

转基因小麦麦谷蛋白亚基突变体类型*

任燕萍 祝长青 覃建兵**

(新疆师范大学分子生物学与生物信息学研究室 乌鲁木齐 830053)

摘要 采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,分析了含外源 *IDx5* 和 *1Ax1* 的 T_7 代转基因小麦 HMW-GS 的突变类型及等位变异。结果显示,随机挑选的 1 000 份 B72-8-11b T_6 代籽粒在 T_7 代中共 21 类突变类型,其外源 *IDx5* 基因表达频率为 49.4%, *Glu A1*、*Glu B1* 和 *Glu D1* 共 3、13 和 9 个等位变异类型,分别以 N、17+18 和 N 为主,占 94.7%、61.5% 和 49.7%; B102-1-2 共 11 类,外源 *1Ax1* 基因表达频率占 95%, *Glu A1*、*Glu B1* 和 *Glu D1* 共 2、7 和 3 个等位变异类型,分别以 1、17+18 和 N 为主,占 95%、98.7% 和 98.3%。研究结果进一步说明了转基因株系的纯合性,完全符合孟德尔遗传分离规律,对小麦优质新品种的培育具有理论意义和应用价值。图 2 表 4 参 9

关键词 突变类型; SDS-PAGE; 转基因小麦; 麦谷蛋白; 等位变异

CLC Q78 : S512.103.3

Mutation Types of HMW-GS Component in Transgenic Wheat Progenies*

REN Yanping, ZHU Changqing & QIN Jianbing**

(Research Division of Molecular Biology and Informatics, Xinjiang Normal University, Urumqi 830053, China)

Abstract Mutation types of HMW-GS component in independent transgenic wheat lines were investigated in this paper. The results showed that there were 21 categories in the 1 000 selected randomly of B72-8-11b, the expression of *IDx5* gene accounted for 49.4%, three types were detected on *Glu A1*, and N subunit was the major types with frequency of 94.7%, thirteen types were detected on *Glu B1*, and 17+18 subunit was the major types with frequency of 61.5%, nine types were detected on *Glu D1*, and N subunit was the major types with frequency of 49.7%; There were 11 categories in the B102-1-2, the expression of *1Ax1* gene accounted for 95%, two types were detected on *Glu A1*, and N subunit was the major types with frequency of 95%, seven types were detected on *Glu B1*, and 17+18 subunit was the major types with frequency of 98.7%, three types were detected on *Glu D1*, and N subunit was the major types with frequency of 98.3%. The results also indicated that the transmission of the transgene and inheritance of its expression followed Mendelian ratios with the method of quantitative genetics, and T_7 generation lines almost homozygous. It would be beneficial for deciding the selection strategy in breeding program. Fig 2, Tab 4, Ref 9

Keywords mutation type; SDS-PAGE; transgenic wheat; glutenin; allelic variation

CLC Q78 : S512.103.3

利用基因工程进行小麦面包烘烤品质改良已是一个普遍关注的问题。转基因技术应用于作物品质改良,其后代的分析鉴定最重要的是判定转化品系的实际应用价值,这将为具有优良农艺性状的其他外源基因的成功转化及转化后的整合、表达规律和应用提供理论和技术依据。对外源基因在种植多代后在转基因小麦中的遗传特性分析和检测虽然已有报道^[1],但对其转化后代高分子量麦谷蛋白(High-molecular-weight glutenin subunit, HMW-GS)突变类型的研究报道较少。

鉴于此,我们采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶

电泳(SDS-PAGE)技术,检测了转基因小麦 B72-8-11b 和 B102-1-2 T_6 代籽粒在 T_7 代 HMW-GS 的突变类型及其等位变异,旨在为改良小麦烘烤品质,以及优质 HMW-GS 在我国具有优良农艺性状的主栽小麦品种中的成功转化提供理论和技术依据,同时对小麦分子育种材料选择策略的制定具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料及背景

