

多倍体麦类作物 W_x 蛋白检测的 SDS-PAGE 方法

王子宁, 郭北海, 李洪杰, 张艳敏, 温之雨

(河北省农林科学院粮油作物研究所, 石家庄 050031)

摘要: 本文通过对小麦蜡质蛋白的实验和研究, 详细论述了蜡质蛋白的特性、提取原理、电泳原理和检验原理。对多倍体麦类作物 W_x 蛋白亚基的检测, 提出了应用效果良好的电泳系统, 并就提取方法、凝胶配方和操作步骤进行了描述。本文还列出了部分麦类作物蜡质蛋白亚基基本模式示意图和实验例证, 具有很好的参考价值。

关键词: 多倍体麦类; W_x 蛋白; 检测; SDS-PAGE

中图分类号: Q512+.4

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)03-0169-03

SDS-PAGE for the Detection of W_x Protein in Polyploid Wheats

WANG Zi-ning, GUO Bei-hai, LI Hong-jie, ZHANG Yan-min, WEN Zhi-yu

(Institute of Food and Oil Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: The waxy protein property, principles of its extraction, electrophoresis and detection were discussed in detail in this paper. According to the detection of polyploid wheat waxy subunits, an effective electrophoresis system was given with the extraction method, gel composition and operating steps listed. The basic iso-form patterns of wheat and related species as well as an application example were also showed in the paper. It is recommended that this paper is valuable both as reference and in application.

Key words: polyploid wheats; W_x proteins; detection; SDS-PAGE

多倍体麦类作物如: 六倍体普通小麦 (AABBDD)、四倍体小麦 (AABB)、八倍体小偃麦 (AABBDEE)、小黑麦 (AABBDDRR) 等, 具有多个染色体组, 其籽粒的蜡质蛋白由多个亚基构成, 分别由不同的染色体控制。小麦 W_x-A1、W_x-B1 和 W_x-D1 分别由 7AS、4AL 和 7DS 控制^[1]; 小偃麦和小黑麦中蜡质蛋白除由 A、B 或 D 染色体控制外^[2], 还分别受偃麦草和黑麦染色体的控制。与玉米、水稻、黑麦、偃麦草等具有单一染色体组的物种不同, 蜡质蛋白亚基多, 且分子量比较接近, 在常规的 SDS-PAGE 系统中难于清楚地检测出来^[3]。这为蜡质蛋白的进一步研究增加了困难。

Nacamura^[4]用双向电泳方法证明了六倍体小麦籽粒的蜡质蛋白由 3 个亚基构成, 但双向电泳操作复杂, 费时费力, 分辨率不高, 每次分析的样品少, 效率低。因而在突变体筛选、基因跟踪和检测等方面有明显的缺陷。Zhao^[5,6]采用的单向 SDS-PAGE 方法较为直观, 但蛋白质提取过程复杂, 有些药品国内不易买到或太贵。同时由于该方法掌握起来有一定难度, 加之 W_x-B 和 W_x-D 两个亚基分子量相等, 只是等电点不同, 因此用该系统分离时分辨率不够高且不稳定, 因而限制了该方法的推广应用。

国外以 Zhao 等人^[6]的 W_x 蛋白电泳方法为典型代表的各

种方法, 大同小异, 不太适合于国内的各种条件。国内的河北农林科学院粮油作物研究所和中国农大农学系等单位先后开展了此项研究工作^[7]。作者曾在《华北农学报》中发表文章对该方法做过简单介绍^[2]。近年来又对其进行了改进和简化, 使之更具有可操作性, 简便实用, 主要优点是: 大大简化了提取过程, 优化了凝胶系统, 可清楚地分开 4 个亚基, 分辨率高且稳定; 与普通的 SDS-PAGE 方法操作相似, 简便且效率高。

