DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00672

小麦品种陕 253 低分子量谷蛋白亚基基因的克隆及原核表达

吴 丹¹ 高 翔^{1,2,*} 于 旭¹ 董 剑^{1,2} 赵万春^{1,2} 陈其蛟^{1,2} 庞红喜^{1,2}
李哲清^{1,2}

¹ 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100; ² 陕西省小麦工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100

摘 要: 利用 LMW-GS 特异引物, 从强筋小麦品种陕 253 中克隆了 1 个 1 498 bp 的片段(GenBank 登录号为 FJ172533), 该片段包含全长为 912 bp 的低分子量谷蛋白亚基的完整编码序列。经比较推导氨基酸序列的同源性, 发现该基因属于 *Glu-D3* 位点编码低分子量谷蛋白亚基的基因, 编码产物 N-端具有 LMW-m 型低分子量谷蛋白亚基的典型特征, 系统演化分析也支持这一结果。构建了该基因的表达载体 pET32a-*GluD3*-S253, 在宿主菌 *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) 中经 IPTG 诱导表达融合蛋白。SDS-PAGE 和 Western blot 检测表达产物, 证实融合蛋白表达成功。

关键词: 小麦; 低分子量谷蛋白亚基; 基因克隆; 融合蛋白; 原核表达

Cloning and Prokaryotic Expression of a Low Molecular Weight Glutenin Gene from Wheat Variety Shaan 253

WU Dan¹, GAO Xiang^{1,2,*}, YU Xu¹, DONG Jian^{1,2}, ZHAO Wan-Chun^{1,2}, CHEN Qi-Jiao^{1,2}, PANG Hong-Xi^{1,2}, and LI Zhe-Qing^{1,2}

¹ College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ² Wheat Engineering Research Center of Shaanxi Province, Yangling 712100, China

Abstract: Low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) plays an important role in determination of flour viscoelastic properties in wheat (*Triticum aestivum* L.). LMW-GS has large polymorphism and variation in molecular size, thus, it is difficult to be isolated using one-dimensional electrophoresis. Shaan 253 is a wheat variety with characteristics of high yield and early maturity, especially, with elite high-molecular-weight glutenin subunits, such as 5+10 on 1D, 14+15 and 20 on 1B, and 1 on 1A. The purpose of this study was to understand the contribution of LMW-GS to the processing quality in Shaan 253. Using a pair of specific primers of LMW-GS and pMD19-T vector, one DNA fragment of 1 498 bp (GenBank accession No. FJ172533) was obtained from Shaan 253. The fragment contained the complete coding sequence of 912 bp and encoded 304 amino acid residues. According to sequence analysis, this gene was involved in *Glu-D3* loci, and had high similarities to other known LMW-GS genes with the highest identity of 99.34%. Deduced amino acid sequence showed there were typical features of LMW-m type in N-terminal region, which was confirmed by the phylogenetic analysis. The expression vector of pET32a-*GluD3*-S253 was constructed and transformed into the host bacteria *Escherichia coli* Rosetta-gami B (DE3). The expression product was testified using SDS-PAGE and Western-blot, indicating that the fusion protein was successfully expressed.

Keywords: Wheat; Low-molecular-weight glutenin subunits (LMW-GS); Gene cloning; Fusion protein; Prokaryotic expression

小麦(*Triticum aestivum* L.)低分子量谷蛋白亚基(low molecular weight glutenin subunit, LMW-GS)是小麦麦谷蛋白的重要组成部分。编码 LMW-GS 的大多数基因被定位在第一同源组群 1A、1B 和 1D 染色体短臂末端的 *Glu-A3*、*Glu-B3* 和 *Glu-D3* 位点, 距着丝点 42~46 cM, 分别与 *Gli-A1*(1.3 cM)、*Gli-B1*(2 cM)

和 *Gli-D1* 紧密连锁^[1-2], 构成一个庞大的基因家族。20 世纪 80 年代后, 通过各种单、双向电泳和反相高效液相色谱及单克隆抗体等分析方法, 证实 LMW-GS 在 *Glu-A3* 位点有 7 个等位基因, 分别是 *Glu-A3a*、*b*、*c*、*d*、*e*、*f* 和 *g*; 在 *Glu-B3* 位点有 9 个等位基因, 即 *Glu-B3a*、*b*、*c*、*d*、*e*、*f*、*g*、*h* 和

