

浅议等电聚焦电泳技术在种子纯度检测中的应用

邢宝田，吴 萍

(北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘 要: 结合多年试验从制胶方法、凝胶浓度、样品提取、染色液的储备及染色方法等方面总结了利用酯酶、过氧化物酶、磷酸葡萄糖变位酶、苹果酸脱氢酶等同工酶谱带鉴别大白菜、黄瓜、番茄、甘蓝等多种蔬菜几十个品种的种子纯度, 综述了等电聚焦电泳技术在种子纯度检测中的应用。

关键词: 等电聚焦; 同工酶; 种子纯度
中图分类号: S 603.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)11—0137—03

等电聚焦电泳技术是 1980 年慕尼黑工业大学食品科学和化学分析研究所的 Radola B J 发展起来, 并经国外一些种子检验实验室改进的一种非常实用的电泳技术^[1], 广泛应用于生物学的各个领域^[2-5]。该方法是利用蛋白质分子具有两性解离及等电点的特征, 加入有 pH 梯度的凝胶介质中, 在电场内经一定时间后, 各组分将分别聚焦在各自等电点相应的 pH 位置上, 形成分离的蛋白质区带。主要特点是: 灵敏度及分辨率高、重复

性好, 特别适用于大批量种子纯度检测和真实性鉴定以及遗传多样性等群体生物学领域的研究。

1 等电聚焦电泳技术在种子纯度检测中的应用
用等电聚焦电泳技术检测种子纯度的主要原理是: 通过分析亲本和 F₁ 样品之间的同工酶谱带的差异, 确定 F₁ 样品中真正的杂交种子占总样品的比率。但是在实际应用过程中, 由于不同的杂交组合, 亲本和 F₁ 样品之间的差异条带也不相同, 有时不能得到满意的分析结果。根据多年实验室工作经验, 从以下几方面进行探索。

1.1 胶的浓度
聚丙烯酰胺是丙烯酰胺和交联剂在催化剂的作用下聚合而成的高分子胶状聚合物, 凝胶孔的大小和胶的

第一作者简介: 邢宝田(1968-), 女, 大专, 助理农艺师, 现主要从事蔬菜种子室内纯度检测及品种真实性鉴定工作。
通讯作者: 吴萍(1962-), 女, 硕士, 副研究员, 现主要从事种子生理研究及种子检测工作。E-mail: wuping@nercv.org。
收稿日期: 2010-03-05

Effects of Medium Concentration on Callus Growth and Resveratrol of Grape

DENG Jian-ping¹, YANG Guo-shun², HUANG Yi-hong¹, LI Yi-feng¹, ZHOU Jie-liang¹

(1. College of Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha, Hunan 410127; 2. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract: Taking Kyoho grape peer callus for materials, using callus at different subculture medium, callus growth and the resveratrol content were determined. The results showed that 5% sucrose in medium was favorable for callus growth and the resveratrol content; High or low of NO₃⁻/NH₄⁺ was unfavorable for callus growth and the resveratrol content, the maximum were achieved when NO₃⁻/NH₄⁺ ratio was 2 : 1; B₅ subculture medium added 5 mg/L NAA and 0.7 mg/L 6-BA was favorable for callus growth and the resveratrol content. In the most suitable medium under the conditions of callus growth was 56.12 g/L, the yield of resveratrol was 464.520 μg/g, the total content of resveratrol was 23.312 mg/L. The resveratrol content and yield of the control were 2.6 times and 2.9 times.

Key words: medium concentration; grape callus; resveratrol

浓度有关。一般情况下,实验室大多使用的制胶浓度为6%~8%^[9],但对于某些品种,却无法找到满意的鉴别谱带。这时可以试一下高浓度的胶,有时可以找到满意的结果。如图1是京丹2号番茄样品的杂交一代与亲本的鉴别谱带,使用10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,才能找出杂种一代与亲本之间的鉴别谱带。图中1为父本带型,图2为F₁带型,图3为母本带型。

1.2 样品的提取

样品提取方法对分析结果至关重要。不同的同工酶样品提取方法不同,同一种同工酶不同的品种提取时间也不同。有些品种取样时间对同工酶谱带的影响很大。通常采用的是:叶菜类种子是3~5 d的种苗,茄果类种子为5~7 d的种苗。苗长在2~4 cm时取样比较合适,苗期见光与否,对同工酶谱带影响不大,但也有特殊品种,例如番茄9812品种,其在不见光的情况下且苗龄为7 d以内是没有鉴别带的,当种苗长2 cm(5~7 d)左右时开始见光,见光2 d后出现鉴别谱带如

