

小麦醇溶蛋白 A-PAGE 电泳鉴定技术的分析

高 梅^{1a}, 张国权^{1b}, 魏益民², 张继澍^{1a}, 党 娇^{1a}, 王秋娟^{1a}

(1 西北农林科技大学 a. 生命科学学院; b. 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农业科学院 农产品加工研究所, 北京 100094)

[摘 要] 为了进一步对小麦醇溶蛋白 A-PAGE 电泳的鉴定方法进行标准化, 比较了凝胶浓度、缓冲体系及其 pH 值对电泳分辨率的影响, 并初步筛选出了适合作为醇溶蛋白电泳标准样品的国内小麦品种。结果表明, 丙烯酰胺和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺 2 个单体的交联百分浓度 (C) 为 4.0%, 总百分浓度 (T) 为 6%, 缓冲体系为甲酸-甘氨酸 (pH 3.0) 混合体系的 A-PAGE 电泳效果较好; 通过国内 40 个小麦品种与加拿大硬红春麦 Marquis 的 R24、R50、R79 标准条带相比较, 确定荔丰 3 号可以作为国内小麦醇溶蛋白电泳的标准样品。

[关键词] 小麦; 醇溶蛋白; A-PAGE 电泳; 标准样品

[中图分类号] S512.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0053-05

Analysis on the wheat gliadin A-PAGE electrophoresis method

GAO Mei^{1a}, ZHANG Guo-quan^{1b}, WEI Yi-min², ZHANG Ji-shu^{1a},

DANG Jiao^{1a}, WANG Qiu-juan^{1a}

(1 a. College of Life Sciences; b. College of Food Science & Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Agrifood Science and Technology, CAAS, Beijing 100094, China)

Abstract: To standardize the method of wheat gliadin A-PAGE and find the native wheat varieties (lines) which can be used as the standard samples of electropherogram. The influences of the gel concentration, buffer system and its pH on the electrophoresis' isolation capacity were analyzed. The results showed that the covalent percentage concentration (C) was 4.0%, the total percentage concentration of arc to bis (T) was 6%, and the formate-glycine mix buffer (pH 3.0) had the sound effects. Compared with the Canadian spring wheat Marquis' R24, R50 and R79 bands, the "Lifeng NO. 3" cultivar could be chosen from 40 native wheat varieties as the wheat gliadin standard sample.

key words: wheat; gliadin; A-PAGE electrophoresis; standard samples

在成熟小麦种子中, 醇溶蛋白约占贮藏蛋白总量的 40%, 是组成面筋的重要蛋白质, 赋予了面筋的黏性和延伸性, 并增加了面团的流变性。编码小麦醇溶蛋白的基因主要位于第 1 和第 6 部分同源群的染色体短臂上, 有 Gli-1、Gli-2 和 Gli-3 3 个位点群共 8 个位点的 117 个等位变异^[1]。因此, 醇溶蛋白在电泳图谱上表现出丰富的多态性。对于某特定小

麦品种而言, 其醇溶蛋白谱带数目一般可达 20~40 条。所以醇溶蛋白可作为品种指纹, 为小麦品种纯度鉴定、品种间遗传变异提供研究依据。

醇溶蛋白的酸性聚丙烯酰胺凝胶 (A-PAGE) 电泳方法最早由 Bushuk 等^[2]提出, 国际种子检验协会 (ISTA) 于 1986 年正式颁布了应用 A-PAGE 方法鉴定小麦和大麦品种的标准程序, 要求在全世界

† 收稿日期] 2006-08-24

[基金项目] 陕西省科技攻关项目 (2005 K01-G3)