采用的实验材料为转基因小麦 B72-8-11b 和 B102-1-2 (T_7 代)、受体对照 L88-31 (T_7 代)、中国春。其中,转基因小麦 B72-8-11b 是以 L88-31 为转化受体,通过基因枪法导入外源 *IDx5* 基因^[2]; B102-1-2 是以 L88-31 为转化受体,导入外源 *1Ax1* 基因^[3]。转化受体材料 L88-31 由 17+18 两个 HMW-GS 组成。

1.2 方法步骤

种子麦谷蛋白提取后,采用 SDS 不连续缓冲体系对其进行分离^[4]: 分离胶 T=10%, C=1.03%, 浓缩胶 T=4%, C=2%; 每份样品上样量 12 μ L, 电极缓冲液为 Tris-硼酸(含 6% SDS), 浓缩胶每板电压 110 V, 分离胶每板电压 170 V, 电

收稿日期: 2009-01-12 接受日期: 2009-05-05

*国家自然科学基金项目(No. 30960092), 科技支疆项目(No. 200840102), 新疆维吾尔自治区高校科研计划重点项目(No. XJEDU2007S27)和新疆师范大学研究生创新基金资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30960092), the Scientific Research Supporting Program for Xinjiang, China (No. 200840102), the Scientific Research Program of the Higher Education Institution of Xinjiang, China (No. XJEDU2007S27) and the Innovative Foundation of Graduate Student of Xinjiang Normal University

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: jianbingqin@tom.com)

泳4~5 h; 用1%的考马斯亮蓝(溶于10%的三氯乙酸和40%的甲醇中)轻缓振荡染色过夜、脱色2~3 h后, 用Gel doc仪记录电泳结果。

(附: 该实验材料是连续自交后代, 根据孟德尔遗传规律, 理论上在第一代 T_1 中, $AA:Aa:aa=1:2:1$; 在第二代 T_2 中, $AA:Aa:aa=6:4:6=3:2:3$; 依此类推, 在第七代 T_7 中, $AA:Aa:aa=8128:128:8128=127:2:127$, $\langle AA+Aa \rangle:aa=8256:8128=129:127$, 即表现型 $\langle A+ \rangle$: 隐型 $\langle A- \rangle=129:127$ 。)

2 结果与分析

2.1 B72-8-11b T_7 代HMW-GS突变类型检测

转基因小麦B72-8-11b T_6 代籽粒种植后, 随机选择1 000粒种子, 采用SDS-PAGE技术, 检测 T_7 代HMW-GS组成。共出现21类种子, 记为类型 $T_7/1\sim T_7/21$ (表1)。其中 $T_7/8$ 出现频率最高, 占47.1%; $T_7/1$ 出现频率次之, 占30.8%; $T_7/12$ 、 $T_7/14$ 、 $T_7/15$ 、 $T_7/16$ 和 $T_7/17$ 出现频率最低, 均占0.1%。

表1 转基因小麦B72-8-11b HMW-GS突变类型
Table 1 Types of HMW-GS mutation in transgenic wheat B72-8-11b

类型 Type	高分子量麦谷蛋白亚基 HWM-GS			频率 Frequency (f%)
	1A	1B	1D	
$T_7/1$	N	6, 21, 17+18	5	30.8
$T_7/2$	1	17+18	5+10	12.4
$T_7/3$	N	17+18	5+10	1.4
$T_7/4$	N	7+8	2+12	0.8
$T_7/5$	N	7+8	N	0.4
$T_7/6$	N	7+9	5	0.2
$T_7/7$	N	6, 21, 7+9	5	0.2
$T_7/8$	2*	17+18	N	47.1
$T_7/9$	2*	17+18	N	0.4
$T_7/10$	2*	21, 17+18	N	1.4
$T_7/11$	2*	6, 21, 17+18	N	0.2
$T_7/12$	N	17+18, 7+8	N	0.1
$T_7/13$	N	6, 21, 7+9	5, 2+12	0.2
$T_7/14$	N	17+18	2	0.1
$T_7/15$	N	7+9	5+10	0.1
$T_7/16$	N	7+8	5+10	0.1
$T_7/17$	N	17+18	N	0.1
$T_7/18$	N	6, 21, 8	5+10	2.0
$T_7/19$	2*	8	5, 2+12	0.2
$T_7/20$	N	7	12, 5+10	1.6
$T_7/21$	N	6, 21, 7	5+10, 2+12	0.2

