

玉米清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳谱带编码 与种子纯度检验

陈景堂¹, 池书敏¹, 马占元², 刘志增¹
魏俊杰¹, 孟义江¹, 宋占权³, 祝丽英¹

(1 河北农业大学 农学院, 河北 保定 071001; 2 河北省农林科学院, 河北 石家庄 050051;
3 保定师范专科学校, 河北 保定 071051)

摘要: 利用改进的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对 20 个玉米自交系和 13 个杂交种清蛋白进行了电泳分析, 并对电泳谱带进行了四位数编码。电泳图根据谱带迁移情况分为 A、B、C 3 个带区, 将 A 区和 B 区之间所有试验材料都有的迁移率为 0.50 的一条谱带编码为 5012; 各自交系和杂交种电泳图均有其鲜明特征, 编码各不相同, 彼此能够区别; 亲本自交系 A 区和 B 区的不同谱带在杂交种 F₁ 发生互补, 杂交种的谱带编码等于双亲自交系共同谱带编码与各自独有谱带编码的叠加; 通过双亲自交系的清蛋白电泳谱带编码可以预测杂交种电泳谱带类型。

关键词: 玉米; 清蛋白; 聚丙烯酰胺; 谱带编码; 种子纯度

中图分类号: S513.01 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2000)增刊- 0020- 06

玉米种子清蛋白是玉米 4 种主要蛋白质成分之一, 遗传背景不同的玉米材料, 通过电泳分析, 将显示出不同的蛋白谱带, 谱带的差异在一定程度上反映出基因型的差异, 分析同一杂交种或自交系不同子粒的清蛋白谱带, 可以看出个体间是否存在遗传上的分歧, 从而便检验了纯度。利用蛋白质电泳技术鉴定玉米种子纯度的研究已有报道^[1~4]。但对蛋白质电泳谱带数据化处理还没有统一的方法, 不利于蛋白谱带数据库的建立和检索。张建华等(1996)对玉米过氧化物酶谱进行了编码研究^[5], 李志西等(1990)采用参照品种命名法对 33 个小麦品种醇溶蛋白谱带进行了编号命名, 并制出了检索表^[6], Lookhart (1983) 和 Sapirstein 等(1985)分别对美国 and 加拿大的小麦品种蛋白质电泳谱带的位置、强度等级输入计算机, 每个待测品种的电泳图谱由计算机进行比较^[7,8]。本研究的目的是通过对玉米种子清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳谱带进行数据化编码, 以达到便于谱带比较、描述、数据库建立和计算机管理。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本试验选用的玉米自交系均来自河北省种子公司, 根据试验需要配制了 13 个生产上应用的同名杂交种 (表 1)。

收稿日期: 2000- 08- 09

基金项目: 河北省农业厅资助(冀农科 9716)

作者简介: 陈景堂(1967-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事玉米遗传育种学的研究工作。

表 1 试验材料

自交系		杂交种				
478	488	H21	冀 815	掖单 22 (488× H21)	冀单 31 (冀 815× 冀 35)	冀单 29 (冀 53× 8112)
冀 35	冀 53	8112	选 34	植抗 4 (选 34× 八苏)	石 92- 1 (京 7× 79038)	京黄 417 (黄早 4× Mo17)
八苏	京 7	79038	黄早 4	唐抗 5 (黄野四× 获唐黄)	京单 931 (478× 京 404)	西玉 3 (478× 502)
Mo17	黄野四	获唐黄	京 404	掖单 19 (478× 52106)	掖单 12 (478× 81515)	掖单 13 (478× 丹 340)
502	52106	81515	丹 340	太合一 (8112× 丹 340)		

1.2 样品提取

种子清蛋白电泳分析采用单粒种子操作, 将单粒玉米种子用单粒种子磨样器磨碎后, 放入离心管中, 加样品提取液(15% 蔗糖+ 0.01% 甲基绿) 室温浸提 0.5 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液备用。

