

胡 政,苏明杰,焦 滇. 部分小麦品种(系)遗传多样性分析及 Dx5 类似亚基鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):24-29.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.008

# 部分小麦品种(系)遗传多样性分析及 Dx5 类似亚基鉴定

胡 政,苏明杰,焦 滇

(郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室,河南郑州 450052)

**摘要:**使用 SDS-PAGE 方法结合分子标记技术,分析了 59 个有代表性的河南省小麦主栽品种(系)及部分稳定遗传的诱变后代材料的 HMW-GS 组成及其等位变异。参试材料中共有 12 种 HMW-GS 亚基类型,Glu-A1 位点上有 3 种,其中 1 亚基为主要类型(占 57.63%);Glu-B1 位点上有 4 种类型,以 7+9 为主要亚基类型(占 67.80%);Glu-D1 位点上有 5 种亚基组合,其中 2+12 为主要类型(占 52.54%)。59 份小麦材料的亚基组合类型共有 19 种,其中组合为 Null、2+12、7+9 的样品 11 份(占 18.64%),比例最高;在参试材料中,仅有 4 个材料检测出优质亚基组合类型(1、7+8、5+10);此外,从 SDS-PAGE 电泳图谱上发现有 16 个材料含有与 1Dx5 非常近似的亚基(以 1Dx5\*表示),使用引物 Dx\*对上述材料进行扩增,均可获得约 476 bp 的电泳条带,其序列信息与 HMW-D'x2 基因、HMW-D'x5 基因相同,与 1Dx5'基因编码区相同,与 1Dx5 基因 99% 相似。

**关键词:**小麦;高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS);十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE);STS 分子标记;Dx5 亚基

**中图分类号:** S512.103.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0024-05

近年来优质成为小麦育种的主攻目标之一<sup>[1]</sup>,在影响小麦加工品质的各因素中,高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)起着重要作用<sup>[2-3]</sup>。用于检测 HMW-GS 最简单有效的方法就是 SDS-PAGE 电泳,但对于部分电泳条带近似的亚基(如 1Bx7 和 1Bx7<sup>OE</sup>)仅靠电泳图谱很难区分。目前大量编码 HMW-GS 的基因已被克隆,与其相关的分子标记开发也有很多报道,而分子标记在育种中的应用研究也日趋成熟<sup>[4]</sup>,且有试验证实,HMW-GS 分子标记与其 SDS-PAGE 检测结果高度一致<sup>[5]</sup>。因此,将 SDS-PAGE 与分子标记技术结合应用到 HMW-GS 鉴定工作中,在保持便捷、快速优势的同时,必将大大提高鉴定的准确性。

小麦 Glu-D1 位点存在广泛的等位变异,早在 20 世纪 90 年代 D'ovidio 等就对硬粒小麦中 1Dx2.2+1Dy12、1Dx2.2\*+1Dy12、1Dx2+1Dy12\*、1Dx4+1Dy12 等稀有亚基组合进行了分子检测,并验证了其中 x 型亚基与 1Dx5 亚基基因的差异<sup>[6-7]</sup>。近期也不断有新的 Glu-D1 位点 x 型亚基被发现。随着与节节麦的杂交,1Dx5+1Dy12、1Dx2.1+1Dy10、1Dx2+1Dy12.2、1Dx2.1+1Dy12.2、1Dx1.5+1Dy10、1Dx2.1+1Dy10.5 以及 1Dx1.5+1Dy12 等亚基组合也不断被引入小麦<sup>[8]</sup>。

小麦是河南省重要的粮食作物,对小麦高分子量麦谷蛋白亚基的研究多数还停留在 20 个基础分型上,关于主要的栽培品种和常用的亲本材料是否含有特殊亚基组合鲜有报道。为了进一步了解河南省育种工作者常用种质资源的品质性状,本试验使用 SDS-PAGE 方法结合分子标记技术,分析了 59 个有代表性的河南省小麦主栽品种(系)及部分稳定遗传的诱变后代材料的 HMW-GS 组成及其 Glu-D1 位点亚基等位变异,从中发掘新的亚基,并为这些材料的进一步利用提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选用材料共 59 份,其中 33 份为河南省主栽品种及育种工作者经常使用的亲本材料(由郑州市农林科学研究所马香花研究员惠赠),26 份为笔者实验室保存的使用离子束诱变技术辐照小麦后筛选出的后代稳定的突变体材料(编号为郑大\*\*\*\*,“\*”表示数字),HMW-GS 对照材料(表 1)由中国科学院遗传研究所李义文研究员惠赠。

表 1 HMW-GS 对照材料亚基组成

品种(系)	亚基组成		
	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1
中国春 <sup>[9]</sup>	Null	7+8	2+12
Jagger <sup>[10]</sup>	1	17+18	5+10
小偃 54 <sup>[11]</sup>	1	14+15	2+12
新冬 3 号 <sup>[12]</sup>	Null	6+8	2+12
济麦 20 <sup>[13]</sup>	1	13+16	4+12
Gabo <sup>[14]</sup>	2*	17+18	2+12
Hartog <sup>[15]</sup>	1	17+18	5+10

