

# 小麦 Waxy 蛋白亚基缺失类型鉴定方法的研究<sup>\*</sup>

张红骥<sup>1</sup>, 吕晓波<sup>2</sup>, 于德才<sup>3</sup>

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农科院生物技术中心, 哈尔滨 150086; 3. 农业部脱毒马铃薯质量监督检验测试中心, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 建立适于我省面条专用小麦育种研究上应用的 Waxy 蛋白亚基缺失类型的鉴定技术; 以改良十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(1-D-SDS-PAGE)为基础, 分析凝胶性质、试验试剂、试验条件对电泳结果的影响, 获得高效低成本、分辨效果佳、重复性好的鉴定方法。

**关键词:** 小麦; 电泳; Waxy 蛋白

中图分类号: S 512.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2004)06-0008-02

## Studying on the Judging Technique of the Wheat Waxy Protein Sub-unites Deleting

ZHANG Hong-ji<sup>1</sup>, LI Xiao-bo<sup>2</sup>, YU De-cai<sup>3</sup>

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 3. Supervision and Testing Center for Virus-Free Seed Potatoes Quality, Ministry of Agriculture, Harbin 150086)

**Abstract:** Selecting by sifting and establishing the judging technique of Waxy protein sub-unites deletion Which is used for noodle wheat breeding in Heilongjiang province. The experiment is based on improved 1-D-SDS-PAGE method. Analysing electrophoresis results which are effected by glue properties, experimental reagents and experimental conditions, and selecting a suitable judging way which is high efficiency but low cost, high segregation and good repetition.

**Key words:** wheat; electrophoresis; Waxy protein

小麦 Waxy 蛋白包括三个作用相同而分子量相差很小的亚基。即 Wx-A1 亚基、Wx-B1 亚基和 Wx-D1 亚基存在于花粉和胚乳的淀粉粒中。一般利用电泳、PCR 和抗血清等技术分离 Waxy 蛋白的三种亚基。目前, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(1-D-SDS-PAGE)应用的较多<sup>[1]</sup>。Schofield 等(1988)<sup>[2]</sup>利用 SDS-PAGE 电泳技术在分析小麦淀粉粒的蛋白过程中鉴定出 Waxy 蛋白, 分子量为 59KD。Nakamura 等(1992)<sup>[3]</sup>应用单向 SDS-PAGE 技术将小麦蜡质蛋白分成移动能力有较小差异的两组成分。进一步通过双向电泳(IEF 加 SDS-PAGE)将三个亚基蛋白区别开, 分子量接

近 61KD。这种电泳技术过程复杂, 且分离效果不够理想。Zhao 和 Sharp(1996)采用改良 1-D-SDS-PAGE 电泳技术, 用半粒种子一步就可以区分出 Wx-A1 亚基, Wx-B1 亚基和 Wx-D1 亚基, 分子量分别为 62.8KD、56.7KD 和 58.7KD, 为该技术在育种上的应用奠定了基础。但因 Wx-B1 亚基和 Wx-D1 亚基的分子量接近, 受仪器、药品、水质和实验技术及条件等影响, 有时利用 Zhao 和 Sharp 的技术也不能将 Wx-B1 亚基和 Wx-D1 亚基完全区分开。如姚大年等(1999)研究我国小麦 Waxy 蛋白类型未能把 B、D 亚基完全区分开, 但可根据蛋白带的位置和宽度分辨不同类型。为使该技术早日

\* 收稿日期: 2004-05-09

基金项目: 留学回国基金项目(LC01C01)

第一作者简介: 张红骥(1978-), 女, 黑龙江省绥化市人, 硕士, 从事微生物应用研究。

在我省小麦育种中应用,我们进行了深入研究,以建立适于我省面条麦育种研究上应用的 Waxy 蛋白亚基类型的鉴定技术。

1 材料与方法

1.1 材料

黑龙江省主栽品种和有望品系 10 份:龙麦 26、19、15、12,克丰 3 号,新克旱 9 号,4081,龙辐 10 号,0657,垦红 14。2002 年入选品系 63 份, F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>、F<sub>4</sub> 和花培纯系材料共 356 份;澳大利亚面条麦材料 3 份: Eradu 和 Hartog (W<sub>x</sub>-B1 亚基缺失), Eujiu-mikomugi (W<sub>x</sub>-A1 亚基缺失), 中国春 (CK)。

