

谷蛋白和醇溶蛋白的电泳分析及小麦品种鉴定

王洪新 胡志昂

(中国科学院植物研究所, 北京)

摘 要

应用不同浓度梯度的聚丙烯酰胺凝胶SDS电泳比较分析了18个小麦品种的、用不同提取方法制备的醇溶蛋白和谷蛋白。结果表明, 经1M脲素提取掉多数醇溶蛋白、清蛋白及其它醇溶成分后的小麦样品, 用加有2% SDS和5% β -巯基乙醇的裂解缓冲液提取的高分子量谷蛋白和醇溶蛋白, 在8—12%梯度的SDS胶中显示出良好的分辨率和极大的多态性, 适于小麦品种鉴定。用裂解缓冲液直接提取半粒小麦的全蛋白可用于逐粒品种鉴别。

关键词 电泳分析 小麦品种鉴定

引 言

小麦是世界上最主要和品种最多的作物, 所以在应用电泳方法鉴定作物品种的工作中, 最常报道及方法最多的首推小麦(Cooke, 1984)。早在七十年代中期发现小麦醇溶蛋白经酸性乳酸铝淀粉凝胶电泳表现显著多态性后, 这种方法在欧洲很多国家和澳大利亚至今还广泛继续用于小麦品种鉴定。然而淀粉胶分辨率较低, 有些品质差别较大的品种, 特别是烘烤质量不同的品种之间, 不能借淀粉胶电泳进行区分, 而不得不辅以硬度和酚试验(Wrigley, 1976)。Bushuk和Zillman(1978)和Shewry(1978)分别报道用酸性乳酸盐聚丙烯酰胺凝胶和SDS聚丙烯酰胺凝胶进行小麦醇溶蛋白的电泳分析以鉴定品种。我国张望恩和谢伯泰(1984)报道过用Shewry(1978)方法分析3个小麦品种的醇溶蛋白。虽然用聚丙烯酰胺胶代替淀粉胶可提高分辨率, 但酸性胶的聚合不易控制, 再现性差。Shewry(1978)方法中醇溶蛋白须先进行酰化, 手续复杂。后来不少人报道了小麦全蛋白的单向和双向电泳, 发现醇不溶的谷蛋白有显著的品种专一性, 如Payne等(1981b, 1981c)。其中Galili和Feldman(1983b)应用单向7—12%梯度聚丙烯酰胺凝胶的SDS电泳[以下简称SDS Poro PAGE]分离小麦全蛋白, 达到了极高的分辨率。特别是亚基分子量为50—120千道尔顿(以下简称K)的高分子量醇溶蛋白和谷蛋白在品种间差异显著, 适于品种鉴定和遗传研究。

小麦种子蛋白电泳分析不仅用于品种鉴定, 而且不少研究者正试图揭示种子蛋白组成和小麦品质, 特别是与烘烤质量的关系。

本文报道用各种方法提取小麦醇溶蛋白和谷蛋白, 比较了18个小麦品种的SDS梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳谱。

材料和方法

分析所用小麦品种* 的名称见表1。

表1

分析的小麦品种*

代号	品 种 名 称	代号	品 种 名 称
1	冬协4号	10	7712
2	太原434	11	8022
3	东方红3号	12	348—3
4	丰抗2号	13	丰抗8号
5	丰抗13号	14	京花1号
6	冬协1号	15	农大139
7	宝丰7228	16	农大311
8	百泉792	17	喀什白皮
9	泰山1号	18	新冬2号

* 本文图版说明使用表中代号。1—9系当年收获的种子, 其余种子的收获时间不详。

小麦醇溶蛋白的提取用两种方法。乙醇提取方法基本上参照Bushuk和Zillman (1978) 具体步骤是称取0.5克面粉加2毫升70%乙醇, 室温下振荡提取一小时。2800g离心5分钟, 取上清液加5倍体积冷丙酮沉淀, 在-20℃下放置过夜, 离心后弃去上清液; 离心沉降物用裂解缓冲液(加有2% SDS和5% β -巯基乙醇的62.5mM Tris缓冲液, pH6.8) 0.7毫升悬浮, 100℃加热5分钟, 这是乙醇提取的醇溶蛋白(gliadin)。脲素提取步骤基本上按du Cros和Wrigley (1979) 方法。具体过程是称取50毫克面粉放入1.5毫升塑料离心管, 加0.5毫升1M脲素溶液, 充分混匀后放置过夜。离心上清液即为脲素提取的醇溶蛋白。

