醇溶蛋白酸性电泳及其在种质资源分析中的应用*

刘香利[1], 郭蔼光[1], 李玉红[2]
(1 西北农林科技大学 生命科学学院; 2 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘　要]　建立了 1 个新的醇溶蛋白酸性电泳方法, 并用此方法对不同倍性小麦品种及黑麦、小黑麦品种的醇溶蛋白组成进行了分析。结果表明, 此方法不仅适用于小麦醇溶蛋白分析, 而且也适用于黑麦和小黑麦种质资源分析。

[关键词]　小麦; 醇溶蛋白; 酸性电泳; 种质资源分析
[中图分类号]　Q 512+. 5　　[文献标识码]　A　　[文章编号]1000-2782(2001)02-017-04

小麦醇溶蛋白占小麦种子蛋白的 40%, 其组成由遗传决定, 几乎不受环境条件的影响, 可作为品种的指纹[1, 2]。醇溶蛋白酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(A-PAGE)因其丰富的多态性而被广泛用于品种鉴定、品质分析和种质资源分析[2~6]。在我国, 此方法在生产实践中并未得到应用, 究其原因, A-PAGE 方法不成熟仍是一个限制因素。本研究对 A-PAGE 方法进行大量的摸索, 并建立了一个新的 A-PAGE 方法, 用此方法对不同小麦种质资源的醇溶蛋白组成进行了分析, 以期为育种中种质资源分析提供一个新的途径。

1　材料和方法

材料　栽培一粒小麦、栽培二粒小麦等二倍体和四倍体小麦以及四倍体小麦杂交后代由西北农林科技大学农学院李邦琴副研究员提供。黑麦、小黑麦品种由西北农林科技大学董安书教授提供。参照品种 Marquis 和 Neepwa 购自中国农科院种质资源研究所。

醇溶蛋白提取　采用乙醇提取法: 取单粒小麦种子, 用样品钳夹碎后放入 1.5 mL 离心管, 加入 100 μL 体积分数 70% 乙醇, 振荡后室温提取 3~4 h 或 40℃水浴中提取 1.5 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液按 1∶0.5 体积加入上样缓冲液(含质量分数 1% 甲基绿和体积分数 70% 甘油), 混匀后上样或于 -20℃保存。上样量 12.5 μL。

醇溶蛋白电泳　保留 Weghe[7] 和 Kolster[8] 方法的优点, 做了适当改进。按 Weghe 的方法配制分离胶, 聚合后再按 Kolster 的方法加灌浓缩胶。分离胶含质量分数 10% Acr、0.4% Bis、1 mol/L 脲素, 缓冲液为 13.3 mmol/L 的甘氨酸-冰乙酸(pH 3.2), 以 AP 和 TEMED 催化, 在 16 ℃左右聚合, 灌胶至仅留 2 cm 浓缩胶, 用水饱和的正丁醇封顶。浓缩胶含质量分数 4.56% Acr、0.24% Bis、0.037% Vc、0.000 3% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 缓冲液为 39.3 mmol/L 的 β-丙氨酸-甲酸(pH 4.25), 加入体积分数 0.003% H_2O_2 催化聚合, 灌后立即插上梳子, 聚合需 5~10 min。

电极缓冲液为 800 mL 5 mmol/L 的甘氨酸-冰乙酸(pH 3.2), 在 4 ℃冰箱中预冷, 电泳在 4 ℃冰箱中进行。上极为正, 下极为负, 100 V 电泳约 15 min, 待进入分离胶后调电压至恒压 350 V, 指示剂至前沿时剥胶(约需 5 h)。在 4~5 mL 质量分数 1% 考马斯亮蓝 R250+250 mL 质量分数 10% 的三氯乙酸染色液中固定和染色过夜后拍照, 封胶保存。

醇溶蛋白电泳图谱分析　以加拿大硬红春小麦品种 Marquis 和 Neepwa 为对照, 按 Bushuk 和 Zillman[9] 的相对迁移率系统对醇溶蛋白电泳图谱谱带进行命名。

2　结果与分析

2.1　不同倍性小麦醇溶蛋白电泳图谱比较

用此 A-PAGE 方法对栽培一粒小麦(AA)和 4 个四倍体小麦: 栽培二粒小麦(AABB)、野生二粒小

* [收稿日期]　2000-05-19
[作者简介]　刘香利(1972-　), 女, 陕西杨陵人, 硕士, 主要从事生物化学教学和研究工作。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

