

小麦种子醇溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的简化研究

高居荣, 王洪刚, 刘树兵, 李兴峰, 孔凡晶, 陈冬花

(山东农业大学 农学院 山东 泰安 271018)

摘要: 在 ISTA 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的基础上, 对影响电泳效果的主要因素进行逐一筛选、改进, 尤其是实验设计的 NaOH-醋酸-甘氨酸缓冲系统和先低后高再低的电泳方式使此项技术具有快速、分辨率较高、重复性较好、易剥胶、操作简单、经济实用等优点, 适于一般实验室利用小麦种子醇溶蛋白技术对小麦进行大量的快速简捷的筛选、鉴定等初步研究。

关键词: 小麦; 种子醇溶蛋白; 凝胶电泳

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)02-0043-04

An Simplified Procedure of Polyacrylamide Gel Electrophoresis Applicable to the Study of the Gliadin of Wheat Seed

GAO Ju-rong, WANG Hong-gang, LIU Shu-bing, LI Xing-feng,

KONG Fan-jing, CHEN Dong-hua

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Based on the standard procedure of polyacrylamide gel electrophoresis set by ISTA for the analysis of the gliadin of wheat and barley seed for the variety identification, we screened the main influence factors which would affect the electrophoresis, and tried to improve them to get the best combination. According to the results, we established an optimal procedure, it had the buffer system of Sodium Hydroxide—Acetic Acid—Glycine, and the voltage of electrophoresis should be lower at beginning, then higher for a while, and lower in the end. This method had the properties of high resolution and stability, using less samples, and the gel can be easily desquamated than the other methods. Furthermore, this method is easily to operate, more economical, and spend less time than the standard procedures, so it can be used in many laboratories to study the gliadin of wheat.

Key words: Wheat; Gliadin of seed; Polyacrylamide gel electrophoresis

小麦种子醇溶蛋白是小麦种子胚乳中的主要储藏蛋白, 约占总蛋白含量的 40%, 醇溶蛋白决定面团的粘着性和延展性^[1, 2], 与小麦面粉的品质密切相关。醇溶蛋白在结构上为单亚基, 其编码基因主要位于第一和第六部分同源群染色体短臂上^[3, 4], 其电泳谱带按其分子量的大小和相对迁移率的不同分为 α , β , γ , ω 4 个区, 其带纹的多少及组合方式受

基因控制, 几乎与环境无关, 因此可以构成小麦品种的指纹^[5]。近年来国内外已将小麦种子醇溶蛋白电泳分析广泛应用到小麦品种鉴定、纯度检验^[3, 4]、亲缘关系分析、异代换系、易位系鉴定、品质预测等方面^[5, 6]。1986 年国际种子检验协会 (ISTA) 颁布的醇溶蛋白电泳鉴定小麦品种标准程序^[7], 虽然分辨率较高, 但要求条件较严格、操作繁琐、所需时间

收稿日期: 2002-06-23

基金项目: 国家计委“山东省聊城市大型优质小麦生产基地项目”科研体系建设资助(国家计委农经(2000)1405号)

作者简介: 高居荣(1964-), 女, 山东宁阳人, 助理研究员, 主要从事试验技术工作。

长、仪器药品昂贵、胶软且不易剥离等,因此限制了此项技术的应用范围。对此许多学者各自已经或正在对小麦种子醇溶蛋白电泳标准方法进行不同程度的改进,但多是对其中单因素的改进或少数几个因素量的增减。本试验试图通过对影响小麦种子醇溶蛋白电泳技术的主要因素进行筛选、改进,建立快速、分辨率较高、重复性较好、易剥胶、操作简单、经济实用的小麦种子醇溶蛋白电泳技术,使此项技术更易于推广使用。

1 材料和方法

1.1 供试材料与仪器药品

1.1.1 供试材料 从烟农 15 与中间偃麦草杂交后代中选育的 7 个异附加系: 996223, 996222, 996221, 996217, 991216, 996215, 996213 及其亲本材料烟农 15(♀) 和中间偃麦草(♂)。

1.1.2 仪器药品 北京六一厂生产的 DYY- II 型稳流稳压电泳仪, 北京六一厂生产的 DYY- III 电泳槽, 样品梳为 19 齿, 中科院生物物理所生产的 TCL- 12 型台式高速冷冻离心机。药品均为国产的化

学纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 影响电泳效果主要因素的筛选 参照王学路^[8]、马守才^[9]、孙新立^[10]、张春庆^[11]、张学勇^[12,13]、杨瑞武^[14]等方法, 对影响电泳效果的 8 个主要因素进行筛选改进, 共设 21 个处理(表 1), 以颜启传等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^[15]与表 1 各处理逐一进行对比实验、筛选。溶液的配制、样品的提取、制胶、加样、电泳、染色等参照 1986 年国际种子检验协会(ISTA)颁布的和颜启传等的小麦种子醇溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳标准程序^[11,14], 略有改动, 凝胶缓冲液和凝胶溶液由分别配制改为混合配制成凝胶储备液, 三氯乙酸和考马斯亮兰由分别配制改为混合配制成染色液, 设计 NaOH 醋酸-甘氨酸系统和电压先低后高再低的电泳方式等, 并从提取剂、胶浓度和交联度、催化剂、缓冲系统、到电泳方式等, 对每个影响因素的不同处理逐一进行对比实验, 筛选出每个影响因素的最优条件。

表 1 实验条件

不同因素	提取剂	胶浓度和交联度	催化-还原系统	缓冲系统	加样量(μL)	pH	电泳方式	溶剂
不同处理	70% 乙醇+ 40% 蔗糖	T= 12% C= 4.5%	H ₂ O ₂ - FeSO ₄	醋酸- 甘氨酸	9	3.0	500V 恒压	去离子水
	乙二醇	T= 10% C= 3.5%	AP- FeSO ₄	NaOH- 醋酸- 甘氨酸	6	3.1	先低后高	蒸馏水
	25% 2- 氯乙醇	T= 9% C= 4%			5	3.2	先低再高再低	
	25% 2- 氯乙醇 + 1% 巯基乙醇				4	3.3		

1.2.2 影响电泳效果主要因素的优化组合 先采用表 1 各处理的最优条件配制溶液、电泳, 再以此与表 1 各处理逐一进行试验, 优化组合出电泳效果最优的适宜条件, 从而使小麦种子醇溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳技术得到简化。

1.2.3 标准法电泳与改进后电泳方法比较 采用标准法和改进法分别对烟农 15 与中间偃麦草杂交后代材料的 7 个异附加系进行电泳。

2 结果与分析

2.1 各处理因素对小麦种子醇溶蛋白电泳效果的影响

2.1.1 提取液对小麦种子醇溶蛋白电泳的影响

试验结果表明, 采用 70% 乙醇+ 40% 蔗糖提取剂的图谱底色较深, 谱带易褪色, 谱带迁移较慢; 乙二醇提取剂的图谱分辨率较好, 但谱带着色力较差, 谱带迁移慢; 25% 2- 氯乙醇提取剂的图谱分辨率较好, 谱带泳动快; 25% 2- 氯乙醇+ 10% 巯基乙醇提取剂能大量增加新带, 但谱带易拖尾, 谱带泳动慢。试验结果表明提取剂 3 优于提取剂 1, 2, 4。

2.1.2 胶浓度和交联度对小麦种子醇溶蛋白电泳的影响 试验结果表明, 采用 T= 12%, C= 4.5% 的凝胶, α, β, γ 区的谱带增多, ω 区谱带减少, 且 α, β 区谱带拖尾; 采用 T= 9%, C= 4%, 谱带较平直, ω 区的谱带增多, α, β 区的谱带减少; 采用 T= 10%, C= 3.5%, 谱带较平直, ω, γ 区的谱带较多, 由此可

见,根据研究目的不同,可调整胶浓度和交联度。

2.1.3 催化系统对小麦种子醇溶蛋白电泳的影响

H₂O₂-Vc- 醋酸催化系统,胶软,易与玻璃板粘着,难以操作,谱带较宽;AP- Vc- 醋酸催化系统,胶较硬,易剥离,且谱带窄而清晰。由此可见,AP- Vc- 醋酸催化系统优于 H₂O₂- Vc- 醋酸催化系统。

2.1.4 缓冲系统对小麦种子醇溶蛋白电泳的影响

醋酸- 甘氨酸缓冲系统,谱带泳动慢,分辨效果差,谱带着色力差,染色时间长;NaOH- 醋酸- 甘氨酸缓冲系统,谱带泳动快,各区的谱带较平直清晰,没有拖尾现象,特别α,β区的谱带增多变细变直,分辨率高,着色适中,不用脱色,染色时间短,6~10 h 即可,且继续染色几天效果仍较好,由此可见,本试验设计的 NaOH- 醋酸- 甘氨酸系统优于醋酸- 甘氨酸系统。

2.1.5 加样量对小麦种子醇溶蛋白电泳的影响

样品提取按 1 mg 加 4 μL 的比例加入提取剂,在一个加样小井中加样 9 μL,谱带有相互连接现象,不易区分;在一个加样小井中加样 4 μL,有些弱带不清晰,甚至表现不出来,在一个加样小井中加样 6 μL 谱带的分辨率较高,因此加样要适量,要根据提取剂的浓度以及提取时间来选择加样量,本试验结果以加样量为 6 μL 左右较适宜。