1 蜡质蛋白的检测原理

1.1 W_x 蛋白的基本特性

小麦蜡质蛋白 (W_x 蛋白) 为结合于淀粉颗粒上的合成酶 (GBSS), 是除麦谷蛋白、麦醇溶蛋白等蛋白成份之外的又一种储存蛋白, 分子量约为 60kDa, 由 3 个亚基构成, 在籽粒充实期表达丰富, 控制着淀粉粒的合成。W_x 蛋白的表达受基因控制, 与直链淀粉的合成密切相关, 其隐性突变体籽粒中直链淀粉含量下降, 支链淀粉含量增加^[4]。W_x 基因突变会导致小麦品质的改变。由于多倍体麦类作物有多个染色体组, 在自然界中还未发现像玉米、水稻等作物的天然糯性突变体。小偃麦、小黑麦和一粒小麦中含有另外的 W_x 亚基, 其分子量

不同,但都介于小麦 W_x-A1 和 $D1$ 亚基之间。一粒小麦 W_x 亚基为 W_x-A^m ,由一粒小麦的 $7A$ 染色体控制;来自于偃麦草、黑麦和簇毛麦的蜡质蛋白亚基有可能分别来自偃麦草的 $7E$ 、黑麦的 $7R$ 和簇毛麦的 $7V$ 染色体。

1.2 W_x 蛋白的提取

与常规的蛋白提取方法原理相似,但重要的是将 W_x 蛋白与其它蛋白如麦谷蛋白、麦醇溶蛋白、球蛋白等分开,才能对它进行检测和分析。由于蜡质蛋白结合在淀粉粒上,所以较为温和的洗涤处理不会造成 W_x 蛋白的损失。经典的方法是利用 SDS 结合蛋白的特性洗涤淀粉中的其它蛋白,利用巯基乙醇作保护剂,保护蛋白使之稳定;但 SDS 只是一般的去污剂,稀盐的掺入会增加蛋白的溶解度,促进蛋白的洗涤。在最后的煮沸过程中, W_x 蛋白四级结构中的 $-S-S-$ 键被打开,使蜡质蛋白从淀粉粒上解离下来,各亚基间相互分离,这时样品中主要成分为 W_x 蛋白亚基。

1.3 电泳及检测

由于蜡质蛋白亚基相对于高分子量麦谷蛋白等,分子量较低,所以采用低交联度大孔径的凝胶进行分离,因为 W_x-B1 和 W_x-D1 两个亚基分子量相等,只是等电点不同,所以一般 SDS-PAGE 分辨率不够高,最好的分离胶 pH7.8^[8,9],在此 pH 值下,蜡质蛋白各亚基间的差异最大,从而可以将它们分开。小麦籽粒中蜡质蛋白的含量很低,利用常规的考马斯亮蓝染色分辨率较低,采用银染效果较好^[6,10]。

2 实验与方法

2.1 贮液配制

(1) 40% 丙烯酰胺(Acr.): 40g 丙烯酰胺溶解于 50ml 蒸馏水中并过滤,用定容至 100ml,4℃ 保存;

(2) 2% 甲叉双丙烯酰胺(Bis-Acr.): 2g 甲叉双丙烯酰胺溶于 50ml 蒸馏水,过滤并定容至 100ml,4℃ 保存;

(3) 1mol/L Tris-HCl, pH7.8: 12.1g Tris 溶于 50ml 蒸馏水,用 HCl 调 pH 至 7.8,定容至 100ml,4℃ 保存;

(4) 0.5mol/L Tris-HCl, pH6.8: 6.05g Tris 溶于 50ml 蒸馏水,用 HCl 调 pH 至 6.8,定容至 100ml,4℃ 保存;

(5) 10% SDS: 10g SDS 溶于 50ml 蒸馏水中,定容至 100ml,常温保存;

(6) 10% 过硫酸铵(APS): 0.1g 过硫酸铵溶于 0.6ml 蒸馏水中,定容至 1ml,新鲜配制,于 4℃ 保存,一周内用完;

(7) 四甲基乙二胺(TEMED) 原液,于 4℃ 保存;