麦(AABB)、墨西里卡(AABB)、波兰小麦(AABB)以及普通六倍体小麦醇溶蛋白组成进行分析(见图1)。从电泳结果可以看出,各品种间醇溶蛋白组成存在很大差异,且随着染色体组数目的增加,醇溶蛋白谱带数也明显增加。栽培一粒小麦醇溶蛋白谱带数明显少于四倍体和六倍体小麦。虽然同为四倍体,野生二粒小麦、栽培二粒小麦、波兰小麦和墨西里卡的醇溶蛋白谱带数和组成也有很大差异。

对波兰小麦及其与普通小麦的六倍体杂交后代947-69、947-73、958-228 和 2 个硬粒小麦墨西里卡、Po250 以及 Po250 与普通小麦杂交后代 95C51-4 醇溶蛋白进行电泳分析(见图 2)表明,除墨西里卡、Po250 及其杂交后代 95C51-4 醇溶蛋白谱带极其相似外,其余品种间均存在显著差异。波兰小麦的杂交后代 947-69、947-73、958-228,其 ω和 γ区谱带数明显多于波兰小麦,这是由于它们从普通小麦亲本中获得了D 组染色体,因而也增加了D 组染色体所编码的一些醇溶蛋白。

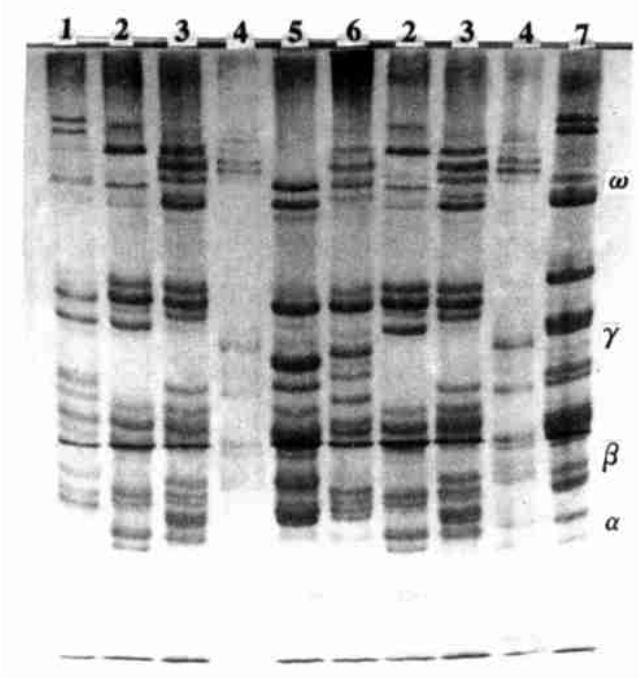

图 1 不同染色体数目小麦醇溶蛋白A-PAGE 图谱
1. 小偃 6 号; 2. 野生二粒小麦; 3. 栽培二粒小麦;
4. 栽培一粒小麦; 5. 波兰小麦; 6. 墨西里卡; 7. 辽春 10 号
Fig. 1 Gliadin electrophoregram of wheat with different chromosome
1. Xiaoyan 6; 2. *T. dicoccoides*; 3. *T. dicoccum*; 4. *T. monococcum*; 5. *T. polonieum*; 6. Moxilika; 7. Liaochun 10

