第 28 卷 第 6 期　　作 物 学 报　　Vol 28, No. 6
2002 年 11 月　734～737 页　　ACTA AGRONOMICA SINICA　　pp. 734～737　Nov., 2002

利用 PCR 技术鉴别普通小麦 Glu-1 位点的某些等位基因*

孙　辉[1,2]　刘志勇[1]　李保云[1]　刘广田[1]

([1]中国农业大学作物遗传育种系, 北京 100094; [2]国家粮食局科学研究院, 北京 100094)

摘　要　Glu-1 位点的等位基因变异与普通小麦的烘烤品质有密切的关系, 本文利用根据 Glu-Dly 位点的基因序列设计的一对引物, 通过 PCR 技术, 可以准确鉴别等位基因的变异 Glu-Dly10 和 Glu-Dly12, 同时还可以初步鉴定 Glu-B1 位点的等位基因变异 Glu-B1h (14+ 15), 为分子标记辅助选择在小麦品质育种中的应用提供了基础。

关键词　普通小麦, Glu-1 位点, PCR

中图分类号: S512　　**文献标识码**: A

Identification of Some Alleles at Glu-1 Loci in Common Wheat with PCR Approach

SUN Hui[1,2]　LIU Zhi-Yong[1]　LI Bao-Yun[1]　LIU Guang-Tian

(*Department of Plant Genetics and Breeding, China Agricultural University, Beijing* 100094, *China*)

Abstract　PCR technich is used to detect allelic variation at Glu-1 loci in common wheat. With a pair of synthetic primers, specific variation for Glu-Dly, Glu-Dly 10 and Glu-Dly 12 can be distinguished clearly. Besides, Glu-B1h (subunit pair 14+ 15) can also be identified with the same primers. Compared with SDS-PAGE, PCR approach provides a more rapid and efficient detection of some alleles at Glu-1 loci in the early generation of wheat breeding program.

Key words　Common wheat, Glu-1 loci, PCR

在所有控制小麦谷蛋白亚基的基因位点中, Glu-D1 位点倍受青睐, 因为该位点控制着与小麦烘烤品质密切相关的两个亚基对 5+ 10 和 2+ 12[1], 与 Glu-1 其它两个位点 Glu-A1 和 Glu-B1 一样, Glu-D1 位点也由两个紧密连锁的基因 Glu-D1x 和 Glu-D1y 组成, 分别控制分子量较大的 x-型亚基和分子量较小的 y-型亚基。在形成谷蛋白聚合体的过程中, 1Dy 亚基的作用尤其重要。传统的谷蛋白亚基分类和鉴别方法是以小麦籽粒贮藏谷蛋白为研究对象的 SDS—PAGE。本研究利用 PCR 技术对 Glu-D1y 位点的等位基因进行鉴别, 以期为小麦品质育种的分子标记辅助选择提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

选用国内外普通小麦品种 21 个, 包括国内育成品种 14 个, 农家品种 2 个, 国外品种 5 个, 阿勃第一部分同源群的缺体材料由陕西省农业科学院小麦研究中心吉万全研究员惠赠。

1.2　试验方法

1.2.1　SDS-PAGE　取单个籽粒敲碎后放入 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 样品提取缓冲液 (0.0625 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 5% (v/v) β-巯基乙醇, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) 丙三醇, 0.002% (w/v) 溴酚蓝), 室温下振荡提取 2～3 小时, 80～90℃水浴提取 5 分钟, 冷却至常温后, 10000 r/min 离心 5 分钟, 取上清 20～30 μL 用于点样。凝胶浓度为 10% (交联度为 2.6%, 胶厚 0.75 mmol/L), 每块胶 15 mA 稳流电泳过夜。凝胶用含有 12.5% 三氯乙酸, 0.05% 考马斯亮蓝染色液染色过夜, 用蒸馏水脱色至背景清晰, 照相或做干胶长期保存。

1.2.2　DNA 提取　基因组 DNA 按照 CTAB 方

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39370440)
作者简介: 孙辉, 女, 博士, 1971 年生, 现工作单位为国家粮食局科学研究院, 主要从事与食品品质有关的科学研究及开发工作。
Received on (收稿日期): 2001-10-12, Accepted on (接受日期): 2002-02-21

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd.　All rights reserved.

