

康美玲,田忠景,张倩倩. 利用醇溶蛋白电泳图谱分析不同玉米品种的遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):70-72.

利用醇溶蛋白电泳图谱分析不同玉米品种的遗传多样性

康美玲, 田忠景, 张倩倩

(枣庄学院生命科学学院, 山东枣庄 277160)

摘要:采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(SDS-PAGE)对 10 个玉米品种进行醇溶蛋白遗传多样性分析。10 个玉米品种共分离出 12 条谱带, 每种玉米品种分离出了 5~8 条谱带, 平均 6.9 条, 其中具多态性的谱带共有 7 条, 多态性比率达 58.33%。按照迁移率由大到小可分为 α 、 β 、 γ 、 ω 4 个区, 其中 α 区存在 1 条谱带, β 区存在 1 条谱带, γ 区存在 3 条谱带, ω 区存在 7 条谱带。10 个玉米品种间的遗传距离变化范围为 0.000~0.538, 平均为 0.195。对供试品种进行系统聚类, 有 10 种玉米品种在 8.96 水平上全部聚为一类, 其中有 7 份材料在 8.10 水平上聚为一类, 3 份材料在 4.20 水平上聚为一类。由此可见, 供试材料之间具有一定的醇溶蛋白遗传多样性, 但遗传多样性不高。

关键词:玉米; 醇溶蛋白; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S513.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0070-03

玉米既是我国重要的粮食作物, 也是保健佳品。我国玉米种植面积很大, 玉米杂交种由于具有杂种优势被广泛采用^[1]。玉米醇溶蛋白具有很强的疏水性、韧性、抗菌性等特点, 是玉米籽粒的主要贮藏蛋白之一^[2]。玉米醇溶蛋白为单亚基结构, 其谱带组成具有很强的异质性和复杂性, 不同玉米品种之间差异明显。玉米醇溶蛋白变异由遗传因素决定, 几乎不受环境影响, 能稳定地反映不同品种编码位点的差异^[3]。目前, 醇溶蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(SDS-PAGE)图谱分析已被广泛应用于品种鉴定、种子纯度检验、亲缘关系比较、遗传多样性等研究^[4-7]。然而, 关于玉米醇溶蛋白遗传多样性研究还比较少。本试验以不同玉米品种种子为材料, 对其醇溶蛋白进行遗传多样性分析, 以期有效利用玉米种质资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 材料 谷玉 178、郑单 958、土海 052、鲁玉 14、山农 201、振杰 4、先行 3、招玉 6、安玉 5、鲁单 981 等 10 个玉米品种(山东省枣庄市种子分公司)为供试材料。

1.1.2 溶液配制 溶液的配制方法见文献^[8-11]。

1.1.2.1 醇溶蛋白提取液 甲基绿 0.05 g、2-氯乙醇 25 mL 加蒸馏水定容至 100 mL, 低温保存。

1.1.2.2 电极缓冲液(4℃保存) 甘氨酸 14.4 g、Tris 3 g、SDS 1 g、蒸馏水 800 mL 溶解之后, 调节 pH 值至 8.8, 最后定容至 1 000 mL。

1.1.2.3 样品缓冲液(4℃保存) Tris 0.15 g、SDS 0.4 g、 β -巯基乙醇 1 mL、甘油 2 mL、蒸馏水 7 mL, -20℃贮存备用。

1.1.2.4 固定及染色液 考马斯亮蓝 0.4 g、无水乙醇 25 mL、三氯乙酸 50 g, 加蒸馏水至 500 mL 配成染色液。

1.1.2.5 脱色液 冰乙酸 100 mL、乙醇 50 mL、蒸馏水 850 mL 配成脱色液。

1.1.2.6 凝胶溶液(表 1)

表 1 按文献^[12-14]的方法配制分离胶和浓缩胶

项目	体积	
	10% 分离胶	5% 浓缩胶
超纯水	11.9 mL	6.8 mL
30% 四甲基乙二胺(Act)/N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(Bis)(29:1)	10 mL	1.7 mL
1.5 mol/L Tris·HCl(pH 值 8.8)	7.5 mL	—
1.0 mol/L Tris·HCl(pH 值 6.8)	—	1.25 mL
10% SDS	300 μ L	100 μ L
10% AP(过硫酸胺)	300 μ L	100 μ L
四甲基乙二胺(TEMED)	12 μ L	10 μ L

1.1.3 主要试剂 Acr、Bis、 β -巯基乙醇、甘氨酸、冰醋酸、2-氯乙醇、十二烷基硫酸钠、过硫酸胺、甲基绿指示剂、考马斯亮蓝 R-250、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、TEMED、甘油、盐酸等。

