A1* 的亚基通常只有 1 个即 1Ax 型,没有发现 1Ay 型亚基<sup>[2,3]</sup>。而 1Ay 亚基在很多乌拉尔图小麦(普通小麦 A 染色体组的供体)种质中表达。如果把表达型的 1Ay 基因转入普通小麦中,或许有可能改善小麦的烘烤品质<sup>[2]</sup>。白建荣已成功克隆并在细菌中表达了乌拉尔图小麦表达型 1Ay 基因<sup>[4]</sup>。

向小麦转移近缘种属基因,转基因技术是最直接的手段,并且没有遗传累赘。当前在小麦转基因中应用最多的方法是基因枪转化法,但由于介导成

本较高,转化率较低,此法在实际应用上有一定困难。花粉管通道法是中国学者周光宇根据植物远缘杂交的实践提出的,其理论假说是存在染色体水平以下的 DNA 片段杂交,外源 DNA 片段在授粉后可通过花粉管通道进入胚囊,最终整合到植物基因组中<sup>[5]</sup>。由于花粉管通道法直接获得转基因种子,避免了复杂的植物组织培养过程,方法简便易行,已成为植物遗传转化中重要方法之一,而且也有许多成功的报道<sup>[6-10]</sup>。本试验利用花粉管通道法将 1Ay 基因的重组质粒导入小麦,以获得表达型 1Ay 亚基的小麦植株。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以“兰考 4 号”、“兰考 52-24”、“遗 2904”、“Pingson”4 个小麦品种(系)为花粉管通道法转化 1Ay 基因的受体材料。大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  由山西省农业科学院作物遗传研究所保存,质粒 pGS1Ay 在大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  中繁殖。质粒的结构基因从 1 份有表达型 1Ay 亚基的乌拉尔图小麦中获得,该基因的启动子也从该材料中获得。然后将启动子和结构基因与 PJIT163 在合适的酶切位点相连构成转化质粒(图 1)。

\* 国家转基因植物研究与产业化开发专项(Jy04-A-1)与山西农业科学院博士基金项目资助

\*\* 通讯作者:白建荣(1961~),女,博士,研究员,主要从事植物基因工程研究。E-mail:jrbai@sohu.com

马建华(1978~),女,硕士研究生。E-mail:mjh778399@163.com

收稿日期:2006-12-10 接受日期:2007-02-10

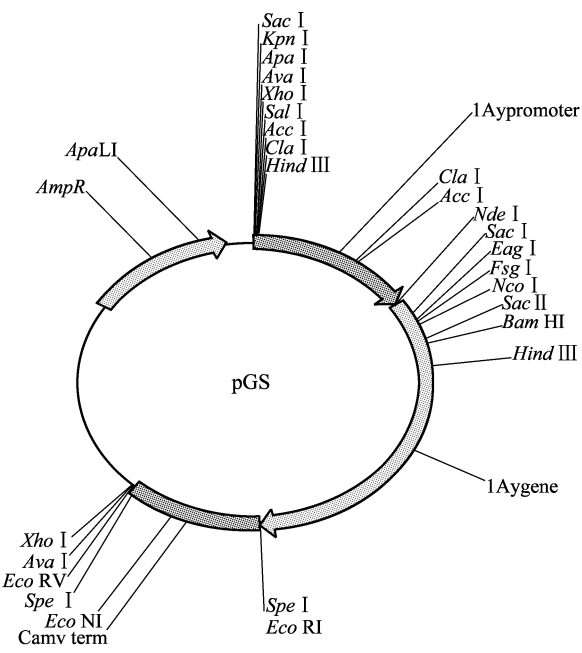


图 1 质粒 pGS1Ay 图谱

Fig. 1 Map of plasmid pGS1Ay

1.2 转化方法

转化前以 pH 为 8.0 的 TE 缓冲液配成质粒浓度为 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液。选授粉后 0.5 ~ 2 h 的小花,沿子房颈剪去羽毛状柱头,用微量进样器在花柱切面上滴注质粒溶液,每柱头切面 8 ~ 10  $\mu\text{L}$ ,套袋标记,自然成熟后收获  $T_0$  代种子。

