

类大麦属高分子量谷蛋白基因 *Kx* 的序列测定及表达 Sequencing and Expression Analysis of a Novel HMW- glutenin Gene *Kx* from *Crithopsis delileana*

郭志富, 颜泽洪, 魏育明, 郑有良*

GUO Zhi-Fu, YAN Ze-Hong, WEI Yu-Ming and ZHENG You-Liang*

四川农业大学小麦研究所, 都江堰 611830

Triticaceae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan City 611830, China

摘 要 利用 SDS-PAGE 检测了 2 份类大麦属 (*Crithopsis delileana*) 材料的高分子量谷蛋白亚基组成, 并对其中 1 份材料的 x 型亚基进行了克隆和测序。结果表明, 2 份材料具有完全相同的蛋白电泳图谱。在小麦的高分子量区域仅检测到一条蛋白质带, 与小麦 y 型亚基的迁移率接近, 但克隆测序表明其为 x 型高分子量谷蛋白亚基, 其编码基因命名为 *Kx*。 *Kx* 基因编码区序列长度为 2052 bp, 编码长度为 661 个氨基酸残基的蛋白质, 其序列具有典型的 x 型高分子量谷蛋白亚基的特征。 *Kx* 基因能在原核表达系统内正确表达, 其表达蛋白与来源于种子中的 *Kx* 亚基的迁移率完全一致。 *Kx* 亚基与小麦属 A、B 和 D, 山羊草属 C 和 U 以及黑麦属 R 染色体组编码的高分子量谷蛋白亚基氨基酸序列非常相似, 但在 N 和 C 保守区的氨基酸组成以及重复区长度上与它们存在明显差异。聚类分析可将 *Kx* 与 Ax1 聚类为平行的分支。由此可见, 来源于 *C. delileana* 的 *Kx* 基因为一新的 x 型高分子量谷蛋白亚基基因。

关键词 类大麦属, HMW-GS, 序列分析, 基因表达

中图分类号 S5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0375-05

Abstract Using SDS-PAGE analysis, the High-molecular-weight (HMW) glutenin subunits of two *Crithopsis delileana* accessions were detected. It was found that the two accessions had the same HMW glutenin subunits. Only one HMW glutenin subunit with the similar electrophoresis mobility to the y-type HMW glutenin subunit of hexaploid wheat was observed in *C. delileana*. However, it was indicated that this glutenin subunit was an x-type glutenin subunit *Kx* by gene sequence analysis. The full coding region of *Kx* gene is 2052bp and could encode a mature protein with 661 amino acid residues. The *Kx* gene could be expressed in the bacterial expression system, and the expressed protein had the same electrophoresis mobility as that in the seed of *C. delileana*. The primary structure of *Kx* subunit was very similar to the x-type HMW glutenin subunits encoded by the A, B and D genomes of wheat, the C and U genomes of *Aegilops*, and the R genome of *Secale cereale*. In the phylogenetic analysis, *Kx* subunit was clustered together with Ax1 subunit by an interior parallelled branch. In conclusion, *Kx* gene is a novel x type glutenin subunit gene from *C. delileana*.

Key words *Crithopsis delileana*, HMW-glutenin subunit, sequence analysis, gene expression

Received: December 13, 2004; Accepted: February 25, 2005.

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 program 2003AA207100), and program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (PCSIRT) and a foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of PR China (FANEDD).

* Corresponding author. Tel: 86-835-2882007, Fax: 86-835-2882336; E-mail: grmb@sicau.edu.cn

国家高科技 863 计划项目(2003AA207100); 长江学者和创新团队发展计划项目和高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金项目资助。

作为重要的小麦种子贮藏蛋白之一,高分子量麦谷蛋白的含量约占种子贮藏蛋白总量的10%^[1-2],其数量和质量对小麦面筋含量及烘烤品质有直接影响^[3-5]。在基因编码区内,高分子量谷蛋白具有不同于低分子量谷蛋白和醇溶蛋白的典型的结构特征,即编码区长度一般在1.8~2.5kb左右,包括由21个氨基酸残基组成的信号肽、保守的N-端和C-端以及由可重复的重复单元组成的中部重复区域。根据高分子量谷蛋白基本结构特征的差异,又可分为x和y型,x型亚基重复区内存在重复三肽(GQQ)类型,N-端保守区一般有3个半胱氨酸,而y型亚基重复区没有重复三肽类型,N-端保守区一般有5个半胱氨酸。而低分子量谷蛋白和醇溶蛋白的分子量一般比高分子量谷蛋白小得多,其编码区也仅在1kb左右,并且基本结构明显不同于高分子量谷蛋白。