本研究由陕西省“13115”科技创新工程重大项目(2007ZDKG-01)和农业部小麦现代产业技术体系建设陕西小麦综合试验重大项目(NYCYTX-001)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 高翔, E-mail: gx@nwsuaf.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: wudanespn@hotmail.com

Received(收稿日期): 2008-09-08; Accepted(接受日期): 2008-12-12.

i; 在 *Glu-D3* 位点有 5 个等位基因, 分别是 *Glu-D3a*、*b*、*c*、*d* 和 *e* [3-5]。此外, 在 *Glu-D4* 和 *Glu-D5* 位点也有报道 [6]。

研究表明, LMW-GS 基因家族成员的编码区在结构上非常相似, 由信号肽、保守 N-端区、含有多个重复短肽的重复区以及 C-端保守区构成 [7], 不具有内含子, 编码的氨基酸序列中通常含有 8 个半胱氨酸残基, 但某些 LMW-GS 含有 9 个半胱氨酸 [8], 这些半胱氨酸位置保守, 对低分子量谷蛋白在面粉加工品质中的作用有重要贡献 [9]。LMW-GS 通过这些半胱氨酸形成分子间二硫键, 结合到以高分子量谷蛋白亚基为骨架的谷蛋白聚合体中, 从而影响小麦面粉的黏弹性, 与面筋延展性和抗性密切相关 [10-13]。由于组成复杂, 分离较为困难, LMW-GS 在小麦品质研究中没有得到充分重视, 研究相对滞后。近年来, 国内外已在改进 LMW-GS 分离方法、编码基因的克隆、分子结构特征及功能研究等方面取得了显著进展 [14]。D'Ovidio 等 [15] 首次报道利用 PCR 方法分离单个低分子量谷蛋白基因。Lee 等 [16] 在 *E. coli* 表达系统中获得了野生一粒小麦 (*T. boeoticum*) LMWG-E2 和 LMWG-E4 基因编码的成熟 LMW-GS 蛋白, 并用于随后的蛋白功能分析。Cloutier 等 [17] 通过 PCR 技术分离克隆了一个编码 LMW-i 型亚基的基因, *E. coli* 体外表达产物经 SDS-PAGE 和 Western 杂交分析, 证明与小麦 Glenlea 中的 LWM-50 具相同的杂交带。

陕 253 是本课题组选育的丰产、早熟、优质强筋小麦新品种, 由陕 229/陕 213 杂交而成, 具有面团形成时间和稳定时间长等突出的品质特征。陕 253 的高分子量谷蛋白亚基组成中含有优异亚基, 即 1D 上含有 5+10 亚基, 1B 上含有 14+15、20 亚基, 1A 上含有 1 亚基 [18]。这说明陕 253 的高分子量谷蛋白亚基品质和数量上都具有优质的构成, 但是目前关于该品种 LMW-GS 对面粉加工品质的贡献了解较少。本研究从陕 253 中克隆了一个 LMW-GS 基因, 并构建了其原核表达载体, 诱导其融合蛋白表达, 为其体外结构及功能的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及其基因组 DNA 的提取

陕 253 种子由本实验室保存, 以室内培养 4~5 d 的幼叶片为材料, 采用微量 CTAB 法 [19] 提取基因组 DNA。

1.2 目的基因克隆

以“陕 253”基因组 DNA 为模板, 采用 LMW-GS 特异引物 P1: 5'-GCCTTTCTTGTTTACGGCTG-3'; P2: 5'-TCAGATTGACATCCACACAAT-3' [20] (Invitrogen 公司合成) 扩增目的基因。PCR 总体积 50 μ L, 含模板 DNA 100 ng、0.1 μ mol L⁻¹ 引物、1.5 U *Taq* DNA 聚合酶、0.05 mmol L⁻¹ dNTP。PCR 程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 3 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并回收目的片段。

回收片段与 pMD19-T 载体 (大连宝生物工程有 限 公 司) 16℃ 连 接 过 夜, 以 连 接 产 物 转 化 *E. coli* DH5 α 感受态 (Promega 公司), 在涂有氨苄青霉素及 X-gal/IPTG 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选, 挑取白色单克隆, 用克隆载体上的随机引物 M13 做菌落 PCR 检测, 反应条件与目的片段扩增条件相同。随机选取 3 个独立的阳性克隆进行测序 (上海生工生物工程技术有限公司)。