1.3 电泳

本研究室改进的聚丙烯酰胺凝胶电泳利用北京六一仪器厂生产的 DYY-III₄ 型稳压稳流高压电泳仪和 DYY-III_{5A} 型单夹芯电泳槽, 采用乳酸-乳酸钠缓冲系统和 TEMED-过硫酸胺聚合催化系统, 分离胶浓度 13.8%, 浓缩胶浓度 4.9%。取备用的清蛋白样品提取液 16 μL 加样, 电泳初始电压 300~350 V, 10~15 min 后将电压逐渐升至 500 V, 在 500 V 电压下稳压电泳 40~45 min。电泳全过程在室温下进行。

1.4 染色

电泳后固定染色(0.01% 考马斯亮兰 R250+ 10% 三氯乙酸) 5 min 以后即可观察谱带, 30 min 后即可进行统计。用自来水浸泡脱色后拍照。

2 结果与分析

2.1 电泳图谱分析

通过对电泳图谱分析发现, 所有供试材料都有一条公共带, 其迁移率 R_f 值为 0.50, 是一条十分保守的标志带, 染色稍浅但很宽, 它的位置却十分固定, 总是处于整个图谱的中间, 即便有的胶版看不清前沿指示剂的位置, 只要通过测量它的迁移距离便可知前沿批示剂的位置, 其对于计算各条带的迁移率很有帮助。根据谱带在电泳图上的分布, 将整个电泳图分为 A、B、C 3 个区, 其中 A 区为主带区, 谱带多, 普遍染色较深, 界限清晰可辨, 是区分不同玉米材料的主要区域; B 区为次带区, 谱带较少, 且有一至两条公共带(R_f 值为 0.55 和 0.60 的带), 但在 A 区无法区别的情况下, 可借助 B 区加以区别; C 区为附带区, 谱带普遍染色浅且界限模糊, 在品种鉴定中只能作为参考(图 1)。

2.2 玉米种子清蛋白电泳谱带编码

一个好的图谱数据化处理办法至少应反映谱带的一些基本特征, 如谱带的位置和清晰度

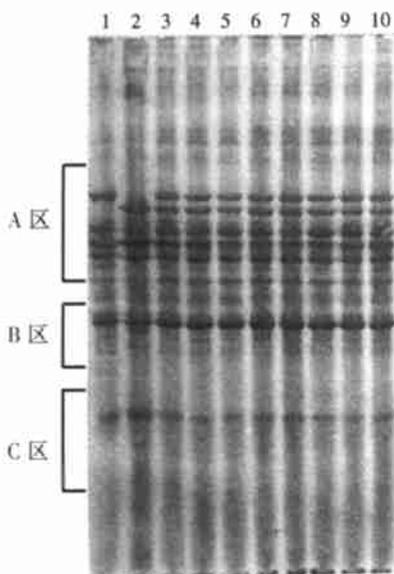


图1 冀单29及其母本冀53、父本8112的清蛋白电泳图

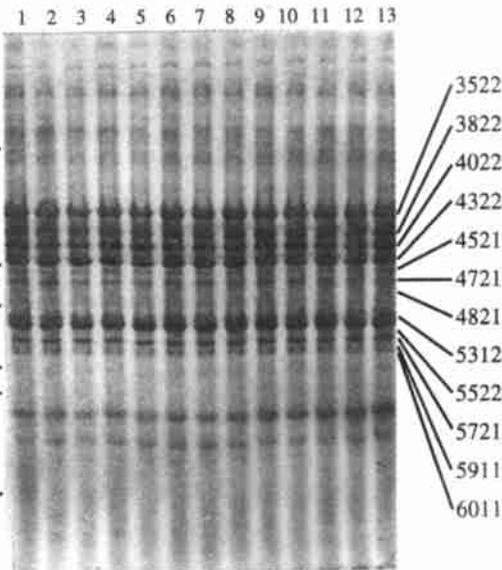


图3 自交系冀815的清蛋白电泳图谱及谱带编码

(染色的深浅和带的宽窄等)，带的位置通过迁移率 Rf 值(某条带的实际迁移距离与前沿指示剂迁移距离之比)来衡量。谱带的清晰度与谱带的染色深浅及宽度有关，本试验对谱带的清晰度的数据处理采用两位数制，第1位数表示谱带染色的深浅，其中“1”代表浅色带，“2”代表深色带；第2位数表示谱带的宽窄，“1”代表窄带，“2”代表宽带；那么“11”代表浅色窄带、“12”代表浅色宽带、“21”代表深色窄带、“22”代表深色宽带，如图2所示。