在众多的小麦族属、种中,含有A、B和D基因组的小麦及其供体物种的高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)等位变异类型和基因序列已得到广泛深入的研究^[6-9]。小麦的一些近缘属,如山羊草属(*Aegilops*)、黑麦属(*Secale*)、偃麦草属(*Elytrigia*)的一些物种的HMW-GS基因也已被分离和测序^[10-13]。簇毛麦属(*Dasyphyrum*)、大麦属(*Hordeum*)等近缘属的HMW-GS基因在各自基因组中染色体上的位置也进行了定位^[14-15]。这些针对小麦近缘属、种HMW-GS的研究为新基因的发掘与利用、遗传多样性以及物种的进化关系分析提供了宝贵的资料。

类大麦属(*Crithopsis delileana* (schult.) Roshev., $2n = 2x = 14, KK$)是小麦野生近缘属中较为少见的二倍体单种属之一,主要分布在亚洲西南部、非洲北部以及中东地区^[16]。以往关于该属的研究主要集中在系统进化方面,Hsiao等(1995)从*C. delileana*中分离出核糖体蛋白DNA,根据内部转录间隔区(ITS)序列差异,揭示了类大麦属与其它小麦族二倍体物种的亲缘关系^[17];Catalan等(1997)对叶绿体NADH脱氢酶亚基F部分基因序列进行了分析,说明了类大麦属的系统演化关系^[18];Petersen等(1997)对叶绿体的*rpoA*基因及其编码的RNA聚合酶 α -亚基的序列结构进行了研究,确立了类大麦属的系统分类地位^[19]。目前,尚未见关于类大麦属物种的高、低分子量谷蛋白以及醇溶蛋白等种子贮藏蛋白研究的文献报道。

在本研究中,我们试图分析类大麦属物种HMW-GS组成,对其基因进行序列测定与体外表达,这对于类大麦属物种新型HMW-GS的发现、利用以

及研究小麦族高分子量谷蛋白基因家族的系统进化关系有着重要的意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

两份类大麦属材料(*C. delileana*)被用作种子高分子量谷蛋白组成分析。由四川农业大学小麦研究所从丹麦引入并收藏。

1.2 SDS-PAGE 分析

按照颜泽洪等(2002)^[20]的方法对种子蛋白进行提取,由于以前没有类大麦属高分子量谷蛋白的报道,故以小麦品种中国春和川育12所含有的高分子量谷蛋白作为相对分子量标准[高分子量谷蛋白组成分别为(null,7+8,2+12)和(1,7+8,5+10)],进行SDS-PAGE分析,根据迁移率区分类大麦属材料中的高分子量谷蛋白和低分子量谷蛋白以及醇溶蛋白。

1.3 基因组DNA提取及PCR扩增

采用2×CTAB法进行基因组DNA提取^[20]。利用扩增HMW-GS基因编码区的特异性引物

P_1 : 5'-AGCTGCAGAGAGTTCTATCA-3',

P_2 : 5'-ATCACCCACAACACCGAGCA-3',

对*C. delileana*基因组DNA进行扩增。PCR反应体系及扩增条件参照颜泽洪等(2002)^[20]的方法进行。扩增产物于0.8%的琼脂糖凝胶中电泳检测并回收。

1.4 PCR产物克隆、序列测定与分析

PCR扩增产物回收纯化后,与pMD18-T载体(TaKaRa, China Dalian, Cat Number D504A)连接,转化并筛选阳性克隆。参照Sambrook(1989)^[21]的方法制备系列嵌套缺失亚克隆用于全序列的测定。序列分析与比较采用NCBI网址(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的相关软件,聚类分析采用Mega2软件(<http://www.oup-usa.org>)进行。

1.5 Kx基因的表达

根据所测定的Kx基因的全长编码区序列设计了一对表达引物,在F端引入Nde I, R端引入EcoR I的识别位点(下划线所示),序列分别为:

