

玉米种子清蛋白和球蛋白 PAGE 比较分析

陈景堂¹, 祝丽英¹, 宋占权², 池书敏¹

(1. 河北农业大学, 保定 071001; 2. 保定师范专科学校, 保定 071051)

【摘要】 利用改进的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 对玉米种子清蛋白和球蛋白进行研究。结果用含有 NaCl 的球蛋白提取液 I 提取 5 次蛋白质后, 清蛋白和球蛋白几乎全部被提取; 而用不含 NaCl 的清蛋白提取液 II 提取 4 次蛋白质后, 再用提取液 I 提取, 可得到球蛋白组分, 而且在清蛋白中也有相同迁移位置的谱带存在。表明对球蛋白进行提取操作时, 总有清蛋白相伴随, 而对清蛋白进行提取分析时一般不会有球蛋白的存在; 球蛋白的遗传组分较清蛋白少, 并在清蛋白中一般都有相同分子量的组分存在。

【关键词】 玉米种子; 清蛋白; 球蛋白; PAGE

【中图分类号】 S513.012

【文献标识码】 A

Compare Analysis of Maize Seed's Albumin and Globulin with PAGE

CHEN Jing-tang¹, ZHU Li-ying¹, SONG Zhan-quan², CHI Shu-min¹

(1. Agricultural University of Hebei, Baoding 071001; 2. Baoding Teachers College, Baoding 071051, China)

Abstract: Compare analysis of maize seed albumin and globulin were made by improving PAGE. Almost all of the albumin and globulin were extracted after using extract solution I which included NaCl five times. But only the globulin were obtained by using extract solution II which didn't include NaCl four times and extract solution I one time. The globulin obtained had bands which had the same mobility as the albumin. The result showed that the albumin had also been extracted while we extracted globulin, but the globulin hadn't been extracted while we extracted albumin. The genetic elements of globulin, which had the same molecular weight as albumin, were less than albumin's.

Key words: The seed of maize; Albumin; Globulin; Polyacryamide gel electrophoresis

玉米种子蛋白质在种质资源评价、性状遗传和品种鉴定等方面受到人们广泛关注。Osborne 根据蛋白质溶解性不同, 将种子蛋白质分为 4 大类, 即溶于水的清蛋白(白蛋白), 溶于 10% NaCl 溶液的球蛋白, 溶于 70%~90% 乙醇的醇溶蛋白和仅溶于稀酸或稀碱溶液的谷蛋白。随后一些学者又根据蛋白质的生物学功能, 把谷物子粒蛋白质分为代谢活跃蛋白(也称细胞质蛋白)和储藏蛋白两大类, 球蛋白和清蛋白属于代谢活跃蛋白, 醇溶蛋白和谷蛋白属于储藏蛋白^[1]。

玉米子粒醇溶蛋白是由大量的分子量相似、等

电点不同的多肽组成^[2,3]。张春庆等利用 IEF 和 NAU-PAGE 对玉米子粒储藏蛋白进行电泳, 分别得到 39 条和 20~40 条谱带^[4,5]。Wang Chun 等利用酸性 PAGE 对玉米子粒盐溶蛋白进行分析, 得到 18~24 条谱带^[6]。宋同明等对玉米种子白蛋白和球蛋白进行电泳分析, 结果自交系或杂交种一般有 40 条左右谱带, 其中清晰可辨的带可达到 35 条左右, 并认为谱带差异是由核基因控制的遗传性状^[7]。利用清蛋白电泳谱带进行玉米种子纯度鉴定和进行玉米自交系类群划分也有研究^[8,9]。但对一种蛋白质提取样品中另类蛋白的存在问题的研究尚未见报道。本研究通过对玉米子粒球蛋白和清蛋白采取分别分级提取若干次后, 再提取另一种蛋白的方法进行电泳比较, 以期揭示蛋白质提取时是否有另类蛋白相伴随以及多态性差别, 为利用蛋白质作为标记进行遗传研究和品种鉴定提供参考。

【收稿日期】 2001-12-21

【作者简介】 陈景堂(1967-), 男(汉族), 硕士, 河北农业大学副教授, 主要从事教学和作物遗传育种研究。

【基金项目】 河北省农业厅科技计划项目(冀农科 9716)

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选用杂交种冀单 31(冀 815 × 冀 35)和自交系 478 作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质提取 子粒蛋白质电泳分析采用单粒操作,将单粒种子用单粒种子磨样器磨碎后放入离心管。用提取液 I 提取 5 次球蛋白(提取液 I: 0.5 mol/L NaCl + 15% 蔗糖 + 0.05% 甲基绿),用提取液 II 提取 4 次清蛋白(提取液 II: 15% 蔗糖 + 0.01% 甲基绿),每次蛋白质提取样品分别保存备用。