法[2]提取并稍加改动。2g 小麦叶片用液氮研磨并迅速移至 1.5 mL 管中, 加入 0.75 mL CTAB 提取缓冲液 (含有 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L EDTA pH 8.0, 700 mmol/L NaCl, 1% CTAB), 轻轻混匀, 65℃水浴 1 h, 加入等体积氯仿/异丙醇(24∶1)混合液, 轻轻摇动 10 min, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液移入新管中, 用 2 倍体积预冷乙醇沉淀 DNA, 将沉淀物用预冷乙醇清洗 2 次, 溶解在双蒸水中, 稀释至工作浓度 20 ng/μL。

1.2.3　PCR 分析　　根据 Smith[3]的引物序列设计的一对 Glu-D1y 位点的特异性引物, 由北京赛百盛公司合成。引物序列为:

5′-GTTGGCCGGTCGGCTGCCATG-3′

5′-TGGAGAAGTTGGATAGTACC-3′

所有扩增反应均在 Perkin Elymer DNA Theomal cycler 480 上进行。PCR 反应体系: 总体积 25 μL, 其中, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.5 μL 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP (25 mmol/L) 2.0 μL, 引物 1+2 (20 ng/μL) 2.5 μL, 模板 DNA (20 ng/μL) 2.0 μL, ddH_2O 14 μL, *Taq* 酶 (2.5 U/μL) 0.5 μL。

PCR 反应条件 94℃预变性 3 min; 94℃变性 1 min, 60℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 40 个循环; 最后, 72℃延伸 5 min。4℃保存。

PCR 产物检测: 在 PCR 扩增产物中, 加入 1 μL 加样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 40% (w/v) 甘油水溶液)。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 100V 稳压 3 h。凝胶用溴化乙锭染色半小时, 蒸馏水脱色 20 min。紫外下观察并照相。

2　结果与分析

2.1　PCR 引物特异性的鉴定

对阿勃 1A 缺体 (N1A)、1B 缺体 (N1B) 和 1D 缺体 (N1D), 以及中国春 (CS) 和 Gabo (G) 的基因组 DNA 进行 PCR 分析, 结果见图 1。

本研究用的 PCR 引物对 Glu-D1y 位点等位基因主要变异扩增出的片段大小不同, 1Dy10 扩增的片段较小。据 Smith 的结果[3], 1Dy10 (Gabo) 扩增的片断应为 576 bp, 而 1Dy12 (中国春) 扩增出的片断为 612 bp。图 1 中, 阿勃 1A 缺体和 1B 缺体均能扩增出约 600 bp 大小的目标片断, 而 1D 缺体不能扩增出这个目标片断。因此, 认为 600 bp 左右的片断是 Glu-D1y 位点的特异性扩增产物。

除了目标片断以外, 还扩增出另外一些 DNA 片断, 350 bp 左右的片断可能位于 1A 染色体, 约 700 bp 的片断则有可能位于 1B 染色体上。

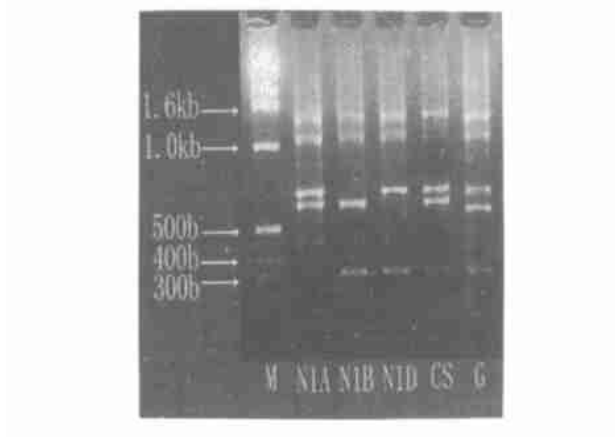

图 1　阿勃缺体和中国春、Gabo 的 PCR 扩增结果

Fig. 1　PCR products of glutenin genes of Abbondanza nullisomics (lane N1A, N1B, N1D), Chinese Spring (lane CS) and Gabo (lane G)