收稿日期:2014-04-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:11375154);河南省基础与前沿技术研究计划(编号:122300410045)。

作者简介:胡 政(1988—),男,江西新余人,硕士研究生,主要从事麦类作物遗传育种研究。E-mail:gyzw@hotmail.com。

通信作者:焦滇,教授,主要从事麦类作物遗传育种研究。E-mail:gyzw@hotmail.com。

1.2 材料蛋白质样品提取

本研究方法根据曹俊梅等的方法<sup>[12]</sup>改进。

1.3 DNA 样品提取

使用 CTAB 法提取小麦幼苗中的 DNA<sup>[16-17]</sup>。

1.4 HMW - GS 电泳

采用不连续分离系统进行 SDS - PAGE 电泳。分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度 5%。1 × 甘氨酸电极缓冲液配方为 0.025 mol/L Tris, 0. 19 mol/L 甘氨酸, 0. 1% SDS。使用 DYCZ - 24DN 型垂直电泳槽(北京六一仪器厂), 恒压 120 V, 电泳 4 h。染色液:45% 甲醇, 10% 冰乙酸, 0. 15% 考马斯亮蓝 G250。染色 2 h, 用蒸馏水脱色。使用数码相机拍照, 并用 camera RAW 软件后期调节曝光度、对比度等。参照 Payne 等的亚基命名及编号的方法<sup>[18]</sup>对亚基进行记录。

1.5 分子标记检测

参考 Ma 等的方法<sup>[19]</sup>合成 1Ax2\* 和 1Dx5 的分子标记引物。引物序列为 Ax2\* (F:5' - ATGACTAAGCGTTGTTCTT - 3', R: 5' - ACCTTGCTCCCCTTGTCTTT - 3'), Dx5 (F: 5' - CGTCCCTATAAAAGCCTAGC - 3', R: 5' - AGTATGAAACCTGCTGCGGAC - 3')。

根据 NCBI 已知所有 Glu - D1 位点 x 型亚基的序列多态

性,设计引物 Dx\* (F:5' - CGTCCCTATAAAAGCCTAGC - 3', R:5' - AGTATGAAACCTGCTGCGGAG - 3')用以扩增 1Dx5\* 亚基的部分基因,回收特异性片段。

1.6 数据分析

HMW - GS 参照 Payne 等的方法<sup>[18,20]</sup>进行编号以及品质评分。

回收片段,送华大基因公司测序。通过 NCBI 网站对测序结果进行 BLAST 分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

2 结果与分析

2.1 供试小麦材料的 HMW - GS 等位变异

以对照材料(表 1)SDS - PAGE 电泳谱带为标准,对 59 份小麦材料的 HMW - GS 进行分析,结果(表 2)表明,59 份供试材料中共检测到 12 种 HMW - GS 类型。Glu - A1、Glu - B1、Glu - D1 位点上的等位变异分别为 3、4、5 种。Glu - A1 位点的 3 种等位变异中 1 亚基比例最大,达到 59. 32%。Glu - B1 位点上的 4 种等位变异中,7 + 9 亚基出现的频率最高,达到 67. 80%。Glu - D1 位点是 3 个位点中等位亚基组合变异最为丰富的,且 2 + 12 亚基出现频率最高,为 50. 85%。此外,有 2 份材料同时含有 1Dx2、1Dx5\* 亚基。

表 2 59 个小麦材料的 HMW - GS 组成

品种 (系)	亚基组成			品种 (系)	亚基组成		
	Glu - A1	Glu - B1	Glu - D1		Glu - A1	Glu - B1	Glu - D1
登海 54	null	7 + 9	2 + 12	郑麦 883	1	7 + 9	5* + 12
2001101x(96177x 郑农 16)	2*	7 + 9	2 + 12	兰考早矮八 C 系	1	7 + 9	2 + 12
矮抗 58	2*	7 + 9	2 + 12	兰考 15	1	7 + 9	2 + 12
周 18	1	7 + 9	2 + 12	郑大 0519	1	7 + 9	2 + 12
pm12/5190 改良	1	7 + 8	5 + 10	郑大 0545	1	7 + 9	2 + 10
豫农 416	1	7 + 8	5 + 10	郑大 0601	1	7 + 9	2 + 5* + 12
郑育麦 9987	1	7 + 9	2 + 10	郑大 0605	null	14 + 15	5* + 12
农大 1108	1	7 + 9	2 + 12	郑大 0616	null	7 + 9	2 + 12
郑麦 366	1	7 + 8	5 + 10	郑大 0620	null	7 + 9	2 + 12
中国农大 9D483s2199	1	7 + 9	5* + 12	郑大 0643	null	7 + 8	5* + 12
开麦 21	1	14 + 15	2 + 12	郑大 0650	1	7 + 9	2 + 12
03087 熟	null	7 + 8	2 + 12	郑大 0741	null	7 + 8	5* + 12
偃展 99(98)	1	6 + 8	5* + 12	郑大 0744	1	7 + 9	2 + 10
05(108)早 1 - 5	null	14 + 15	2 + 10	郑大 0747	null	7 + 9	5* + 12
温 6	1	7 + 9	5* + 12	郑大 0748	1	7 + 9	2 + 12
偃展 988 - 3 - 2	1	7 + 8	5* + 12	郑大 0749	1	7 + 9	5 + 10
中国农大 1836	2*	7 + 8	2 + 12	郑大 0751	1	7 + 9	2 + 12
L799	1	7 + 8	5* + 12	郑大 0753	null	7 + 9	2 + 12
陕 225 - 1	1	7 + 9	2 + 10	郑大 0754	null	7 + 8	2 + 12
中国农大 1806	1	7 + 8	2 + 12	郑大 0804	null	7 + 9	2 + 12
陕 225 - 2	1	14 + 15	2 + 12	郑大 0807	1	7 + 9	2 + 12
陕 225 - 3	1	14 + 15	2 + 12	郑大 0810	null	7 + 9	2 + 12
周黑麦 1 号	1	7 + 8	5 + 10	郑大 0817	1	7 + 9	5* + 12
周麦 28	1	7 + 9	5* + 12	郑大 0903	null	7 + 9	5 + 10
周麦 27	1	7 + 8	5* + 12	郑大 0908	null	7 + 9	2 + 12
10CA70	1	7 + 9	2 + 10	郑大 0912	null	7 + 9	5* + 12
CIMMYTRC6077	null	7 + 9	5 + 10	郑大 0918	null	7 + 9	2 + 12
1xA025	null	7 + 9	2 + 12	郑大 0942	1	7 + 9	2 + 5* + 12
新麦 18	null	7 + 9	2 + 12	郑大 0946c	1	7 + 9	2 + 12
郑州 831	null	7 + 9	2 + 12				