KxF: 5'-ATCCATATCGAAGGTGAGGCCTCTGGGCA-3',

KxR: 5'-CAGGAATTCCTATCACTGGCTGGCCGACA-3',

表达引物所扩增的Kx基因编码区去除了信号肽序列。将Kx引入pET-30a(Novagen, Cat number 69909.3)获得阳性质粒pPET-30aKx。参照Wan等(2002)^[10]的方法进行表达,利用1 mmol/L IPTG诱导。参照Mackie(1996)^[8]的方法选择性提取表达产

物中的高分子量谷蛋白。

2 结果分析与讨论

2.1 *C. delileana* 高分子量谷蛋白亚基 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析结果显示,2份来自于丹麦的材料种子蛋白带型完全一致,在小麦的高分子量谷蛋白区域,*C. delileana* 仅有一条带(图1,有尾箭头所示),电泳迁移率介于普通小麦 By8 和 Dy10 亚基之间,应为一个 HMW-GS。在普通小麦的低分子量谷蛋白和醇溶蛋白区域,紧接 *C. delileana* 的 HMW-GS 亚基还出现了一条染色强度与它的高分子量谷蛋白相当的带(图1,无尾箭头所示),根据每个染色体组可编码一个 x 型和一个 y 型高分子量谷蛋白亚基, y 型亚基的分子量比 x 型小而电泳迁移率较快这一依据进行推断,认为它可能是一高分子量谷蛋白,但这需要验证。同样的情况在其它的小麦近源属物种中发现过,即有比普通小麦中的 y 型亚基分子量更小的高分子量谷蛋白亚基,这种亚基的电泳迁移率比普通小麦中分子量最小的高分子量谷蛋白亚基的电泳还快,根据分子量的大小很容易误判为低分子量谷蛋白或醇溶蛋白,但实际上是高分子量谷蛋白。

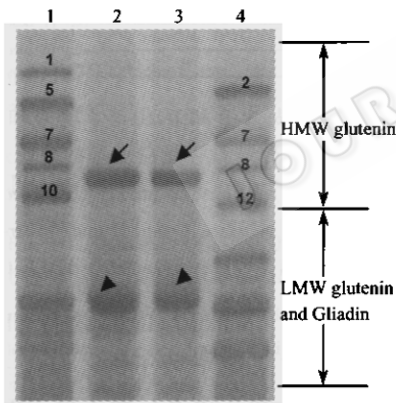


图1 应用 SDS-PAGE 分析检测的类大麦属材料的高分子量谷蛋白亚基

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the HMW-GS in *C. delileana*

1: hexaploid wheat Chuanyu12; 2 and 3: *C. delileana*; *C. delileana*; Lane4: hexaploid wheat Chinese spring

Tailed and Nontailed arrows indicated the putative High molecular weight glutenin subunits.

2.2 PCR 扩增及克隆

D'ovidio^[22]等(1995)在前人研究的基础上设计了一套用于扩增面包小麦3个 HMW-GS 基因位点的全部6个亚基的全长编码区以及重复区的引物(包括沉默基因),特异性扩增并分离出了各个等位基因。说明了 HMW-GS 基因编码区在 N、C 端保守区核苷酸序列很相似,仅在较少部位的核苷酸存在

差异。所以,利用这些特异引物能分离出不同小麦品种或近缘野生物种的未知等位基因。

因此,为了分离 *C. delileana* 中未知的 HMW-GS 基因,我们充分利用了这类基因编码区保守端核苷酸序列高度相似的特征。利用所设计的特异性引物 P₁ 和 P₂,选取其中1份材料的基因组总 DNA 作为模板,同时扩增出两条 DNA 片段(图2),其中一条约 2.1 kb,另一条约 1.7 kb。由于 2.1 kb 片段与小麦中的 y 型 HMW-GS 的基因编码区长度相当,故将 2.1 kb 片段回收并克隆于 pMD18-T 载体,获得阳性质粒 pK2.1。对 pK2.1 进行亚克隆,以进行全序列的测定。至于 1.7 kb 片段是否为 HMW-GS 亚基编码区片段尚在确认之中。

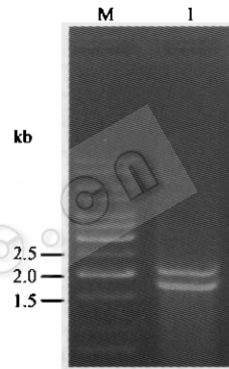


图2 PCR 扩增高分子量谷蛋白基因编码区

Fig.2 Amplification of the complete coding regions of HMW glutenin by PCR methods

Lane M: DNA markers (kb); 1: PCR products.

