

小麦糖原合成酶激酶基因 (*TaGSK1*) 的染色体定位

李亚青^{1,2}, 毛新国³, 赵宝存¹, 葛荣朝¹, 沈银柱¹, 黄占景¹

(1. 河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050016; 2. 石家庄市农科院, 河北 石家庄 050041;

3. 中国农业科学院作物科学研究所农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程,

农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: 以中国春缺体-四体系为材料, 提取各材料的基因组 DNA, 分别经限制性内切酶 *EcoRI* 和 *KpnI* 完全酶切、电泳、转膜后, 用 α -³²P-dCTP 标记的与小麦耐盐相关的糖原合成酶激酶基因 *TaGSK1* 为探针进行杂交, 结合生物信息学的方法, 将该基因定位于普通小麦第一同源群染色体的短臂上, 为进一步研究小麦耐盐性的遗传及机理奠定了基础。

关键词: 染色体定位; *TaGSK1* 基因

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)05-0039-03

The Chromosomal Location of *Triticum aestivum* Glycogen Synthase Kinase Gene (*TaGSK1*)

LI Ya-qing^{1,2}, MAO Xin-guo³, ZHAO Bao-cun¹, GE Rong-chao¹,
SHEN Yin-zhu¹, HUANG Zhan-jing¹

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China; 2. Shijiazhuang Institute of Agricultural Sciences, Shijiazhuang 050041, China; 3. National Key Facility for crop Gene Resources and Genetic Improvement, Key Laboratory of Crop Germplasm and Biotechnology, the Ministry of Agriculture, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In this paper, Chinese Spring null tetrasomic lines was studied as material. Their genomic DNA were extracted and were digested completely by *EcoRI* and *KpnI*. After electrophoresis and transmembrane, digested genomic DNA hybridized with the probe of the gene of glycogen synthase kinase 1 in *Triticum aestivum* (*TaGSK1*), involved in salt tolerance and marked with α -³²P dCTP. Associated with Bio information, *TaGSK1* was located in the short arm of 1st chromosom group, ie. 1AS, 1BS and 1DS. This paper established the base of heredity and mechanism in wheat salt tolerance.

Key words: Chromosomal location; *TaGSK1* gene

全世界有 20% 的耕地、50% 的灌溉土地受到盐胁迫的危害。在我国, 盐渍土地约有 1 亿多公顷, 主要分布在以小麦为主要栽培作物的干旱和半干旱地区。近年来, 由于不合理灌溉和耕作, 又有大量耕地出现次生盐渍化现象, 导致我国耕地地力逐年下降, 严重威胁着我国粮食安全^[1]。定位、克隆耐盐相关基因, 培育耐盐小麦品种, 对深入开展小麦耐盐机理研究, 提高我国盐渍土地的生产能力, 保障粮食安

全, 具有重要意义。

河北师范大学分子细胞生物学实验室长期从事小麦耐盐相关基因的研究, 通过小麦花药培养和 EMS 诱变, 从小麦“一粒传”后代中获得一系列耐盐性状有明显差异的品系, 利用 cDNA AFLP 技术自小麦耐盐突变体 RH8706-49 分离、克隆了小麦糖原合成酶激酶 (*Triticum aestivum* Glycogen Synthase Kinase) 基因 *TaGSK1*^[2,3], 并作为小麦中新发现的基因在

收稿日期: 2006-05-16

基金项目: 国家自然科学基金(30070471); 国家转基因专项(JY04-A-01); 河北省自然科学基金(301103)

作者简介: 李亚青(1973-), 女, 河北石家庄人, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究工作; 黄占景为通讯作者。

GeneBank 登录(AF525086),经原核表达鉴定能明显提高受体菌 *E. coli* 的耐盐性^[4],又经构建双元表达载体 pBIN-Ta-GFP,转化农杆菌 GV3101 后侵染 Columbia 型拟南芥,将 TaGSK 定位于细胞质内,并发现 TaGSK1 在根尖细胞及与侧根发生有关的中柱鞘细胞分布较多,表明 TaGSK1 能促进细胞分裂,在对转基因拟南芥进行耐盐性鉴定时,发现 TaGSK1 能明显提高转基因植株的抗渗透、抗胁迫能力^[5]。但目前尚未见有该基因染色体定位的研究。本试验用 Southern 杂交和生物信息学的方法对其进行了染色体定位。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用的中国春缺体四体系材料,由中国农业科学院作物科学研究所贾继增研究员馈赠。

