

# 热导系玉米种子贮存蛋白的生物指纹图谱分析<sup>\*</sup>

李国良

(黑龙江省农科院玉米所, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS—PAGE)对热导系玉米种子的可溶性蛋白进行分析, 结果表明, 清蛋白、球蛋白、谷蛋白都显示出丰富的带谱。自交系间谱带数目、带的强弱与分布等特点均可见较明显的差异, 可将各供试自交系互相区分出来; 醇溶蛋白谱带均较弱, 自交系间差异小, 难以把各供试自交系互相区分出来。尽管种子的可溶蛋白质 PAGE 图谱都可作为玉米自交系鉴定的蛋白质指纹图谱, 相比之下, 利用清蛋白 PAGE 图谱较为理想。

**关键词:** 玉米; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 指纹图谱

**中图分类号:** S 513      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1002—2767(2005)06—0025—03

## Finger Print Analysis on Seed Protein of Maize Inbred Line

LI Guo-liang

(Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** Electrophoretic analysis was made on the seed soluble protein of 9 maize inbred lines by polyacryamide gel electrophoresis (PAGE) techniques. The results showed that the zeins were both simple and differences among varieties were small. It was, therefore, difficult to distinguish all the varieties studied with the zein patterns. Though, the PAGE of the seed soluble proteins all can be regarded as protein fingerprint for identification of 9 maize varieties, the PAGE patterns of the albumins were, however, abundant and the differences among varieties were obvious in bands number distribution and concentration. On the basis of these characteristics, all the varieties studied could be discriminated from each other. It was suggested that PAGE of seed albumin was useful in variety identification in maize.

**Key words:** maize; SDS—PAGE; finger print

生物指纹图谱(finger print)是能够鉴别生物个体之间差异的电泳图谱, 这种电泳图谱多态性丰富, 是鉴别自交系的有力工具<sup>[1]</sup>。自交系之间的差异主要取决于遗传物质 DNA 和 RNA 的差异, 而 DNA 和 RNA 的直接产物就是蛋白质, 不同自交系间种子蛋白质的种类、含量等均有不同, 通过种子蛋白质差异的测定, 可以鉴定品种<sup>[2]</sup>。贮藏蛋白是种子的主要成分, 几乎所有的作物种子贮藏蛋白都有特异性, 且容易分离和提取。Osborne 根据蛋白质溶解性不同, 将种子蛋白分为 4 大类, 即溶于水的水溶性蛋白醇溶蛋白(albumin)、溶于 10% NaCl 溶液的盐溶性蛋白(globulin)、溶于 70%~90% 乙醇的

醇溶蛋白(prolamine)和仅溶于稀酸或稀碱溶液的谷蛋白(glutenin), 这就是传统的“Osborne 蛋白质分类系统”。热导系玉米即是把热带、亚热带的玉米自交系与温带的玉米自交系杂交, 从而培育出适合北方气候又具有南方优良品质的玉米自交系。将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蛋白谱带, 可以看出个体之间是否存在遗传上的分歧, 从而便于检验纯度。利用生化指纹鉴定技术进行玉米自交系鉴定和纯度检验国内外都有研究<sup>[3~10]</sup>, 但利用热导系玉米种子贮存蛋白鉴定玉米种子纯度未见研

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2005—07—14

作者简介: 李国良(1973—), 男, 黑龙江省肇东市人, 助理研究员, 从事玉米育种研究。

究。本实验根据玉米种子的溶解特性不同,采用分级提取的方法,依次加入样品提取液。提取了热稳定系玉米种子的清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

供实验的材料共有9个自交系,即甸11、HR95、HR97、红玉米、HR102、HR103、长3、HR124、HR137。

### 1.2 样品制备

玉米子粒蛋白电泳分析采用单粒种子操作,将干燥的种子磨粉后,准确称取50 mg,放入离心管中。

1.2.1 清蛋白的制备 用10 mmol/L Tris-HCl, pH值7.5缓冲液200  $\mu$ L,温度为4 $^{\circ}$ C,提取2 h,16 000 rpm,15 min离心,取上清。

1.2.2 球蛋白的制备 于上步沉淀中加入1 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl, pH值7.5缓冲液,利用旋涡振荡器混匀,温度为4 $^{\circ}$ C,提取2 h,16 000 rpm,15 min离心,取上清。

1.2.3 醇溶蛋白的制备 于上步沉淀中用70% (v/v)乙醇,10 mmol/L Tris-HCl, pH值7.5缓冲液,利用旋涡振荡器混匀,温度为4 $^{\circ}$ C,提取2 h,16 000 rpm,15 min离心,取上清。