注:郑大 0601、郑大 0942 经 3 次重复提取种子蛋白质并进行 SDS - PAGE 电泳,glu - D1 位点均为 2 + 5\* + 12。

2.2 供试小麦材料 HMW - GS 的组合类型

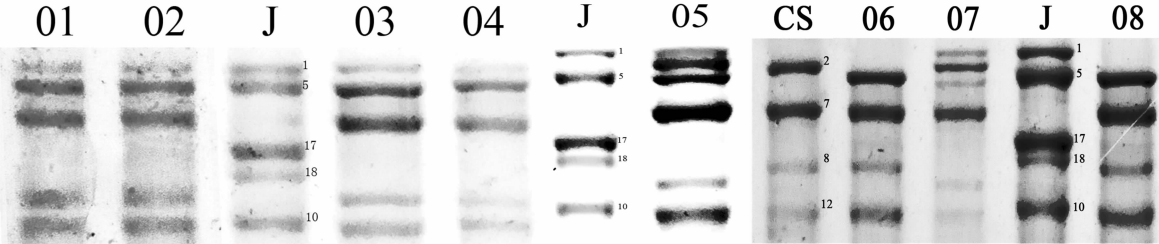
由表 3、表 4 可知,59 份小麦材料中,Glu - 1 位点共检测到 19 种亚基组合,类型较多。其中 null/7 + 9/2 + 12 组合的材料有 11 份,出现频率为 18.64%;其次是 1/7 + 9/2 + 12 组合,出现频率为 16.95%;其余亚基组合出现的频率都低于 10%。由于某些亚基的品质评分标准尚未确定,20 种亚基组合中只有 6 种得到评分结果,评分值介于 5 ~ 10 分之间。1/7 + 8/5 + 10 亚基组合的评分值最高,但其频率仅有 6.78%;相反,null/7 + 9/2 + 12 组合出现的频率最高,但其评分值仅为 5 分。

表 3 供试小麦材料的 HWM - GS 等位变异及其频率

位点	亚基组成	材料数(份)	频率(%)
Glu - A1	null	21	35.59
	1	35	59.32
	2 *	3	5.08
Glu - B1	7 + 9	40	67.80
	7 + 8	13	22.03
	6 + 8	1	1.69
	14 + 15	5	8.47
Glu - D1	2 + 10	6	10.17
	2 + 12	30	50.85
	5 + 10	7	11.86
	5 * + 12	14	23.73
	2 + 5 * + 12	2	3.39

2.3 使用分子标记鉴定 Dx5 近似亚基 Dx5 \*

通过 SDS - PAGE 电泳发现,有 16 个材料[郑大 0601、L799、郑大 0605、周麦 28、周麦 27、郑大 0741、郑大 0942、郑大 0643、郑大 0747、中国农大 9D483s2199、偃展 99(98)、温 6、郑麦 883、偃展 988 - 3 - 2、郑大 0912、郑大 0817] Glu - D1x 型 HMW - GS 的电泳速率都快于 1Dx5 亚基(部分材料的电泳图谱见图 1),而且与其连锁的 Glu - D1 位点 y 型 HMW - GS 也并非 1Dy10 亚基,而是 1Dy12 亚基。



CS—中国春; J—Jagger; 01—郑麦883; 02—偃展988-3-2; 03—L799; 04—郑大0749; 05—郑大0601; 06—郑大0643; 07—郑大0942; 08—郑大0741