2.3 序列分析与比较

核苷酸序列测定结果表明,所克隆基因的核苷酸序列全长为 2052 bp,由其推导的氨基酸序列含 682 个氨基酸残基,具有 x 型 HMW-GS 典型特征,包括 21 个氨基酸残基组成的信号肽,86 个氨基酸残基组成的 N-端保守区,533 个氨基酸残基组成的重复区,42 个氨基酸残基组成的 C-端保守区(图3)。N 和 C-端保守区内分别含 3 个和 1 个半胱氨酸(C)。重复区内,含有 9 个三肽(GQQ)、56 个六肽(PGQGQQ)、16 个九肽(GYYPTSLQQ),故将该基因命名为 *Kx*。进一步证明了利用基因编码区保守端核苷酸序列高度相似的特征分离 *C. delileana* 中未知的 HMW-GS 基因获得成功。

Kx 蛋白与小麦属 A、B 和 D、山羊草属 C 和 U 以及黑麦属 R 染色体组编码的亚基(分别以 Ax1, Bx7, Dx5, Cx, Ux 和 Rx 为代表,EMBL 序列号分别为 X61009, X13927, X12928, AF476959, AF476961, AJ314782)的氨基酸序列组成十分类似。信号肽和 C-端的氨基酸数目分别相同,但个别部位的氨基酸

被替换了, Kx 信号肽被替换的一般有 2 个, C 端一... 一般有 1~2 个, 最长达 5 个(与 Bx7)。Kx 与 Ax1, Bx7, Dx5, Cx, Ux 和 Rx 亚基的 N-端保守区在氨基酸残基组成数目上有一定的差异, 比 Bx7 亚基多 5 个, 而比 Dx5 亚基少 3 个, 为 86 个, 与山羊草属 C 和 U 以及黑麦属 R 染色体组编码的亚基数目一致。除此以外, Kx 与它们的差异表现在个别部位氨基酸残基的替换, 都分别有 10 个及以上的氨基酸部位被替换了, 最多可达 25 个(与 Bx7)(图 4)。在重复区的差异主要表现在可重复的短肽类型数目的增加或减少, 以及可重复单元内个别座位的氨基酸的替换和少量部位的缺失。与其它亚基序列长度相比, Kx 氨基酸序列最短, 主要由于其重复区的长度最短所引起。

Table with 3 columns: Genotype (A, B, C), Amino Acid Index, and Sequence. It shows the putative amino acid sequences for Kx subunit from C. delileana compared with other sequences from wheat, Aegilops, and S. cereale. The sequences are aligned to show similarities and differences.

图 4 类大麦属 Kx 高分子量谷蛋白亚基与小麦 A、B 和 D 以及山羊草 C 和 U、黑麦 R 染色体组编码的 x 型亚基在信号肽(A) N 端(B)和 C 端(C)的氨基酸序列比较
Fig. 4 Comparison of the putative amino acids sequence of Kx subunit from C. delileana with other sequences of x-type HMW glutenin subunits encoded by the A, B and D genomes of wheat, the C and U genomes of Aegilops, and the R genome of S. cereale.

Figure 3: Nucleotide and deduced amino acid sequences of Kx. The table shows multiple rows of DNA nucleotide sequences and their corresponding deduced amino acid sequences. Brackets and arrows are used to mark specific domains like the signal peptide, N-terminal, and C-terminal regions.