1.3 麦谷蛋白电泳分析(采用 SDS-PAGE 系统)

取半粒  $T_0$  种子胚乳粉碎后,加 0.3 mL 样品提取缓冲液(66 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 6.8, 3 g  $\cdot \text{L}^{-1}$  SDS, 3% 甘油, 0.05 g  $\cdot \text{L}^{-1}$  溴酚兰, 2% 巯基乙醇),充分震荡混匀。室温静置 6 h,沸水中煮沸 5 min。5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,将上清液吸至 1.5 mL 离心管,供点样用。蛋白电泳采用 Tris-Borate SDS-PAGE 系统,凝胶配方见文献[11]。电泳结束后,将胶板浸泡在固定染色液中染色 3 h,随后在脱色液中脱色 10 min,背景变白后拍照。根据电泳图谱选择含有 1Ay 亚基的种子。

2 结果与分析

2.1 花粉管通道法转化 1Ay 基因植株结实率

花粉管通道法转化外源 DNA 对正在开花的小花子房和柱头造成了一定的伤害,因此成功的关键之一是要得到较高的结实率。表 1 列出了不同材料经转化后的结实率情况。从表 1 看出,4 个受体品种共转化 2 963 朵小花,收获种子 1 693 粒,结实率 50% ~ 59%,平均结实率为 57.14%。可见受体经过处理后结实率均降低。另外,采用花粉管通道法导入目的基因后,当代所获得的种

子都很瘦小。

2.2 HMW-GS 检测

对所获得的  $T_0$  种子用半粒法测定高分子量麦谷蛋白亚基组成发现,“兰考 4 号”中有 1 粒种子含有 1Ay 亚基(图 2)。说明导入的 1Ay 亚基的基因已在受体上表达。将这 1 粒种子(半粒)播种后,目前已获得  $T_1$  代植株。

表 1  $T_0$  代的结实率

Tab. 1 Seeding rate of  $T_0$  plants

材料 Cultivar	转化小花数(个) No. of transformed flower	结实数(个) Seeding number	结实率 Seeding rate (%)
兰考 4 号 Lankao 4	1 217	708	58.18
兰考 52-24 Lankao 52-24	665	364	54.74
遗 2904 Yi 2904	128	65	50.78
Pingson	953	556	58.34
合计 Total	2 963	1 693	57.14

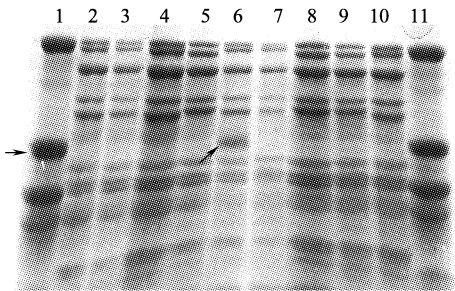


图 2  $T_0$  代种子 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE pattern of  $T_0$  seed

1、11 为乌拉尔图小麦“IZ29-1”(对照), 2 ~ 10 为“兰考 4 号”。其中 6 为表达 1Ay 亚基的“兰考 4 号”, 箭头所指为 1Ay 亚基。

Lanes 1, 11 are *T. urartu* accession “IZ29-1” (CK), lanes 2 to 10 are “Lankao 4”, lane 6 is “Lankao 4” seed with Glu-1Ay.

Arrows indicate the Glu-1Ay.