1.2.4 谷蛋白的制备 于上步沉淀中用0.5% SDS,1%巯基乙醇,10 mmol/L Tris-HCl, pH值7.5缓冲液,利用旋涡振荡器混匀,温度为4 $^{\circ}$ C,提取2 h,16 000 rpm,15 min离心,取上清。

### 1.3 电泳

1.3.1 电泳 利用Amersham pharmacia biotech电泳仪和Hoefer Mini VE型单夹芯电泳槽。电泳采用Tris-甘氨酸缓冲系统和TEMED-过硫酸胺聚合催化系统。分离胶浓度10%,浓缩胶浓度4%。取备用的提取液10  $\mu$ L与2倍上样buffer 10  $\mu$ L,混均于沸水浴中加热3 min使之变性后加样,在室温下稳流电泳2~3 h。

1.3.2 染色 电泳后染色(0.05%考马斯亮兰R-250+40%甲醇+7%冰醋酸),染色3 h。

1.3.3 脱色 利用脱色液(40%甲醇+7%冰醋酸)脱色至背景清晰透明为止,观察谱带。

## 3 结果与分析

### 3.1 清蛋白、球蛋白、谷蛋白电泳效果

从图1可以看到,用PAGE技术分离的清蛋白谱带多、分辨率高,自交系间谱带显示了丰富的多态性,每个材料都有自己独特的指纹。这与Wilson<sup>[1]</sup>报道的结果是一致的。谱带大多数都很清晰。在自

交系间,谱带数目具有较明显的差别。根据谱带数目可以把一部分自交系区分出来。如第1泳道和第3泳道有相同的谱带数目,为17条明显的带,而第2泳道只有15条明显的带。再根据谱带的强弱可以把第1泳道和第3泳道区分开,如箭头所示第1泳道的条带是一条特强的带,而第3泳道则为一条弱带。同样可以把其他各个自交系相互区分开来。

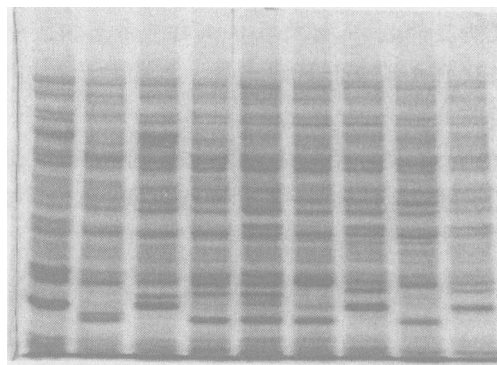


图1 清蛋白电泳图

从图2可以看到,分离的球蛋白谱带大多数都很清晰。在自交系间,谱带数目具有较明显的差别。根据谱带数目及谱带的强弱也可以把一部分自交系区分出来。如根据谱带的强弱可以把第1泳道和其他的泳道区分开,箭头1所示位置在第1泳道是一条特强带,而其他泳道则为一条弱带(如泳道2,3,4,5,6,8)或者无带(如泳道7,9)。又如箭头2所示,第5泳道是一条特强带,而其他泳道则为一条弱带。这样可以把各个自交系相互区分开来。

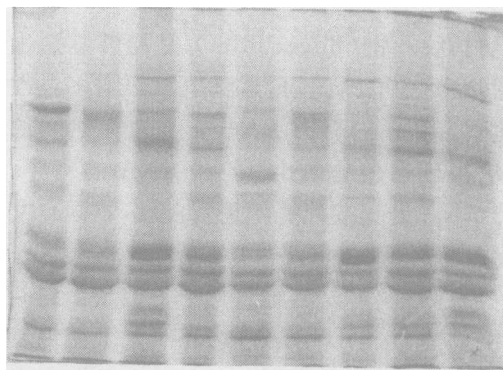


图2 球蛋白电泳图

从图3可以看到,谷蛋白谱带大多数很清晰。不同自交系的谱带数目具有较明显的差别。根据谱带数目及谱带的强弱也可以把一部分自交系区分出来。箭头1所示第5泳道的条带是一条特强带,而其他的则为一条弱带(如泳道1,2,3,4,6,)或者无