1.3 目的基因序列分析

利用 NCBI 在线 BLAST 工具, 对开放阅读框 (ORF)、核苷酸及氨基酸序列进行同源性搜索; 用 DNAMAN (5.2.9 Demo version) 进行 DNA 序列翻译; 用 MEGA4.0 软件构建系统演化树。

1.4 原核表达载体的构建与鉴定

根据目的序列的完整编码区, 利用 Primer5.0 设计一对表达引物, 即 P3: 5'-CGCGGATCCATGGAGACTAGATGCGTC-3', P4: 5'-CCCAGCTTCCGCTGCATCGACATA-3' (Invitrogen 公司合成), 下划线分别表示 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点。以阳性克隆质粒为模板, 扩增并回收目的基因。PCR 体系总体积 50 μ L, 含模板 DNA 100 ng、0.1 μ mol L⁻¹ 引物、1.5 U *Taq* DNA 聚合酶、0.05 mmol L⁻¹ dNTP。PCR 程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 8 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

纯化的 PCR 产物及 pET-32a(+) 质粒 (MERCK 公司) 分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 回收纯化酶切片段, 并用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜。将连接产物转化至宿主菌 *E. coli* DH5 α 中, 在含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上 37℃ 培养过夜。挑取白色阳性菌落, 用随机引物 M13 及 P3、P4 引物进行菌落 PCR 检测; 用碱裂解法提取质粒, *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切筛选, 并测序鉴定。

1.5 重组质粒的诱导表达

将重组表达质粒转化入宿主菌 *E. coli* Rosetta gami B (DE3)(MERCK 公司)中。挑取重组菌单菌落,接种至含有羧苄青霉素的 LB 培养基中,37℃培养过夜。将培养物按 1 100 接种至 5 mL LB 培养基中,培养至 $A_{600} = 0.5\sim 0.8$ 时,取 1 mL 作为未诱导的阴性对照,同时设立诱导及未诱导的空载体对照,向剩余培养液加入 IPTG(终浓度为 1 mmol L^{-1}),37℃诱导 6 h 后取菌液 1 mL, $15\ 000\times g$ 离心收集菌体 10 min,加入 $1\times$ SDS 凝胶加样缓冲液 100 μL ,重悬,煮沸 5 min,用 12% SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白的表达情况。

1.6 重组蛋白的 Western blot 分析

采用 12%SDS-PAGE 电泳分析处理后的样品,并将表达产物经 60 V 2 h 电转移到硝酸纤维膜上,加入新鲜配制的封闭液(含 5%脱脂奶粉的 TBS),室温摇床封闭 1 h。弃封闭液,加鼠抗 His 抗体(1:5000),于室温摇床孵育 1 h。回收一抗,TBS 洗膜 2 次,TBST 洗膜 2 次。用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗(1:500)室温孵育 1 h。回收二抗,TBS 洗膜 2 次,TBST 洗膜 2 次,用 DAB 显色试剂盒进行化学发光法显色鉴定。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增及克隆

用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物可见一条约为 1 500 bp 的条带(图 1)经回收纯化后,连接进入 pMD19-T 克隆载体,转化产物经过蓝白斑及菌落 PCR 筛选后,获得一阳性克隆,命名为 pMD-LMW-S253。

图 1 PCR 产物电泳分析
Fig. 1 PCR amplified products separated on 1% agarose gel
M: DL2000; 1: 陕 253 PCR 产物; 箭头示 PCR 条带。
M: DL2000; 1: PCR product from Shaan 253. Arrow shows the target band from Shaan 253.

2.2 目的基因序列分析

阳性克隆测序表明,插入片段长 1 498 bp。该序列与已经发表的小麦低分子量谷蛋白 *Glu-D3* 位点所编码氨基酸序列的同源性很高,而与栽培品种“Glenlea”来源(GenBank 登录号为 EU189094)的 LMW-m 型亚基的一致性高达 99.34%(表 1),仅在 2 个位点出现氨基酸变异(V→I, D→G)。

利用 NCBI 上的 BLASTx 及 DNAMAN 对序列的 ORF 进行分析,结果表明,该序列含有一个 912 bp 完整的开放阅读框,无内含子,共编码 304 个氨基酸。翻译后的氨基酸序列,含一个 N-端信号肽,由 20 个氨基酸组成;13 个保守的氨基酸残基组成的 N-末端,其中包含一个半胱氨酸,重复短肽组成的具有 100 个氨基酸的重复区,该区富含谷氨酰胺(Q)和脯氨酸(P),以及由 171 氨基酸组成的保守 C 端,其