1.2.2 电泳 利用六一仪器厂的 DYY-Ⅲ₄ 型电泳仪和 DYY-Ⅲ₂₅A 型单夹芯电泳槽。凝胶采用乳酸-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%。取备用的提取液 16 μL 加样,在室温下稳压电泳 40 ~ 45 min。

1.2.3 染色 电泳后固定、染色(0.01% 考马斯亮兰 R250 + 10% 三氯乙酸)5 min 以后观察谱带,用自来水浸泡脱色后拍照或制备干胶。

2 结果与分析

对同一玉米子粒先分次用提取液 I 提取球蛋白,最后再用提取液 II 提取一次清蛋白;对同一试验材料的另外子粒先分次用提取液 II 提取清蛋白,然

后再用提取液 I 提取一次球蛋白。每次提取的蛋白质样品分别点样,同时进行电泳比较。图 1 是冀单 31 分别用提取液 I 和提取液 II 分级提取蛋白质的电泳图,其中用 1 ~ 9 数字标记的是用提取液 I 共提取了 5 次球蛋白电泳图谱,10 是用提取液 I 完成 5 次提取后,用提取液 II 提取一次的清蛋白图谱;11 ~ 18 是用提取液 II 分别提取 4 次的清蛋白图谱,19 和 20 是用提取液 II 分别提取 4 次后又用提取液 I 提取一次球蛋白的图谱。从图中不难看出:无论是球蛋白还是清蛋白,第一次提取的样品染色最深,说明提取液中蛋白质的浓度最高,每提取一次,蛋白质浓度都比上一次递减,染色也越来越浅。当提取 5 次球蛋白后再提取清蛋白,只有两条谱带显现,而且这两条谱带在球蛋白的谱带中都有相同迁移位置谱带存在,染色也比第 5 次球蛋白的相应谱带浅,表明这两条带是第 5 次提取球蛋白后的剩余,提取了 5 次球蛋白后清蛋白已几乎不存在,换言之,即在提取球蛋白时也提取了清蛋白;而清蛋白不同,提取 4 次清蛋白后再提取的球蛋白与第 4 次提取的清蛋白相比存在 5 条谱带(a、b、c、d 和 e)的差异,这 5 条谱带可以认为是真正的球蛋白的组分。由于提取球蛋白时清蛋白也相伴随被提取,而且球蛋白的谱带在清蛋白中也相应谱带存在,所以用清蛋白和球蛋白分别进行玉米种子纯度检验和真实性鉴定可能会得出相同结论。

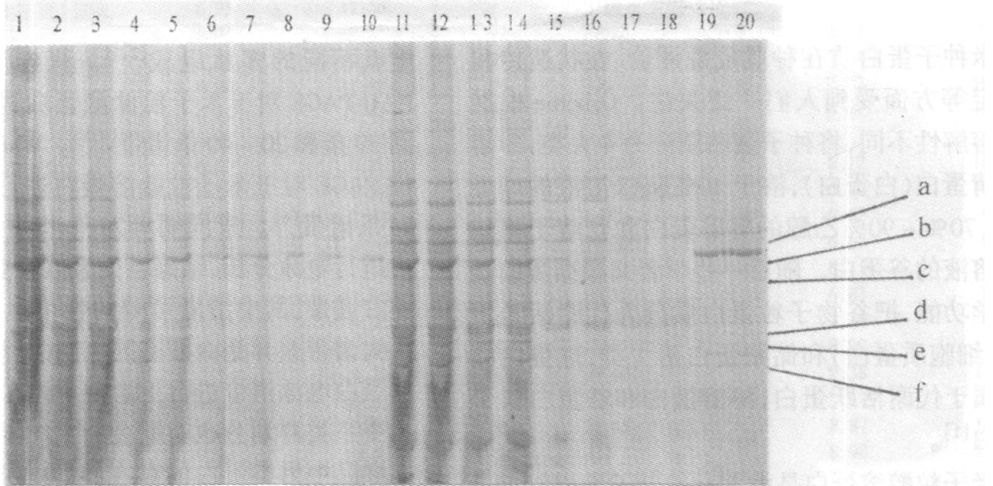


图 1 分级提取球蛋白和清蛋白电泳

1. 第一次球蛋白;2~3. 第二次球蛋白;4~5. 第三次球蛋白;6~7. 第四次球蛋白;8~9. 第五次球蛋白;10. 清蛋白;11~12. 第一次清蛋白;13~14. 第二次清蛋白;15~16. 第三次清蛋白;17~18. 第四次清蛋白;19~20. 球蛋白。