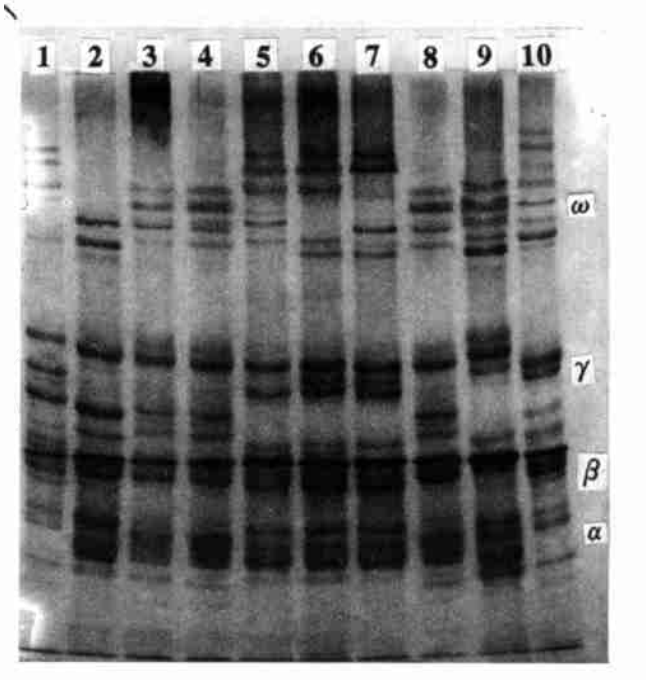

图 2 四倍体小麦及其与普通小麦杂交后代醇溶蛋白A-PAGE
1. Marquis; 2. 波兰小麦; 3. 墨西里卡; 4. 94C51-4; 5. 947-69; 6. 947-74; 7. 958-228; 8. Po 250; 9. 栽培二粒小麦; 10. Neepawa
Fig. 2 Gliadin electrophoregram of tetraploid wheat and its hybrid with common wheat
1. Marquis; 2. *T. polonieum*; 3. Moxilika; 4. 94C51-4; 5. 947-69; 6. 947-74; 7. 958-228; 8. Po 250; 9. *T. dicoccum*; 10. Neepawa

2.2 黑麦和小黑麦醇溶蛋白电泳图谱比较

对 5 个黑麦品种美国黑麦、法国黑麦、奥地利黑麦、AR77、荆州黑麦以及六倍体小黑麦 H4372 醇溶蛋白进行电泳分析(见图 3)。表明与普通小麦相比,黑麦含有较多的高分子量(HMW)醇溶蛋白,是普通小麦所没有的,以前研究认为它与小麦高分子量麦谷蛋白有同源性[10]。其 ω醇溶蛋白也具有丰富的多态性,仅利用此区的谱带组成就可将 5 个黑麦品种区分开。其 α区谱带与小麦相似,而 β和 γ区醇溶蛋白谱带较少。黑麦的 ω和 γ醇溶蛋白与小麦具有同源性。小黑麦(AABBRR)由于不具有D 组染色体,因此与四倍体小麦相似,缺少D 组染色体控制合成的蛋白质,醇溶蛋白谱带数较六倍体小麦少。但与四倍体小麦不同,它遗传有 HMW 醇溶蛋白和某些 ω醇溶蛋白谱带,同时还从普通小麦中遗传一些黑麦所不具有的 γ区谱带。因此,醇溶蛋白 A-PAGE 不仅可用于小麦品质分析、品种鉴定和种质资源分析,在黑麦品种鉴定和种质资源分析中此方法同样有效。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

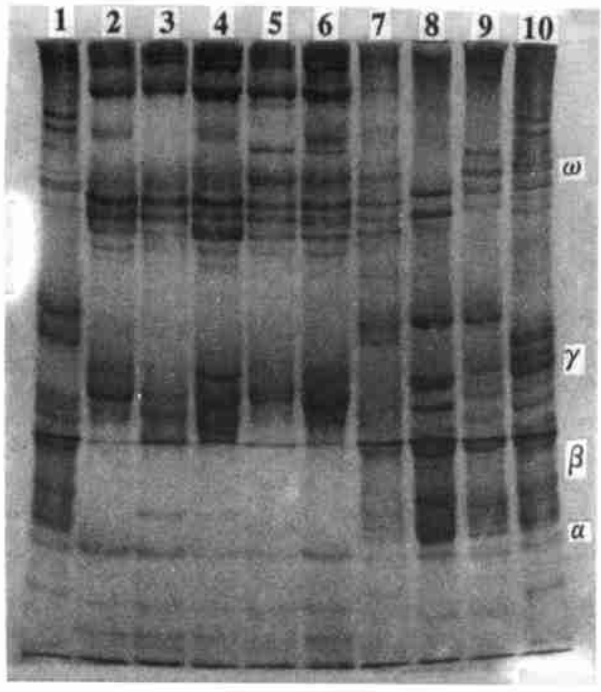

图 3　黑麦及小黑麦醇溶蛋白 A-PAGE 图谱

1. 小偃 6 号; 2. 美国黑麦; 3. 法国黑麦; 4. 奥地利黑麦; 5. AR77; 6. 荆州黑麦; 7. H4372; 8. 波兰小麦; 9. 墨西里卡; 10. 辽春 10 号