1.2 Southern 杂交

Southern 杂交所用探针为 TaGSK1 基因的 cDNA 序列,该序列是通过 PCR 的方法从分子细胞生物学实验室的克隆载体 pD T23 扩增得到的。小麦基因组 DNA 提取参考贾继增方法^[6,7]。小麦基因组 DNA 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 进行完全酶切,经琼脂糖凝胶电泳(0.8%)和脱嘌呤处理后,用毛细管法将 DNA 转移到 Hybond N⁺ 尼龙膜上。在预杂交的同时,用 α -³²P-dCTP 标记探针,经过杂交、洗膜、曝光等一系列处理后,最后用磷屏仪检测 Southern 杂交结果^[8]。

1.3 生物信息学分析

将 TaGSK1 基因的核苷酸序列提交到小麦 EST 协作网(<http://wheat.pw.usda.gov/>)进行比对,验证 Southern 分析结果。

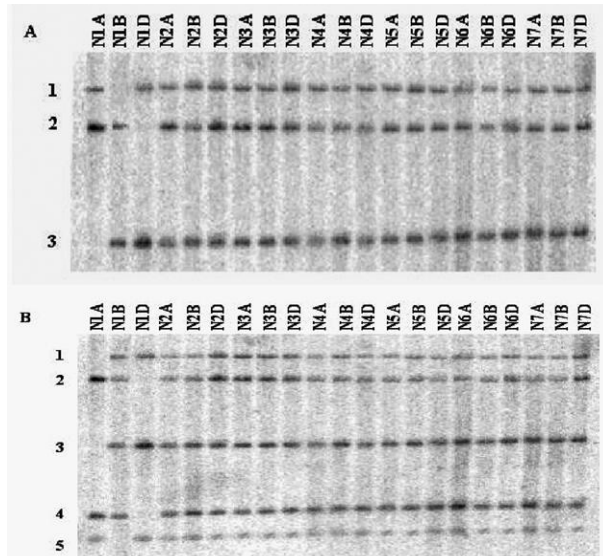
2 结果与分析

2.1 Southern 杂交结果

TaGSK1 基因序列分析表明,该基因内部没有限制性内切酶 *EcoR* I 的酶切位点,但有一个限制性内切酶 *Kpn* I 酶切位点。由此推测,六倍体小麦基因组 DNA 经 *EcoR* I 酶切后,其杂交带能够真实反映 TaGSK1 基因的拷贝数,而对于 *Kpn* I,由于基因 TaGSK1 含有 *Kpn* I 酶切位点,所以其杂交信号带可能超过 TaGSK1 基因的实际拷贝数。

在图 1 中 N1A, N1B, N1D, N2A, N2B, N2D, N3A, N3B, N3D, N4A, N4B, N4D, N5A, N5B, N5D, N6A,

N6B, N6D, N7A, N7B 和 N7D 为小麦缺体四体的 21 个系, N 表示缺少某一对染色体。Southern 杂交结果表明,小麦基因组 DNA 经 *EcoR* I 酶切后的杂交信号带有 3 条(图 1 A),其中在 N1A 泳道,缺失第 3 条杂交带;在 N1B 泳道,缺失第 1 条杂交带;在 N1D 泳道,缺失第 2 条杂交带。由此初步断定, TaGSK1 的 3 个拷贝分别位于 1A, 1B 和 1D 染色体上。小麦基因组 DNA 经 *Kpn* I 酶切后,有 5 条杂交带(图 1—B),其中在 N1A 泳道,缺失第 1, 3 杂交带(说明 A 基因组上 TaGSK1 的一个拷贝被切割成两部分);在 N1B 泳道缺失第 5 杂交带;在 N1D 泳道,缺失第 2, 4 杂交带(A, D 基因组上 TaGSK1 的两个拷贝分别被切割成两部分,而 B 基因组上的一个拷贝没有被切割)。这说明 TaGSK1 在 B 基因组的拷贝中,可能由于变异或其他原因导致 *Kpn* I 酶切位点消失,而在 A, D 基因组的拷贝中, *Kpn* I 酶切位点正常。根据图 1-B 的杂交结果也可以将 TaGSK1 基因定位于小麦 1A, 1B 和 1D 染色体上。比较图 1 A 和 1 B 的杂交结果,不难发现,采用不同酶切得到的结果完全吻合。



A. 中国春小麦缺体四体 DNA 经 *EcoR* I 的酶切 Southern 分析结果;

B. 中国春小麦缺体四体 DNA 经 *Kpn* I 的酶切 Southern 分析结果

A. Southern blot result of TaGSK1 gene with wheat nulli-tetrasomic

DNA digested with *EcoR* I ; B. Southern blot result of TaGSK1

gene with wheat nulli-tetrasomic DNA digested with *Kpn* I

图 1 小麦糖原合成酶激酶(TaGSK1)缺体四体定位分析

Fig 1 Southern blot hybridization of nulli-tetrasomic lines of wheat using TaGSK1 as probe