图 2 是自交系 478 用提取液 II 提取 5 次清蛋白后又用提取液 I 提取球蛋白所得到的电泳图,其中

5、6、7、8 分别是 4 粒 478 种子的清蛋白电泳图谱,1、2、3、4 是相应的、提取 5 次清蛋白后的球蛋白电泳

图谱。图一方面显示了各个子粒之间的一致性,另一方面还显示了清蛋白的谱带数目高于球蛋白,前者约有 22 条清晰可辨的谱带,而后者只有 a、b、c、d 和 e 共 5 条带,可见其多态性不如清蛋白丰富,而且它们都和清蛋白谱带平行存在。

从图 1 可以看出,利用提取液 I 所得到的蛋白质谱带与提取液 II 提取得到的蛋白质谱带的带型和数目基本一致。图 1 和图 2 还显示,杂交种冀单 31 和自交系 478 有 5 条迁移相同的球蛋白谱带存在,即 a、b、c、d 和 e 带,前者比后者多一条 f 带。球蛋白的多态性有限,不仅表现在数目上,而且还表现在不同材料的球蛋白谱带的差异不明显。由于冀单 31 和 478 之间不存在亲、子代关系,故无法验证球蛋白从亲代到子代的遗传,双亲球蛋白是否同时在子代表达还有待于进一步研究。

醇,谷蛋白溶于稀酸或稀碱溶液。本研究结果表明,提取球蛋白时有清蛋白相伴被提取,原因笔者认为主要是球蛋白的提取液成分中有大量水的存在,而醇溶蛋白和谷蛋白的提取液分别是乙醇、酸或碱的水溶液,由此可以推断,进行醇溶蛋白和谷蛋白提取时,无疑也会有清蛋白被提取,对这样的蛋白质提取样品进行电泳分析,清蛋白也会染色显现。如果抛开清蛋白分析球蛋白、醇溶蛋白或谷蛋白电泳谱带可能会与实际不符。而清蛋白却不同,因为提取清蛋白时,提取液既不加盐、乙醇,也不加酸或碱等溶剂,所以清蛋白提取样品中其它蛋白质成分存在的可能性很小。故笔者认为在作物种子几种蛋白质中,把清蛋白作为分析对象更可靠一些。由于本研究所得到的的是在选用的材料数量和分级提取蛋白质的次数都比较少的情况下的初步结果,所以有必要增加试验材料数目和分级提取次数做进一步验证。

[参考文献]

- [1] 张国平. 国外谷物种子蛋白的研究现状[J]. 世界农业, 1987, (12): 23-25.
- [2] Gianazza E, Righetti P G, Pioli F, et al. Size and charge heterogeneity of zein in normal and opaque-2 maize endosperms[J]. Maydica, 1976, 21: 1-17.
- [3] Righetti P G, Bosisio A B. Applications of isoelectric focusing to the analysis of plant and food proteins[J]. Electrophoresis, 1981, 2: 65-75.
- [4] 张春庆, 张德水, 陈民生. 玉米子粒贮藏蛋白组成及特性的研究[J]. 西北植物学报, 1998, 18(3): 386-392.
- [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] Wang Chun, Bian Ke, Zhang Huaxiao, et al. Polyacrylamide gel electrophoresis of salesoluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment[J]. Seed Sci and Technol, 1994, 22: 51-57.
- [7] 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.
- [8] 陈景堂, 池书敏, 刘志增, 等. 利用清蛋白多态性鉴定玉米种子纯度研究[J]. 作物学报, 2001, 27(2): 196-200.
- [9] 陈景堂, 池书敏, 马占元, 等. 利用清蛋白 PAGE 技术进行玉米自交系类群划分的初步研究[J]. 玉米科学, 2001, 9(2): 18-21.

联系电话: 0312-2091589

E-mail: jichen@heinfo.net

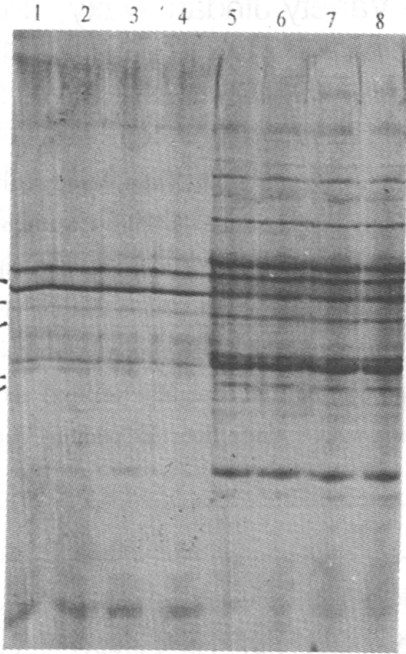


图 2 自交系 478 电泳

- (1)5. 第一粒球、清蛋白; (2)6. 第二粒球、清蛋白;
(3)7. 第三粒球、清蛋白; (4)8. 第四粒球、清蛋白。

3 讨论

按 Osborne 的作物种子蛋白质分类,清蛋白直接溶于水,球蛋白溶于稀盐溶液,醇溶蛋白溶于有水乙