图1 部分供试小麦地方品种(系)的 HMW - GS 电泳图谱

3 结论与讨论

许多研究证明,在育种早代选择中,根据 HMW - GS 与品质相关性的大小,选择与优质有关的亚基作为优良的标志和育种目标是可行的<sup>[24-28]</sup>。本试验结果表明,检测的 59 份小麦材料 HMW - GS 的变异和组合类型均比较丰富,在 Glu - A1、Glu - B1、Glu - D1 位点上共检测到 12 种亚基和 20 种亚基组成,其中有 35 个含有 1 亚基,3 个含 2 \* 亚基,13 个含 7 +

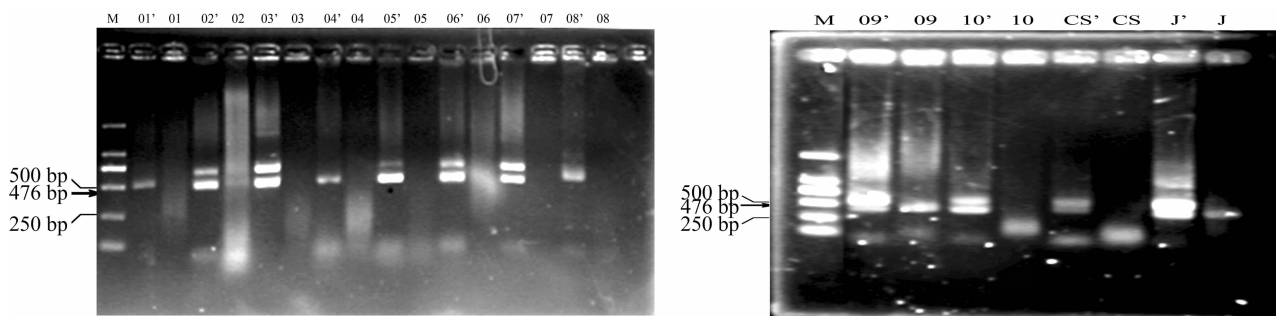
表 4 供试材料的 HMW - GS 组成及其品质得分

Glu - A1	Glu - B1	Glu - D1	材料数(份)	频率(%)	品质得分
1	7 + 9	2 + 10	5	8.47	—
1	14 + 15	2 + 12	3	5.08	—
1	7 + 8	2 + 12	1	1.69	8
1	7 + 9	2 + 12	10	16.95	7
1	7 + 8	5 + 10	4	6.78	10
1	7 + 9	5 + 10	1	1.69	9
1	6 + 8	5 * + 12	1	1.69	—
1	7 + 8	5 * + 12	3	5.08	—
1	7 + 9	5 * + 12	5	8.47	—
1	7 + 9	2 + 5 * + 12	2	3.39	—
2 *	7 + 9	2 + 12	2	3.39	—
2 *	7 + 8	2 + 12	1	1.69	—
null	14 + 15	2 + 10	1	1.69	—
null	7 + 8	2 + 12	2	3.39	—
null	7 + 9	2 + 12	11	18.64	5
null	7 + 9	5 + 10	2	3.39	7
null	14 + 15	5 * + 12	1	1.69	—
null	7 + 8	5 * + 12	2	3.39	—
null	7 + 9	5 * + 12	2	3.39	—

注:“—”表示某个亚基的品质评分标准尚未确定。

使用 Dx5 分子标记引物对上述 16 份材料进行 PCR 扩增,电泳检测均表现为阴性(部分材料分子标记扩增图谱见图 2)。根据 NCBI 已有 Glu - D1 位点 x 型亚基的序列多态性,设计引物 Dx \* 再次对以上材料进行 PCR 扩增,均可获得约 476 bp 的电泳条带。对 PCR 扩增产物回收测序并进行 BLAST 分析发现(图 3),其序列信息与 *Aegilops tauschii* HMW - D'x2 等位基因<sup>[21]</sup>、*Triticum aestivum* 株系 SQ - 884、SQ - 188、SQ - 783、SQ - 180、SQ - 659 高分子量麦谷蛋白亚基 D'x5 等位基因<sup>[22]</sup>相似程度为 100%,与小麦 1Dx5 亚基对应基因相似程度为 99%,与 1Dx5' 编码区<sup>[23]</sup>相似度 100%。

8 亚基,5 个含 14 + 15 亚基,7 个含 5 + 10 亚基,这些材料可供优质小麦育种利用。与前人研究结果相比,参试的 59 份材料在 Glu - A1 位点编码的与优质有关的 1Ax1 和 1Ax2 \* 亚基的比率(64.41%)高于国内育成品种(10.78% ~ 42.6%)平均水平,Glu - B1 位点上的 7 + 8 优质亚基(22.03%)在国内育成品种(36.1% ~ 65.96%)中属于较低水平,在 Glu - D1 位点上 5 + 10 亚基比例(11.86%)在国内育成品种(9.30% ~ 36.36%)中属于较低水平,表明河南省小麦育种比较重视品



