

澳冰草中一个新型 *-gliadin* 基因的克隆与序列分析

李光蓉, 杨足君*, 张勇 周建平, 任正隆 (电子科技大学生命科学与技术学院, 四川成都610054)

摘要 以澳冰草 (*Australopyrum retrofractum*) 基因组 DNA 为模板, 用小麦种子醇溶蛋白的保守引物进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行克隆测序。结果表明, 获得的扩增片段总长度为 936 bp, 包含一个完整的 262 个氨基酸的编码区, 基因库登录号为 EF536330, 序列比对表明该序列为 *-gliadin* 基因家系成员。利用 *-gliadin* 基因的编码氨基酸序列建立系统树分析表明, 序列 EF536330 不能与源于普通小麦的 A、B 和 D 染色体组的 *-gliadin* 基因序列聚在一起, 而单独聚为一类, 推测所获得的来自澳冰草 W 染色体组的序列 EF536330 为麦类 *-gliadin* 基因家系的新类型。

关键词 澳冰草; 醇溶蛋白; 基因克隆

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)27-08457-02

Cloning and Sequence Analysis of An *-gliadin* Gene from *Australopyrum retrofractum*

LI Guang-rong et al (School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan 610054)

Abstract PCR was carried out in the genomic DNA from *Australopyrum retrofractum* with the conserved primers specific for *-gliadin* gene. The PCR products were cloned and then sequenced. The results showed that the PCR product was a length of 936 bp containing a coding region of 262 amino acids, with Genbank Accession Number EF536330. BLAST search showed that it was a member of *-gliadin* super-family. The phylogenetic tree indicated that the present EF536330 could not be clustered to the group of *-gliadin* genes from the A, B and D genome from wheat (*Triticum aestivum*), but in a new group. The result demonstrated that the sequence EF536330 may represent a new type of *-gliadin* gene from the W genome of *A. retrofractum*.

Key words *Australopyrum retrofractum*; *-gliadin*; Gene isolation

麦醇溶蛋白是小麦胚乳贮藏蛋白的重要组成部分, 它约占小麦胚乳贮藏蛋白总量的 40%~60%, 对小麦烘烤品质具有重要作用, 其主要表现在它决定面团的延展性^[1]。麦醇溶蛋白在较低的 pH 值条件下, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 按电泳迁移率的不同, 可以分离成 4 种类型, 在栽培小麦及其近缘属物种中, 因麦醇溶蛋白的等位性变异极为丰富, 故常被用在小麦遗传资源的鉴定之中^[1]。麦醇溶蛋白基因在结构上具有一定的保守性, 因而有利于基因序列水平上来阐释其遗传变异的分子机制^[1-2], 继续从小麦近缘属物种中发掘和鉴定麦醇溶蛋白新基因, 可以丰富基因的遗传多样性, 并为小麦品质育种提供新的基因源^[2]。

澳冰草 (*Australopyrum*) 被首先描述为仅分布在澳大利亚的小麦族植物^[3]。后来, 研究者在新西兰的一些地方也发现澳冰草的一些物种^[4]。澳冰草主要分布在富含石灰石的土壤中, 具有较强的耐瘠和抗旱特性。目前报道的 3 个种 *A. velutinum*, *A. pectinatum* 和 *A. retrofractum*, 它们均为 2 倍体, 其染色体组被命名为 W。有关澳冰草的研究较少, 主要集中在澳冰草与小麦族植物的系统发育关系上^[5], 目前未见澳冰草功能基因的克隆与序列分析的研究报道。笔者从澳冰草克隆了一个 *-gliadin* 基因, 并进行了序列分析, 为进一步研究麦醇溶蛋白基因的结构奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 澳冰草 (*A. retrofractum*) H533015 由美国 NPCS 提供, 对照普通小麦中国春 (CS) 由四川农业大学植物遗传育种重点实验室保存并提供。

1.2 方法

1.2.1 *-gliadin* 基因 PCR 扩增。 根据预测蛋白 *-gliadin* 基因的核苷酸序列设计一对简并引物, P1: 5'-ACCACAAATCCAA