转基因小麦B72-8-11b经过连续自交后, 在其后代材料种子胚乳里HMW-GS组成出现了一定数量的变异类型(图1)。

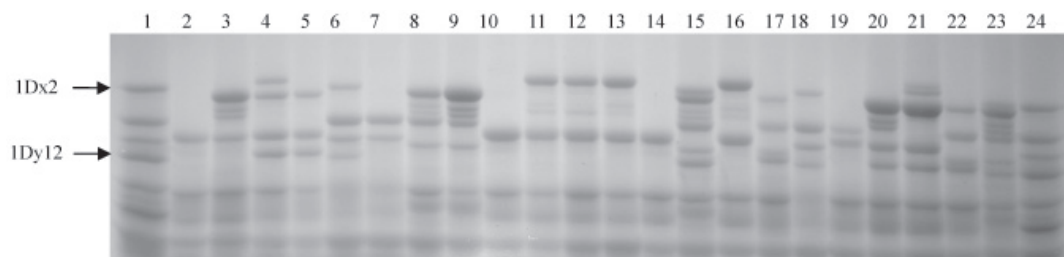


图1 转基因小麦B72-8-11b HMW-GS突变类型

Fig. 1 Types of HMW-GS mutation in transgenic wheat B72-8-11b

1~24. 中国春 Chinese spring; 2. L88-31; 3~23. $T_7/1\sim T_7/21$

在突变类型中外源 $IDx5$ 基因表达量占49.4%, 含有 $IDx5$ 基因片段(A^+)的样品和不含 $IDx5$ 基因片段(A^-)的样品比例为494:506=247:253, 与理论比例129:127一致, 完全符合孟德尔遗传分离规律。

2.2 B102-1-2 T_7 代HMW-GS突变类型检测

采用SDS-PAGE技术, 随机检测转基因小麦B102-1-2 T_7 代1 000粒种子。共出现11类种子, 记为类型 $T_7/1\sim T_7/11$ (表2)。其中 $T_7/8$ 出现频率最高, 占92.9%; $T_7/5$ 、 $T_7/7$ 和 $T_7/11$ 出现频率最低, 占0.1%。

表2 转基因小麦B102-1-2 HMW-GS突变类型
Table 2 Types of HMW-GS mutation in transgenic wheat B102-1-2

类型 Type	高分子量麦谷蛋白 HWM-GS			频率 Frequency (f%)
	1A	1B	1D	
$T_7/1$	1	17+18	5+10	0.9
$T_7/2$	N	17+18	5+10	0.6
$T_7/3$	N	17+18	2+12	0.2
$T_7/4$	1	6, 7+9	N	0.2
$T_7/5$	1	7+9, 17+18	N	0.1
$T_7/6$	1	7+9	N	0.2
$T_7/7$	N	6, 21, 17+18	N	0.1
$T_7/8$	1	17+18	N	92.9
$T_7/9$	N	17+18	N	4.1
$T_7/10$	1	6, 21, 17+18	N	0.6
$T_7/11$	1	6, 17+18	N	0.1

转基因小麦B102-1-2在其后代材料种子胚乳里HMW-GS组成同样也出现了一定数量的变异类型(图2)。其中外源 $lAx1$ 基因表达量占95%, 转基因小麦B102-1-2已经几乎纯合。

2.3 转基因小麦 T_7 代HMW-GS等位变异分析

转基因小麦B72-8-11b等位变异结果见表3。 $Glu A1$ 位点上有1、N和2*共3个等位变异类型, 以N亚基为主要类型, 占94.7%; $Glu B1$ 位点上有7、8、7+8、7+9、17+18共5个等位变异类型和8个混合亚基类型, 以17+18亚基为主, 占61.5%; $Glu D1$ 位点上有2、5、N、5+10、2+12共5个等位变异类型和4个混合亚基类型, 以N亚基为主, 占49.7%