[作者简介] 高 梅 (1973-), 女, 天津人, 讲师, 主要从事小麦品质生理研究。E-mail: rosaliem2002@yahoo.com.cn

[通讯作者] 张国权 (1968-), 男, 天津蓟县人, 副教授, 主要从事谷物品质评价及淀粉工程技术研究。E-mail: zhanggq98@126.com

推广和应用^[3]。颜启传等^[4-5]对 ISTA 所推荐的方法进行了试验验证。针对我国试验条件,国内许多科研工作者对该方法进行了一定改进^[6-8]。

A-PAGE 方法所具有的简便、快速、低成本的特点,是目前其他方法所无法替代的。但是,其分辨率和重现性受电泳体系的影响较大。影响电泳分辨率的因素主要有凝胶的胶孔尺度、缓冲体系的 pH 和离子强度等,本研究针对这些问题对 A-PAGE 电泳鉴定技术进行了研究;同时分析了国内 40 个小麦品种(系)的醇溶蛋白相对迁移率,以期筛选可以作为标准蛋白样品的国内小麦品种,为小麦醇溶蛋白指纹图谱分析技术的发展和标准化提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试小麦 供试小麦品种有:中国春、Marquis、Neepawa、小偃 926、陕 354、陕 225、小偃 107、西农 383、陕 150、高优 503、小偃 54、陕 253、豫麦 18、西农 88、8-57、徐州 25、豫麦 47、小偃 6 号、普冰 143、319、西农 2611、秦龙 068、小偃 22、西农 976、淮麦 8 号、烟台 4 号、陕农 28、898、981-1、郑引 97300-1、小偃 128、荔丰 3 号、陕 229、军绿 4 号、西农 2208、西农 163、西杂 1 号、太空 5 号、92-10、88(2)-3、8132-2、97(39)、9-1-1-5。

加拿大硬红春麦品种 Marquis 和 Neepawa 均由中国农业科学院作物品种资源研究所提供,其他小麦品种均由国家小麦改良中心陕西杨凌分中心提供。

1.1.2 主要试剂的配制 (1)ZY 型提取液。100 mL ZY 型提取液中含 6 g 尿素、25 mL 2-氯乙醇和 1 mL β -巯基乙醇。

(2)凝胶缓冲液。称取 1.0 g 抗坏血酸和 0.08 g 硫酸亚铁,加入 1 000 mL 蒸馏水,用甲酸或醋酸-甘氨酸调至所需 pH 值,即为凝胶缓冲液。

(3)凝胶配制。根据所分离蛋白的分子量,选择合适的丙烯酰胺和 N,N-甲叉双丙烯酰胺 2 个单体的总百分浓度(T)和交联百分浓度(C),才能使凝胶充分发挥其分子筛效应,使不同分子量的蛋白彼此分离。二者的计算公式分别为:

$$T/\% = (a + b) / m \times 100\%,$$

$$C/\% = b' / (a + b) \times 100\%.$$

式中, a 为丙烯酰胺的质量(g), b 为 N,N-甲叉双丙烯酰胺的质量(g), m 为缓冲液的终体积(mL)。

用 1.1.2(2)的凝胶缓冲液分别配制 C 为

4.0%, T 分别为 6%,8%和 10% 3 种不同浓度的丙烯酰胺凝胶。灌胶前用 6 mL/L 过氧化氢进行化学诱发聚合,聚合时间约 10 min。

(4)染色液。含 10 g/L 考马斯亮蓝质量分数为 12%的三氯乙酸溶液。

生化试剂由 AMRESCO 公司生产;化学试剂由西安化学试剂厂生产。

1.1.3 主要仪器 包括北京六一仪器厂 DYY-12 型电泳仪、DYCZ-28B 型垂直板电泳槽、SYNGENE 凝胶成像系统及图像分析系统。

1.2 方法

1.2.1 小麦醇溶蛋白的提取 随机取 10 粒干燥小麦种子,研磨成细粉,准确称取 40 mg 面粉装入 1.5 mL 离心管,向其中加入 1 mL ZY 型提取液,振荡混匀,4℃提取过夜。次日 1 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入 1.5 mL 离心管,加入适量甲基紫和甘油,冷藏备用。

1.2.2 凝胶浓度对小麦醇溶蛋白电泳结果的影响 分别配制 C 为 4.0%, T 为 6%,8%和 10% 3 种不同浓度的凝胶进行 A-PAGE 电泳。供试小麦品种为陕优 225。凝胶厚度 3 mm,350 V 稳压电泳约 100 min。染色 48 h,清理凝胶表面染料后照相。

1.2.3 缓冲液体系及其 pH 对小麦醇溶蛋白电泳结果的影响 配制 C 为 4.0%、 T 为 6% 的凝胶,以小偃 107 和中国春作为供试品种,在以下 3 种凝胶缓冲液体系中进行 A-PAGE 电泳,电泳条件同 1.2.2。
a. 甲酸体系:凝胶缓冲液和电极缓冲液均使用甲酸, pH 2.0~2.5; b. 甘氨酸体系:凝胶缓冲液和电极缓冲液均为醋酸-甘氨酸, pH 3.0; c. 甲酸-甘氨酸体系:凝胶缓冲液为甲酸,电极缓冲液为醋酸-甘氨酸, pH 3.0。