表 1 pMD-LMW-S253 (GenBank 序列号 FJ172533)推导的氨基酸序列与 *Glu-3* 位点编码基因的氨基酸序列一致性比对
Table 1 Identity of LMW glutenin S253 from wheat cultivar Shaan 253 with homologous genes encoded by *Glu-3* in wheat

亚基类型 Type of subunit	GenBank 登录号 GenBank acc. No.	来源 Source	氨基酸序列的一致性 Identity of protein (%)
LMW-Glu-A3	AY453159	<i>T. aestivum</i>	49.59
	AY453160	<i>T. aestivum</i>	51.65
	AY453156	<i>T. aestivum</i>	57.71
	DQ234069	<i>T. monococcum</i>	69.75
LMW-Glu-B3	EU369729	<i>T. aestivum</i>	60.45
	EU369716	<i>T. aestivum</i>	65.65
	EU369708	<i>T. aestivum</i>	70.33
	EU369703	<i>T. aestivum</i>	74.93
LMW-Glu-D3	EU189096	<i>T. aestivum</i>	64.77
	EF437422	<i>Aegilops tauschii</i>	73.80
	DQ457416	<i>T. aestivum</i>	77.12
	EU189094	<i>T. aestivum</i>	99.34

中含 7 个半胱氨酸。N-/C-端氨基酸(图 2 和图 3)及系统演化(图 4)分析结果表明, 该基因编码产物为典型的

LMW-m 型低分子量谷蛋白, 属于 Type V (Group 10), 但在 N-端存在单个氨基酸的替换(I→V)。

图 2 FJ172533 推导的氨基酸序列

Fig. 2 Deduced amino acid sequence of FJ172533
方框示半胱氨酸残基。Cysteine residues are boxed.

图 3 FJ172533 编码的 N-/C-端部分氨基酸

Fig. 3 Partial N-/C-terminal amino-acids encoded by FJ172533
箭头示氨基酸变异位点。Arrowhead indicates the mutated amino acid.

图 4 FJ172533 所推导氨基酸序列的系统演化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequence of FJ172533
箭头示 S253(FJ172533)推导的氨基酸序列。
Arrowhead shows the LMW-GS gene from Shaan 253 (FJ172533).

2.3 原核表达载体的构建和重组子鉴定

目的片段及 pET32a(+)经过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 纯化、连接, 构建重组表达载体。单克隆经菌落 PCR 检测为 1 000 bp 左右插入片段, 与目的片

段(912 bp)大小基本相符(图 5); 双酶切结果为 1 000 bp 左右的目的基因片段及 5 900 bp 左右的 pET32a(+)序列(图 6)。重组质粒经再次测序表明, 与克隆序列完全一致, ORF 正确。表明成功构建了 *Glu-D3* 原核

表达载体, 并将其命名为 pET32a-*GluD3-S253*。

图 5 pET32a-*GluD3-S253* 重组菌落 PCR

Fig. 5 PCR of recombinant single clone
箭头示表达载体插入片段。

Arrow shows amplification product from the positive clone.

图 6 pET32a-*GluD3-S253* 重组质粒双酶切

Fig. 6 Digestion of pET32a-*GluD3-S253* with *BamH I*/*Hind III*
箭头示双酶切片段。

Arrows show enzyme digestion fractions of pET32a-*GluD3-S253*.

2.4 目的基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

经过 IPTG 诱导, pET32a-*GluD3-S253* 重组质粒在 Rosetta gami B (DE3) 中表达, 分子量 55 kD 左右, 与预计的低分子量谷蛋白融合蛋白分子量相似(图 7), 目的蛋白约 34.602 kD, 标签蛋白 20.4 kD。

2.5 目的基因表达产物的 Western blot 分析

表达产物经 12% SDS-PAGE 后, 电转移至 NC 膜上, 经牛奶封闭后依次加入小鼠抗 His 一抗, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗, 最后在联苯胺溶液中观察到一条 55 kD 条带(图 8), 证明融合表达蛋白成功表达。

图 7 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 Analysis of expressed proteins by SDS-PAGE

M: 蛋白质分子质量标准; 1、4: 未诱导重组质粒; 2、3、5: IPTG 诱导后的重组质粒; 6: 未诱导空载体; 7: 诱导后空载体。箭头示基因 *S253* 表达产物。

M: protein molecular weight marker; 1 and 4: protein of recombinant plasmid pET32a-*GluD3-S253* before induction; 2, 3, and 5: protein of recombinant plasmid induced by IPTG; 6: uninduced protein of pET32a (+); 7: induced protein of pET32a (+).