图 3 Kx 亚基的全长编码区核苷酸和推测的氨基酸序列
Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the complete coding sequences of Kx

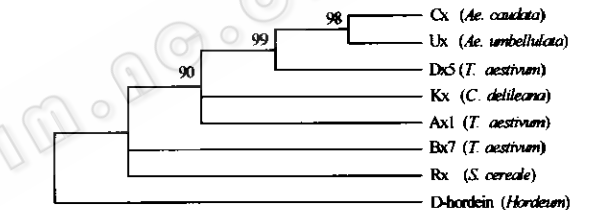


图 5 类大麦属 K, 小麦 A、B 和 D, 山羊草属 C 和 U 以及黑麦 R 基因组的 x 型高分子量谷蛋白亚基的系统进化分析
Fig. 5 Phylogenetic relationships among C. delileana K, wheat A, B and D, Aegilops C and D and S. cereale R genome encoded x-type representative HMW-GS

The signal peptide, N-, C-terminal region and the central repetitive domains were marked by "[]", "| |", "()" and tailed arrowheads, respectively; Non-tailed arrowheads indicate cysteine residues; two stop codons are indicted by asterisks.

2.4 HMWx 型亚基进化分析

利用 Mega2 软件对来自于 C. delileana 的 Kx 与小麦属 A、B 和 D、山羊草属 C 和 U 以及黑麦属 R 染色体组编码的 x 型亚基(分别以 Ax1, Bx7, Dx5, Cx, Ux 和 Rx 为代表)的 N 端氨基酸序列进行聚类分析并以大麦 D-hordein 作为外类群, 结果表明 Kx 可与 Ax1 亚基聚类为平行的内部分支(图 5)。

2.5 Kx 基因体外表达

利用所设计的表达引物扩增质粒 pK2.1, 将 Kx 基因编码区通过限制性酶切位点 Nde I 和 EcoR I 克隆到原核表达载体 pET-30a, 获得了表达质粒 pET-30aKx, 转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3), 37℃ 培

养至 OD₆₀₀ = 0.6, 经 1 mmol/L IPTG 诱导 3h, 获得了表达蛋白, 该蛋白与来源于种子的 x 型亚基有一致的迁移率(图 6, 第 2 和 0 泳道), 而未经 IPTG 诱导的则没有外源蛋白的表达(图 6, 第 1 泳道)。为了验证表达的产物为高分子量谷蛋白而不是其它蛋白, 使用 Mackie(1996)[8] 的方法选择性提取高分子量谷蛋白。该提取方法仅获得了唯一的一条蛋白质带(图 6, 第 3 泳道), 该蛋白与来源于种子的 x 型高分子量谷蛋白亚基有相同的迁移率(图 6, 第 3 和 0 泳道)。可见, 所克隆的 Kx 基因在大肠杆菌中得到正确表达。

在本工作中, 通过克隆、序列测定和基因体外表达确认了 C. delileana 中检测到的唯一与普通小麦 y 型高分子量谷蛋白亚基分子量接近的蛋白质带是 x 型亚基, 而不是 y 亚基。根据小麦和其它近缘物种中的研究结果[3], 在理论上二倍体物种

C. delileana 应该有 2 个可表达的高分子量谷蛋白亚基, 由于同一染色体组编码的高分子量谷蛋白亚基的分子量总是 *x* 型大于 *y* 型, 紧接 *x* 亚基的一条位于小麦低分子量区域的蛋白质带是否 *y* 型亚基, 还需进一步确认。

Kx 在原核表达系统内成功获得表达, 验证了所克隆谷蛋白新基因的可表达性。在小麦遗传背景中过量表达小麦外源高分子量谷蛋白亚基对小麦品质遗传改良作用的转基因技术体系已经建立起来, 这为通过转基因途径验证 *Kx* 亚基对品质遗传改良效应提供了可能^[23,24]。目前, 利用转基因技术研究 *Kx* 蛋白对麦类品质的影响正在进行之中。

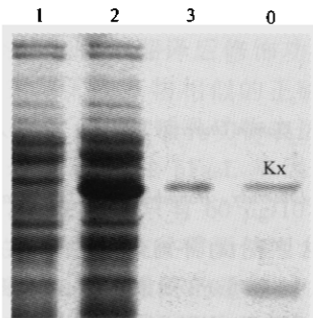


图 6 *Kx* 基因在大肠杆菌中的表达

Fig.6 Expression of *Kx* gene in *E. coli* cells

1: Proteins extracted from uninduced *E. coli* cells; 2: proteins from induced *E. coli* cells by 1 mmol/L IPTG; 3: Selectively extracted HMW glutenin from the IPTG induced *E. coli* cells; 4: HMW glutenin extracted from *C. delileana* seeds.