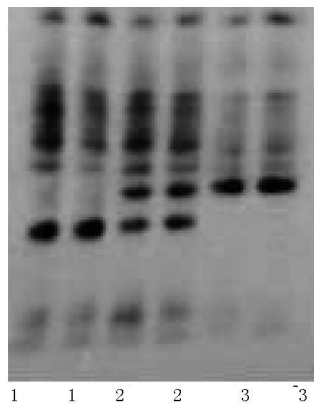


图1 京丹2号番茄种子鉴定图谱

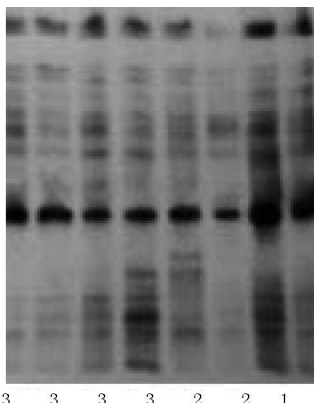


图2 9812番茄种苗在见光2 d的谱带

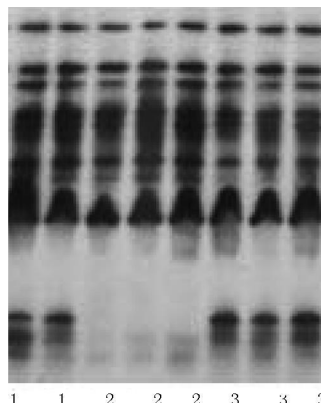


图3 9812番茄种苗见光5 d后的谱带



图4 BIORAD-3 000XI 电泳设备的制胶板(中间放的是玻璃)

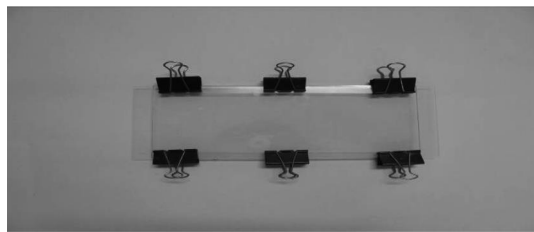


图5 2块玻璃板中放入垫片制胶法

1.4 胶的厚度

用图4方法制胶,胶的厚度固定为0.75 mm,用图5方法制胶,胶的厚度可以根据试验需要调节。不同厚度的垫片,制出的胶厚度也不同,通常有3种,其中最薄的胶约为0.44 mm,很适合于过氧化物同工酶(POX)染色,

图2,而且种苗颜色越深鉴别带越清晰(见图3)。

1.3 制胶方法

要得到满意的分析结果,分析胶的质量也很重要。通常实验室应用的是BIORAD-3 000XI电泳设备。图4是该系统的制胶板,用它可以制出厚度一致的胶板。但是在样品很多,急需检测结果的情况下,不能满足数量上的需求。在此介绍一种简单的制胶方法,图5是用2块宽度相等,长短不等的玻璃板中间放上垫片(上面的玻璃板短一些,下面的玻璃板长一些),用夹子夹紧,调好水平,将胶液灌上即可,大大提高了效率。而且可以根据需要任意调整胶的厚度。缺点是制胶过程有些烦琐,需要注意调节玻璃板水平。课题组也曾经试过另外一种方法,既垫片是方型的,只在一边上有一个小小的缺口,把垫片放在大小适当的玻璃板上,倒入胶液,然后用相同大小的玻璃板盖在上面,经过多次使用效果不是很好,即在制胶过程中很容易产生气泡,气泡会使谱带弯曲变形,甚至影响鉴别。

显色需要的时间很短,谱带也很清晰,缺点是只能带着玻璃板一起染色,不能制成干胶保存;第2种垫片1 mm,适合于常规性试验;第3种垫片厚度有1.5 mm,因为胶比较厚,试验中用的也比较少。

1.5 胶的保存

常温下制好的胶放置 24 h 后使用是没有任何问题的,但北方空气干燥,注意保湿即可。方法是准备一个合适的盘子(或者盒子),先在盘子里放几层吸水纸(或者别的吸水性好的介质),让纸吸足水分,然后将制好的胶连同玻璃板一起放在上面,注意胶面向上,玻璃板与纸接触,再盖好盖子即可。如果将盘子放入冷藏箱内 3~4 d,胶也是可以正常使用的。优点:可以合理安排时间,提高工作效率。缺点:注意保湿,如胶脱水变形就不能使用了。