Arrow shows expression product of LMW-GS *S253*.

图 8 重组质粒 pET32a-*GluD3-S253* 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 8 Western blot of expression product of the recombinant plasmid pET32a-*GluD3-S253*

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 未诱导重组质粒 pET32a-*GluD3-S253*; 2: 诱导后的重组质粒。

M: protein molecular weight marker; 1: uninduced recombinant plasmid pET32a-*GluD3-S253*; 2: induced recombinant plasmid pET32a-*GluD3-S253*.

3 讨论

低分子量谷蛋白是小麦种子中含量最丰富的贮藏蛋白, 分别占小麦种子储藏蛋白及谷蛋白总量的 40% 和 60% 左右^[21], 在一个普通小麦品种中具有多达 30~40 个 LMW-GS 基因^[22]。对于低分子量麦谷蛋白亚基基因主要有 4 种分类系统: (1) Gupta 和 Shepherd^[23]、Jackson 等^[24]根据低分子量谷蛋白在 SDS-PAGE 以及 2D IEF/SDS-PAGE 的迁移率不同, 划分了 B、C 和 D 区, 其中 B 区为碱性蛋白, 分子量 42~51 kD; C 区为一组与 γ -和 α -醇溶蛋白重叠的

LMW-GS, 分子量 31.0~36.5 kD; D 区为酸性蛋白, 其迁移率介于 A 和 B 区之间, 且与 ω -醇溶蛋白位置相近。(2) Lew 等^[25]、Sissons 等^[26]和 Cloutier 等^[27]根据 LMW-GS 编码产物的 N-末端或起始氨基酸序列将 LMW-GS 分为 LMW-m、LMW-s 和 LMW-i 型, 其起始氨基酸序列分别是 METSH(R/C)I-、SHIPGL-和 ISQQQ-(缺少 N-末端区域)。(3) 根据染色体定位, 可将 LMW-GS 划分为 Glu-A3、Glu-B3 和 Glu-D3^[28]。(4) Masci 等^[29]和 Ikeda 等^[30]根据半胱氨酸的分布、C-/N-端保守氨基酸序列将 LMW-GS 基因划分为 6 种类型, 即 Type I 至 Type VI, 共分 12 组。基于通用三联体密码推导的 LMW-GS 基因氨基酸序列比较、演化分析及原核表达, 本研究克隆的 S253 属于 C 组、LMW-m 型、Type V (第 10 组)亚基, 系 *Glu-D3* 编码的新基因。

韩彬和 Shepherd^[31]研究表明, A 组亚基(HMW-GS-A)与 B 组亚基(LMW-GS-B)占谷蛋白的比例与沉降值呈显著正相关, 而 C 组亚基(LMW-GS-C)呈显著负相关, 籽粒蛋白含量主要通过 A 和 C 组亚基比例影响品质。本研究发现的 LMW-GS 基因 S253, 其编码产物对强筋小麦陕 253 面粉烘烤品质有何作用尚需进一步研究。

LMW-GS 亚基一般含有 8 个半胱氨酸残基, 与高分子量谷蛋白亚基通过分子间二硫键形成蛋白质聚合体, 从而影响面粉的品质。虽然已经知道小麦 LMW-GS 对面团阻力和延展性有着重要作用, 但由于 LMW-GS 不仅数量远多于 HMW-GS, 其基因家族也较为复杂, 且变异广, 在 SDS-PAGE 中与醇溶蛋白谱带重叠^[32], 给深入研究 LMW-GS 带来了难度, 绝大多数低分子量谷蛋白亚基对小麦品质的作用并没有得到清楚认识。因此, 有必要将低分子量谷蛋白从小麦贮藏蛋白中分离出来。迄今, 国内外对低分子量亚基的分离方法虽有一些报道, 但因分离量少、操作繁琐、不易掌握等原因始终未能广泛用于品质育种^[14]。以 PAGE 改进的一系列电泳方法易受实验过程中很多难以准确操作的影响, 使定性、定量分析准确性较低^[33], 且分离效果差。与此相比, 液相色谱仪具快速、简单和高通量的特点, 可以定性分析贮藏蛋白组分, 但其的定量分析能力相对较差^[34], 且其仪器、标样价格昂贵, 样品的前期制备也比较繁琐。