转基因小麦B102-1-2等位变异结果见表4。 $Glu A1$ 位点上有1和N共2个等位变异类型, 以1亚基为主, 占95%; $Glu B1$ 位点上有7+9和17+18共2个等位变异类型和5个混合亚基类型, 以17+18亚基为主, 占98.7%; $Glu D1$ 位点有N、5+10和2+12共3个等位变异类型, 以N亚基为主, 占98.3%。

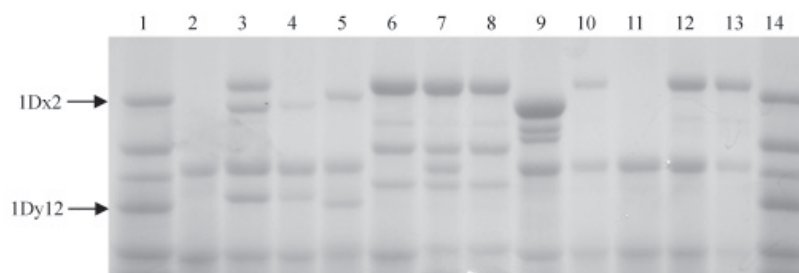


图2 部分转基因小麦B102-1-2 HMW-GS突变类型

Fig. 2 Types of HMW-GS mutation in transgenic wheat B102-1-2

1~14. 中国春 Chinese spring; 2. L88-31; 3~13. T₁/1~T₁/11

表3 转基因小麦B72-8-11b HMW-GS组成及出现频率

Table 3 Frequency of HMW-GS in transgenic wheat B72-8-11b

位点 Locus	亚基 Subunit	频率 Frequency (f%)
<i>Glu A1</i>	N	94.7
	1	3.1
	2	2.2
<i>Glu B1</i>	7+8	1.3
	7+9	0.3
	17+18	61.5
	Other	36.9
<i>Glu D1</i>	2+12	0.8
	5+10	16
	N	49.7
	Other	33.5

表4 转基因小麦B102-1-2组成及出现频率

Table 4 Frequency of HMW-GS in transgenic wheat B102-1-2

位点 Locus	亚基 Subunit	频率 Frequency (f%)
<i>Glu A1</i>	N	5
	1	95
<i>Glu B1</i>	7+9	0.5
	17+18	98.7
	Other	0.8
<i>Glu D1</i>	2+12	0.2
	5+10	1.5
	N	98.3

3 讨论

在转基因植株后代中, 优质外源基因稳定遗传并表达, 并且生物环境和自身遗传背景不被干扰^[5], 决定了小麦遗传改良后的实际应用价值. B72-8-11b和B102-1-2是经基因枪转化法获得的转基因品系. 相关研究表明, 基因枪转化法能够使外源基因有功能拷贝在1个位点并能够简单、稳定遗传^[7], 这也为优质高产转基因新品系的选育奠定了理论基础, 增加了选择的预见性.

转基因材料的遗传稳定性是基因工程成败的关键内容之一, 快速确认其多代遗传特性是进行大量后代材料分析的技术保证. 有同类报道^[8], 转*IDx5*基因小麦品系B73-6-1 T₀代HMW-GS组成出现与受体材料L88-6相同且出现外源基因超量表达外, 还发现了内源HMW-GS组成发生变异的个体, 该研究表明转*IDx5*基因的小麦的外源基因和内源高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)编码基因存在同源关系, 发现转基因单株后代中存在多种内源HMW-GS组成发生变异的个

体, 并认为这是导入外源基因所致, 可能归因于外源基因和同源的内源基因的非等位交换, 然而这一推论是基于蛋白质分子水平上HMW-GS组成的比较结果, 正在从基因整合的DNA水平上提供进一步的证据.