小麦种子谷蛋白(glutenin)的制备: 经乙醇提取掉麦醇溶蛋白后的面粉剩余物再用70%乙醇提取一次, 弃去离心上清液以去除剩余的醇溶蛋白, 其沉降物加2毫升裂解缓冲液悬浮, 室温放置过夜, 离心上清液即为麦谷蛋白。用脲素提取过麦醇溶蛋白后的沉降物同样加0.5毫升裂解缓冲液悬浮后, 放置过夜, 离心上清液也为麦谷蛋白。

小麦种子全蛋白的提取也用两种方法, 一是称取50毫克面粉放入1.5毫升塑料离心管中, 加入0.5毫升裂解缓冲液充分混匀, 室温下放置过夜。另一方法是取不带胚的半粒小麦种子, 用克丝钳夹碎后放入1.5毫升塑料离心管, 加入0.5毫升裂解缓冲液后用玻璃棒搅拌, 在室温下放置过夜, 上清液是半个单粒小麦种子的全蛋白。各种提取液或立即电泳或冰箱存放。

梯度SDS Poro PAGE的情况同前报道(胡志昂、王洪新 1986)。

* 表1所列18个小麦品种的种子由中国农科院作物所王光瑞、本所王敬驹、简令成、郝迺斌、林忠平、徐德平等赠送, 一并致谢。

结果和讨论

从18个小麦品种所提各种蛋白组分的SDS Poro PAGE谱见图1至图5。图1是用12—20%浓度梯度胶分辨的70%乙醇提取的小麦蛋白。图两侧为大豆种子蛋白(图中标有S字样),用作分子量标准。根据我们以前发表的结果(胡志昂、王洪新,1986),大豆种子各多肽亚基的分子量:脲酶93k、副大豆球蛋白 α' 亚基83k、 α 亚基76k、 β 亚基56k、大豆球蛋白A₃亚基45k、多数A亚基38k、A₅亚基11k、B亚基22k。从图1可以看出,其中部是70%乙醇提取的主要成分,分子量为38k左右的几个多肽,因含量高而相互重叠。估计这一带即为Cole等(1981)报道的A₄区,是小麦醇溶蛋白最主要的成分:醇溶蛋白 α 。18个品种间没有分子量的差别。由70%乙醇提取的种子蛋白中第二个主要成分是胶下方分子量约13k的多肽,品种间也看不出差别。Cole等(1981)认为是小麦的清蛋白主要成分,他们把10—28k之间称为A₅区。图1中50—70k之间的区域可能相当于Cole等(1981)的A₂和A₃区域,Galili和Feldman(1983)认为它们可能同于Bietz等(1977)指出的高分子量的醇溶蛋白 ω ,当然也可能有些非高分子量的谷蛋白,这部分在图1中含量也是比较高的,且不同品种有显著差别。但因靠近高含量的醇溶蛋白 α ,这种差异不够清晰。含量比较低的分子量大于80k的是高分子量谷蛋白,Cole(1981)称之为A₁区。其最高分子量带和大豆种子128k多肽相近,在图1中品种间差异不明显。从整个图1可以看出,用70%乙醇提取出来的主要成分是小麦醇溶蛋白 α 和清蛋白,还有一些醇溶蛋白 ω 和谷蛋白。设想小麦球蛋白也提取出来了,但因含量少不明显。用1M脲提取的小麦种子蛋白组分和70%乙醇的近似(图略)。因为各品种间醇溶蛋白 α 和清蛋白有类似亚基组成,而大于50k的带虽有不同但分辨较差。因此,用12—20% SDS胶虽可看出小麦种子蛋白的全貌,但不适于小麦品种鉴定。为了使高分子量的多肽分辨得更好,我们改用8—12%浓度梯度的胶。图2、3是用乙醇或1M脲提取掉醇溶蛋白、清蛋白之后用裂解缓冲液提取的蛋白组分的电泳图。胶两侧仍以大豆蛋白为分子量标准。下列几点值得注意:

- 1、蛋白组分里存在的大量亚基在8—12%梯度胶里的确得到很好的分辨。

- 2、比较两个图,可以看出无论什么品种,用两种方法所得电泳谱很一致。表明用70%乙醇提取两次和1M脲素提取一次所余蛋白成分相同。

- 3、除了农大139(15)与农大311(16),喀什白皮(17)和新冬2号(18)俩俩相近外,品种有其特征亚基组成。几次实验之间品种内有很好的重复性。因此,可以用于品种鉴定。