1.2.4 醇溶蛋白标准小麦品种的筛选 于 C 为 4.0%、 T 为 6%、甲酸-甘氨酸体系电泳条件下,以加拿大硬红春麦 Marquis 和 Neepawa 作为对照,分离供试的国内 40 个小麦品种(系)的醇溶蛋白,筛选出含有与对照样品 R24、R50、R79 标准条带迁移率相近的醇溶蛋白组分的品种(系)。测量相应条带的相对迁移率 R_f 值并以 Marquis 为基准计算相对偏差。相对偏差计算公式为: $I/\% = |(品种 R_f - Marquis 参照条带 R_f)| / Marquis 参照条带 R_f \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 凝胶浓度对小麦醇溶蛋白电泳结果的影响

在小麦醇溶蛋白 A-PAGE 方法中,习惯上使用

C 为 4.0 % 的凝胶。在 C 一定的情况下,各研究者所选择的 T 为 5 % ~ 20 %^[4,7,9]。ISTA 推荐的 T 为 10 %,而 Bushuk 等^[2]采用的 T 为 6 %。为了确定合适的凝胶浓度,本试验设计了 C = 4.0 %, T 分别为 6 %, 8 % 和 10 % 3 种不同的浓度凝胶进行电泳,结果如图 1 所示。

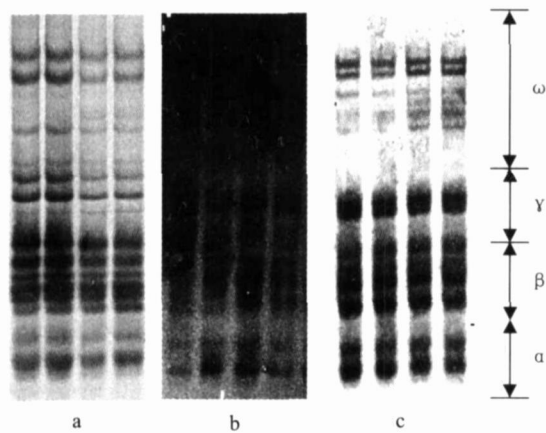


图 1 不同凝胶浓度下陕优 225 醇溶蛋白的电泳结果
a. T = 6 %; b. T = 8 %; c. T = 10 %
Fig. 1 Gliadin electrophoregram with different gel concentration of Shaanyou 225

从图 1 可以看出, T = 6 % 的凝胶分辨率最高。随着凝胶浓度的增大, γ ~ α 区域的分辨率越来越差;而 ω 区域的分辨率则随凝胶浓度的增加而提高。可见,采用单一浓度的凝胶对醇溶蛋白的分离具有一定的局限性。这个问题虽然可以通过梯度胶来解决,但后者无法保证重现性^[6]。所以,在单一胶条件下,选择 T = 6 % 的凝胶更有利于分离出较多的蛋白组分,适用于品种的醇溶蛋白多态性分析、品种鉴定及种间比较。

2.2 缓冲体系及其 pH 对小麦醇溶蛋白电泳结果的影响

除凝胶浓度以外, pH 值是影响 A-PAGE 电泳分辨率的另一个重要因素。电泳体系 pH 决定所分离蛋白的解离程度。此外,缓冲体系所选用的试剂种类不同,在电场中随蛋白一起迁移的离子种类与强度也有差异,这些离子将与电场发生相互作用,影响蛋白的迁移。

ISTA 所推荐的缓冲体系为乳酸-乳酸铝体系 (pH 3.1),但由于国内乳酸铝价格昂贵,我国科研工作者普遍采用醋酸-甘氨酸体系 (pH 3.0 左右)^[4]或甲酸体系 (pH 2.0 左右)^[9]。上述 2 种缓冲体系除了存在 pH 差异之外,前者的缓冲体系中存在甘氨酸阴离子,而后者没有。理论上,在 A-PAGE 电