1.1.4 主要试验器材 DYY-4 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器制造厂)、DYY-III28D 型电泳槽(北京六一仪器制造厂)、JT201N 电子天平(上海精天电子仪器有限公司)、Eppendorf-centrifuge 5415R 小型台式冷冻离心机。

1.2 方 法

1.2.1 玉米醇溶蛋白提取 玉米种子洗净后 70℃烘干至恒重, 将各品种玉米单粒粉碎至粉末状, 置于 -20℃冰箱中保存备用。将玉米粉置于 1.5 mL 离心管中, 加 800 μ L 醇溶蛋白提取液, 涡旋振荡 10 min, 室温振荡浸提过夜, 4℃8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液即醇溶蛋白(若浑浊则需重复离心), 置于 -20℃冰箱中保存备用。

1.2.2 玉米醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳 根据说明书安装玻璃板。加热煮沸琼脂, 作为封底胶进行封底。制备分离胶, 由于加入 TEMED 后凝胶就开始聚合, 所以要立即旋动混合液, 迅速在电泳槽的玻璃板之间灌注, 留出梳齿的齿高加 2~3 cm 的空间以便灌注浓缩胶。用滴管在溶液上覆盖 1 层蒸

收稿日期:2013-05-20

作者简介:康美玲(1977—),女,山东枣庄人,硕士,讲师,从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:kmling006@126.com。

馏水。待分离胶聚合完全后,倒出覆盖水层。注入浓缩胶后立即插入梳子,待胶凝固。拔出样品梳,整理点样孔,用滤纸条吸去槽内多余水分,取 20 μL 等体积充分混匀的上样缓冲液和样品提取液混合液(100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3~5 min)^[15],注入点样孔。分别在前槽和后槽内加入电极缓冲液。接好电极线,打开电源,采用稳压电泳:浓缩胶 110 V,分离胶 220 V,待指示染料移动到凝胶下缘 1 cm 时,停止电泳。电泳结束后,剥下胶板,并切下胶板一角,作左右标记,用蒸馏水冲洗凝胶数次,放入染色液中染色过夜。用脱色液进行脱色,更换脱色液,直至背景无色。

1.3 数据处理

按有或无记录每个材料的电泳谱带,同一位置的电泳谱带存在时赋值 1,否则赋值 0。材料间相似系数(GS)计算公式如下。用 DPS 3.01 系统进行聚类分析。

$$GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j); \quad (1)$$

$$GD = 1 - GS. \quad (2)$$

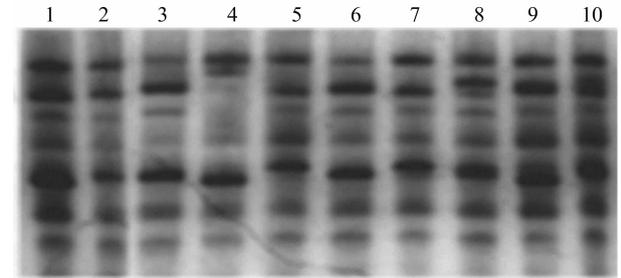
式中: N_i 为 i 材料出现的谱带数, N_j 为 j 材料出现的谱带数, N_{ij} 为 i 材料和 j 材料共有的谱带数, GD 为遗传距离。

2 结果与分析

2.1 醇溶蛋白谱带多样性分析

由图 1 可知,各玉米品种间具有一定的醇溶蛋白多态性。10 个玉米品种共分离出 12 条谱带,每个玉米品种分离出 5~8 条谱带,平均 6.9 条,其中具多态性的谱带有 7 条,多态性比率为 58.33%。迁移率由大到小可分为 α 、 β 、 γ 、 ω 4 个区,其中 α 区存在 1 条谱带, β 区存在 1 条谱带, γ 区存在 3 条谱带, ω 区存在 7 条谱带,谱带数量由多到少依次为 ω 区 > γ 区 > β 区 = α 区。电泳谱带集中分布在 ω 区(7 条), γ 区也较多(3 条), α 区、 β 区较少(1 条)。谷玉 178 和安玉 5 谱带基本相同,说明这 2 个玉米品种遗传差异不大,亲缘关系相近。鲁单 981 与谷玉 178、安玉相比, γ 区少 1 条带, ω 区多 1 条带,存在遗传差异。山农 201 和先行 3 谱带完全相同,说明这 2 个玉米品种遗传差异很小,亲缘关系非常相近。振杰 4 与山农 201 和先行 3 只是 γ 区的蛋白含量稍有不同,说明振杰 4 与这 2 个玉米品种遗传差异小,亲缘关系相近。郑单 958 与土海 052 谱带基本相同,只是 γ 区和 ω 区蛋白含量有所不

