

辅助选择优质蛋白玉米种质的 ELISA 方法

丁占生¹, 康继伟², 张世煌³, 傅俊骅³, 李新海³, 袁力行³, 李明顺³

(1 河北省农林科学院粮油作物研究所, 石家庄 050031; 2 四川省农科院作物所, 成都 610066;

3. 中国农科院作物所, 农业部作物遗传育种重点实验室 AMBIONET 中国实验室, 北京 100081)

[摘要] 基于玉米胚乳中赖氨酸含量与 EF-1 α 含量呈显著正相关, 利用 ELISA 技术定量检测胚乳中 EF-1 α 含量, 进而估测胚乳中赖氨酸含量, 建立了辅助选择优质蛋白玉米种质的 ELISA 技术体系。通过对 653 份 QPM 家系的检测, 表明该方法具有简便、快速、准确的特点, 可有效辅助选择优质蛋白玉米种质。

[关键词] 优质蛋白玉米; ELISA(酶联免疫吸附反应); 检测

[中图分类号] S 513.033

[文献标识码] A

Assistant Method of ELISA To Select QPM Germplasm

DING Zhan-sheng¹, KANG Ji-wei², ZHANG Shi-huang³, FU Jun-hua³, LI Xin-hai³, YUAN Li-xing, LI Ming-shun³

(1. Institute of Oil and Grain Crops, Hebei Academy of Agricultural & Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031;

2. Institute of Crops, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066;

3. Institute of Crops Breeding and Planting, China Academy of Agricultural Sciences, The Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Agriculture Department, AMBIONET China Lab, Beijing 10081, China)

Abstract: Basing on the Lysine content in maize endosperm is positively relative with the EF-1 α , we can estimate the Lysine content in maize endosperm by detecting EF-1 α content with ELISA, so establish a novel method to select QPM germplasm. Using this method, we have detected the Lysine content of 653 samples of QPM, we found the method is simple, quick and sensitive to select QPM germplasm.

Key words: QPM; ELISA; Detection

玉米是重要的饲料和粮食作物, 但普通玉米胚乳中缺乏人以及单胃动物必需的赖氨酸、色氨酸等必需氨基酸, 营养品质较差。采用育种手段改进玉米的蛋白质品质, 选育优质蛋白玉米(QPM)品种, 是一项重要的研究课题。玉米子粒中蛋白质的分布不均衡, 在胚乳中约占 75%~80%, 在胚中约占 15%~20%。胚中的蛋白质含量相对较高, 氨基酸组成合理, 品质较好; 而胚乳蛋白质结构不合理, 缺乏赖氨酸、色氨酸等单胃动物所必需的氨基酸, 所以品质较差。目前优质蛋白玉米(QPM)育种的技术路线, 主要是利用胚乳突变基因 opaque-2 (O_2) 提高胚乳中

的赖氨酸、色氨酸含量, 利用胚乳物理性状修饰基因保持胚乳硬质度等普通玉米的农艺性状。进一步发展 QPM 育种的技术路线之一是采用不饱和回交技术把普通玉米的骨干自交系转育为 QPM 自交系。这样能够进一步提高 QPM 自交系和杂交种的配合力水平和适应性。但胚乳修饰基因为多基因控制的复杂系统, 修饰基因的剂量不同, 纯合隐性 O_2O_2 基因型子粒胚乳中的赖氨酸含量有很大差异 (Gloverson L. Moro, 1996)。因此, 选择胚乳赖氨酸含量较高的种质就成为 QPM 育种的关键环节。

用高效液相色谱法测定玉米子粒中赖氨酸含量费用昂贵、速度慢; 比色计方法简单, 可是准确性较差。由于玉米胚乳中的赖氨酸含量与 EF-1 α (蛋白质合成延长因子) 含量显著正相关 (Jeffrey E. Habben, 1995; Gloverson L. Moro, 1996), 因此可以利用 ELISA(酶联免疫吸附反应) 定量测定胚乳中 EF-

[收稿日期] 2001-12-18

[作者简介] 丁占生(1971-), 男, 硕士, 河北省农林科学院助理研究员, 从事作物遗传育种研究。

[基金项目] 农业部作物遗传育种重点实验室开放课题

1 α 含量,从而有效地推测胚乳中的赖氨酸含量。在 QPM 育种中采用这种方法,可以在普通玉米与 QPM 的杂交或回交后代中筛选赖氨酸含量高的普通子粒类型的家系或单株,从而提高选择优质蛋白玉米种质的效率。用普通玉米(如 Mo17)作阴性对照,用 QPM(如 CML177)作阳性对照。在 ELISA 反应中, O.D 值大于、等于阳性对照的样品,说明其赖氨酸含量大于、等于阳性对照; O.D 值小于、等于阴性对照的,说明其赖氨酸含量小于、等于阴性对照。O.D 值介于阴性、阳性对照之间的可分为几个级别, O.D 大于阳性对照的可分为三级,表示样品赖氨酸含量的多少,以便于选择优质蛋白种质。该方法的技术流程如下。