泳中,蛋白质向阴极移动,带负电荷的离子向相反方向移动,结果会生成局部电动势,从而对蛋白质的分离产生影响。缓冲体系中阴离子的种类及其在不同 pH 下的解离程度,均影响蛋白质的分离效果。本试验设计了 3 种缓冲体系,比较阴离子强度对小麦醇溶蛋白分离效果的影响,结果见图 2。由图 2 可见,缓冲体系 pH 为 3.0 的凝胶蛋白条带 (b、c) 有一些横向扩散,泳道相对较宽,且染色较深,这与高居荣等^[10]的报道一致。缓冲体系 b 的分辨率比 a 高,蛋白相对迁移率 (R_f) 也明显不同。电泳效果最好的是缓冲体系 c,其染色较深,背景清晰,分辨率高。由此可知,当缓冲体系 pH 为 3.0 时,有利于提高蛋白分辨率和改善电泳图谱的效果,而缓冲系统中甘氨酸阴离子的含量影响蛋白的迁移率和分辨率。此外,含有甲酸的缓冲体系均具有较好的凝胶强度,剥胶时不易断裂。在以往的研究中未见关于甲酸-甘氨酸体系的电泳报道,甲酸、乙酸、甘氨酸在电场中与蛋白质的相互作用问题,尚需进一步研究。

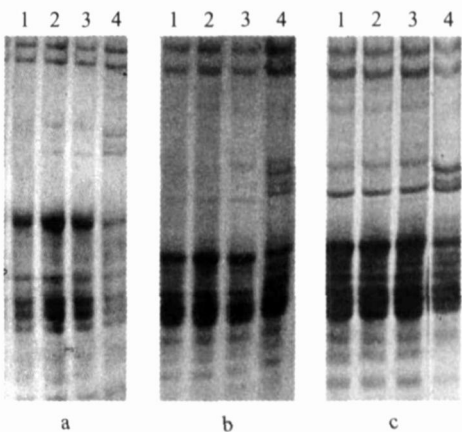


图 2 不同缓冲体系对小麦醇溶蛋白电泳结果的影响
a. 甲酸体系 (pH 2.0 ~ 2.5); b. 甘氨酸体系 (pH 3.0);
c. 甲酸-甘氨酸混合体系 (pH 3.0); 1 ~ 3. 小偃 107; 4. 中国春
Fig. 2 Separation effect of wheat gliadin in different buffer system
a. Formate buffer (pH 2.0 ~ 2.5); b. Glycine acetic acid buffer (pH 3.0); c. Formate-glycine mix buffer (pH 3.0);
1 - 3. Xiaoyan 107; 4. Chinese Spring

2.3 醇溶蛋白标准小麦品种的筛选

加拿大硬红春麦 Marquis 和 Neepawa 的 R24、R50、R79 条带一般被作为小麦 A-PAGE 电泳的相对迁移率标准。在我国小麦的 A-PAGE 电泳研究中,使用上述品种作为标准蛋白在材料的获得上有一定难度,且生态环境的不同易导致该品种在中国繁育期间发生变异^[11]。此外,电泳体系的不同也会使 R_f 值出现偏差^[12]。本研究以 Neepawa 作为标

准蛋白时发现,其 R24 条带的 R_f 值与 Sapirstein 等^[13]的报道不符。所以,筛选国内品种作为辅助参照对研究结果是有利的。

本试验在供试的国内 40 个小麦品种(系)中,筛

选出含有与 Marquis R24、R50、R79 标准条带迁移率相近醇溶蛋白组分的 7 个品种(系)。该 7 个品种(系)与 Marquis R24、R50、R79 对应蛋白组分的 R_f 值及相对偏差 I 见表 1。

表 1 7 个国内小麦品种的醇溶蛋白 R_f 及与 Marquis 品种对照的相对偏差

Table 1 Gliadin R_f and the relative deviation compared with Marquis of 7 internal wheat varieties								
项目 Item	Marquis	太空 5 号 Taikong No. 5	西农 163 Xinong 163	92-10	荔丰 3 号 Lifeng No. 3	小偃 128 Xiaoyan 128	8132-2	郑引 97300-1 Zhengyin 97300-1
R_{f24}	0.236 9	0.237 7	0.237 3	0.238 8	0.237 4	0.239 9	0.242 1	0.238 6
$I_{24}/\%$	-	0.34	0.17	0.80	0.21	1.27	2.20	0.72
R_{f50}	0.500 3	0.510 7	0.501 5	0.501 0	0.503 3	0.498 8	0.514 0	0.520 0
$I_{50}/\%$	-	2.08	0.24	0.14	0.60	0.30	2.74	3.94
R_{f79}	0.760 8	0.730 8	0.740 6	0.764 7	0.763 4	0.762 8	0.762 4	0.768 6
$I_{79}/\%$	-	3.94	2.66	0.51	0.34	0.26	0.21	1.03