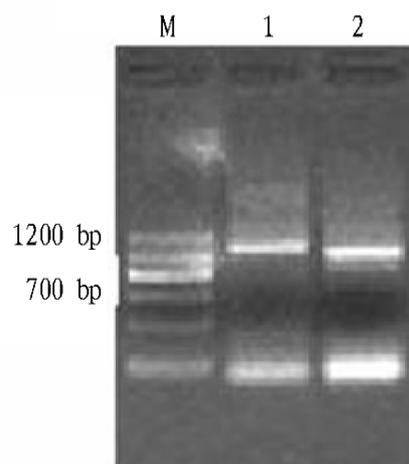
CATG(A/T)AGACCTT(C/T)(A/Q)TCA T-3', P2: 5'-TTCCCATG(C/T)TTGAACTA(G/C)TATAGGT(C/A)G, 通过 PCR 进行扩增。

1.2.2 PCR 产物克隆测序。 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离、回收, 并将回收产物连接到载体 pMD18-T, 通过蓝白斑筛选, 获得的阳性克隆送上海英骏生物公司测序。测序得到的核苷酸序列在 NCBI 的 GenBank 中进行登录。

1.2.3 序列对比及进化分析。 用 BioEdit 软件分析 DNA 序列, 并在 NCBI GenBank 中进行 BLAST 搜索, 并选取代表性物种的 *-gliadin* 基因家族的序列, 用 Clustal X 软件进行系统发育树构建。

2 结果与分析

2.1 澳冰草醇溶蛋白基因的 PCR 扩增 利用引物对 P1 + P2, 对普通小麦中国春和澳冰草 H533015 进行了扩增 (图 1), 结果表明, 该引物在这两个材料中均获得了约 1 kb 的产物。从图 1 中看出, H533015 扩增产物分子量小于中国春。



注: M, Marker; 1. 中国春;

2. H533015。

2.2 PCR 扩增产物的序列分析

对澳冰草 H533015 进行克隆测序, 获得的片段总长度为 936 bp (图 2), 从序列中可以看出, 在 5' 端 12 个核苷酸为非编码区, 开放阅读框从第 13 个核苷酸起, 至第 797 个核苷酸止, 编码区全长 786 bp, 编码 262 个氨基酸。将该核苷酸序列提交 GenBank, 获得基因登录号为 EF536330。经预测该序列编码蛋白 29.8 kD, 等电点为 9.0, 其氨基酸组成中, 含量最多的是谷氨酰胺 Gln(Q) 共 73 个, 占 27.97%, 其次是脯氨酸 Pro(P) 有 40 个, 占 15.30%, 具有 6 个半胱氨酸残基(C), 主要位于 C 端, N 端的前 22 个氨基酸为信号肽 (图 2)。

2.3 序列比对与系统树分析 将序列 EF536330 与 NCBI 基

基金项目 教育部春晖计划项目(2004251008); 教育部留学回国人员科研启动基金。

作者简介 李光蓉(1974-), 女, 四川万源人, 博士研究生, 研究方向: 植物分子细胞生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2007-05-28

因库中登录的小麦属、山羊草属物种的种子醇溶蛋白序列进行同源性分析,并构建了系统发育树(图3),结果表明,序列EF536330属于-gliadin基因家族的成员,具有-gliadin基因的典型特征。聚类分析发现,来自栽培普通小麦(*Triticum aestivum*)、二粒小麦(*T. dicoccoides*)及其染色体组供体一粒小麦(*T. monococcum*,A染色体组)、斯卑尔脱山羊草(*Aegilops speltoides*,B染色体组)、粗山羊草(*Ae. tauschii*,D染色体组)的-gliadin基因序列被分别聚成3类,而该研究获得的澳冰草序列EF536330被单独聚为一类。推测所获得的澳冰草-gliadin基因序列EF536330可能为-gliadin基因家族中的新类型。