2.2　Glu-1 位点等位基因的鉴别

对 21 份国内外的普通小麦品种, 分别进行 SDS—PAGE 和 PCR 分析, 研究其亚基组成和等位基因变异, 结果见表 1 和图 2。

从亚基组成可以看出, 参试品种在所有的 Glu-1 位点均存在一定程度的变异, 基本上包括了我国小麦品种的主要变异, 如 Glu-A1 位点为 a、b 和 c, Glu-B1 位点为 a、b、c、h、i 和 f 等, Glu-D1 位点为 a 和 d (表 1)。参试品种 Glu-1Dy 的 PCR 扩增带谱与表 1 中的几乎完全相符 (图 2), 即具有 Glu-D1a 的品种 (序号为 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21) 能够扩增出 612 bp 的片断, 而具有 Glu-D1d 的品种 (序号为 1-6, 8, 9, 18) 能够扩增出 576 bp 的片断。值得注意的是, 2 个农家品种大头秋和白芒糙 (图 2 中的 11 和 12) 在 Glu-D1 位点都只有 x-型亚基 (见图 3), 没有 y-型亚基, 但是其染色体 DNA 经过 PCR 扩增之后, 都能扩增出相应的 612 bp 大小的片段, 即 Glu-1Dy12 的特异性扩增片段, 其原因尚需进一步研究。除了 Glu-D1y 的扩增片断以外, 还有另外两条染色体基因位点的特异性片断, 其中 Glu-A1 的扩增片断大小为 350 bp, Glu-B1 的则为 700 bp 左右。在 Glu-B1 位点, 所有具有亚基对 14+15 (即等位基因的变异为 h) 的品种都不能扩增出 700 bp 的片断, 而具有 Glu-B1 位点其他变异类型的材料如 Glu-B1a (亚基 7)、Glu-B1b (亚基 7+8)、Glu-B1c (亚基 7+9)、Glu-B1i (亚基 17+

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd.　All rights reserved.

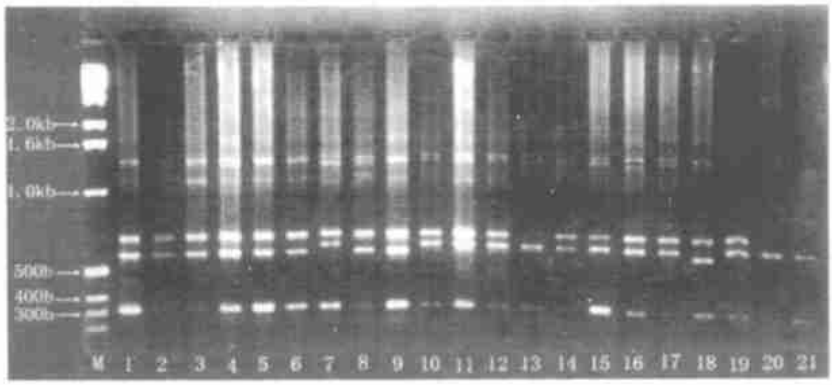

图 2 小麦品种的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplication results of 21 common wheat varieties