2.2 生物信息学分析结果

将 TaGSK1 基因 cDNA 序列提交到小麦组 EST 序列协助网(<http://wheat.pw.usda.gov/>)进行序列

比对, 结果发现 *TaGSK1* 与小麦组的一个 EST 序列 (Accession No. BF291549) 具有很高的相似性 (Score] 442, E Value] e 124, Identities = 250/259)。说明 *TaGSK1* 基因的核苷酸序列包含了该 EST 序列, 而该 EST (BF291549) 已经被定位到小麦的 1A、1B 和 1D 上。由此, 可以进一步说明, *TaGSK1* 基因位于 1A、1B 和 1D 染色体的短臂上。

3 讨论

在 *TaGSK1* 基因的碱基序列中, 没有限制性内切酶 *EcoR* I 的酶切位点, 经 *EcoR* I 酶切杂交后, 在中国春 N1A、N1B 和 N1D 材料中分别缺少一条杂交带, 说明糖原合成酶激酶基因 *TaGSK1* 在小麦的基因组中有 3 个拷贝, 即 1A、1B 和 1D 染色体上各有一个拷贝。限制性内切酶 *Kpn* I 在 *TaGSK1* 基因的 cDNA 序列中有一个酶切位点, 位于 870 bp 附近, 根据图 1 A 的结果, 图 1 B 应该有 6 条带, 但图 1-B 中只出现了 5 条带, 其中一个很可能的原因是 *TaGSK1* 在 B 基因组中的拷贝发生了变异, 因为相对于 A、D 基因组而言, B 基因组的变异更丰富一些^[9]。另外也不排除其他可能导致出现单一杂交信号带的原因, 如因酶切片段较短, 电泳时跑出凝胶, 因此未能出现杂交信号。

小麦组 EST 协作网 (<http://wheat.pw.usda.gov>) 是国际 EST 协作组织 (International tritaceae EST cooperation, ITEC) 创建的^[10], 目前该组织利用小麦缺失系对近 16 000 条小麦 EST 进行了定位^[11], 是利用生物信息学方法进行基因定位的有效辅助工具。本研究利用生物信息学方法对我们使用缺体四体定位的结果进行了验证, 并将 *TaGSK1* 基因进一步定位在 1A、1B 和 1D 染色体的短臂上, 说明采用 Southern 杂交和生物信息学相结合的方法, 对基因进行染色体定位的方法是可行的。

致谢: 本试验的完成得到中国农业科学院作物科学研究所贾继增研究员的热情指导, 特此表示感谢!

参考文献:

- [1] 王宝山, 朱可夫, 邹 齐. 作物耐盐机理研究进展及提高作物抗盐性的对策[J]. 植物学通报, 1997, 14(增刊), 25—30.
- [2] 陈桂平, 黄占景, 马闻师, 等. 盐胁迫下小麦耐盐突变体后代差异 cDNA 的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 2003, 36(9): 996—999.
- [3] Chen G P, Ma W S, Huang Z J, *et al.* Isolation and characterization of *TaGSK1* involved in wheat salt tolerance[J]. Plant Science, 2003, 165: 1369—1375.
- [4] 徐 涛, 马闻师, 沈银柱, 等. 小麦糖原合成酶激酶 (*TaGSK1*) 表达载体的构建及原核表达[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1593—1597.
- [5] 吴立柱. 小麦糖原合成酶激酶(*TaGSK1*)的亚细胞定位及其功能鉴定[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2004: 6.
- [6] Jia J Z, Miller T E, Reader S M. RFLP Tagging of a Gene *Pm12* for Powdery Mildew Resistance in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Science in China(中国科学)(Series B), 1994, 37(5): 531—537.
- [7] 陈军方, 任正隆, 高丽锋, 等. 从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 154—158.
- [8] Sumbrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [9] 贾继增, 张正斌, Devos K, 等. 小麦 21 条染色体 RFLP 作图位点遗传多样性分析[J]. 中国科学 C 辑, 2001, 31(1): 13—21.
- [10] 骆 蒙, 贾继增. 国际麦类基因组 EST 计划研究进展[J]. 中国农业科学, 2000, 33(6): 110—112.
- [11] Qi L L, Echaliier B, Chao S, *et al.* A chromosome bin map of 16 000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat[J]. Genetics, 2004, 168(2): 701—712.