1 准备测样

(1) 种子在蒸馏水中浸泡, 4℃ 下过夜后, 剥去胚和果皮, 然后在 70℃ 下烘干 48 h。

(2) 用种子磨粉机将胚乳磨成直径小于 1mm 的细粉, 磨完 1 份材料后, 用高压气枪将磨粉机冲洗干净, 再磨第 2 份样品。

2 提取 EF-1 α 蛋白

(1) 称取 25mg 胚乳粉, 放入 1 mL 离心管内, 每个样品称两份。

(2) 胚乳粉中加入 1 mL EF-1 α 提取液(12.5 mM 硼酸钠, 1% SDS, pH10, 临用前加入 2% β -巯基乙醇, 在通风橱内操作), 在震荡器上震荡混匀。

(3) 在恒温摇床内轻摇, 37℃ 过夜。

(4) 离心, 14 000 r/min, 10 min, 上清液即为 EF-1 α 提取液, 将其转入新管内备用。每份样品重复提取两次 EF-1 α 。

3 包被抗原

(1) 将 EF-1 α 提取液稀释 333 倍。997 μ L CCB (1.59 g/L NaCO₃, 2.93 g/L NaHCO₃, pH9.6) 缓冲液中加入 3 μ L EF-1 α 提取液, 混匀。

(2) 酶联板孔内加入样品提取液。设空白和阳性、阴性对照。各孔内先加入 67 μ L CCB, 除空白外各孔内再加入 33 μ L EF-1 α 稀释液, 混匀。每份 EF-1 α 提取液重复点两个孔。

(3) 4℃ 下过夜。

4 加入 EF-1 α 抗体(一抗)

(1) 洗板。倒净酶联板中抗原溶液, 各孔内再加

入 200 μ L TTBS (9g/L NaCl, 25 mM Tris-HCl, 1.5% Tween-20, pH7.5), 3 min 后倒净 TTBS, 此为洗板一次。重复用 TTBS 洗板两次。

(2) 各孔内加入 100 μ L 用 TTBS 稀释 1000 倍的 EF-1 α 抗体(CIMMYT 提供), 25℃ 下 4 h。

5 加入碱性磷酸脂酶标记的养抗免抗体(二抗)

(1) 洗板, 同前。

(2) 各孔内加入 100 μ L 用 TTBS 稀释 1 000 的二抗, 25℃ 下 2 h。

6 加入碱性磷酸脂酶底物

(1) 洗板, 同前。

(2) 各孔内加入浓度为 1 mg/mL 的 200 μ L 底物(硝基酚磷酸, pNPP)溶液, 底物用 9.7% 二乙醇胺(pH9.8)溶解。

7 读数

反应 30min 后, 用酶标仪(MRX-II)测样品的 O.D 值, 进行数据分析。

8 小 结

ELISA 是把抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化反应相结合而发展起来的检测技术, 是用酶作为标记物, 进行抗原、抗体定性、定量测定的综合技术。它的突出优点有: (1) 灵敏度高, 检测限度可达 1~10 ng/mL; (2) 专化性强, 重复性好; (3) 简便、快速; (4) 费用相对较低, 适用于处理大批样品。2000 年中国农科院作物所与河北农科院、四川农科院合作, 用 ELISA 的方法筛选了 653 个 QPM 家系, 其中阳性率为 60%。表明借助 ELISA 技术, 可有效地帮助育种者选择优质蛋白玉米种质。

[参 考 文 献]

- [1] Gloverson L. Moro, et al. Characterization of the variability in lysine content for normal and opaque-2 maize endosperm[J]. Crop Sci. 1996, 36: 1651-1659.
- [2] Jeffrey E. Habben, et al. Elongation factor 1 α concentration is highly correlated with the lysine content of maize endosperm[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92: 8640-8644.
- [3] Gloverson L. Moro, et al. Phenotypic effects of opaque2 modifier genes in normal maize endosperm[J]. Cereal Chem. 1995, 72 (1): 94-99.

联系电话: (0311) 5051759-3329

E-mail: zhanshengding@163.com