1	CAC AAA TCC AAC ATG AAG ACC TTC ATC ATC CTT GCC CTC CTT GCT	45
	M K T F I I L A L L A	11
46	ATT GCG GCG ACC ACC GCT ACA GCC GTA CTT AGA GAT CCA ATG TCA	90
12	I A A T T A T A V L R D P M S	26
91	CAA TTG CAG CCG CAA AAT CCA TCT TCG CAA CAA CCA CAA CTA TGG	135
27	Q L Q P Q N P S S Q Q P Q L W	41
136	TTT CCA GGG AGG CAA CGA CAA CAA TTT CCA GGG CAG CAA CAA CCA	180
42	F P G R Q R Q Q F P G Q Q Q P	56
181	TTC CCA CCA CAA CAG CCA TAT CCA CAG CCG CAA CCA TTT CCG CAG	225
57	F P P Q Q P Y P Q P Q P F P Q	71
226	CCG CAA CCG TTT CCA CCA CAG CAA CCA TAT CCG CAG CCG CAA CCG	270
72	P Q P F P P Q Q P Y P Q P Q P	86
271	TTT CCA CCA CAA CAA CCA TAT CCA CAG CTG CAA CAA CCA ATT TCG	315
87	F P P Q Q P Y P Q L Q Q P I S	101
316	CAG CAA CAA GGA CAA CAA GTT CCA CAA CAA CAA ACC CTT CAA CAG	360
102	Q Q Q G Q Q V P Q Q Q T L Q Q	116
361	TTT CTT CAA CAA CAG ATG ATT CCC TGC AGG GCT GTC CTC TTG CAA	405
117	F L Q Q Q M I P Q R A V L L Q	131
406	CAA CGC AAA GTT GCC CCT GTA AGG TCA CAA GTA TTG CAA CAA AGT	450
132	Q R K V A P V R S Q V L Q Q S	146
451	AGT TAC CAG GAG TTG CAA CAA CAG TGT TGT CAG CAG CTG TGG CAG	495
147	S Y Q E L Q Q Q Q Q Q Q L W Q	161
496	ATC CCT GAG CAG TCA CGG TGC CAA GCC ATC AAT AGT GTC GTT CAC	540
162	I P E Q S R Q Q A I N S V V H	176
541	GCA ATA ATT CTG CAT CAA CAA CTG CAG CAG TAC CCG TCC GGC CAA	585
177	A I I L H Q Q L Q Q Y P S G Q	191
586	GGA TCC ATC CAA CAG TAC CCG TTA AGC CAA GGC TCC TTC CAG CAA	630
192	G S I Q Q Y P L S Q G S F Q Q	206
631	TCT CAG CAA CAG TAC CCA CAT GGC CAG GGC ACT GTC CAG CCT CAA	675
207	S Q Q Q Y P H G Q G T V Q P Q	221
676	CAA ATA CCT CAG TTC GAG GAG ATA AGG AAC TTA GTG CTG CAG ACG	720
222	Q I P Q F E E I R N L V L Q T	236
721	CTA CCA GCA TTG TGC AAT GTG TAT GTC CCG CCA TAC TGC TCT ACC	765
237	L P A L Q N V Y V P P Y Q S T	251
766	ACC ACC GCG CCA TTT GGT AGC ACC GGC AGT AAC TGA GAA GAG AAG	810
252	T T A P F G S T G S N *	
811	AAC TCT AGT ACT AGA TAT ATG GAA CAC CGT TGC TTA ATC GAT GGT	855
856	TTG GTC GTT GTA GCG GTG AAA AAT AAA GTG CCA TGC ACA ATC ATG	900
901	TGT GAA CCC GAC CTA TAC TAG TTC AAA CAT GGG AA	936

注:下划线为预测信号肽序列,方框内为半胱氨酸残基。

图2 澳冰草-gliadin基因核苷酸及推测氨基酸序列

3 讨论

人们过去对麦醇溶蛋白的研究一般采用酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳方法来分离,并按迁移率为依据来划分醇溶蛋白的类型,随着一些醇溶蛋白相关基因的克隆与序列分析,发现麦醇溶蛋白具有一些保守的结构区域,根据这些保守的结构区域可以对醇溶蛋白进行类型的划分^[1]。-gliadin基因的氨基酸组成包括6~8个半胱氨酸残基以及信号肽、多聚谷胺酰胺

