

用马铃薯块茎全蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳技术鉴定品种的真实性和纯度

吴凌娟 董传民 张亚奎 温福君
(大兴安岭地区马铃薯科研中心 加格达奇 165000)

摘 要

试用 Stegemann 报道的电泳方法, 用一小块薯肉提取全蛋白, 对 30 个马铃薯品种进行电泳分析。结果看到, 所有品种的全蛋白电泳图谱都有差异, 且品种内个体间的图谱表现一致。这表明品种的全蛋白电泳图谱与遗传因子有关, 是鉴定品种的可靠特性。因此, 块茎全蛋白电泳技术可用于马铃薯品种真实性鉴定和纯度检验。本法具有分辨力高、简便、快速等特点。

关键词 马铃薯品种, 块茎全蛋白电泳技术

1 前 言

60 年代以来, 国外的一些学者进行了

不同马铃薯品种块茎全蛋白电泳图谱的研究^[1,2], 认为全蛋白的电泳图谱不受种植环境等外部因素的影响, 而与品种的遗传特性密切相关。Stegemann^[3]等人通过大量试验, 认为马铃薯块茎全蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳

收稿日期: 1997-01-10

THE EFFECTS OF CARRAGEENIN AND AGAR SOLIDIFIED MEDIUM ON THE GROWTH OF VIRUS-FREE POTATO PLANTLETS

Luo Zhimin, Wang Bingjun, Li Shutong, Ju Yuling, Gu Yu and Wei Zhongji
(Tianjin Vegetable Research Institute, Tianjin 300381)

ABSTRACT

The effects of carrageenin and agar solidified medium on the growth of virus-free potato plantlets *in vitro* was discussed in this paper. The plantlets cultured in carrageenin solidified medium grew faster than those in agar solidified medium, and had lower cost of production.

KEY WORDS: potato, carrageenin, tissue culture, virus-free plantlets

图谱可作为品种的生化“指纹”, 适用于鉴定品种的真实性和纯度。他们还分析了欧洲使用的 1000 多个品种的全蛋白和酯酶的电泳图谱, 编制了“欧洲马铃薯品种索引”。此外, 他和其他学者还应用等电聚焦电泳和双向电泳技术来分析不同马铃薯品种的全蛋白电泳图谱, 也都证实了上述论点。国内马铃薯科研单位也曾用全蛋白电泳技术来鉴定马铃薯品种 (个人通讯), 认为不同马铃薯品种的全蛋白电泳图谱存在差异, 且不受栽培条件的影响。

近年来, 由于大兴安岭地区建立脱毒马铃薯繁育基地, 在脱毒前后常需认真核对品种的真实性, 在种薯销售中也常有品种真实性和纯度的纠纷。因此, 迫切需要建立快速、简易、准确的鉴定品种真实性和纯度的方法。

2 材料与方法

2.1 材料

选用生产上常用的马铃薯品种 30 个, 即: 无花、WZ-1、国引 7 号、品比 19、90DT-11-5、大 92062-1、克 83-28、呼 8408-6、东农 304、春薯 3-1、88-5、克新 2 号、大西洋、肯德、鲁引 1 号、中薯 1 号、早大白、超白、诺兰、内薯 7 号、小叶子、卡它丁、新克新 4 号、克新 4 号、东农 303、治杂 8 号、中薯 3 号、克新 12 号、兴安红、系薯 1 号。测定块茎全蛋白电泳图谱按照上述品种先后顺序进行测定。

2.2 方法

基本按 Stegemann 的方法, 略加变动。

2.2.1 块茎全蛋白的提取

选用新鲜或贮藏的成熟马铃薯块茎, 用打孔器取样, 去掉表皮, 称取 5g 薯肉放入钵中, 加 0.5ml 亚硫酸钠溶液 ($1\text{g Na}_2\text{SO}_3 + 0.75\text{g Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 加水到 20ml), -20°C 冷冻过夜, 室温条件下融化、研碎, $3,000\text{r/min}$ 离

心 10min。吸取 0.8ml 上清液, 加入 0.2ml 样品缓冲液 (5mg 溴酚兰加水 20ml, 离心后留上清液加水到 50ml, 再加入蔗糖 25g)。

2.2.2 凝胶制备

凝胶浓度为 6%, 交联度为 5%, 配 60ml 胶液, 具体如下:

①30%凝胶溶液 (丙烯酰胺 28.5g, N, N-亚甲基双丙烯酰胺 1.5g, 加水到 100ml) 10ml; ②1M Tris, 0.15M 硼酸缓冲液, pH8.9, 6.3ml; ③亚硫酸钠 17mg; ④蒸馏水 43.4ml; ⑤TEMED 25μl; ⑥10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.3ml。

混匀, 取出 10ml 封板, 然后倒入电泳装置的双层玻璃板夹缝中, 制成的胶片高、宽、厚分别为 210、125、1.5mm, 胶片上端有 15 个样品凹。

2.2.3 上样和电泳

每个样品上样 10μl, 电极缓冲液为 0.125M Tris, 19mM 硼酸系统, pH8.9, 电泳时, 从负极到正极, 稳压 40mA, 温度不超过 20°C , 当前沿指示染料溴酚兰达到样品凹下端 14cm 时停止电泳。电泳时间约 70min, 拆开电泳玻板, 切掉溴酚兰下方空白胶片, 进行染色。

2.2.4 染色

用 0.025% 考马斯亮兰 R-250 染色和银染色方法进行对比。用 0.025% R-250 染色 3h 或 0.01% 浓度染色过夜。具体方法: 水 160ml, 甲醇 40ml, 冰醋酸 14ml, 溶进三氯乙酸 12g, 然后加 1% R-250, 无水乙醇溶液 5ml 染色 3h。脱色用水 140ml, 甲醇 60ml, 冰醋酸 10ml 混合液, 整个脱色过程中换液 3、4 次。

银染色方法步骤:

①固定: 20ml 乙醇, 1ml 冰醋酸加水到 200ml, 浸入胶片, 轻轻振荡 10min; ②染色: 用 0.2% AgNO_3 溶液染色 15min, 染色过程

中轻微振荡；③洗涤：用蒸馏水洗 4 次，每次间隔 15s；④还原：NaOH 3g，NaBH₄ 17.5mg，甲醛 0.75ml，加水到 200ml，直到胶片显现清晰的谱带为止，然后用自来水冲洗停止反应；⑤增色：Na₂CO₃ 1.5g 加水到 200ml。