M—DL2000; CK1—水; CK2—水使用 Dx\* 分子标记扩增; PCR 扩增模板 01/01'—郑大 0601, 02/02'—偃展 988-3-2, 03/03'—郑大 0912, 04/04'—郑大 0817, 05/05'—周麦 28, 06/06'—周麦 27, 07/07'—郑大 0741, 08/08'—郑大 0942, 09/09'—郑大 0749, 10/10'—郑麦 883, CS/CS'—中国春, J/J'—Jagger; 其中 01、02、03、04、05、06、07、08、09、10、CS、J 使用 Dx5 引物扩增, 特异性片段约 476 bp; 01'、02'、03'、04'、05'、06'、07'、08'、09'、10'、CS'、J' 使用 Dx\* 引物扩增, 特异性片段约 476 bp

图2 部分供试小麦地方品种(系)的 Dx5 分子标记与 Dx\* 电泳图谱

DX*	TCGTCCTTATAAAAGCCTAGCCAACCTTCACAATCTTATCATCACCACAACACCGAGCACCACAACTAGAGATCAATT	80
1DX5	TCGTCCTTATAAAAGCCTAGCCAACCTTCACAATCTTATCATCACCACAACACCGAGCACCACAACTAGAGATCAATT	3 880
1DX5'	.....	0
DTX2	TCGTCCTTATAAAAGCCTAGCCAACCTTCACAATCTTATCATCACCACAACACCGAGCACCACAACTAGAGATCAATT	61 137
DTX5	TCGTCCTTATAAAAGCCTAGCCAACCTTCACAATCTTATCATCACCACAACACCGAGCACCACAACTAGAGATCAATT	279
DX*	CACTGATAGTCCACCGAGATGGCTAAGCGGTTAGTCTCTTTGTGGCGGTAGTCGTCGCCCTCGTGCTCTCACCCTCGC	160
1DX5	CACTGATAGTCCACCGAGATGGCTAAGCGGTTAGTCTCTTTGTGGCGGTAGTCGTCGCCCTCGTGCTCTCACCCTCGC	3 960
1DX5'	.....ATGGCTAAGCGGTTAGTCTCTTTGTGGCGGTAGTCGTCGCCCTCGTGCTCTCACCCTCGC	62
DTX2	CACTGATAGTCCACCGAGATGGCTAAGCGGTTAGTCTCTTTGTGGCGGTAGTCGTCGCCCTCGTGCTCTCACCCTCGC	61 217
DTX5	CACTGATAGTCCACCGAGATGGCTAAGCGGTTAGTCTCTTTGTGGCGGTAGTCGTCGCCCTCGTGCTCTCACCCTCGC	359
DX*	TGAAGGTGAGGCCTCTGAGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGCTCCAGGAGCGCGAGCTCAAGGCATGCCAGC	240
1DX5	TGAAGGTGAGGCCTCTGAGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGCTCCAGGAGCGCGAGCTCAAGGCATGCCAGC	4 040
1DX5'	TGAAGGTGAGGCCTCTGAGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGCTCCAGGAGCGCGAGCTCAAGGCATGCCAGC	142
DTX2	TGAAGGTGAGGCCTCTGAGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGCTCCAGGAGCGCGAGCTCAAGGCATGCCAGC	61 297
DTX5	TGAAGGTGAGGCCTCTGAGCAACTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGCTCCAGGAGCGCGAGCTCAAGGCATGCCAGC	439
DX*	AGGTCATGGACCAACAGCTCCGAGACATTAGCCCCGAGTGCCACCCCGTCGTCGTCAGCCCGGTCCGCGGACAAATACGAG	320
1DX5	AGGTCATGGACCAACAGCTCCGAGACATTAGCCCCGAGTGCCACCCCGTCGTCGTCAGCCCGGTCCGCGGACAAATACGAG	4 120
1DX5'	AGGTCATGGACCAACAGCTCCGAGACATTAGCCCCGAGTGCCACCCCGTCGTCGTCAGCCCGGTCCGCGGACAAATACGAG	222
DTX2	AGGTCATGGACCAACAGCTCCGAGACATTAGCCCCGAGTGCCACCCCGTCGTCGTCAGCCCGGTCCGCGGACAAATACGAG	61 377
DTX5	AGGTCATGGACCAACAGCTCCGAGACATTAGCCCCGAGTGCCACCCCGTCGTCGTCAGCCCGGTCCGCGGACAAATACGAG	519
DX*	CAGCAAATCGTGGTGCCGCCCAAGGGCGGATCTTTCTACCCCGGCGAGACCACGCCACCGCAGCAACTCCAACAACGTAT	400
1DX5	CAGCAAATCGTGGTGCCGCCCAAGGGCGGATCTTTCTACCCCGGCGAGACCACGCCACCGCAGCAACTCCAACAACGTAT	4 200
1DX5'	CAGCAAATCGTGGTGCCGCCCAAGGGCGGATCTTTCTACCCCGGCGAGACCACGCCACCGCAGCAACTCCAACAACGTAT	302
DTX2	CAGCAAATCGTGGTGCCGCCCAAGGGCGGATCTTTCTACCCCGGCGAGACCACGCCACCGCAGCAACTCCAACAACGTAT	61 457
DTX5	CAGCAAATCGTGGTGCCGCCCAAGGGCGGATCTTTCTACCCCGGCGAGACCACGCCACCGCAGCAACTCCAACAACGTAT	599
DX*	ATTTTGGGGAATACCTGCACTACTAAAAAGGTATTACCCAAGTGTAACTTCTCCGCAG	458
1DX5	ATTTTGGGGAATACCTGCACTACTAAAAAGGTATTACCCAAGTGTAACTTCTCCGCAG	4 258
1DX5'	ATTTTGGGGAATACCTGCACTACTAAAAAGGTATTACCCAAGTGTAACTTCTCCGCAG	360
DTX2	ATTTTGGGGAATACCTGCACTACTAAAAAGGTATTACCCAAGTGTAACTTCTCCGCAG	61 515
DTX5	ATTTTGGGGAATACCTGCACTACTAAAAAGGTATTACCCAAGTGTAACTTCTCCGCAG	657