目前还有一些关于低分子量谷蛋白功能的研究方法, 如低分子量谷蛋白的转基因^[35]、体内过量表

达低分子量谷蛋白亚基、筛选一系列仅一个或几个低分子量谷蛋白亚基有差异的小麦体系等, 但这些技术研究时间长, 试验技术复杂, 要求高。

目的蛋白微量掺粉试验为研究低分子量蛋白质亚基对品质的影响提供了快速、简便的途径。该方法只需将外源的低分子谷蛋白添加到面粉中, 用微量揉和仪即可以测定其品质效应。但这种方法要求足量的纯化蛋白质, 高水平的原核表达体系的产物经纯化后能满足试验需求, 由于低分子量谷蛋白基因本身的特性及该基因家族丰富的变异, 国内的相似研究还比较少^[36]。就目前而言, 针对 D 基因组的 LMWG-16/10 以及 LMW-i 型低分子量谷蛋白基因, 其表达载体主要采用 pET11、PACym1 和 pET3a, 宿主细胞 BL21SI、JM109/AD494(DE3)、BLR21(DE3) pLysS, 但普遍表达量低或者无法成功表达^[37-38]。本研究利用 pET-32a 构建了 LMW-m 型亚基的表达载体, 并在 *E. coli* Rosetta gami B (DE3)体系中实现对单个低分子谷蛋白亚基的分离, 可获得大量纯化的目的蛋白, 为微量掺粉试验对低分子量谷蛋白亚基品质效应等的综合评定奠定了基础。

4 结论

获得全长为 912 bp 的完整编码序列, 属于 *Glu-D3* 位点基因。其 N-端氨基酸序列符合 LMW-m 型低分子量谷蛋白特征。获得基因融合蛋白表达产物, 该基因编码产物为 C 组 LMW-GS。

References

- [1] Singh N K, Shepherd K W. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat: 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 75: 628-641
- [2] Gupta R B, Shepherd K W. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin: 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 65-74
- [3] Gupta R B, MacRitchie F. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1* of common wheats: II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. *J Cereal Sci*, 1994, 19: 19-29
- [4] Flaete N E S, Uhlen A K. Association between allelic variation at the combined *Gli-1*, *Glu-3* Loci and protein quality in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Cereal Sci*, 2003, 37: 129-137
- [5] Cherdouh A, Khelifi D, Carrillo J M, Nieto-Taladriz M T. The high and low molecular weight glutenin subunit polymorphism of Algerian durum wheat landraces and old cultivars. *Plant Breed*, 2008, 124: 338-342
- [6] Sreeramulu G, Singh N K. Genetic and biochemical characteriza-