PCR克隆醇溶蛋白基因提供了依据^[2,6]。该研究从澳冰草中

获得的基因序列EF536330在N端序列中的22个氨基酸具有-gliadin基因保守的信号肽序列(图2),在序列中含有利于蛋白质形成二硫键的6个半胱氨酸残基位点,具有小麦醇溶蛋白家族中-gliadin基因的典型特征,结合序列同源性比对分析,证实克隆的EF536330为-gliadin基因家族的新成员。

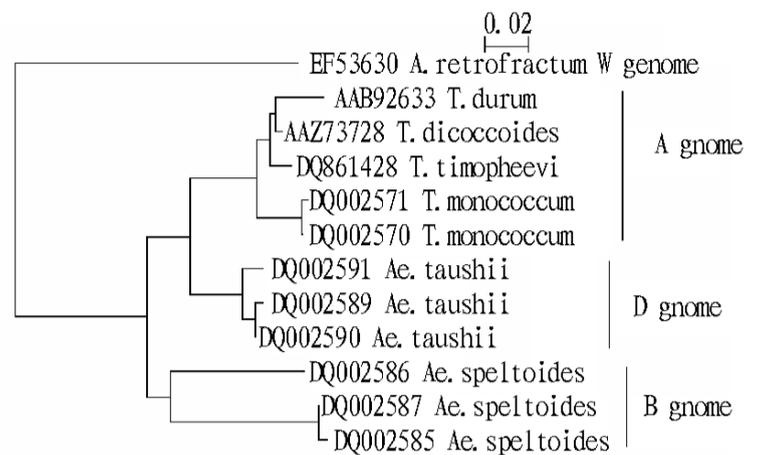


图3 -gliadin基因的系统聚类图

该研究用的澳冰草是小麦族的二倍体物种,它的分布区域比较局限,因而形成了特殊的基因进化类型,染色体组分析结果表明,澳冰草具有的W染色体组,与小麦族的其他染色体组具有较大的遗传差异^[5]。因此对澳冰草特异基因的克隆与分析,不仅能发掘新基因,而且有助于揭示该物种在小麦族植物中的系统分化地位。该研究从澳冰草中克隆的EF536330序列属于-gliadin基因家族,但利用目前发表的源自栽培小麦及其A、B和D染色体组供体的-gliadin基因序列进行的聚类分析(图3),表明EF536330序列不能与小麦的-gliadin基因聚在一起,说明该序列可能是-gliadin家系中的新类型,并且可能是-gliadin基因中比较古老的类型,这与澳冰草特殊的生态进化类型有关。随着对澳冰草醇溶蛋白基因克隆与序列测定工作的开展,将有助于了解麦醇溶蛋白基因的系统进化、结构与功能,并对丰富小麦品质改良的基因源具有重要意义。

参考文献

- [1] METAKOVSKY E V, NOVOSELSKAYA A Y. Gliadin allele identification in common wheat I. Methodological aspects of the analysis of gliadin patterns by one dimensional polyacrylamide gel electrophoresis [J]. J. Genet. Breed., 1991, (45): 317 - 324.
- [2] ANDERSON O D, LITIS J C, GREEN F C. The -gliadin gene family I. Characterization of ten new wheat -gliadin genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and southern analysis of the gene family [J]. Theor. Appl. Genet., 1997, 95: 50 - 58.
- [3] LOVE A. Conspectus of the Triticaceae [J]. Feddes Repertorium, 1984, 95: 425 - 521.
- [4] CONNOR H E, MOLLOY B P J, DAWSON M I. Australopyrum (Triticaceae: Gramineae) in New Zealand [J]. New Zealand Journal of Botany, 1993, 31: 1 - 10.
- [5] HIAO C, CHATTERTON N J, ASAY K H, et al. Phylogenetic relationships of the nongenomic species of the wheat tribe, Triticaceae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences [J]. Genome, 1995, 38(2): 211 - 223.
- [6] GU Y Q, CROSSMAN C, KONG X, ANDERSON O D, et al. Genomic organization of the complex alpha gliadin gene locus in wheat [J]. Theor. Appl. Genet., 2004, 109: 648 - 651.