

适用于小麦品质育种的一种 A-PAGE 方法

高崇婧^{1,2}, 张延滨^{1,2}, 李集临¹, 姜焕焕^{1,2}, 赵海滨², 宋庆杰², 于海洋², 张春利², 辛文利², 肖志敏²
(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 黑龙江省农业科学院 作物育种研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为育种需要大批量地分析 5+10 亚基龙麦 19 中对小麦品质有较大影响的醇溶蛋白块品系, 利用双板夹芯式垂直槽, 凝胶面积为 182 mm(宽)×95 mm(高), 分离胶浓度为 6%, 以甲酸为缓冲体系的不连续的酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(A-PAGE)来鉴定该醇溶蛋白块。结果表明:该系统可以较好地鉴定该醇溶蛋白块, 具有简便、经济、高效、重复性好等特点, 是适合于小麦育种过程中快速大量鉴定需要的一种 A-PAGE 电泳方法。

关键词:小麦; 品质; 醇溶蛋白; 近等基因系; A-PAGE

中图分类号:S512 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2010)010-0001-03

小麦胚乳贮藏蛋白主要由麦谷蛋白(Glutenins)和醇溶蛋白(Gliadins)组成, 研究表明它们对小麦烘烤品质具有重要作用^[1-3]。在单向 A-PAGE 条件下, 一个品种可分离出 15~30 个组分, 而在双向电泳下可分离出多达 50 个的组分^[1,4]。醇溶蛋白在小麦品种间存在明显差异, 其电泳谱带的多少及组合方式受基因型控制, 几乎不受环境的影响, 因此被称为品种的指纹^[5], 广泛应用在品种登记注册、遗传标记育种等研究领域^[6-7]。

Metakovsky 等发现一些醇溶蛋白组份(可多达 9 个)表现共同遗传的特点, 杂交世代的分离象一个孟德尔性状, 由共显性等位基因控制, 称为醇溶蛋白遗传块(gliadin block)^[8]。每一醇溶蛋白位点控制一组共同遗传的组份(gliadin block)合成, 同一位点内的基因间极少发生重组。目前已在普通小麦中鉴定和命名了 100 多个醇溶蛋白等位基因^[9]。

小麦品种龙麦 19(L-19), HMW-GS 为 2*, 7+9, 2+12, 是黑龙江省农业科学院作物育种研究所 1994 年在黑龙江省推广的小麦品种, 由于该品种不含 5+10 亚基, 1995 年利用 L-19 为 5+10

亚基受体和轮回亲本, 以加拿大小麦品种 Marquis 为 5+10 亚基供体, 通过 6 次回交然后自交的方法在 2000 年获得了带有 5+10 亚基的 L-19 回交 6 代的品系 L-19-D613(2*, 7+9, 5+10)和 L-19-D626(2*, 7+9, 5+10)。2002 年吕晓波^[10]在龙麦 19 的 HMW-GS 近等基因系的研究中发现, L-19-D613 除 5+10 亚基外其它电泳谱带均与 L-19 相同。而 L-19-D626 比其姊妹系 L-19-D613 多出 3 条来源于 Marquis 的醇溶蛋白谱带, 初步判定 L-19-D613 和 L-19-D626 是一对醇溶蛋白近等基因系, 通过对该近等基因系的品质分析, 发现这 3 条醇溶蛋白特异谱带对很多品质参数的作用为负向效应。

任梓源等^[11]在后来的研究中发现, 这 3 条特异醇溶蛋白谱带是一个紧密连锁遗传的醇溶蛋白块, 并且进一步证实了该醇溶蛋白块的存在对小麦多项加工品质具有负向的遗传学效应。为在育种过程中淘汰类似劣质醇溶蛋白基因, 需要一种适合于小麦育种大量鉴定工作的 A-PAGE 电泳方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试小麦品种为龙麦 19(L-19)及龙麦 19 回交 6 代的 5+10 亚基品系 L-19-D613(2*, 7+9, 5+10)和 L-19-D626(2*, 7+9, 5+10), 对照品种为 Marquis。

试验所用仪器为 DYY-III 6C 型电泳仪(北京

收稿日期:2010-08-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871525)

第一作者简介:高崇婧(1983-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 在读硕士, 从事小麦品质育种研究。