- tion of novel low molecular weight glutenin subunits in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 1997, 40: 41–48
- [7] Cassidy B G, Dvorak J, Anderson O D. The wheat low-molecular-weight glutenin gene: Characterization of six new gene and process in understanding gene family structure. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 743–750
- [8] Wei Y-Y(魏燕燕), Zhao H-X(赵惠贤), Li Y-C(李勇超), Wang Y-P(王银萍), Guo A-G(郭蔼光). Cloning and sequencing of LMW-GS gene at *Glu-B3* in wheat. *Acta Bot Boreali-Occid Sin* (西北植物学报), 2006, 26(9): 1864–1869 (in Chinese with English abstract)
- [9] D'Ovidio R. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J Cereal Sci*, 2004, 39: 321–339
- [10] Liu L(刘丽), He Z-H(何中虎), Yu Y-X(于亚雄), Yang J-H(杨金华), Cheng G(程耿), Hu Y-X(胡银星). Research progress in wheat glutenin. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 2004, 37(1): 8–14 (in Chinese with English abstract)
- [11] Feilet P, Autoran J. The low molecular glutenin proteins in the determination of cooking quality. *Cereal Chem*, 1989, 66: 26–30
- [12] Yang W-Q(杨文强). Low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) and their relationship with quality of wheat. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), 2003, 34(4): 482–485 (in Chinese with English abstract)
- [13] Lei D-F(雷东锋), Ma J-G(马建岗), Zhao W-M(赵文明). The progress of study on wheat seed storage proteins. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 2001, 21(3): 584–593 (in Chinese with English abstract)
- [14] D'Ovidio R, Masci S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J Cereal Sci*, 2004, 39: 321–339
- [15] D'Ovidio R, Tanzarella O A, Porceddu E. Nucleotide sequence of a low-molecular-weight glutenin from *Triticum durum*. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 781–784
- [16] Lee Y K, Bekes F, Ciaffi M. The low-molecular-weight glutenin subunit proteins of primitive wheats: IV. Functional properties of products from individual genes. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 149–155
- [17] Cloutier S, Rampitsch C, Penner G A, Lukow O M. Cloning and expression of a LMW-i glutenin gene. *J Cereal Sci*, 2001, 33: 143–154
- [18] Xu Z-F(徐兆飞), Zhang H-Y(张惠叶), Zhang D-Y(张定一). Wheat quality and its improvement. Beijing: China Meteorological Press, 2000. pp 47–51 (in Chinese)
- [19] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321–4325
- [20] An X, Zhang Q, Yan Y, Li Q, Zhang Y, Wang A, Pei Y, Tian J, Wang H, Hsam S L K, Zeller F J. Cloning and molecular characterization of three novel LMW-i glutenin subunit genes from cultivated einkorn (*Triticum monococcum* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 383–395
- [21] Bietz J A, Wall J S. Isolation and characterization of gliadinlike subunits from glutenins. *Cereal Chem*, 1973, 50: 537–547
- [22] Cassidy B G, Dvorak J, Anderson O D. The wheat low-molecular weight glutenin genes: Characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 743–750
- [23] Gupta R B, Shepherd K W. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutelin. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 65–74
- [24] Jackson E A, Holt L M, Payne P L. Characterization of high-molecular-weight gliadins low-molecular-weight glutenin subunit of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localization of their controlling gene. *Theor Appl Genet*, 1983, 66: 29–37
- [25] Lew E J L, Kuzmicky D D, Kasarda D D. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem*, 1992, 69: 508–515
- [26] Sissons M J, Bekes F, Skerritt J H. Isolation and functionality testing of low molecular weight glutenin subunits. *Cereal Chem*, 1998, 75: 30–36
- [27] Cloutier S, Rampitsch C, Penner G A, Lukow O M. Cloning and expression of a LMW-i glutenin gene. *J Cereal Sci*, 2001, 33: 143–154
- [28] Masci S, D'Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda D D. Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1147–1158
- [29] Tabiki T, Ikeguchi S, Ikeda T M. Effects of high-molecular-weight and low-molecular-weight glutenin subunit alleles on common wheat flour quality. *Breed Sci*, 2006, 56: 131–136
- [30] Ikeda T M, Nagamine T, Fukuoka H, Yano H. Characterization of new low-molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 680–687
- [31] Han B(韩彬), Shepherd K W. The correlations between low glutenin subunits and gliadins and their effects on bread-making quality in the progeny of two wheats. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1991, 24(4): 19–25 (in Chinese with English abstract)
- [32] Gianibelli M C, Larroque O R, Macritchie F, Wrigley C W. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem*, 2001, 78: 635–646
- [33] Kolster P, Krechting C F, Van Gelder W M J. Quantification of individual high molecular weight glutenin subunits using SDS-PAGE and scanning densitometry. *J Cereal Sci*, 1992, 15: 49–61
- [34] Zhang P-P(张平平), Zhang Y(张勇), Xia X-C(夏先春), He Z-H(何中虎). Protocol establishment of reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) for analyzing wheat gluten protein. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2007, 40(5): 1002–1009 (in Chinese with English abstract)
- [35] Benmoussa M, Vezina L P, Page M, Gelinas P, Yelle S, Laberge S. Potato flour viscosity improvement is associated with the expression of a wheat LMW-glutenin gene. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 87: 495–500
- [36] Wang X Y, Liu K F, Guo W Z. Cloning and expression of low molecular weight glutenin genes from the Chinese elite wheat cultivar “Xiaoyan 54”. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48: 212–218
- [37] Patacchini C, Masci S, D'Ovidio R, Lafiandra D. Heterologous expression and purification of native and mutated LMW-GS from durum wheat. *J Chromatogr B*, 2003, 786: 215–220
- [38] Tamás L, Shewry P R. Heterologous expression and protein engineering of wheat gluten proteins. *J Cereal Sci*, 2006, 43: 259–274