2.2.5 谱带等级的划分和相对迁移率 Rf 值的测定

凝胶片上的全蛋白谱带依其颜色深浅和宽窄划分成 11 个等级，同时测定各条谱带的迁移率。各个等级谱带的图示如下。

深色宽带	中色宽带	浅色宽带
深色中带	中色中带	浅色中带
深色窄带	中色窄带	浅色窄带
深色细带		浅色细带

把胶板放到玻璃板上，下边放个荧光灯，测量每一个谱带中心距上样凹处(即原点)的距离，同时记录这个带多宽，颜色多深，按各个等级谱带的图示记录，见图 1。

测定各条谱带的迁移率：

$$\text{迁移率 Rf 值} = \frac{\text{每个谱带中心距原点的距离}}{\text{胶板按 14cm 计}}$$

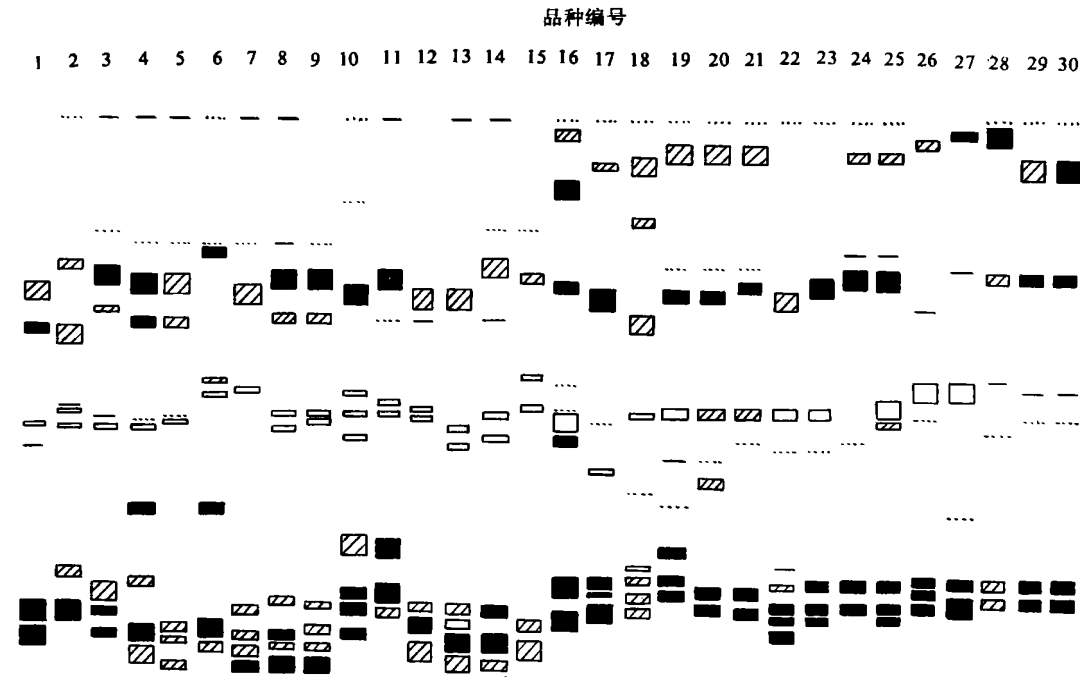


图 1 马铃薯品种 (1~30) 块茎全蛋白电泳图谱 (银染色)

I 区各谱带迁移率测定：

	0.192	0.214	0.321	0.371	0.414	0.457	0.478
	0.171	0.214	0.300	0.392	0.457		
	0.142	0.214	0.392	0.414			
	0.142	0.214	0.250	0.392	0.414		
	0.342	0.392	0.414	0.457			
	0.142	0.342	0.371	0.442	0.457		
	0.142	0.171	0.271	0.321	0.342	0.371	0.457

从以上迁移率分析, R_f 值 ≤ 0.478 为Ⅰ区谱带, 共有 14 条迁移率。

Ⅱ区各谱带迁移率测定:

 0.542	0.585	0.607	0.628	0.650	0.678
 0.585	0.607				
 0.542					
— 0.542	0.585	0.607	0.628	0.650	0.678
---- 0.542	0.585	0.607	0.628	0.650	0.678

从Ⅱ区迁移率分析, $0.542 \leq R_f$ 值 ≤ 0.678 为Ⅱ区谱带, 共有 6 条迁移率。

Ⅲ区各谱带迁移率测定:

 0.700	0.800	0.878	0.900	0.957	0.992
 0.835	0.857	0.878	0.900	0.921	0.957
 0.957					
 0.800	0.857	0.878	0.921	0.935	0.957
 0.742	0.800	0.857	0.878	0.900	0.935
— 0.835					
---- 0.714	0.742				
 0.921	0.835				
 0.878					

从Ⅲ区迁移率分析, R_f 值 ≥ 0.700 为Ⅲ区谱带, 共有 12 条迁移率。

3 结果与分析

3.1 马铃薯品种间全蛋白电泳图谱的差异

综合 30 个供试品种, 其块茎全蛋白共有 32 条迁移率, 色泽深浅和宽窄不同的电泳谱带 (图 1), 按谱带的实际分布情况, 可将他们分为 3 个谱带区。迁移率 ≤ 0.478 的为Ⅰ区谱带, 共 14 条; 迁移率 $0.542 \sim 0.678$ 的为Ⅱ区谱带, 共 6 条; 迁移率 ≥ 0.700 的为Ⅲ区谱带, 共 12 条。

从图 1 可以看出, Ⅰ区谱带宽而颜色较深, 且与Ⅱ区界线明显; Ⅱ区谱带窄而颜色浅; Ⅲ区的谱带较窄而颜色较深, 且与Ⅱ区靠得较近。在 3 个谱带区上品种间都表现程度不同的差异, 尤其以Ⅰ区和Ⅲ区的谱带差异大, 将所有供试品种的图谱逐个相互重叠核对, 发现各品种的块茎全蛋白电泳图谱均

有差异。它们或表现为谱带数目不同, 或表现为谱带宽窄和颜色深浅有别, 更多的则表现为谱带迁移率的差异, 所有供试品种都具有独特的全蛋白电泳图谱类型。如克新 4 号、东农 303、治杂 8 号 3 个品种, 尽管它们是从同一对亲本选育出的品种 (白头翁 $\times$ 卡它丁), 但谱带数目、颜色深浅及迁移率仍有明显差异。极易辨认, 这说明这一电泳方法具有较高的蛋白谱带分辨力。另外, 从不同种植地点搜集的同一品种, 如东农 303 和克新 4 号, 都表现出相同的谱带, 同一品种不同块茎全蛋白电泳谱带是品种的属性, 其特征与品种的遗传组成有关。因此, 利用块茎全蛋白电泳图谱可以鉴定马铃薯品种的真实性、纯度及品种的异同。