表 1 参试品种 HMW-GS 组成和 PCR 扩增结果

Table 1 The compositions of HMW-GS and PCR products list

序号 No.	品种 Variety	Glu-A1		Glu-B1			Glu-D1		
		亚基 Subunit	基因 Gene	亚基 Subunit	基因 Gene	PCR 扩增 PCR product	亚基 Subunit	基因 Gene	PCR 扩增 PCR product
1	Gabo	1	a	17+ 18	i	700 bp	5+ 10	d	576 bp
2	CNN	2*	b	7+ 9	c	700 bp	5+ 10	d	576 bp
3	Roblin	2*	b	7+ 8	b	700 bp	5+ 10	d	576 bp
4	郑州 941	1	a	7+ 9	c	700 bp	5+ 10	d	576 bp
5	安农 2192	1	a	7+ 8	b	700 bp	5+ 10	d	576 bp
6	冀 5099	1	a	17+ 18	i	700 bp	5+ 10	d	576 bp
7	豫麦 2 号	1	a	7+ 9	c	700 bp	2+ 12	a	612 bp
8	NE7060	2*	b	7+ 9	c	700 bp	5+ 10	d	576 bp
9	# 409	1	a	17+ 18	i	700 bp	5+ 10	d	576 bp
10	中国春	0	c	7+ 8	b	700 bp	2+ 12	a	612 bp
11	大头秋	0	c	7	a	700 bp	2		612 bp
12	白芒糙	0	c	7+ 8	b	700 bp	2		612 bp
13	陕优 225	1	b	14+ 15	h	-	2+ 12	a	612 bp
14	小冰 33	0	b	7+ 8	b	700 bp	2+ 12	a	612 bp
15	高优 503	1	a	13+ 16		700 bp	2+ 12	a	612 bp
16	京冬 8 号	0	c	7+ 9	c	700 bp	2+ 12	a	612 bp
17	京 411	0	c	7+ 8	b	700 bp	2+ 12	a	612 bp
18	矮原 3 号	1	a	7+ 9	c	700 bp	5+ 10	d	576 bp
19	安农 9339	1	a	7+ 9	c	700 bp	2+ 12	a	612 bp
20	陕麦 8003	0	b	14+ 5	h	-	2+ 12	a	612 bp
21	农大 95	1	b	14+ 15	h	-	2+ 12	a	612 bp

18) 以及 Glu-B1f (亚基 13+ 16) 等却都能够扩增这个片断，说明该片断的有无可能是等位基因变异 Glu-B1h (即亚基对 14+ 15) 是否存在的标记，这需要进一步的验证。

2.3 杂种 F_1 表现

谷蛋白亚基在杂种 F_1 呈共显性遗传，图 4 为 3 个杂交组合正反交 F_1 及其相应亲本的 PCR 扩增结果。所用亲本在 Glu-D1 位点具有不同的等位基因变异，其杂种 F_1 都能同时扩增出 Glu-D1y10 和 Glu-D1y12 的目标片断，表现出明显的共显性遗传，与 SDS-PAGE 结果一致。因此，在小麦育种和杂种优势利用中，可用 PCR 技术来鉴别真假杂种。

3 讨论

Glu-1 位点的某些基因与烘烤品质性状的优劣密切相关[4, 5]，在育种过程中需要有简便而快速鉴别这些亚基或基因的技术和方法。SDS—PAGE 的优点是成本低，一次可以分析大量品种，样品准备程序比较简单，结果容易分析，并且能够同时得到三个位点的基因或亚基的分析结果；它的缺点是所需时间比较长，操作也相对复杂一些，无法实现自动化操作。同时亚基的迁移率也会受到凝胶的浓

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

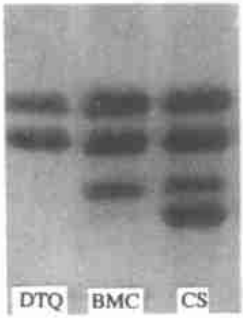

图 3　大头秋、白芒糙和中国春的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3　SDS-PAGE patterns of Da-tou-qiu, Bai-mang-cao and Chinese Spring