图2 玉米种子清蛋白电泳谱带清晰度命名示意图

本研究对清蛋白电泳谱带的编码采用四位数，所有谱带按照从正极到负极的顺序编码。图谱中各谱带的 Rf 值采用四舍五入的方法取小数点后的两位数，也就是取 Rf 值小数点后的两位数作为某条带编码的前两位数，表示谱带所在的位置，第3, 4位数表示谱带的清晰度，其中第3位数表示该谱带染色的深浅，第4位数表示该谱带的宽窄。例如自交系冀815(图3)的电泳图A区和B区共有13条谱带，它们的迁移率 Rf 依次为：0.35, 0.38, 0.40, 0.43, 0.45, 0.47, 0.48, 0.50, 0.53, 0.55, 0.57, 0.59, 0.60，谱带的清晰度依次为22, 22, 22, 22, 21, 21, 11, 12, 12, 22, 21, 11, 11。那么第1条谱带的数码就是3522，第2条是3822，依此类推，其整个图谱的编码为3522, 3822, 4022, 4322, 4521, 4721, 4811, 5012, 5312, 5522, 5721, 5911, 6011，这样编码的四位数组数为该品种的蛋白谱带条数。根据这一编码序列，反过来又可恢复图谱原形，还有利于建立品种的谱带数据库，便于种子鉴别和微机处理。

根据上述谱带编码原则，除了对自交系冀815(图3)、冀35(图4)和杂交种冀单31(图5)进行了编码外，还对另外12个杂交种和18个自交系进行了谱带编码(表2;表3)。参试的20

个自交系共分离出 228 条清蛋白谱带，平均每个自交系分离出 11.4 条谱带；13 个杂交种共分离出 175 条清蛋白谱带，平均每个杂交种分离出 13.5 条，平均 1 个杂交种比自交系多 2 条带，说明杂交种的遗传相对于自交系要复杂，主要由于杂交种受到父母本双亲共同的遗传影响。玉米种子清蛋白电泳谱带编码随品种不同而不同，具有明显的特异性。在试验的 20 个玉米自交系和 13 个杂交种的种子清蛋白电泳谱带编码中，没有编码完全相同的品种，这种特异性为玉米种子纯度检验奠定了基础。

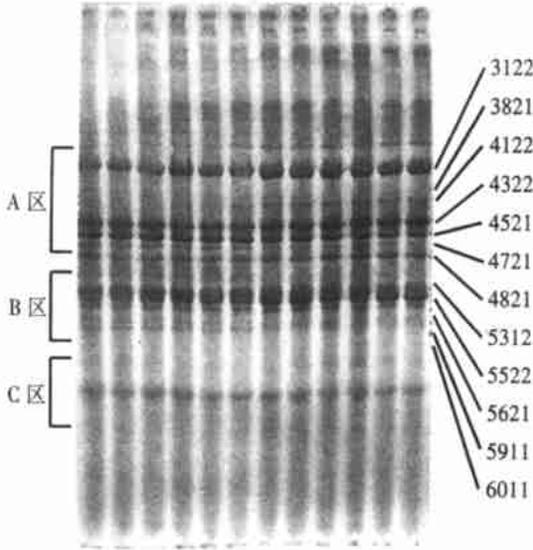


图 4 自交系冀 35 的清蛋白电泳图谱及谱带编码

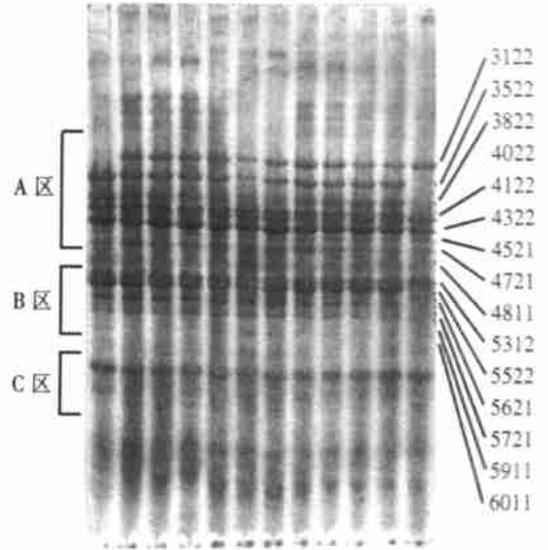


图 5 杂交种冀单 31 及其母本冀 815、父本冀 35 的清蛋白电泳图谱和冀单 31 谱带编码

表 2 20 个玉米自交系种子清蛋白电泳谱带编码(A 区和 B 区)