2.1.6 pH 值对小麦种子醇溶蛋白电泳的影响

pH 值低于 3.0 电泳谱带横向扩散较严重,谱带迁移率较大,着色浅;pH 大于 3.2,谱带易横向扩散,迁移率较小,着色较深。结果表明 pH 在 3.1~ 3.2 时较适宜。

2.1.7 电泳方式对小麦种子醇溶蛋白电泳的影响

采用恒压 500 V 电泳谱带不整齐且α,β区谱带宽,易拖尾;采用 120 V 电泳 20 min,使指示剂处于同一水平线上时再调电压 500 V 电泳,待指示剂离底约 2 cm 时,再调电压 300 V 电泳,待指示剂刚出胶板时,停止电泳,谱带整齐,α,β区谱带变窄,且分辨率高。结果表明,本试验设计的先低后高再低的电泳方式效果较好。

2.1.8 溶剂对小麦种子醇溶蛋白电泳的影响

采用去离子水配制溶液,谱带不整齐,模糊不清。用蒸馏水配制溶液,谱带整齐、清晰,且分辨率高,因此用蒸馏水配制溶液效果较好。

2.2 小麦种子醇溶蛋白电泳条件的优化组合

组合方法 1.2.1 中筛选改进出的最优条件,即

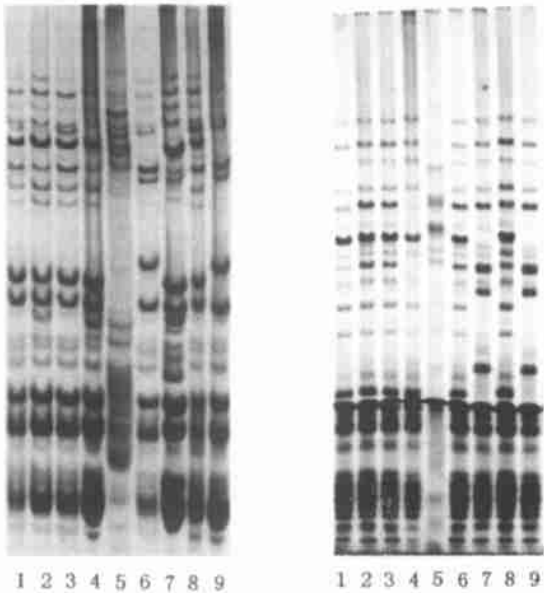
提取剂 25% 2- 氯乙醇,胶浓度和交联度 T= 10%, C= 3.5%,催化- 还原系统 AP-FeSO₄,缓冲系统 NaOH- 醋酸- 甘氨酸,加样量 6 μL, pH= 3.1,电泳方式先低再高再低,蒸馏水配制溶液,并以此与表 1 各处理再进行对比实验,结果表明以在方法 1.2.1 中筛选改进的最优条件效果较好,并以此作为电泳技术的简化方法,其具体电泳过程见表 2。

表 2 简化法电泳过程

药品用量	
凝胶溶液 (200 mL)	丙烯酰胺 21.3 g, 甲叉双丙烯酰胺 0.96 g, 尿素 12 g, 甘氨酸 0.12 g, 抗坏血酸 0.2 g, Fe ₂ SO ₄ 0.04 g
10% 过硫酸铵 100 mL	过硫酸铵 10 g
缓冲溶液 (pH= 3.1) 1 000 mL	甘氨酸 0.04 g, 冰醋酸 4 mL, NaOH 0.07 g
电泳	300 V- 500 V- 300 V
染色	0.05% 考马斯亮蓝 R- 50+ 12% 三氯乙酸
保存	7% 冰醋酸

2.3 标准法电泳图谱与简化法电泳图谱结果比较

标准法电泳方法参考颜启传等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(ISTA),简化法电泳见表 2。标准法电泳图谱与简化法电泳图谱结果见图 1,2。由图 1 可



1. 996223 2. 996222 3. 996221 4. 996217 5. 中间偃麦草
6. 烟农 15 7. 991216 8. 996215 9. 996213

图 1 标准法电泳图谱结果 图 2 简化法电泳图谱结果
可以看出,谱带条数较少,谱带清晰度较差,α,β区的谱带有拖尾现象,分辨率较低。图 2 的整个谱带较

清晰, 谱带条数增多, 每个泳道谱带多 2~ 8 条, 特别是 α , β 区的谱带增多变细变直, 分辨率较高。标准法剥较困难、操作较复杂、电泳时间长约 3 h、染色慢约 24 h。而改进法重复性好、用样少、易剥胶、操作简单、经济实用、电泳时间短 1~ 1.5 h、染色快 6~ 10 h、着色力适中不用脱色。