通讯作者:张延滨(1957-), 男, 硕士, 研究员, 从事小麦品质遗传及育种研究。E-mail:yanbin_zhang@163.com。

六一仪器厂)、DYCZ-30 型双板夹芯式垂直电泳槽(北京六一仪器厂)、德国 Eppendorf 5424 型离心机、pH 计(上海精密科学仪器有限公司 PHSJ-3F 实验室)。凝胶面积为 182 mm(宽)×95 mm(高);样品梳为 52 齿,厚 1.5 mm。

1.2 方法

醇溶蛋白 A-PAGE 方法参照张延滨等的方法^[12],分离胶浓度(T)改为 6%。正负电极缓冲液分别为 0.2% 和 0.1% 的甲酸(88%, v/v)各 900 mL。浓缩胶每板电流 28 mA,分离胶每板电流 65 mA,电泳时间约 2 h,需冷凝回流。

2 结果与分析

电泳结果见图 1。可知,龙麦 19(L-19)与 L-19-D613 的电泳谱带是相同的。其中线形标记所指示的 3 个条带即为 L-19-D626 中多出的 3 条来自其 5+10 亚基供体品种 Marquis 的醇溶蛋白块。由此可以清楚地看到 L-19-D626 与 L-19 和 L-19-D613 的醇溶蛋白谱带相比多出 3 条,这 3 条谱带与其 5+10 亚基供体 Marquis 的 3 条谱带具有相同的迁移率,表明这 3 条谱带来自于其 5+10 亚基供体 Marquis。

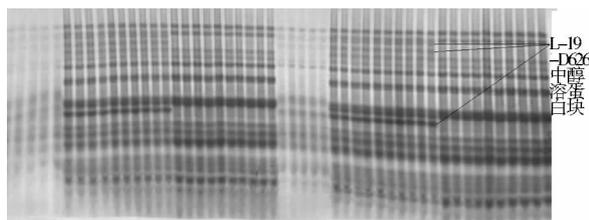


图 1 L-19-D613 和 L-19-D626 近等基因系 A-PAGE 图谱
点样顺序从左至右依次为 Marquis(1~5 泳道,26~30 泳道),
L-19-D626(6~15 泳道,31~40 泳道),L-19-D613(16~25 泳道)
以及 L-19(41~50 泳道)

以往的 A-PAGE 研究过程中,通常利用北京六一厂 DYCZ-28B 型单板夹芯式垂直槽,凝胶面积为 125 mm(宽)×200 mm(高),一次电泳最多只能分析 15 个样品,虽然该电泳系统凝胶面积较大,分析效果好,但不能满足常规育种计划中需要大量分析样品的要求,尤其是不能适应在秋季收获后到冬季温室加代或异地加代和冬季温室或异地加代后到春播这一短暂的时间内大量分析样品的要求。

该方法可在一个电泳槽中分析鉴定 104 个小

麦品种是否带有 L-19-D626 中对小麦品质有较大影响的醇溶蛋白谱带,有利于小麦育种过程中大批量地鉴定不同株系的醇溶蛋白构成。由于凝胶高度为 95 mm,所以电泳时间相对较短。而且单个样品所需的凝胶面积和缓冲液用量只有 DY-CZ-28B 型 125 mm(宽)×200 mm(高)的凝胶板的 1/5 和 1/7。可以节省制胶及染色过程中试剂的用量,大大地降低电泳分析所需的成本。

3 结论与讨论

由于影响醇溶蛋白电泳的因素很多,比如电泳槽、蛋白提取方法、药品来源及纯度、凝胶配方和电极缓冲液等^[5,12-18]。而且不同的方法在实验室条件要求、试验成本、不同区段谱带的分辨率等方面各有优点,因此不同的研究单位有不同的醇溶蛋白电泳方法。该试验方法源自傅宾孝的方法^[15],经研究组改进后^[12]配制更方便,图谱和分辨率与 Bushuk^[13]的更加接近。将原来的凝胶浓度由 5% 改为 6%,以增加凝胶的强度。