本研究采用SDS-PAGE技术检测样品的结果显示, 随机挑选的转基因小麦株系B72-8-11b在T₁代发现了共21类突变类型, 其中外源*IDx5*基因表达量为49.4%, *IDx5*基因表达的样品与*IDx5*基因未表达的样品比例完全符合孟德尔遗传分离规律; B102-1-2共出现11类突变类型, 外源*Iax1*基因表达量为95%, 其后代种子理论上已经几乎纯合. 研究结果表明, 转基因小麦株系内源基因HMW-GS组成的多样性, 同时在突变类型中出现了其他优质亚基如1、2*、5+10的组合, 潘志芬等针对川育小麦的研究结果表明1亚基的作用显著大于2*亚基, 5+10亚基显著优于2+12亚基^[9], 这些含有优质基因的株系为利用基因工程技术进行小麦遗传改良奠定了坚实的理论基础.

与此同时, B72-8-11b在T₁代HMW-GS的*Glu A1*、*Glu B1*、*Glu D1*共出现3、13和9种等位变异类型, 出现频率最高亚基为N、17+18和N, 分别为94.7%、61.5%和49.7%; B102-1-2 HMW-GS的*Glu A1*、*Glu B1*和*Glu D1*共出现2、7和3种等位变异, 出现频率最高亚基为1、17+18和N, 分别为95%、98.7%和98.3%. 变异的原因主要有3种可能: 第一, 基因枪轰击的遗传转化步骤引起的变异; 第二, 组织培养产生无性系变异; 第三, 转基因材料在有性生殖过程中多拷贝外源基因引起的变异. 以上推论是基于蛋白质分子水平上HMW-GS组成的比较结果, 还有待于从基因整合水平上提供进一步的证据. 因此, 此项工作还有待进一步的深入研究: 外源基因整合的位点特征; 提高外源基因在小麦中的转化频率; 其他具有优良农艺性状的外源基因在小麦中的成功转化等.

References

- Qin JB (覃建兵), Zhu CQ (祝长青), Zhao HX (赵惠新). Measures of interesting gene *IDx5* expression in transgenic wheat progenies. *J Huazhong Norm Univ* (华中师范大学学报), 2008, **42** (2): 267-271
- Li SH (李三和), Li J (李举), Wang NL (王娜丽), He GY (何光源). Variation of HMW-GS expression resulted by the foreign *IDx5* gene. *Lett Biotechnol* (生物技术通讯), 2007, **18** (2): 217-219
- Wang NL (王娜丽), Wang YS (汪越胜), Li J (李举), Li SH (李三和), He GY (何光源). Studies on transgenes *IDx5* and *Iax1* transferred into elite wheat cultivars by cross breeding. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究),

- 2007, **25** (4): 331~334
- 4 Huang DY, Khan K. Quantitative determination of high molecular weight glutenin subunit of hard red spring wheat by SDS-PAGE: Quantitative effects of total amounts on bread making quality characteristics. *Cereal Chem*, 1997, **76**: 781~788.
 - 5 Zhang XM, Xu HJ, Du LP, Ye XG, Xin ZY, Guo AG, Xue S, Ma YZ. Excision of bar gene from transgenic wheat obtained by biolistic co-transformation. *Acta Agron Sin*, 2004, **30** (1): 26~30
 - 6 He G Y, Rooks L, Steele H S, Bekes F, Gras P, Tatham A S, Fido R, Barcelo P, Shewry P R, Lazzeri P A. Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) with high-molecular-weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality. *Mol Breeding*, 1999, **5**: 377~386
 - 7 Wang YS (汪越胜), Qin JB (覃建兵), Chang JL (常俊丽), Fang JY (房敬业), He GY (何光源), Peter Shewry. Study on heritage of foreign gene *IDx5* expressed in transgenic wheat. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 2005, **3** (4): 451~455
 - 8 Wang YS (汪越胜), He T (柯涛), Li SH (李三和), Qin JB (覃建兵), Liu Y (刘勇), He GY (何光源). Variation of HMW-GS component in the progeny of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, **31** (4): 529~531
 - 9 Pan ZF (潘志芬), Deng GB (邓光兵), Liu Y (刘毅), Wu F (吴芳), Yu MX (余懋群). Composition of high molecular wheat glutenin subunits and effect on wheat baking quality. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2006, **12** (2): 155~159