Dx\*—Dx\*引物扩增产物; 1DX5—小麦高分子量麦谷蛋白亚基1DX5 基因 (GB: X12928.5); 1DX5'—小麦高分子量麦谷蛋白亚基1DX5'基因编码区 (GB: HM050419.1); Dtx2—*Aegilops tauschii* HMW-Dx2 基因 (GB: AF497474.1); Dtx5—*Triticum aestivum* 株系SQ-884高分子量麦谷蛋白亚基 Dx5 部分基因 (GB: AY513776.1)

图3 Dx\* 引物扩增产物 DNA 序列比对

质的改良,拥有一批性状优良、品质较优的资源<sup>[12,29-33]</sup>。但在这些资源中,优质亚基组合类型较少,“1Ax1、Bx7 + By8、

1Dx5 + 1Dy10”评分最高的组合所占比率仅为 6.78%,因此在河南省小麦品质育种中,应注重利用含有不同位点优质亚基

的亲本材料配制杂交组合,使不同的优质亚基能充分聚合到同一材料中,从而选育出优质亚基聚合体,改良小麦的亚基组成,提高小麦品质。

SDS - PAGE 电泳技术是分析鉴定小麦 HMW - GS 最简单快速的方法。但是如果得到的电泳谱带与对照样品有细小差异,难以判定时,使用分子标记技术辅助鉴定最为有效、快捷。本研究利用这一方法成功区分 1Dx5\* 亚基,经比对发现其序列信息与小麦近似种的 HMW - D'x2 等位基因一致,这在以往对河南省小麦材料的研究中未见报道。以往认为小麦 HMW - GS 高度保守,然而近期 Glu - D1d 位点不断有新的等位基因被发现<sup>[8,21-23]</sup>。最近有报道推测,10 000 年前,小麦 Glu - D1d 位点起源自不同的供体,因此小麦 Glu - D1d 位点还是存在着不同的等位基因变异<sup>[34]</sup>。本研究分析的河南省目前广泛使用的部分小麦材料中大量存在着与 1Dx5 亚基 SDS - PAGE 电泳谱带相似,过去被认为是 1Dx5 亚基(如温 6)的储藏蛋白,这类亚基的品质特性尚未得到鉴定。对它的鉴定与品质研究或许可以为今后的小麦品质育种工作作出一定贡献。

在对 NCBI 已登记的所有 Glu - D1 位点 x 型亚基 DNA 序列进行比对后,发现编码区第 353 位仅存在 G(同 1Dx5 亚基)、C(同 1Dx2 亚基)2 种变异。使用中国春全基因组为模板,Dx\* 引物也可通过错配扩增得到约 476 bp 条带;而使用纯水作为对照,Dx\* 引物无法得到扩增产物。因此,在使用分子标辅助鉴定小麦 1Dx5 亚基时,本研究使用的 Dx\* 引物可以作为 Dx5 分子标记的对照使用,在 Dx5 分子标记扩增条带为 null 时,使用 Dx\* 引物对其进行扩增,如果可以得到约 476 bp 条带,则可断定样品 Dx5 分子标记扩增为阴性。通过这个方法可以排除 Dx5 分子标记 PCR 检测中可能出现的假阴性,从而提高分子标记辅助鉴定 1Dx5 亚基的准确性。