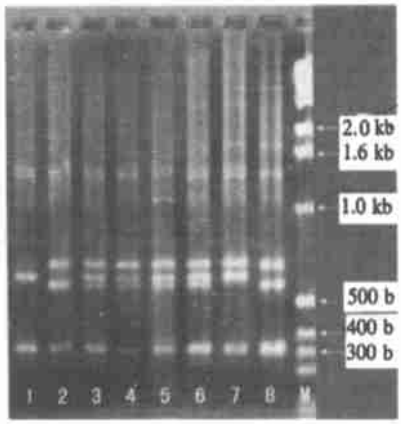

图 4　杂种 F_1 的 PCR 扩增结果

从左至右分别为亲本农大 95 和 NE7060, F_1 农大 95×NE7060 和 NE7060×农大 95, 京 411×# 409 和 # 409×京 411, 亲本京 411 和 # 409

Fig. 4　PCR products of hybrids and their parents

From left to right: the parents Nongda 95 and NE7060 (lane 1 and 2), Nongda 95×NE7060 and NE7060×Nongda 95 (lane 3 and 4), Jing411×# 409 and # 409×Jing411 (lane 5 and 6), Parents Jing 411 and # 409 (lane 7 and 8)

度、pH 值等电泳因素的影响, 一方面容易混淆那些分子量不同而迁移率相似的亚基, 另一方面电泳方法的不同也会造成谱带迁移率的差异。通过 HMW-GS 的序列分析可知, 各亚基分子大小的差异主要是由中部重复区长度的不同造成的, PCR 技术就是以此为基础, 对 HMW-GS 控制基因的结构和遗传多态性进行快速、精确地研究[6]。本试验所用的引物能够快速而准确地鉴别出 Glu-D1y 位点的优质等位基因 Glu-1Dy10。此外, Glu-B1 位点的等位基因变异 h 编码的亚基对 14+15 在国外的小麦品种中属于比较罕见的变异类型[7], 但在我国小麦品种中却占有一定的比例, 王瑞等[8]的研究表明, 该亚基对与 Glu-D1d 编码的优质亚基对 5+10 一样, 对面包品质有重要的贡献。本文用 Glue-D1y 位点的特异性引物能够扩增出非 Glu-B1h 等位基因变异的片断(约 700 bp), 因此可以从 Glu-B1 位点的其他等位基因变异(Glu-B1b, c, i, f 等)中特异性地鉴别出 Glu-B1h(即亚基对 14+15)。配之以简单而快捷的 DNA 提取方法, PCR 技术就为等位基因变异的鉴别提供了一种更为简单、精确而快速的方法, 较之 SDS—PAGE 技术更具有优越性。

References

[1] Payne P I, Corfield K G. Subunit composition of wheat glutenin proteins isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta*, 1979, 145: 83～88

[2] Saghai-Maroof M A, Sliman K M, Jorgensen R A, *et al*. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal locations and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1984, 81: 8014～8018

[3] Smith R L, Schweder M E, Barnett R D. Identification of glutenin alleles in wheat and Tritical using PCR-generated DNA markers. *Crop Sci*, 1994, 34: 1373～1378

[4] Manley M, Randall P G, McGill A E J. The prediction of dough properties of South African wheat cultivars by SDS-PAGE analysis of HMW glutenin subunits. *J Cereal Sci*, 1992, 15: 39～47

[5] Hamer R J, Weegels P L, Marseille J P. Prediction of the bread-making quality of wheat: the use of HMW glutenin-A subunit-based quality scoring systems. *J Cereal Sci*, 1992, 15: 91～102

[6] D'Ovidio, Porceddu E, Lafiandra D. PCR analysis of genes encoding allelic variants of high-molecular-weight glutenin subunits at the Glu-D1 locous. *Thero Appl Genet*, 1994, 88: 175～180

[7] Payne P I, Lawrence G J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A*1, *Glu-B*1 and *Glu-D*1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res Camm*, 1983, 11: 29～35

[8] Wang R(王瑞). Ning K(宁锟), Peña R J. The Relationship between HWM-GS composition of some wheat verities and their hybrids to bread-making qulity. *Acta Universitatis Agriculturalis Boreali-occidentalis*(西北农业大学学报), 1995, 4: 25～30

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.