1.2 方法

1.2.1 提取方法 ①将半粒远胚端种子砸碎置 5 mL 离心管加入 1 mL 无离子水 4 mL 过夜。②将表皮面粉等杂质用牙签剔出,电动摇床上混匀震荡 5 min, 10 000 r/min 离心 3 min, 去上清。③加 1 mL 洗液混匀震荡, 13 000 r/min 离心 3 min, 去上清, 重复 3 次。④加 1 mL 水混匀震荡 5 min, 13 000 r/min 离心 4 min, 去上清, 重复 2 次。⑤加 1 mL 丙酮混匀震荡 5 min, 13 000 r/min 离心 4 min, 去上清, 沉淀物干燥过夜, 得到提纯淀粉可冷藏备用。⑥取 5 mg 加入 60 μL 提取液震荡 90 min, 沸水煮 15 min, 冷却 5 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取 15 μL 上清液点样。

1.2.2 电泳方法<sup>[4]</sup> 以改良单向十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (1-D-SDS-PAGE) 为基础, 进行试剂纯度试验, 建立适用的技术体系。通过改变电泳条件, 缩短试验时间; 适量减小凝胶长度; 减少试剂用量, 实现高效低成本。

2 结果与分析

2.1 胶浓度和交联度的改进

在前人的基础上, 大胆改进了胶浓度和交联度, 胶浓度设 20%、17%、15% 和 13%、交联度设 0.1、0.125 和 0.155。结果是胶浓度为 17%, 交联度为 0.125 的组合电泳的分辨效果最佳, 重复性好。图中的 H1、Eradu 和 Hartog 和龙麦 26 是 W<sub>x</sub>-B1 亚基缺失类型, 4595 为三种亚基全缺类型, 4597 为 W<sub>x</sub>-A1 亚基和 W<sub>x</sub>-D1 亚基缺失, 4599 是 W<sub>x</sub>-A1 亚基和 W<sub>x</sub>-B1 亚基缺失, 中国春为 CK。

2.2 试验试剂的改进

多次试验表明, 国产丙烯酰胺和甲叉配制后经过滤可替代进口试剂, Tris、SDS 和甘氨酸以进口试剂为好。超纯水的效果最佳, 电泳速度快效果好, 蒸

馏水的质量很重要, 在电导率符合电泳要求时, 可代替超纯水。

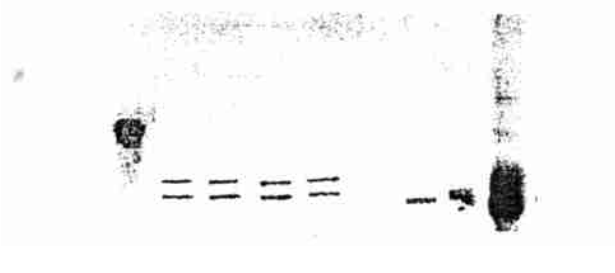


图 2 小麦蜡质蛋白电泳图谱  
由左至右为: Marker H1、Eradu、Hartog、  
龙麦 26、4594、4597、4599 和中国春

2.3 电泳条件的改进

在掌握电泳方法后用 15 cm 高度的电泳槽替代 20 cm, 可得到相同的分离效果, 且药品用量可减少 1/3, 可降低成本。

稳电流 15~20 mA, 在 40℃条件下电泳时间为 16~24 h, 在循环水冷却条件下, 稳压 500 伏可使电泳时间缩短到 5~7 h。进一步改用稳功率 25 J, 时间仅为 3~4 h, 而且分离效果最佳, 重复性好。

循环水冷却较 40℃冰柜冷却均匀, 可用自来水做循环水装置, 简单适用。

3 结论

研究结果表明, 胶浓度为 17%, 交联度为 0.125 的组合电泳的分辨效果最佳, 重复性好。

国产丙烯酰胺和甲叉配制后经过滤可替代进口试剂; 蒸馏水在电导率符合电泳要求时, 可代替超纯水。

用 15 cm 高度的电泳槽, 稳功率 25 J, 电泳时间为 3~4 h, 可用自来水做循环水装置, 简单适用。

参考文献:

[1] 姚大年, 孙辉, 李保云, 等. 小麦品种 Waxy 蛋白亚基缺失类型若干淀粉性状研究[J]. 中国粮油学报, 1999, 14(1): 6-9.  
[2] P. Vrinten, T. Nakamura, M. Yamamori. Molecular Characterization of Waxy Mutations in Wheat[J]. Mol Gen Genet, 1999, 261: 466-471.  
[3] T. Demek, P. Hucl. Biochemical Characterization of the Wheat Waxy A Protein and Its Effect on Starch Properties[J]. Cereal Chem, 1999, 76(5): 694-698.  
[4] R. A. Graybosch, C. J. Peterson, L. E. Hansen. Identification and Characterization of US Wheats Carrying Null Alleles at the Wx Loci[J]. Cereal Chem, 1998, 75(1): 162-165.