Fig. 3　Gliadin electrophoregram of rye and triticale

1. Xiaoyan 6; 2. America rye; 3. France rye; 4. Austria rye; 5. AR77; 6. Jingzhou rye; 7. H4372; 8. *T. polonieum*; 9. Xoxilika; 10. Liaochun 10

3　讨　论

虽然目前已报道的 A-PAGE 方法很多, 但因酸性条件下影响电泳的因素较多, 如催化系统、缓冲系统、电泳条件等, 因而选择一个适合自己实验条件的方法仍需进行大量的探索。作者先后尝试过多种 A-PAGE 方法, 最后发现 Kolster 方法浓缩效果好、分辨率高, 尤其是 α 和 β 区分辨率有显著提高。但此方法电泳过程中电流很大, 因无循环冷却系统, 产热多, 条带呈弧形, 甚至出现蛋白质沉淀, 即使预冷电极缓冲液和冰槽冷却也得不到满意的效果。降低电压, 分辨率也会随之降低。且此方法用 $FeSO_4$-Vc-H_2O_2 催化, 所制胶紧粘于玻璃板上, 不易获得完整的胶片。Weghe 的方法, 所制胶机械性能好, 易于操作, 350 V 电压即可得到满意的效果, 但其无浓缩效应, 电泳受上样情况影响大, 谱带不齐, 影响分辨效果。本实验作了方法改进后, 保留了这 2 个方法的优点。所制浓缩胶用 $FeSO_4$-Vc-H_2O_2 催化, 聚合快、胶软、样品梳易拔出、且样品槽整齐、上样容易、浓缩效果好, 使分辨率提高。同时, 把电极缓冲液的量加大至 800 mL, 并预先在 4 ℃冰箱中预冷, 电泳在 4 ℃冰箱中进行以减少产热造成的影响。

对供试材料醇溶蛋白的分析表明, 改进后的 A-PAGE 方法不仅可用于小麦品种的鉴定和种质资源分析, 同样适用于黑麦和小黑麦的品种鉴定和种质资源分析, 为育种中黑麦优质资源的利用提供了新的分析方法。

[参考文献]

[1] Jones R W. Eletrophoresis and fractionation of wheat gluten[J]. Arch Biochem Biophys, 1959, 84: 363- 376.

[2] Zillman R R, Bushuk W. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. Ⅱ. Effects of environmental and experimental factors on the gliadin electrophoregram[J]. Can J Plant Sci, 1979b, 59: 281- 286.

[3] Khan K, Hamada A S, Patek J. Polyacrylamide gel electrophoresis for wheat variety inentification: effect of variables on gel properties[J]. Cereal Chem, 1985, 62(5): 310- 313.

[4] Campbell W P, Wrigley C W, Cresey P J, et al. Statistical correlations between quality attributes and grain-protein composition for 71 hexaploid wheats used as breeding parents[J]. Cereal Chem, 1987, 64(4): 293- 299.

[5] Metakovsky E V, Annicchiarico P, Boggini G, et al. Relationship between gliadin alleles and dough strength in Italian bread wheat cultivars[J]. J Cereal Sci, 1997b, 25(3): 229- 236.

[6] Draper S R. Standard reference method for the identification of cultivars of wheat and barley by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Seed Sci Technol, 1987, 15: 431- 434.

[7] Weghe L V D. Camparative study of electrophoretic methods for cultivar identification of wheat and triticale[J]. Seed Sci Technol, 1994, 50: 41- 50.

[8] Kolster P, Gelder W M J, Vereiken J M, et al. Polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadins: the use of a moving boundary for improved resolution[J]. Euphytica, 1989, 40: 207- 212.

[9] Bushuk W, Zillman R R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature[J]. J Plant Sci, 1978, 58: 505- 515.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[10] 赵文明. 小麦面筋蛋白的种类及特性[J]. 生命的化学, 1987, 7(4): 37- 39.