自交系名称	谱带条数	编 码												
478	10	3122	3822	4122	4322	4721	5012	5312	5522	5721	6011			
488	11	3522	3922	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5721	6011		
H21	11	3122	3922	4222	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5621	6011		
冀 815	13	3522	3822	4022	4322	4521	4721	4811	5012	5312	5522	5721	5911	6011
冀 35	13	3122	3821	4122	4322	4521	4721	4811	5012	5312	5522	5621	5911	6011
冀 53	12	3122	3822	4022	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5821	5911	6011	
8112	12	3322	3822	4022	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5721	5911	6011	
选 34	12	3222	3922	4222	4422	4622	4711	5012	5312	5522	5621	5911	6011	
八苏	12	3122	3922	4222	4422	4622	4811	5012	5312	5522	5621	5721	6011	
京 7	10	3222	4222	4422	4622	4721	5012	5312	5522	5621	6011			
79038	10	3922	4022	4422	4622	4721	5012	5312	5522	5711	6011			
黄早 4	12	3122	3612	4121	4422	4511	4721	5012	5312	5522	5711	5821	6011	
M017	12	3222	3612	3922	4422	4511	4721	5012	5312	5522	5611	5821	6011	
黄野 4	12	3322	3711	3811	4022	4322	4511	4611	5012	5312	5522	5611	6011	
获唐黄	11	3322	3822	4022	4322	4511	4611	5012	5312	5522	5721	6011		
京 404	9	3822	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5622	6011				
502	11	3122	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5611	5721	6011		
52106	12	3322	3822	4122	4322	4611	4721	5012	5312	5522	5611	5721	6011	
81515	12	3022	3822	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5611	5721	6011	
丹 340	11	3222	3822	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5721	6011		

表 3 13个常用玉米杂交种清蛋白电泳谱带编码(A区和B区)

杂交种名称	谱带条数	编 码															
掖单 22	14	3122	3522	3922	4122	4222	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5621	5721	6011		
冀单 31	16	3122	3522	3822	4022	4122	4322	4521	4721	4811	5012	5312	5522	5621	5721	5911	6011
冀单 29	14	3122	3322	3822	4022	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5721	5821	5911	6011		
植抗 4	14	3122	3222	3922	4222	4422	4622	4811	5012	5312	5522	5621	5721	5911	6011		
石 92-1	13	3222	3922	4022	4222	4422	4622	4721	5012	5312	5522	5621	5711	6011			
京黄 417	15	3122	3222	3612	3922	4121	4422	4511	4721	5012	5312	5522	5611	5711	5821	6011	
唐抗 5	13	3322	3711	3822	4022	4322	4511	4611	5012	5312	5522	5611	5721	6011			
京单 931	12	3122	3822	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5622	5721	6011				
西玉 3	12	3122	3822	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5611	5721	6011				
掖单 19	13	3122	3322	3822	4122	4322	4611	4721	5012	5312	5522	5611	5721	6011			
掖单 12	13	3022	3122	3822	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5611	5721	6011			
掖单 13	12	3122	3222	3822	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5721	6011				
太合一	14	3222	3322	3822	4022	4122	4322	4511	4721	5012	5312	5522	5721	5911	6011		

玉米种子纯度主要受母本去雄不及时或不干净形成母本自交粒或是混入父本种子的影响,因此区别杂交种与自交系间种子清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳谱带的差异便可以鉴别出杂交种子中混有的自交系子粒。