注： R_{f24} 、 R_{f50} 、 R_{f79} 分别表示供试小麦品种(系)与 Marquis R24、R50、R79 相对应蛋白组分的相对迁移率。
Note： R_{f24} 、 R_{f50} and R_{f79} are the mobility ratios of the correspondding protein bands experimental varieties(lines) to Marquis' R24、R50 and R79.

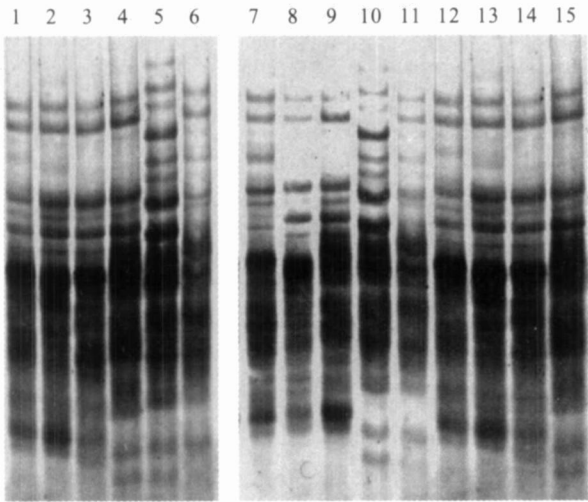


图 3 国内部分小麦品种的 A-PAGE 电泳结果

1. 太空 5 号;2. 西农 163;3. 92-10;4. 西农 2208;5, 10. Neepawa;6, 9, 11. Marquis;7. 荔丰 3 号;8. 小偃 128;
12. 9-1-1-5;13. 97(39);14. 8132-2;15. 郑引 97300-1

Fig. 3 A-PAGE electrophoregram of several internal wheat varieties

1. Taikong No. 5;2. Xinong 163;3. 92-10;4. Xinong 2208;5, 10. Neepawa;6, 9, 11. Marquis;7. Lifeng No. 3;
8. Xiaoyan 128;12. 9-1-1-5;13. 97(39);14. 8132-2;15. Zhengyin 97300-1

部分小麦品种的 A-PAGE 电泳结果见图 3。当 $I < 1$ 时,认为该条带的出现位置与 Marquis 的相应标准条带是非常接近的,可考虑作为参照条带使用。表 1 表明,荔丰 3 号同时具有与 Marquis R24、R50、R79 最接近的 3 个醇溶蛋白组分,可以作为 R_f 参照。其他品种各有 1~2 条带可以作为辅助参照,如西农 163 的 R24、R50 条带;小偃 128 的 R79 条带等。品系材料如 92-10 等可提供一定参考作用。

3 结论与讨论

醇溶蛋白的分析在小麦遗传、育种、品质研究中

占有重要地位。要充分开发利用我国小麦品种丰富的醇溶蛋白遗传资源,就必须建立有效的分析技术和评价体系。技术的先进性和评价体系的标准化是研究的前提和保障。

从技术层面分析,醇溶蛋白 A-PAGE 电泳技术的简便性其他方法所不能替代的,但分辨率和重现性问题还是阻碍该技术实现标准化的瓶颈。任何 A-PAGE 电泳技术的改进均应以维持简便性、保证重现性、提高分辨率为原则。本研究从保证重现性和简便性的角度出发,选择单一胶进行电泳,没有使用梯度胶,结果表明,单一胶重现性好,但对分辨率

会产生一定的影响。此外,缓冲体系的 pH 和阴离子强度的调整,改变了电泳中的游离电荷数量,这种电荷差异与电场及正在迁移的蛋白组分相互作用,造成电泳中局部电动势的改变,对蛋白的分离产生影响。深入研究电荷差异对电泳分辨率的影响可为 A-PAGE 电泳技术的进一步改进提供新的空间。