An improved acid polyacrylamid gel electrophoresis method and its application in germ plasm resources analysis

LIU Xiang-li[1], GUO Ai-guang[1], LI Yu-hong[2]

(1 College of Life Sciences, 2 College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The method of polyacrylamid electrophoresis in acid environment is improved. Using this method, the gliadin of several wheat, rye and triticale is analyzed. The result shows there are significant differences between each varieties. This method can be used in variety identification and germ plasm analysis not only for wheat but also for rye.

Key words: wheat; gliadin; acid polyacrylamid gel electrophoresis; germ plasm resources analysis

西北农林科技大学出版的科技期刊在国内影响力排名

《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》, 是目前国内收录期刊种类最多、最全的专门用于科技期刊引证分析研究的重要检索评价工具。该报告 2000 年以不同学科的 2804 种中国科技期刊为刊源, 在与国际评价体系保持一致的基础上, 结合中国科技期刊的实际情况, 选择了总被引频次、影响因子、即年指标、基金论文比和平均引用率等 5 项科学计量指标。现将西北农林科技大学出版的科技期刊的 5 项评价指标及其在国内的排序列于表 1。

表 1 西北农林科技大学出版的科技期刊在国内影响力排名

期 刊	总被引频次		影响因子		即年指标	基金论文比	平均引文率	文献量
	1999(1998)年	排序	1999(1998)年	排序		1999(1998)年		
西北农业大学学报*	**291(239)**	**351(319)**	**0.163(0.153)**	**970(890)**	**0.050**	**0.71(0.636)**	**9.21**	**140**
干旱地区农业研究*	255(214)	403(367)	0.459(0.256)	235(455)	0.022	0.80(0.512)	7.73	90
西北植物学报*	240(185)	427(441)	0.287(0.229)	522(549)	0.049	0.52(0.579)	12.45	185
水土保持通报*	233(177)	440(462)	0.396(0.217)	311(604)	0.044	0.51(0.289)	4.32	90
西北林学院学报*	154(104)	671(773)	0.161(0.205)	979(646)	0.023	0.56(0.192)	10.74	87
陕西农业科学*	120(73)	838(1003)	0.090(0.037)	1506(1926)	0.007	0.20(0.012)	4.78	122
西北农业学报*	112(102)	900(782)	0.167(0.132)	942(1025)	0.016	0.39(0.393)	8.34	123
昆虫分类学报*	89(67)	1045(1065)	0.053(0.132)	1901(1025)	0.00	0.32(0.356)	6.49	68
黄牛杂志	76	1141	0.099	1429	0.017	0.10	3.73	116
土壤侵蚀与水土保持学报*	75(45)	1149(1339)	0.365(0.308)	357(333)	0.116	0.88(0.409)	6.94	69
麦类作物	73(39)	1170(1422)	0.260(0.095)	597(1278)	0.035	0.34(0.263)	5.70	113
水土保持研究*	56(58)	1334(1167)	0.090(0.190)	1506(705)	0.007	0.20(0.189)	4.78	137
家畜生态*	47(27)	1141(1640)	0.106(0.051)	1370(1739)	0.064	0.17(0.283)	5.96	47
畜牧兽医杂志	45(56)	1496(1188)	0.052(0.035)	1913(1957)	0.000	0.03(0.059)	2.55	88
防渗技术	15	2068	0.058	1831	0.018	0.00	1.02	55
动物医学进展	13(6)	2134(2234)	0.061(0.028)	1802(2042)	0.016	0.31(0.075)	8.54	127
北方蚕业	8(3)	2309(2369)	0.028(0.019)	2191(2.68)	0.000	0.03(0.026)	1.05	66

注: * 为源期刊标志。根据 1998, 1999 年中国科技期刊引证报告(扩刊版)整理, 统计期刊源 1998 年为 2648 种, 1999 年为 2804 种。

目前, 西北农林科技大学正式出版的科技期刊有 19 种, 有 11 种为统计的来源期刊。1999 年进入统计的有 17 种, 较 1998 年增加了《黄牛杂志》和《防渗技术》, 减少了《陕西林业科技》。从表 1 中可以看出, 绝大多数期刊的被引频次、影响因子及基金论文比都较 1998 年有不同程度的提高, 全校被引频次较高的前 9 位期刊的顺序, 两年基本保持稳定, 说明我校科技期刊的整体水平保持稳步上升的趋势。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net