#### 参考文献:

- [1] 何中虎,夏先春,陈新民,等. 中国小麦育种进展与展望[J]. 作物学报,2011,37(2):202-215.
- [2] Shewry P R, Napier J A, Tatham A S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis[J]. The Plant Cell, 1995, 7(7): 945-956.
- [3] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S, et al. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties[J]. Adv Food Nutr Res, 2003, 45: 219-302.
- [4] 郑寒,陈静,任妍,等. 小麦优质谷蛋白亚基分子标记多重 PCR 体系的建立与应用[J]. 作物学报,2009,35(10):1831-1835.
- [5] 金慧. 高低分子量麦谷蛋白亚基的分子标记检测及其对小麦加工品质的影响[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
- [6] D'ovidio R, Porceddu E, Lafiandra D. PCR analysis of genes encoding allelic variants of high - molecular - weight glutenin subunits at the Glu - D1 locus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88(2): 175-180.
- [7] Marchylo B, Handel K, Mellish V. Fast horizontal sodium dodecyl sulfate gradient polyacrylamide gel electrophoresis for rapid wheat cultivar identification and analysis of high molecular weight glutenin subunits[J]. Cereal Chemistry, 1989, 66(3): 186-192.
- [8] Rasheed A, Mahmood T, Kazi A G, et al. Allelic variation and composition of HMW - GS in advanced lines derived from D - genome synthetic hexaploid/bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2012, 15(1): 1-7.
- [9] Payne P, Law C, Mudd E. Control by homoeologous group 1 chromosomes of the high - molecular - weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1980, 58(3/4): 113-120.
- [10] 李小军,李秀全,杨欣明,等. 美国小麦品种高分子量麦谷蛋白亚基组成分析[J]. 麦类作物学报,2005,25(6):51-54.
- [11] 赵继新,武军,陈宏新,等. 小偃系列小麦品种的 HMW - GS 和醇溶蛋白分析[J]. 中国农学通报,2008,24(1):176-180.
- [12] 吴新元,芦静,李冬,等. 新疆不同类型冬小麦品种品质性状的生态变异[J]. 新疆农业科学,2010,47(2):274-280.
- [13] 张瑞奇,胡琳,许为钢,等. 黄淮冬麦区不同时期大面积推广品种的高分子量麦谷蛋白亚基组成分析[J]. 麦类作物学报,2006,26(2):63-67.
- [14] Lawrence G. The high - molecular - weight glutenin subunit composition of Australian wheat cultivars[J]. Crop and Pasture Science, 1986, 37(2): 125-133.
- [15] Uthayakumaran S, Gras P, Stoddard F, et al. Effect of varying protein content and glutenin - to - gliadin ratio on the functional properties of wheat dough[J]. Cereal Chemistry, 1999, 76(3): 389-394.
- [16] Tel - Zur N, Abbo S, Myslabodski D, et al. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17(3): 249-254.
- [17] 张晓祥,王玲,寿路路. 一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法[J]. 中国农学通报,2012,28(36):46-49.
- [18] Payne P, Holt L, Law C. Structural and genetical studies on the high - molecular - weight subunits of wheat glutenin[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1981, 60(4): 229-236.
- [19] Ma W, Zhang W, Gale K R. Multiplex - PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat[J]. Euphytica, 2003, 134(1): 51-60.
- [20] 赵和,卢少源,李宗智. 小麦高分子量麦谷蛋白亚基遗传变异及其与品质和其它农艺性状关系的研究[J]. 作物学报,1994, 22(1):67-75.
- [21] Anderson O, Rausch C, Moullet O, et al. The wheat D - genome HMW - glutenin locus: BAC sequencing, gene distribution, and retrotransposon clusters[J]. Functional & Integrative Genomics, 2003, 3(1/2): 56-68.
- [22] Lu C, Yang W, Lu B. Differentiation of the high molecular weight glutenin subunit Dtx2.1 of *Aegilops tauschii* indicated by partial sequences of its encoding gene and SSR markers[J]. Euphytica, 2005, 141(1/2): 75-83.
- [23] Feng B, An X, Xu Z, et al. Molecular cloning of a novel chimeric HMW glutenin subunit gene 1Dx5' from a common wheat line W958 [J]. Molecular Breeding, 2011, 28(2): 163-170.
- [24] 马小乐,柴守玺,方永丰,等. 不同蛋白亚基类型的小麦品种品质性状评价[J]. 甘肃农业大学学报,2010,45(4):55-58,62.
- [25] 赵京岚,李斯深,范玉顶,等. 小麦品种蛋白质性状与中国干面条品质关系的研究[J]. 西北植物学报,2005,25(1):144-149.
- [26] 范玉顶,李斯深,孙海艳,等. HMW - GS 与北方手工馒头加工品质关系的研究[J]. 作物学报,2005,31(1):97-101.
- [27] Brönneke V, Zimmermann G, Killermann B. Effect of high molecular weight glutenins and D - zone gliadins on bread - making quality in German wheat varieties[J]. Cereal Research Communications, 2000,

王 杰,肖 政,范 里,等. 培养基组分及操作参数对抗体多聚体形成的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):29-32.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.009

# 培养基组分及操作参数对抗体多聚体形成的影响

王 杰<sup>1</sup>,肖 政<sup>1</sup>,范 里<sup>1</sup>,邓献存<sup>2</sup>,刘旭平<sup>1</sup>,谭文松<sup>1</sup>

(1. 华东理工大学生物反应器国家重点实验室,上海 200237; 2. 浙江海正药业股份有限公司,浙江台州 318000)