3 讨论

本试验对影响小麦醇溶蛋白电泳的主要因素进行逐一筛选、改进、优化组合, 凝胶溶液由分别配制, 改为混合配制, 以及本试验设计的 NaOH-醋酸-甘氨酸缓冲系统和电泳先低后高再低的电泳方式使小麦醇溶蛋白电泳快速、分辨率较高、重复性好、易剥胶、操作简单、经济实用, 且仪器药品国产化, 使此项技术易于推广使用。尤其是 NaOH-醋酸-甘氨酸缓冲系统使电泳和染色的时间缩短 2 倍多, 且谱带不拖尾较平直, 谱带条数增多, 染色效果好, 易保存; 先低后高再低的电泳程序使同区同亚基的谱带处于同一水平线上, 且使 α , β 区的谱带变细变多, 效果明显, 便于分析研究。至于溶液的配制用去离子水还是用蒸馏水, 有的研究者认为无关紧要, 我们的试验结果表明配制溶液用蒸馏水比用去离子水电泳效果好。

从小麦醇溶蛋白提取到获得稳定的保存图谱, 这一电泳全过程的可变因素很多, 仅就小麦种子醇溶蛋白的提取过程来看, 不仅存在着提取剂的不同, 而且这些提取剂的浓度、提取时间与提取剂量之比亦有差异, 至于凝胶的制备其变化因素则更多, 电极缓冲液、电泳时间、谱带染色和电泳设备的不同均会影响电泳图谱。并且小麦种子醇溶蛋白电泳程序是一个动态平衡, 若一旦打破这种平衡, 将使电泳效果改变很大, 在我们的试验过程中, 也多次证实了这一结论, 所以整个操作过程必须严格控制条件。我们对小麦醇溶蛋白电泳技术只是初步进行了简化研究, 若研究出一项适于我国一般实验室应用的最佳方法仍是今后小麦种子醇溶蛋白电泳技术需要解决的一个重要问题。

参考文献:

[1] Dachkevitch T, Redaelli R, Biancardi A M, *et al.* Ge-

netics of gliadins coded by the group I chromosomes in the high quality bread wheat cultivar Neepawa[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 389- 399.

- [2] Shewry P R, Tatham A S, Forde J, *et al.* The classification and nomenclature of wheat gluten protein: a reassessment[J]. *J Cereal Sci*, 1986, 4: 97- 106.
- [3] Bietz J A. Genetic and biochemical studies of nonenzymatic endosperm proteins[J]. *Wheat and Wheat Improvement - Agronomy Monograph*, 1987, 13, 215- 241.
- [4] Payne P I, Harris P A, Law C N, *et al.* The high-molecular-weight subunits of glutenin: classical genetics, molecular genetics and the relationship to bread-making quality[C]. *Proc 6th Int Wheat Genet Symp*, 1983. 827- 834.
- [5] 陈玉清, 郑有良, 魏育明. 四川小麦主栽品种醇溶蛋白遗传差异分析[J]. *四川农业大学学报*, 1999, 17(3): 254- 260.
- [6] 李平路. 普通小麦- 中间偃麦草(*Elytrigia intermedium*) 双体异附加系的筛选和鉴定研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 1997.
- [7] Draper S R. ISTA Committee Report of the working group for biochemical of test for cultivar identification. 1983- 1986[J]. *Seed Sci and Techno*, 1987, 15: 431- 434.
- [8] 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.
- [9] 马守才, 张改生, 刘宏伟, 等. 多种小麦蛋白质酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳方法研究[J]. *麦类作物学报*, 2000, 20(4): 55- 58.
- [10] 孙新力, 张来群, 孙海虹, 等. 小麦醇溶蛋白酸性电泳条件的探索[J]. *作物学报*, 1999, 25(1): 126- 130.
- [11] 张春秋. 玉米子粒贮藏蛋白组成及特性的研究[J]. *西北植物学报*, 1998, (3): 386- 392.
- [12] 张学勇, 董玉琛. 小麦与彭梯卡偃麦草杂种及其衍生后代的细胞遗传学研究—II. 来自小麦和彭梯卡(长穗)偃麦草及中间偃麦草杂种后代 11 个八倍体小偃麦的比较研究[J]. *遗传学报*, 1994, 21(4): 287- 296.
- [13] 张学勇, 杨欣明. 醇溶蛋白电泳种质资源遗传分析中的应用[J]. *中国农业科学*, 1995, 28(4): 25- 32.
- [14] 杨瑞武, 周永红, 郑有良, 等. 波兰小麦醇溶蛋白遗传差异及其与新疆稻麦的关系[J]. *麦类作物学报*, 2000, 20(4), 1- 5.
- [15] 颜启传, 黄亚军. 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.