在评价体系方面,建立具有中国特色的评价体系,并将其与国际标准接轨是不矛盾的。本研究对国内 40 个小麦品种(系)进行了初步筛选,以期筛选出可以作为醇溶蛋白标准的品种。本研究结果表明:供试品种中有 7 个品种(系)的个别条带与 Marquis 的 R24、R50、R79 条带有不同程度的吻合;品种荔丰 3 号同时具有与 Marquis R24、R50、R79 最接近的 3 个醇溶蛋白组分,可以作为 R_f 参照。说明在我国的小麦醇溶蛋白遗传资源中,能够作为标准参照品种的资源是比较丰富的。要有效开发利用我国小麦醇溶蛋白资源,需要针对不同用途制定不同的标准化评价体系。这就要求在收集醇溶蛋白指纹资源的基础上,以应用目标为出发点,对信息进行科学地分析和归类,构建小麦醇溶蛋白理论研究 - 技术创新 - 高效应用之间的桥梁。

[参考文献]

[1] Payne P I, Roca A. Genetic linkage between storage protein genes on each of the short arms of chromosome 1A and 1B of wheat[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 1001-1007.

[2] Bushuk W, Zillman R R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams[J]. Can J Plant Sci, 1978, 58: 505-515.

[3] Draper S R. ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983 - 1986[J]. Seed Sci Technol, 1987, 15: 431-434.

[4] 颜启传, 黄亚军, 徐 媛. 我国适用的小麦和大麦种子醇溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定品种的标准程序[J]. 种子, 1989(6): 55-57.

[5] 颜启传, 黄亚军, 徐 媛. 试用 ISTA 推荐的种子醇溶蛋白电泳方法鉴定大麦和小麦品种[J]. 作物学报, 1992, 18(1): 61-68.

[6] 邵锦震, 丁 毅. 麦醇溶蛋白 A-PAGE 方法的优化和改进[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 2000, 46(6): 733-738.

[7] 王学路, 钱曼懋, 宋春华, 等. 改良 ISTA 醇溶蛋白电泳方法及其应用[J]. 作物品种资源, 1994(2): 32-34.

[8] 阎旭东, 卢少源, 李宗智. 适合于我国小麦醇溶蛋白分析的 A-PAGE 方法[J]. 河北农业大学学报, 1994, 17(1): 7-10.

[9] 傅宾孝, 于光华, 王乐凯, 等. 小麦醇溶蛋白电泳分析的新方法[J]. 作物学报, 1993, 19(2): 185-187.

[10] 高居荣, 王洪刚, 刘树兵, 等. 小麦种子醇溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的简化研究[J]. 华北农学报, 2003, 18(2): 43-46.

[11] 孙致良, 蒋家慧, 梁永平, 等. 小麦品种电泳分类鉴定技术的标准化研究[J]. 植物学报, 1997, 39(8): 731-736.

[12] 刘 华, 王宇生, 张 辉, 等. 小麦种质资源醇溶蛋白指纹图谱数据库的初步建立及应用[J]. 作物学报, 1999, 25(6): 674-682.

[13] Sapirstein H D, Bushuk W. Computer-aided analysis of gliadin electrophoregrams I. Improvement of precision of relative mobility determination by using a three reference band standardization[J]. Cereal Chem, 1985, 62(5): 372-377.

(上接第 52 页)

[6] 严菊芳, 张嵩午, 刘党校, 等. 干旱胁迫下不同温型小麦农田微气象特征研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(10): 49-54.

[7] 许秀娟, 张嵩午. 冷型小麦灌浆期农田水分利用状况初探[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(5): 13-15.

[8] 翁笃鸣, 陈万隆, 沈觉成, 等. 小气候及农田小气候[M]. 北京: 农业出版社, 1981: 40-90.

[9] 郎红东, 杨剑虹. 土壤 CO₂ 浓度变化及其影响因素的研究[J].

西南农业大学学报: 自然科学版, 2004(6): 731-734.

[10] 郑广华, 徐阿炳, 李雅志. 小麦体内同化产物分配利用规律的初步研究[J]. 植物生理学通讯, 1964(3): 7-16.

[11] 张嵩午, 王长发, 冯佰利, 等. 冷型小麦单穗潜在库填充的研究[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(4): 31-33.

[12] 周春菊, 张嵩午, 王林权, 等. 冷型小麦产量及其构成因素的施肥效应分析[J]. 干旱地区农业研究, 2006, 24(4): 1-4.