**摘要:**近年来,国家食品药品监督管理局基于药物安全性的考虑对于治疗性蛋白的质量提出了更高的要求,而蛋白多聚体能引起人体免疫反应,被认为是关键质量属性(critical quality attributes,CQA)。采用培养基组分添加试验和操作参数控制试验的方法,系统研究了培养基中氧化还原物质和培养过程参数(温度和 pH 值)对抗体多聚体形成的影响。结果表明,半胱氨酸的添加能显著抑制多聚体的形成,培养基中半胱氨酸添加浓度增至 30 mmol/L,多聚体含量下降 40%。而铜离子的添加浓度从 500  $\mu\text{mol/L}$  降至 0  $\mu\text{mol/L}$ ,多聚体含量则降低了 43%。培养温度从 35  $^{\circ}\text{C}$  降低至 32  $^{\circ}\text{C}$ ,重链结合蛋白(BiP)和蛋白二硫键异构酶(PDI)的表达水平平均提高了 89%,细胞翻译后修饰能力显著加强,分泌至上清液中的抗体多聚体含量相应下降了 38%。研究结果明确了生产工艺和产品关键属性之间的关系,为后续设计优化以质量为先导的培养过程,生产质量可控、安全、有效抗体药物奠定了基础。

**关键词:**单克隆抗体;多聚体;氧化还原;操作参数;培养基组分

**中图分类号:**Q943.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)02-0029-04

21 世纪以来,食品药品监督管理局对治疗性蛋白药物安全性和功效性要求不断提高,质量监测和控制成为动物细胞大规模培养过程中的研究热点,美国药物与食品监管局和欧洲药物局于 2004 年提出了在所有的药物开发生产中补充质量设计(quality by design,QbD)理念<sup>[1]</sup>。

多聚体含量是蛋白药物关键质量属性(CQA)之一,越来越受到人们的关注。生产过程中形成的蛋白多聚体会影响最终产品安全性和功效性。Rosenberg 指出蛋白多聚体是免疫反应的强力诱导者,仅 10% 的多聚体含量就会引发人的免疫反应,甚至导致人的死亡,因此要严格控制生产过程中多聚体的形成<sup>[2]</sup>。

蛋白多聚体是通过共价键(例如二硫键),或者非共价键(静电作用和疏水作用)的连接形成的<sup>[3]</sup>。抗体二硫键连接

发生在内质网中,内质网的氧化还原电势将直接影响到抗体二硫键的连接。培养过程中的控制参数(pH 值和温度)已被广泛证明会影响细胞生理状态,影响抗体表达,折叠和翻译后修饰,Yoon 等报道,降低培养温度至 33.5  $^{\circ}\text{C}$ ,使 EPO 的比生成速率提高了 4 倍,使 EPO 的产量提高了 2.4 倍<sup>[4]</sup>。Muthing 等报道 pH 值影响了杂交瘤细胞表达的单克隆抗体的半乳糖和唾液酸的含量<sup>[5]</sup>。抗体分泌到胞外后已正确连接的二硫键又会被氧化还原物质还原和重构,形成蛋白多聚体<sup>[6]</sup>。而为防止因活性氧(reactive oxygen species,ROS)引起的细胞凋亡,培养基中一般均会添加谷胱甘肽、N-乙酰半胱氨酸等还原物质,这可能会加速蛋白多聚体的形成。基于 QbD 理念基础,亟须研究培养过程参数及培养基组成对蛋白多聚体形成的影响,深入理解多聚体和生产工艺之间的联系,建立多聚体与过程参数的关系,从而减少最终产品多聚体含量,保证实现质量设计。

我们采用培养基组分添加试验和操作参数控制试验的方法,系统研究了培养基中氧化还原物质和培养过程参数(温度和 pH 值)对抗体多聚体形成的影响。研究结果为后续在质量设计(QbD)指导下进行工艺开发提供了数据支持,为建立质量可控的培养工艺奠定了基础。

收稿日期:2014-11-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:21106045)。

作者简介:王 杰(1987—),女,河北保定人,硕士研究生,研究方向为动物细胞与组织工程。E-mail:ecust12wj@126.com。

通信作者:谭文松,教授,研究方向为动物细胞与组织工程。E-mail:wstan@ecust.edu.cn。

28(1/2):187-194.

[28] Meng X, Cai S. Association between glutenin alleles and Lanzhou alkaline stretched noodle quality of northwest China spring wheats. II. Relationship with the variations at the Glu-1 loci [J]. Cereal Research Communications, 2008, 36 (1): 107-115.

[29] 马冬云,朱云集,郭天财,等. 河南省 21 个小麦品种(系)高分子量麦谷蛋白亚基的电泳分析[J]. 华北农学报,2002,17(3): 29-32.

[30] 郑 威. 长江流域小麦地方品种农艺品质性状的遗传多样性 [D]. 武汉:华中农业大学,2013.

[31] 李学军,王 辉,于新智,等. 陕西关中不同时期小麦品种高分

子量麦谷蛋白亚基变异分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(4):41-44.

[32] 李 博,张荣琦,王亚娟,等. 黄淮麦区部分小麦地方品种高分子量麦谷蛋白亚基组成分析[J]. 麦类作物学报,2007,27(3): 483-487.

[33] 刘香利,郭蔼光,赵惠贤. 陕西省部分小麦栽培品种高分子量麦谷蛋白亚基组成及其与品质关系[J]. 分子植物育种,2007,5(6):827-832.

[34] Dong Z, Yang Y, Li Y, et al. Haplotype variation of Glu-D1 locus and the origin of Glu-D1d allele conferring superior end-use qualities in common wheat[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74859.