3.2 凝胶不同染色方法与块茎全蛋白电泳图谱的分辨力

1979 年以来, Switzer^[4]等人陆续报道了染色凝胶中蛋白质和核酸的银染法。银染法的灵敏度高, 染色蛋白质时比考马斯亮兰染

色的灵敏度高 100 倍, 可以达到纳克 (ng) 水平, 染色快, 可以在 2h 内完成, 而考马斯亮兰染色, 则需 10h 或更多时间。

我们染色块茎全蛋白电泳凝胶, 主要应用银染法, 在电泳图谱中, 蛋白质谱带数目比考马斯亮兰染色的明显增多, 着色层次也深浅分明, 不同品种间的电泳谱带容易辨认, 从而提高了分辨力。

3. 3 应用其它电极缓冲系统与块茎全蛋白电泳图谱的分辨力, 改变凝胶浓度和交联度

我们以亲缘关系近的品种东农 303 和克新 4 号等品种为试材, 以检测马铃薯纺锤块茎类病毒的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法所应用的凝胶浓度 (5% 浓度凝胶, 2.4% 交联度) 和电极缓冲系统 (89mM Tris, 89mM 硼酸, 2.5mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 8.3), 进行块茎全蛋白电泳检测, 其结果与应用本文材料和方法中列举的方法, 获得的电泳图谱极为相似。

4 讨 论

4. 1 马铃薯块茎全蛋白电泳图谱鉴定品种的有效性

国外许多研究表明, 马铃薯块茎全蛋白的组成是由品种的遗传因素决定的, 它几乎不受栽培条件等环境因素的影响, 是鉴定品种的可靠性状。从本试验应用的供试品种的电泳图谱分析, 也证实了这一点。因此, 可将块茎全蛋白电泳图谱作为品种的生化“指纹”, 用于鉴定马铃薯品种是有效的, 而且只

从块茎取下一小块薯肉即可得到清晰的电泳图谱。所以, 它不仅可以测定品种的真实性, 也可用于品种纯度的鉴定。

4. 2 试验方法特点

对 Stegemann 原来的方法作了一些改动, 使其趋于简易、快速, 所用的仪器和试剂, 基层农业科研单位的试验室也有能力装备。因此, 我们认为, 本法有如下显著的特点:

①取样数量少。蛋白质提取方法简便, 每一块茎只需取出一小块薯肉, 研磨后可低速离心应用上清液作样品; 也可不离心, 在冰箱中自然沉淀分离, 这样可以在短时间内制备大量样品。

②电泳时间短。在 40mA 恒定电流条件下只需 60~70min, 蛋白质可展开分离, 泳到 14cm, 在气温不超过 20℃ 时, 可在室温条件下电泳; 如气温高, 可在冰箱中电泳。

③灵敏度高、染色快。改考马斯亮兰染色为银染法, 其灵敏度高, 染色所需时间短, 谱带多且清晰, 谱带间区分方便, 分辨力高, 重演性好。

参 考 文 献

- 1 Zwartz J A · Eur Potato J, 1966, 9: 111~128
- 2 Loeschke V and Stegemann H · Phytochem, 1996, 5: 985~991
- 3 Stegenann H and Loeschke V · Index of European Potato Varieties · Mitteilungen der Biologischem Bundesanstalt, Heft 168, Berlin. 1976, pp 1~215
- 4 Switzer R C et al · Biochem, 1979, 98: 231

TESTING TRUENESS AND PURITY OF POTATO VARIETY BY TUBER TOTAL PROTEIN POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS TECHNIQUE

Wu Lingjuan, Dong Chuanmin, Zhang Yakui and Wen Fujun

(Daxinganling Potato Research Center 165000)

ABSTRACT

Total protein was extracted from tubers of each of 30 varieties and electrophoresis was carried out, using modified Stegemann's method. The results indicated that the total protein electrophoresis diagrams were different for these varieties tested, but the diagram was the same for different individual of a variety, suggesting that the diagram is related to hereditary factors of a variety. Therefore, this method can be used to test trueness and purity of potato variety. The method used in this experiment is accurate, simple and rapid, and is suitable for ordinary laboratory.

KEY WORDS: potato, variety, electrophoresis