同,说明这 2 个玉米品种亲缘关系较近。鲁玉 14 和招玉 6 与其他 8 个玉米品种相比,谱带数量与分布差异较大,说明鲁玉 14 与招玉 6 之间及与其他 8 个玉米品种的亲缘关系较远。12 条谱带中,只有 2 条是所有品种的共有谱带,说明不同品种间存在一定的遗传差异,具有一定的遗传多样性(表 1)。



1~10 分别代表谷玉 178、郑单 958、土海 052、鲁玉 14、山农 201、振杰 4、先行 3、招玉 6、安玉 5、鲁单 981 等 10 个玉米品种

图 1 10 个玉米品种醇溶蛋白电泳结果

表 1 10 个玉米品种醇溶蛋白电泳条带

品种	总带数(条)	电泳条带(条)			
		α 区	β 区	γ 区	ω 区
谷玉 178	8	1	1	3	3
郑单 958	6	1	1	1	3
土海 052	6	1	1	1	3
鲁玉 14	5	1	1	1	2
山农 201	7	1	1	2	3
振杰 4	7	1	1	2	3
先行 3	7	1	1	2	3
招玉 6	8	1	1	2	4
安玉 5	8	1	1	3	3
鲁单 981	7	1	1	2	3

2.2 遗传距离分析

由表 2 可知,根据 12 条具有多态性的醇溶蛋白条带计算供试材料间的遗传相似系数,再计算相应的 GD , GD 的变化范围为 0.000~0.538,平均值为 0.195,说明供试材料间具有一定的醇溶蛋白遗传多样性,但多样性水平不高。1(谷玉 178)和 9(安玉 5)之间的遗传距离最小, GD 为 0.000。8(招玉 6)与 4(鲁玉 14)和 5(山农 201)间的遗传距离最大, GD 为 0.538。

表 2 10 个玉米品种之间的遗传距离矩阵

品种编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000									
2	0.143	0.000								
3	0.143	0.167	0.000							
4	0.385	0.455	0.455	0.000						
5	0.067	0.231	0.231	0.333	0.000					
6	0.067	0.077	0.076	0.500	0.143	0.000				
7	0.067	0.077	0.231	0.500	0.000	0.143	0.000			
8	0.125	0.143	0.286	0.538	0.538	0.200	0.200	0.000		
9	0.000	0.286	0.285	0.385	0.385	0.200	0.067	0.125	0.000	
10	0.333	0.231	0.231	0.500	0.500	0.143	0.143	0.200	0.200	0.000

2.3 醇溶蛋白的聚类分析

由图 2 可知,10 个玉米品种的遗传相异系数在 8.96 水平上全部聚为一类,其中 5(山农 201)、7(先行 3)在 0.75 水

平上聚为一类,说明二者的亲缘关系很近。3(土海 052)、6(振杰 4)在 1.21 水平上聚为一类,说明两者的亲缘关系较近。9(安玉 5)、8(招玉 6)、10(鲁单 981)在 4.20 水平上聚为

一类,说明三者的亲缘关系较近。1(谷玉178)、2(郑单958)、5(山农201)、7(先行3)、3(士海052)、6(振杰4)、4(鲁玉14)之间存在一定的亲缘关系。

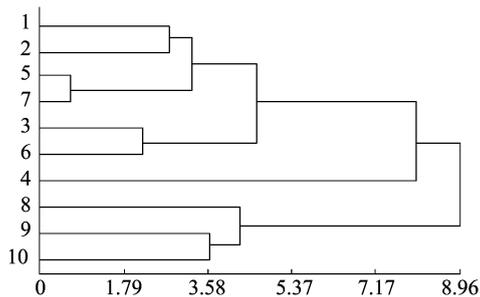


图2 10个玉米品种醇溶蛋白间的遗传差异聚类分析

3 结论

醇溶蛋白是玉米籽粒中贮藏蛋白的主要成分,是玉米基因在特定时空的表达产物,其PAGE谱带的丰度只与基因有关,与环境基本无关,能反映不同玉米品种在分子水平上的差异性。醇溶蛋白电泳图谱间的差异性可以用来判断品种间亲缘关系的远近^[10,16]。本研究利用醇溶蛋白标记技术对10个玉米品种进行遗传多样性分析,结果表明,SDS-PAGE能较好地 将醇溶蛋白谱带分离出来,10个玉米品种共分离出12条谱带,每个玉米品种分离出5~8条谱带,平均6.9条,其中具多态性的谱带共有7条,多态性比率达58.33%,GD范围为0.000~0.538。利用醇溶蛋白标记技术能较好地揭示10个玉米品种之间的亲缘关系,在蛋白质水平上证明不同玉米品种之间具有一定的遗传多样性,但多样性水平不高。