带(如泳道 7,8,9)。箭头 2 所示第 1 泳道的条带是一条特强带,而其他的则为一弱带或者无带。这样可以把其他各个自交系相互区分开来。

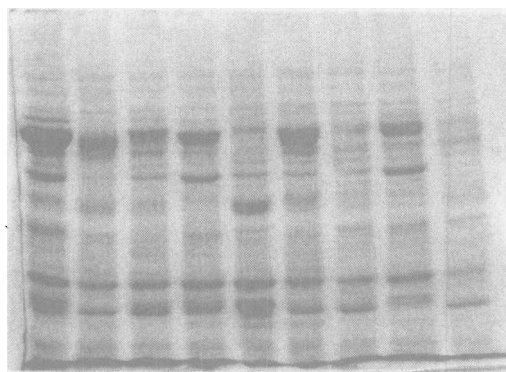


图 3 谷蛋白电泳图

### 3.2 醇溶蛋白的电泳效果

从图 4 看到,自交系谱带数目较少。谱带较简单,自交系间在谱带数目和其他谱带特征虽有一定的差异,但差异较小,不如前三个蛋白图谱容易把较多的自交系相互区分开来。

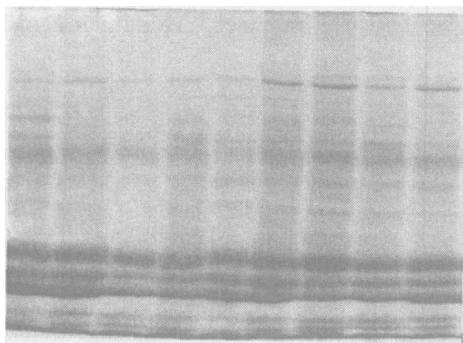


图 4 醇溶蛋白电泳图

## 4 讨论

经常作为自交系纯度鉴定用的种子蛋白质类型有清蛋白、盐溶蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白,每种蛋白质通过电泳所产生的蛋白质谱带类型都可作为自交系的“生化指纹”,这种“生化指纹”可以鉴定未知自交系或品种的纯度。玉米清蛋白具有丰富的带谱,自交系间在谱带数目和谱带强弱等特点均有明显的差异,图 1 表明,虽然各材料之间的亲缘关系较近,但都能彼此区别,每一材料都有各自独特的清蛋白“指纹”。玉米清蛋白虽然含量较少,但其分子多态性和自交系间的异质性较大,这在玉米自交系鉴定及遗传研究上有重大的意义。通过研究表明,我们采用清蛋白作为玉米纯度鉴定用的贮藏蛋白质比用

其它蛋白质具有许多优点:清蛋白是玉米种子蛋白主要成分中唯一能直接溶于水的蛋白质,其提取方法较其他蛋白质简单。蛋白质谱带窄,清晰,具有较高的分辨率,谱带差异很容易显示出来。同时谱带相对较多,便于区别种类繁多的玉米自交系找出每一自交系的特征谱带,是玉米的一个较理想的生化标记。实验证明,用玉米种子清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳技术进行自交系鉴定及纯度检验是一条有效途径。

本实验提取的醇溶蛋白谱带数目较少的可能原因有两条。首先,玉米醇溶蛋白是由少数几种大小不同的多肽分子组成的,因而电泳的谱带较少。其次,玉米醇溶蛋白分为  $\alpha$ -zein 和  $\beta$ -zein 两类。 $\alpha$ -zein 可溶于 95% 乙醇,  $\beta$ -zein 溶于 60% 乙醇,不溶于 95% 乙醇。而本实验中醇溶蛋白是用 70% 乙醇提取的,对于  $\alpha$ -zein 和  $\beta$ -zein 都不是最适的提取浓度,因而可能有些醇溶蛋白未溶解。这也与 Wilson<sup>[11]</sup> 和朱应泽<sup>[12]</sup> 的结论相符。

### 参考文献:

- [1] 梁明山,侯留记. 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定烟草品种[J]. 种子,2001,(1):9-11.
- [2] 颜廷进,李群,公茂洪. 玉米种子蛋白质电泳技术的改进[J]. 种子科技,1999,(2):28-29.
- [3] 颜启传,王未英,周亚娣. 杂交玉米丹玉 13 及其亲本自交系品种的同工酶电泳鉴定[J]. 浙江农业大学学报,1993,19(3):313-315.
- [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.
- [6] McDonald MB, Elliotj, Sweeney PM. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies[J]. Seed Sci and Technol,1994,22(1):171-176.
- [7] Smith J S C, Smith O S. Restriction fragment length polymorphism can differentiate among U. S. maize hybrids[J]. Crop Sci,1991,31:893-899.
- [8] 胡志昂,王洪新. 蛋白质多样性和品种鉴定[J]. 植物学报,1991,33(7):556-564.
- [9] 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.
- [10] 王玺,张野田. 玉米杂交种纯度检测方法及其述评[J]. 种子,1997,(3):31-34.
- [11] C. M. Wilson. Seed Protein Fraction of Maize, Sorghum and Related Cereals[J]. Seed Proteins,1983,3(5):271-307.
- [12] 朱应泽,刘容山,李方安. 玉米种子蛋白质电泳鉴定品种的研究[J]. 四川农业大学学报,1995,13(2):150-153.