3 讨论

普通小麦有 6 个高分子量麦谷蛋白基因, 尽管每个基因都有等位变异, 可它们之间具有高度的同源性, 这为利用 PCR 方法同源克隆这类基因提供了方便, 但也为这类基因的转基因植株鉴定带来了困难。这类基因在种子胚乳中特异性表达, 因此应用 SDS-PAGE 系统分析转化植株后代种子中高分子量麦谷蛋白亚基的组成, 可以准确、方便地鉴定出该类基因的转基因植株。本试验结果表明, 应用 SDS-PAGE 系统分析转化植株后代种子中高分子量麦谷蛋白亚基的组成是鉴定该类基因转基因植株的较好方法。

采用花粉管通道法向小麦转化高分子量麦谷

蛋白基因,用 SDS-PAGE 系统分析转化植株当代种子中高分子量麦谷蛋白亚基组成,以鉴定该类基因转基因植株,可避免长时间组织培养过程,降低成本;且不受受体小麦基因型限制,是转化这类基因的较好方法。尽管转化率较低,如果控制好授粉条件,正确掌握花粉管通道的形成时间,改进操作技术,可以提高花粉管通道法的遗传转化率。因此,我们认为花粉管通道法是向小麦转化这类基因的理想方法。

目前有采用转基因方法将小麦高分子量麦谷蛋白亚基基因成功转入小麦中的报道,如 Blehl 和 Anderson 把 1Dx5 和 1Dy10 亚基基因导入普通小麦<sup>[12]</sup>,Alpeter 等<sup>[13]</sup>和张晓东等<sup>[14]</sup>分别把 1Ax1 和 1Dx5 亚基基因导入普通小麦,但尚无将近缘种属麦谷蛋白亚基基因导入小麦的报道。本试验所转化质粒的 1Ay 基因是白建荣首次从乌拉尔图小麦中克隆获得。本试验通过花粉管通道法将 1Ay 基因导入普通小麦品种中并得到表达,首次得到了具有 1Ay 亚基的小麦植株,进而丰富了小麦高分子量麦谷蛋白亚基的组合类型。如果导入的基因能在后代中继续稳定表达,则可利用这些转化后代研究 1Ay 亚基对小麦加工品质的影响,并以它们为育种材料培育具有 1Ay 亚基的新型小麦,这对我国小麦转基因研究以及我国小麦品质改良都具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Lawrence G. J., Shepherd K. W. Inheritance of glutenin protein subunits of wheat[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1988, 60:333-337
- [2] Lawrence G. J., Shepherd K. W. Chromosomal location of genes controlling seed proteins in species related to wheat[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1981, 59:25-31
- [3] Payne P. I., Corfield K. G., Blackman J. A. Identification of a high molecular weight subunit of glutenin whose presence correlated with breadmaking quality in wheats of related pedigree[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1979, 55:153-159
- [4] Bai Jianrong, Jia Xu, Liu Kunfan, *et al.* Cloning and characterization of the coding sequences of the 1Ay high molecular weight glutenin subunit genes from *Triticum urartu*[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(4):463-471
- [5] 周光宇,龚蓁蓁,王自芬. 远缘杂交的分子基础——DNA 片段杂交假设的一个论证[J]. *遗传学报*, 1979, 6(4):405-412
- [6] 王立新,孟荣华,郭仁俊. 应用花粉管通道法进行小麦抗白粉病转基因的研究初报[J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9(3):265-266
- [7] 王广金,李忠杰,张晓东,等. 利用花粉管通道法将编码优质 HMW. GS 基因导入小麦进行品质改良的研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2002, 2(6):1-3
- [8] 侯文胜,郭三堆,路明. 利用花粉管通道法获得转雪花莲凝集素基因小麦[J]. *植物学通报*, 2003, 20(2):198-204
- [9] 冀俊丽,盛长忠,石明,等. 通过负压花粉管法将耐盐基因 HVA1 转入小麦的研究[J]. *麦类作物学报*, 2002, 22(2):10
- [10] 牟红梅,刘树俊,周文娟,等. 慈姑蛋白酶抑制剂通过花粉管途径对小麦的导入及转基因植株分析[J]. *遗传学报*, 1999, 26(6):634-643
- [11] Shewry P. R. Separation of plant proteins by electrophoresis[M]//Jones H. *Methods in Molecular Biology: Plant Gene Transfer and Expression Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999
- [12] Belch A. E., Anderson O. D. Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(7):875-879
- [13] Alpeter F., Vasil V., Srivastava V., *et al.* Integration and expression of the high-molecular weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(9):1155-1159
- [14] 张晓东,李冬梅,徐文英,等. 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