参考文献:

[1]刘树朋,刘艳岩,王永柱,等.对玉米地方种质资源利用的建议[J].辽宁农业科学,2005(3):43-44.
 [2]Burr B,Burr FA. Zein synthesis in maize endosperm by polyribosomes

attached to protein bodies[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1976,73(2):515-519.
 [3]代寿芬,郑有良,颜泽洪.西藏小麦醇溶蛋白Gli-1和Gli-2位点等位基因组成分析[J].四川农业大学学报,2004,22(2):107-111.
 [4]赵继新,武军,陈新宏,等.几种小麦族亲缘植物麦谷蛋白和醇溶蛋白研究[J].河北农业大学学报,2008,31(6):1-6.
 [5]刘宗利,王乃强,袁卫涛,等.玉米醇溶蛋白的研究及市场应用[J].中国食品添加剂,2009,16(增刊):19-21.
 [6]胡智学.玉米醇溶蛋白的提取及应用[J].河北化工,2007,30(12):8-9.
 [7]杜悦,陈野,王冠禹,等.玉米醇溶蛋白的提取及其应用于农产品加工[J].农产品加工:学刊,2008,15(7):23-29.
 [8]杨瑞武,魏秀华,周永红,等.赖草属植物醇溶蛋白的遗传多态性[J].云南植物研究,2004,26(1):103-110.
 [9]马啸,周永红,于海清,等.野生垂穗披碱草种质的醇溶蛋白遗传多样性分析[J].遗传,2006,28(6):699-706.
 [10]郎明林,卢少源,张荣芝.中国北方冬麦区主栽品种醇溶蛋白组成的遗传演变分析[J].作物学报,2001,27(6):958-966.
 [11]魏育明,郑有良,刘登才,等.四川小麦地方品种Gli-1、Gli-2和Glu-1位点的遗传多样性[J].植物学报,2000,42(5):496-501.
 [12]刘果厚,贾宝丽.浑善达克沙地榆遗传多样性的研究[J].干旱区资源与环境,2003,17(5):123-128.
 [13]兰秀锦,郑有良,刘登才,等.山羊草属植物醇溶蛋白的遗传多样性分析[J].草业学报,2006,15(6):93-100.
 [14]孙坤,陈纹,马瑞君,等.子午岭中国沙棘亚居群的遗传多样性研究[J].兰州大学学报:自然科学版,2004,40(3):72-75.
 [15]范莉英,李德颖,李敏.应用种子蛋白电泳图谱对高羊茅品种进行鉴别与聚类研究[J].草业学报,1996,5(4):5-10.
 [16]朱利霞,牛吉山,王亚平.部分普通小麦醇溶蛋白的遗传多样性分析[J].麦类作物学报,2008,28(4):588-593.

欢迎订阅 2014 年《江苏农业科学》

邮发代号:28-10

《江苏农业科学》是由江苏省农业科学院主办的综合性农业科技期刊,为双核心期刊(中国科技核心期刊、全国中文核心期刊)、CSCD来源期刊、RCCSE中国核心学术期刊、中国农业核心期刊,荣获第三届国家期刊奖提名奖、第二届国家期刊奖百种重点期刊奖、全国优秀科技期刊、江苏省双十佳期刊、江苏省优秀期刊、全国农口学会优秀期刊、华东地区优秀期刊等。主要刊登国内最新农业科技创新和研究成果方面的研究论文,时效性强、发表周期短、信息量大,适合农业科研人员、农业行政管理人员、农业技术推广人员、农业企业管理人员、生物与农业院校师生以及农民等阅读。《江苏农业科学》刊载的文章科学性强、论证严谨,在学术上多有新的见解与发展,而且通俗易懂,是您从事农业科研、农技推广、农业管理,跟踪农业科技,实现科学致富的良师益友。

《江苏农业科学》为月刊,每月25日出版,大16开,每期432页,辟有专论、生物技术、育种栽培与生理生化、新品种、植物保护、园艺园林、畜牧兽医、水产养殖与特种种养、贮藏与加工、质量与安全检测分析、资源与环境、农业工程、农业经济与管理等栏目。国内外公开发行,邮发代号:28-10。中国标准连续出版物号:CN32-1214/S;ISSN1002-1302。每期定价25.00元,全年300.00元。

地址:南京市孝陵卫钟灵街50号 邮编:210014 网址: <http://www.jsnykx.cn>

电话:025-84390282 E-mail: jsnykx@vip.163.com