3 讨论

玉米种子蛋白质与同工酶相比具有本身的特点,即不要求严格的低温(4℃)条件,所以进行玉米种子纯度检验时,只要注意样品中清蛋白的浓度要尽可能一致,就可使不同批次材料具有可比性。因为玉米子粒大小不一,要使样品中清蛋白浓度相同,在试验时尽量做到提取液与子粒按照一定的体积/重量比进行。由于在实际应用时,大都整粒操作,进行谱带比较时主要观察谱带的有无,而对谱带的清晰度(带的染色深浅和宽窄)往往被忽略不记,所以利用本试验的谱带代码时,应主要参考编码的前两位数,即它的迁移率 R_f 值。

本研究进行玉米杂交种电泳时,在同一胶版上也同时加入父本和母本的样品进行比较(图1,图5),这样做具有一定的实际意义,因为它为我们提供了改进的电泳技术能否将杂交种与亲本鉴别开来的信息。鉴别杂交种与亲本(主要是母本)主要靠互补带,因为他们直接从父本和母本遗传而来,是鉴别杂交种和亲本自交系的主要依据。对13个杂交种标准图谱的分析表明,都能借助于互补带将杂交种 F_1 与父本、母本一一区别开,如杂交种冀单31标准图谱(图5),来自父本冀35的3122,4122,5621带可将冀单31与母本冀815区别开;而来自母本冀815的3522,4022,5721带可将冀单31与父本冀35区别开。同理,杂交种冀单29有来自父本8112的3322,5721带可将杂交种与母本冀53区分开;而来自母本冀53的3122,5821带有助于将杂交种和父本区别开。

参考文献:

- [1] 周展明,卞科,王春,等.玉米蛋白PAGE法鉴定玉米品种及纯度[J].郑州粮食学院学报,1992,

(3): 23– 28.

- [2] 张春庆, 金锡奎, 郑成超. NAU- PAGE 技术与玉米种子纯度测定[J]. 中国农业科学, 1995, 28(6) : 20– 24.
- [3] 王景升, 王 玺, 刘国奇, 等. 电泳谱带法在作物品种纯度鉴定上的应用研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1996, 27(3) : 221– 225.
- [4] 宋同明, 郑大浩, 刘 岩. 利用玉米种子清蛋白和球蛋白乳酸聚丙烯酰胺电泳鉴定品种[J]. 植物学报, 1996, 38(8) : 599– 604.
- [5] 张建华, 郭庆法, 李 霞, 等. 玉米过氧化物酶酶谱编码与品种鉴别[J]. 作物学报, 1996, 22(30) : 251– 253.
- [6] 李志西, 黄先纬, 杨福伟, 等. 醇溶蛋白凝胶电泳方法在作物品种鉴定中的应用[J]. 西北农业大学学报, 1990, 18(增刊) : 93– 101.
- [7] Lookhart G L, Jones B L, Walker D E, *et al.* Computer-assisted method for identifying wheat cultivars from their gliadin electrophoregrams[J]. Cereal Chem, 1983, 60: 111– 115.
- [8] Sapirstein H D, Bushuk W. Computer-aimed analysis of gliadin electrophoregrams: 1. Improvement of precision of relative mobility determination by using a three reference band standardization[J]. Cereal Chem, 1985, 62: 372– 377.

Polyacrylamide Gel Electrophoretic Band Coding of Maize Albumin and Purity Test of Seed

CHEN Jing-tang¹, CHI Shu-min¹, MA Zhan-yuan², LIU Zhi-zeng¹
WEI Jun-jie¹, MENG Yi-jiang¹, SONG Zhan-quan³, ZHU Li-ying¹

(1 Department of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2 Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China;

3 Baoding Teachers College, Baoding 071051, China)

Abstract: Electrophoretic analysis were made on the albumins of 20 inbred lines and 13 hybrids of maize by improved polyacrylamide gel electrophoresis technique, and the electrophoretic bands were coded by four numbers. According to the mobilities, the electrophoretograms were divided into three zones: A, B and C. Lying between A, B zones, the common band with a mobility of 0.50 was coded 5012. The electrophoretograms of the inbred lines and the hybrids had their own manifest characteristics and different codings, and they could be differentiated from each other. The different bands of parent inbred lines were complementary in hybrid F₁ in A and B zones. The common band codings of the parents inbreds and their own band codings made up that of their hybrids. The bands of hybrids could be predicted using that of their parents inbreds.

Key words: Maize; Albumin; PAGE; Band coding; Seed purity