- 4、各个品种间种子蛋白亚基组成的差别主要在两个区域。一是相当大豆蛋白 α' 亚基(83k)到128k多肽之间的高分子量谷蛋白(Galili和Feldman, 1983a)。每个品种一般有4—5个成分,和多数文献一致(如Payne等, 1981b)。二是显示品种间差异的是60—70k之间的区域,每个品种有3—5个成分,可能是高分子量醇溶蛋白。这个区域的多态性虽不如谷蛋白,但对品种鉴定也有价值。例如丰抗13号(5)和冬协1号(6)有相似的高分子量谷蛋白,但高分子量醇溶蛋白亚基组成差别很显著。这个区域也可能是非高分子量的谷蛋白。60k以下各品种间虽有差别,最多是个别带的不同,主要是带强度的差别,这对品种鉴

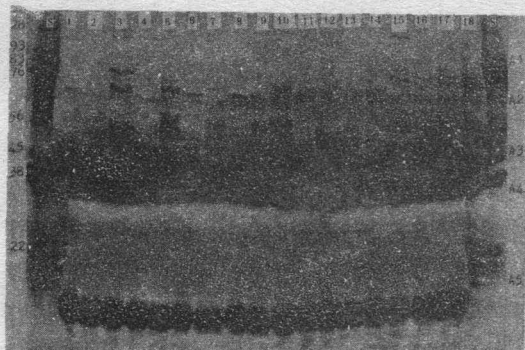


图1. 小麦70%乙醇提取液的12—20%
浓度梯度SDS Poro PAGE谱

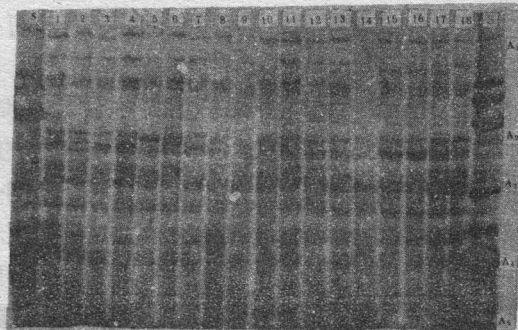


图2. 用乙醇提取掉醇溶蛋白、清蛋白后用裂
解缓冲液提取的小麦蛋白8—12%浓度梯
度SDS Poro PAGE图谱

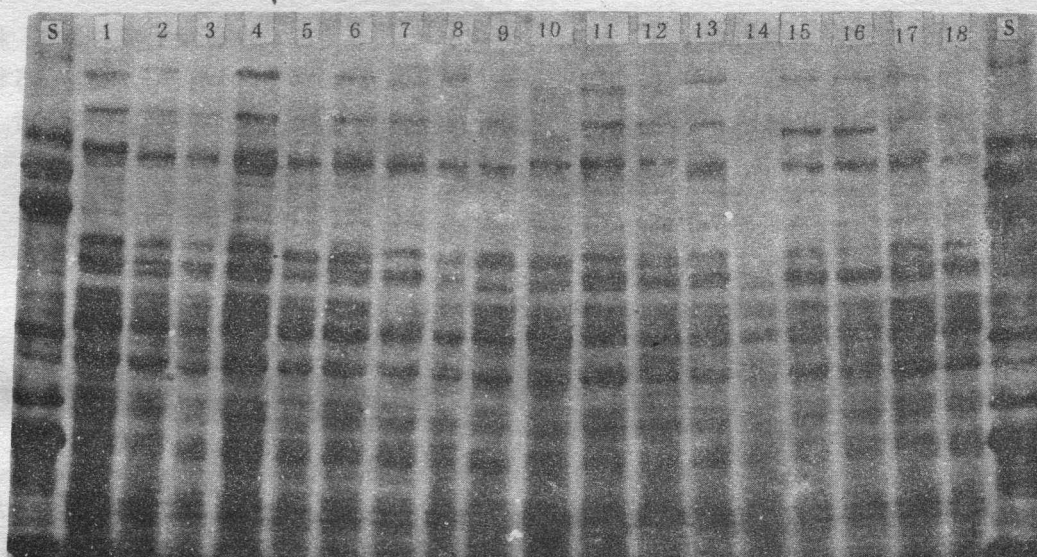


图3. 用1M脲提取掉醇溶蛋白、清蛋白后，用裂解缓冲液提取的小麦蛋白8—12%浓度梯度
SDS Poro PAGE图谱

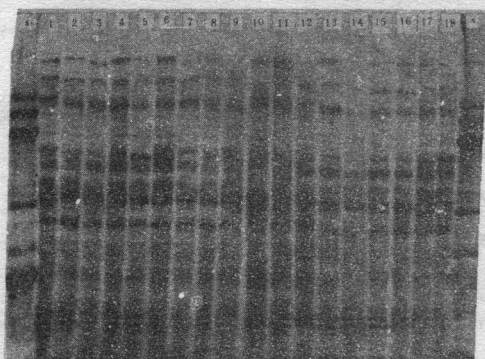


图4. 18个小麦品种小麦粉用裂解缓冲液
提取的全蛋白电泳谱



图5. 用裂解缓冲液直接从小麦半粒谷粒
提取的全蛋白电泳谱

别意义不大。38k以下品种间没有差别。而小于22k的多肽在该电泳系统中走在溴酚蓝染料之前, 不能看到。

图4是18个品种小麦粉用裂解缓冲液提取全蛋白的电泳谱。基本情况和图2、3相似, 但分辨较差, 背景染色较深。基于有相似的蛋白亚基组成, 所以不清晰的原因看来主要不是因为醇溶蛋白和清蛋白含量太多, 更可能是小麦种子里其他醇溶物质的干扰。曾用裂解液直接在研钵里研磨小麦远胚半粒种子, 所得离心上清液的电泳谱很接近图4(图略)。因此, 用8—12%的梯度胶分析小麦种子全蛋白也可以进行品种鉴定, 程序就简单多了。为了进一步简化操作, 我们用克丝钳夹碎小麦籽粒后直接在塑料离心管中用玻璃棒提取全蛋白, 所得上清液的电泳谱见图5。除了丰抗13号(5)和8022(11)因提取不完全而高分子量谷蛋白染色太浅外, 基本情况同图4。看来进一步改进破碎方法, 有实际应用的可能。

在各种提取方法和电泳中, 京花1号小麦(14)的蛋白带染色很浅, 可能是种子衰老的问题。

根据以上结果, 我们认为用8—12% SDS Poro PAGE, 小麦种子的高分子量谷蛋白和醇溶蛋白显示品种间的多态性, 可以用于品种鉴定。种子预先粉碎用1M脲素提取掉醇溶物质后可以得到十分清晰的电泳谱。裂解缓冲液直接提取小麦种子全蛋白可以进行逐粒分析。

参 考 文 献

- [1] 胡志昂、王洪新: 鉴定菜豆品种的电泳方法, 《华北农学报》1986, 1(1), 1—7
- [2] 张望恩、谢伯泰: 小麦醇溶蛋白多肽的SDS凝胶电泳分析, 《西北植物研究》1984, 4(2), 101—106
- [3] Bietz, J. A. et al.: Wheat gliadin homology revealed through N-terminal amino acid sequence analysis. *Cereal Chem.* 1977, 54, 1070—1083
- [4] Burnouf, T. and R. Bouriquet, : Glutenin subunits of genetically related European hexaploid wheat cultivars: their relation to breadmaking quality. *Theor. Appl. Genet.* 1980, 58, 107—111
- [5] Bushuk, W. and Zillman, R. R.: Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can. J. plant Sci.* 1978, 58, 505—515