1.6 染色液的储备

有些酶的染色液要现配现用,而且要求操作时速度要快,避免试剂在空气中停留时间过长而失效,如 PGM、IDH 等,但 POX 染色液在冷藏箱内可以保存 2 周。像大白菜和黄瓜等许多品种都是用过氧化物同工酶鉴定纯度的,在集中检测时,可以将染色液配制好存放在冷藏箱里,这样可以节省时间。

1.7 染色方法

按照染色液制备的方式,可分成 2 种:液染和胶染。在等电聚焦电泳染色时基本上是液染法。液染也是传统的常用染色方法,首先要配制好染液,等电泳结束后,将整片胶浸没在染液里,这样染液能和凝胶充分接触进行反应,这对有中间产物的酶染色是有利的,象 PGM、MDH 等^[7]。然而过氧化物同工酶(POX)显色比较快,等电聚焦电泳胶片又比较薄,当电泳结束后,取出胶片放入适当的容器中摆平,将染色液均匀倒在凝胶上薄薄 1 层,轻轻摇动,2 min 之内谱带就显现出来了。这种方法既节约了成本,又减少了试剂对环境的污染。

2 应用前景展望

通过优化等电聚焦电泳技术的制胶及染色等方法,以及调整取样时间及胶的浓度,已成功找出大白菜 40 个组合、小白菜 12 个组合、甜椒 10 个组合、花椰菜 5 个

组合、黄瓜 12 个组合、番茄 5 个组合,甘蓝 10 个组合的同工酶鉴别谱带,并实际应用于种子纯度检测。收到了良好效果。

电泳技术具有简单、方便、快速、谱带不受环境因素的影响,电泳程序又很容易规范化等优点,易形成统一的标准而推广。1991 年北美洲官方种子协会出版了《品种纯度测定方法》第 4 类即为电泳技术。1992 年 ISTA 在《品种纯度生化测定方法》里,全面介绍了几种用于品种纯度鉴定的电泳方法,并于 1996 年纳入国际种子检验规程。我国也将大麦、小麦及玉米纳入检验规程之中。随着科学技术的发展,电泳技术应用的范围将不断扩展,如新品种审定,亲缘关系分析和分类研究等方面。虽然,最近各种分子技术及研究方法有了长足发展,但分子技术因其要求检测水平高、费用大、谱带多,不易分析等缺点,不适用于大批量种子纯度检测及品种鉴定。随着等电聚焦电泳技术的改进和应用方法的创新,仍然可以作为种子生物学等研究的重要实验工具之一。

参考文献

[1] Radola B J. Ultrathin-layer isoelectric focusing 50 ~ 100^μm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films [J]. Electrophoresis 1980(1): 43-56.
[2] 黄为平, 郑晓鹰, 邢宝田. 电聚焦种子蛋白电泳方法检测蔬菜杂交种纯度[J]. 华北农学报, 1995, 10(4): 76-78.
[3] 黄为平, 郑晓鹰, 邢宝田. 电聚焦同工酶电泳技术鉴定一代杂种纯度[J]. 种子, 1995(6): 8-10.
[4] 宋明, 刘宝敬, 李成琼. 等. 电聚焦电泳法测定甘蓝自交不亲合性[J]. 园艺学报, 1995 25(2): 194-196.
[5] 王卫红, 张静梅, 苏瑞萍. 等. 应该等电聚焦电泳测定玉米种子纯度[J]. 华北农学报, 2003, 18(2): 27-31.
[6] 郑晓鹰, 李丽, 邢宝田. 同工酶差异位点分析在蔬菜杂交种纯度检测中的应用[J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 56-62.
[7] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.

Application of Isoelectric Focusing Techniques in Seed Purity Testing

XING Bao-tian, WU Ping

(Vegetable Research Centre, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: Combined many years' experience, from the method of rubber, gel concentration, sample extraction, reserves of coloration liquid and staining methods were summarized, use of esterase, peroxidase, glucose phosphate mutase, malate dehydrogenase isozymes with identification of Chinese cabbage, cucumber, tomato, cabbage and other vegetables, dozens of varieties of seed purity, the isoelectric focusing techniques in seed purity detection were summarized.

Key words: isoelectric focusing; isozyme; seed purity