(8) 淀粉漂洗缓冲液: 70mmol/L Tris-HCl pH6.8, 含 2% β -ME, 2% SDS;

(9) 提取缓冲液: 漂洗缓冲液中另外含 20% 甘油;

(10) 电极缓冲液: pH8.0 Tris-HCl: Tris 3.0g, 甘氨酸 40g, 10% SDS 10ml, 定容 1000ml;

(11) 固定液: 含 10% 醋酸, 50% 甲醇;

(12) 银染液: 0.25% $AgNO_3$, 0.15% 的甲醛;

(13) 显色液: 2.5% $NaCO_3$, 0.05% 甲醛, 0.1×10^{-6} 的硫代硫酸钠;

(14) 固定液: 3ml 冰醋酸定容至 100ml;

(15) Farmer's reducer 褪色液: 3.0g 铁氰化钾, 5.0g 硫代硫酸钠, 定容于 300ml 蒸馏水。新鲜配制,注意铁氰化钾有毒性。

2.2 凝胶配方

贮液(ml)	分离胶(15%)	堆积胶(4.5%)
40% Acr	15.0	1.1
2% Bis-Acr	1.55	1.5
1mol/L Tris-HCl, pH7.8	15.0	-
0.5mol/L Tris-HCl, pH6.8	-	2.8
dH ₂ O	7.9	4.5
10% SDS	0.4	0.1
10% APS	0.1	0.05
TEMED	0.03	0.01
总体积	40.0	10.0

2.3 W_x 蛋白提取

(1) 将种子用钳子夹裂,放入 1.5ml 离心管中,加入 0.6ml 漂洗缓冲液,4℃ 过夜;

(2) 用专用杵将淀粉块捣开,去掉种皮和面筋;

(3) 16 000 r/min 离心 1 min,去上清,加入 1ml 漂洗缓冲液,悬浮,离心去上清,此步重复 2~3 次;

(4) dH₂O 悬浮淀粉,16 000 r/min 离心 1 min,去上清,重复 2~3 次;

(5) 按每粒小麦种子加入 0.6ml 提取液,悬浮淀粉;

(6) 100℃ 水浴煮沸 4min;

(7) 趁热离心,16 000 r/min 6~10 min,保留上清;

(8) 依据凝胶厚度和加样孔的大小不同,取 25~40 μ l 上清上样;

2.4 电泳

以 170 \times 150 \times 0.7(mm \times mm \times mm) 垂直双板为例,采用瑞典 PHARMACIA 生产的 MULTIPHAR II 电泳仪及 PROTEAN II 电泳槽,稳压条件下采用初始电压 130V,待溴酚蓝进入分离胶后调整电压为 300V,电泳 5 h;稳流条件下采用 15mA/胶板,电泳过夜,约 17 h。

2.5 银染

(1) 凝胶固定: 将凝胶放入 150ml 固定液中,固定过夜;

(2) 水洗: 用大量 dH₂O 洗胶两次,每次 3min;

(3) 银染: 将胶泡入 $AgNO_3$ 染液中,浸染 30min;

(4) 水洗: 用 dH₂O 洗胶 20 s,快速倒掉水;

(5) 显色: 用少量显影液快速洗胶一次,倒掉浑浊显影液,再倒入大量显影液,轻轻摇动染色盒,直至凝胶上带清晰而背景浅为好;

(6) 停显: 倒掉显影液,用 3% 醋酸停显 10min;

(7) 记录: 直接拍照或通过扫描仪记录于计算机中更好;

(8) 1~7 步在摇床上进行时可以使每次操作充分进行,但摇床不是必须的。凝胶染色不好时,可以用 Farmer's reducer 褪色液^[11] 浸泡凝胶直至凝胶颜色退干净,再用蒸馏水浸泡漂