REFERENCES (参考文献)

- [1] Huebner FR, Donaldson GL, Wall JS. Wheat Glutenin Subunits. II. Compositional Differences. *Cereal Chem*, 1974, 51:240 - 249
- [2] Khan K, Bushuk W. Studies of Glutenin. X III. Gel filtration, isoelectric focusing, and amino acid composition Studies. *Cereal Chem*, 1979, 56:505 - 512
- [3] Lawrence GJ, Shepherd KW. Chromosomal location of genes controlling seed proteins in species related to wheat. *Theor Appl Genet*, 1981, 59:25 - 31
- [4] Shewry PR, Mifflin BJ. Seed storage proteins of economically important cereals. *Adv Cereal Sci Technol*, 1985, 7:81 - 84
- [5] Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD. Functional properties of wheat glutenin. *J Cereal Sci*, 1996, 23:1 - 18
- [6] Payne PI, Lawrence GJ. 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. *Cereal Res Commun*, 1983, 11:29 - 35
- [7] Anderson OD, Greene FC. The characterization and comparative analysis of High-molecular-weight glutenin genes from genome A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet*, 1989, 77:689 - 700
- [8] Mackie AM, Lagudah ES, Sharp PJ. Molecular and biochemical characterization of HMW glutenin subunits from *T. tauschii* and the D genome of hexaploid wheat. *J Cereal Sci*, 1996, 23:213 - 225
- [9] Li BY(李保云), Xie CJ(解超杰), You MS(尤明山) *et al.* Diversity of High Molecular Weight subunits in Wild Emmer. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2002, 22(3):21 - 24
- [10] Wan Y, Wang D, Shewry PR *et al.* Isolation and characterization of five novel high molecular weight subunit of glutenin genes from *Triticum timopheevi* and *Aegilops cylindrica*. *Theor Appl Genet*, 2002, 104:828 - 839
- [11] Liu Z, Yan Z, Wan Y *et al.* Analysis of HMW glutenin subunits and their coding sequences in two diplod *Aegilops* species. *Theor Appl Genet*, 2003, 106:1368 - 1378
- [12] De Bustos A, Rubio P, Jouve N. Characterization of two gene subunits on the 1R chromosome of rye as orthologs of each of the *Glu-1* genes of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*, 2001, 76:513 - 529
- [13] Wang JR, Yan ZH, Wei YM *et al.* A novel HMW glutenin subunit gene *Ee1.5* from *Elytrigia elongata* (Host) Nevski. *J Cereal Sci*, 2004, 40:289 - 294
- [14] Blanco A, Resta P, Simeone R *et al.* Chromosomal location of seed storage protein genes in the genome of *Dasypyrum villosum* (L) Candargy. *Theor Appl Genet*, 1991, 82:358 - 362
- [15] Morris LD, Raupp WJ, Gill BS. Isolation of Ht genome chromosome additions from polyploid *Elymus trachycaulus* (StStHtHt) into common wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 1990, 33:16 - 22
- [16] Frederiksen, Signe. Taxonomuc studies in some annual genera of the Triticeae (poaceae). *Nord J Bot*, 1993, 13:481 - 493
- [17] Catalan P, Kellogg EA, Olmstead RG. Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 1997, 8 (2): 150 - 166
- [18] Petersen G, Seberg O. Phylogenetic analysis of the Triticeae (Poaceae) based on *rpoA* sequence data. *Mol Phylogenet Evol*, 1997, 7(2):217 - 230
- [19] Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH. Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, Triticeae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences. *Genome*, 1995, 38(2):211 - 231
- [20] Yan ZH, Wan YF, Liu KF *et al.* Identification of a novel HMW glutenin subunit and comparison of its amino acid sequence with those of homologous subunits. *Chin Sci Bull*, 2002, 47(3):220 - 225
- [21] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [22] D'ovidio R, Masci S, Porcedu E. Development of a set of oligonucleotide primers specific for genes at the *Glu-1* complex loci of wheat. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 189 - 194
- [23] Rooke L, Barro F, Tatham AS *et al.* Altered functional properties of tritordeum by transformation with HMW glutenin subunit genes. *Theor Appl Genet*, 1999, 99:851 - 859
- [24] Vasil V, Castillo AM, Fromm ME *et al.* Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus, *Bio/technology*, 1992, 10:667 - 674