该方法对试剂要求不高,种类较少,价格低廉,配制方便,操作方法简单,重复性好。由于采用的是不连续的凝胶系统,谱带平直且较窄,因此在较短的(95 mm 高)凝胶板上仍有较高的分辨率。可以很容易地鉴定 5+10 亚基龙麦 19 中对品质有负向影响的醇溶蛋白块,表明该系统可用于一些特殊醇溶蛋白块的鉴定。而且电泳时每个点样孔所需的样品点样量少,仅需 2~3 μ L,基于这一特点,在籽粒样品的提取过程中仅需小半粒籽粒即可满足多次 A-PAGE 的分析鉴定。特别适合利用“半粒法”进行蛋白的分析要求。尤其是在蛋白亚基转育的回交时,杂种种子或回交种子一般都很小,此方法更具有优越性。

参考文献:

- [1] Payne P I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1987, 38:141-153.
- [2] Payne P I, Nightingale M A, Krattiger A F, et al. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1987, 40(1):51-65.
- [3] Metakovsky E V, Branlard G, Chemakov VM, et al. Recom-

- biination mapping of some chromosome 1A-, 1B-, 1D-and 6B-controlled gliadins and low molecular weight glutenin subunits in common wheat[J]. Theoretical Applied Genetics, 1997, 94: 788-795.
- [4] Gianibelli M C, Larroque O R, Macritchie F, et al. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat endosperm proteins[M]. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists Press, 2001.
- [5] Draper S R. ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983~1986[J]. Seed and Sci. Technol, 1987, 15: 431-434.
- [6] Gupta B R. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci. Glu-1, Glu-2, Glu-3 and Gli-1 of common wheat. L. Its additive and interaction effect on dough properties[J]. J. Cereal Sci. , 1994, 19: 9-17.
- [7] Erry K W. A catalog of biochemical fingerprints of registered canadian wheat cultivars by electrophoresis and high-performance liquid chromatography [M]. Manitoba, Canada: Food Sci. Dept. , University of Manitoba, 1998.
- [8] Metakovsky E V. Blocks of gliadin components in winter wheat detected by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Theor Appl Genet, 1984, 67: 559-568.
- [9] Metakovsky E V. Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat[J]. Genet and Breed, 1991, 45: 325-344.
- [10] 吕晓波. 小麦近等基因系 HMW-GS 2+12 和 5+10 对蛋白组分和品质的效应[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004.
- [11] 任梓源. 生产密度下 5+10 亚基在小麦品种中的遗传效应及 Mx 醇溶蛋白块对小麦品质的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2009.
- [12] 张延滨, 祁适雨, 肖志敏, 等. 不连续麦醇溶蛋白酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(APAGE)的研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1997, 13(6): 70-73.
- [13] Bushuk W, Zillman R R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregram I, Can[J]. J. Plant Sci. , 1978, 58: 506-515.
- [14] 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方法[J]. 种子, 1989(6): 55-57.
- [15] 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.
- [16] 阎旭东, 卢少源, 李宗智. 适用于我国小麦醇溶蛋白分析的 APAGE 方法[J]. 河北农业大学学报, 1994, 17(1): 7-10.
- [17] 孙新立, 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): 126-129.
- [18] 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.

An A-PAGE Method Applied for Quality Breeding of Wheat

GAO Chong-jing¹, ZHANG Yan-bin^{1,2}, LI Ji-lin¹, JIANG Huan-huan^{1,2}, ZHAO Hai-bin²,
SONG Qing-jie², YU Hai-yang², ZHANG Chun-li², XIN Wen-li², XIAO Zhi-min²

(1. Life Science and Technology College of Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025; 2. Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Due to breeding requirements, large quantities of gliadin block lines of Longmai 19 were needed to be identified. The gliadin block came from its donor cultivar Marquis and had great influence on the quality of wheat. In this study, a discontinuous acidic polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE) was developed. Beijing 61 Factory DYCZ-30 dual vertical sandwich board slot was used because it could analyse 104 samples of wheat one time. The gel area was 182 mm(width) × 95 mm(height). The buffer system was formic acid and the separating gel concentration was 6%. The results showed that this A-PAGE system could better identify some specific gliadin blocks. It was featured for simple, economical, efficient and well repeatable. It is suitable for rapidly identifying large numbers of gliadin blocks in the process of wheat breeding.

Key words: wheat; quality; gliadin; near-isogenic lines (NILs); A-PAGE