图 1 采用传统方法电泳实例



图 2 部分麦类作物 W_x 蛋白亚基电泳图谱

1. 中国春 2. 冀麦 38 3. 唐麦 4 号 4. 渭麦 5 号 5. 农大 139 6. 冀麦 37 ;
7. 石农 8717 8. 石 90-4185 9. 小偃 693 ;10. 冬小偃麦。

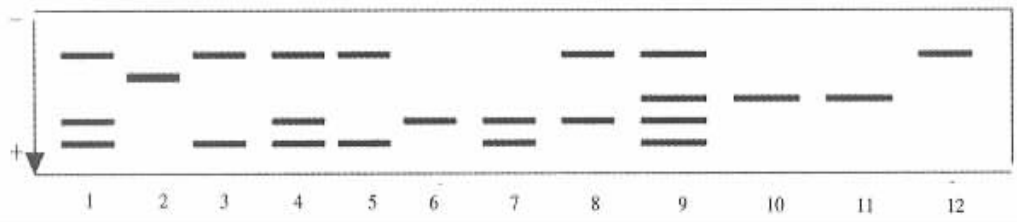


图 3 部分麦类作物 W_x 蛋白亚基示意图

1. 中国春 2. 一粒小麦 3. 四倍体小麦 4. 六倍体小麦 5. 白火麦 6. 关东 107 ;
7. 农林 67 8. 红稃麦 9. 小偃 693 ;10. 簇毛麦 ;11. 偃麦草 ;12. 黑麦。

洗凝胶若干次,直至凝胶上黄色漂洗干净,再重复 1~7 步。

2.6 电泳图谱

采用传统方法电泳实例见图 1,采用本文实验方法电泳实例见图 2 部分麦类作物蜡质蛋白亚基示意图见图 3。

2.7 本方法的主要改进之处:

(1)与 Zhao 的方法相比,提取过程中省去了昂贵的药品氯化铯,省略了乙醇漂洗和丙酮漂洗等几个步骤,节省了时间和药品;(2)与 Zhao 等人采用的丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺为 30:0.135、分离胶浓度为 17% 的系统不同,本研究采用的是丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺为 30:0.155 的比例、凝胶浓度采用 15%。在 12%~17% 浓度范围内均可跑出分辨率令人满意的胶片,W_x-E、W_x-B1 和 W_x-D1 蛋白亚基可以完全分开。

参考文献:

- [1] Nakamura T, Yamamori M. Identification of three W_x proteins in wheat [J]. *Biochemical Genetics*, 1993a, 31: 75~86.
[2] 王子宁,郭北海,等.小麦地方品种的 W_x 亚基构成分析[J]. *华北农学报*, 1999, 79: 53~59.
[3] Okuno K. Expression of mutant genes specifying starch synthesis in cereal grains [J]. *Gamma-Field Symposium*, 1985, 24: 39~62.

- [4] Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, *et al.* Decrease of waxy (W_x) protein in two wheat cultivars with low amylose content [J]. *Plant Breeding*, 1993b, 111: 99~105.
[5] Zhao XC, and Sharp PJ. A single genetic locus associated with starch granule properties and noodle quality in wheat [J]. *J. Cereal Sci.* (in press).
[6] Zhao XC, and Sharp PJ. An improved 1D SDS-PAGE method for identification of three bread wheat waxy proteins [J]. *J. Cereal Sci.* 1996, 23: 192~93.
[7] 姚大年,王新旺,等.小麦品种 Waxy 蛋白的鉴定和筛选 [J]. *农业生物技术学报*. 1999, 7 (1): 1~9.
[8] Rahman S, Kosar-Hashemi B, *et al.* The major proteins of wheat endosperm starch granules [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1995, 22: 793~803.
[9] Shibanuma K, Takeda Y, Hizukuri S. Molecular structures of some wheat starches [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1994, 25: 111~116.
[10] Oakley B R, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultra-sensitive silver stain for detecting proteins in poly-acrylamid gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, 105: 361~363.
[11] Pharmacia LKB. User's Manual of Multiphor II Electrophoresis System [M]. LKB, 1990, 369.