- [6] Cole, E. W. et al.: Grain protein variability among species of *Triticum* and *Aegilops*: quantitative SDS-PAGE studies. *Theor. Appl. Genet.*, 1981, 60, (1) 17—30
- [7] Cooke, R. J.: The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. *Electrophoresis*. 1984, 5, 59—72
- [8] Du Cros, D. L. and Wrigley, C. W.: Improved electrophoretic methods for identifying cereal varieties. *J. Sci. Food Agric.* 1979, 30, 785—794
- [9] Du Cros, D. L. et al.: Two-dimensional analysis of gliadin proteins associated with quality in durum wheat: chromosomal location of genes for their synthesis. *Theor. Appl. Genet.* 1983, 66, 297—302
- [10] Galili, G. and Feldman, M.: Genetic control of endosperm proteins in wheat. 1. *Theor. Appl. Genet.* 1983, 64, 97—101

THE ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF GLUTENIN AND GLIADIN FOR WHEAT CULTIVAR IDENTIFICATION

Wang Hongxin Hu Zhiang

(Institute of Botany, Academia Sinica Beijing)

ABSTRACT

A comparative electrophoretic analysis of gliadins and glutenins for 18 native chinese cultivars extracted with different methods was made by using different gradient SDS polyacrylamide gel. The results reported here indicated that after removing most of gliadins, albumins and other alcohol-soluble substances by using 1M urea, those HMW (high molecular weight) glutenins and gliadins extracted with lysis buffer containing 2% SDS and 5% β -mercaptoethanol showed a high resolution and considerable polymorphism in an 8-12% gradient polyacrylamide SDS gel. It is considered, therefore, this procedure may be useful in the cultivar identification of wheat. Besides, the total proteins extracted directly from half seed with lysis buffer may be useful for single seed characterization of wheat cultivars.

Key words: electrophoretic analysis, wheat cultivar identification.