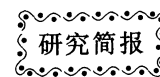


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01374



利用 A-PAGE 研究谷子籽粒蛋白质多态性

杨延兵 张华文 秦 岭 王海莲 管延安* 段乃彬 张 晗

山东省农业科学院作物研究所, 山东济南 250100

摘 要: 研究谷子贮藏蛋白多态性对谷子品种选育和鉴定评价具有重要的意义。本文利用 A-PAGE 方法对来自不同生态区的 24 份谷子品种籽粒的水溶蛋白、盐溶蛋白、酸溶蛋白和醇溶蛋白的多态性进行了研究。结果发现, 不同谷子品种之间籽粒水溶蛋白、酸溶蛋白谱带相似, 基本没有差异; 每个谷子品种的盐溶蛋白谱带有 20 多条, 仅有 4 个品种出现多态性谱带, 多态性也较低。说明谷子品种水溶蛋白、盐溶蛋白和酸溶蛋白 A-PAGE 谱带不适用于谷子鉴定研究。谷子醇溶蛋白谱带存在一定的异质性, 每个品种有 7~10 条醇溶蛋白谱带, 其中 5 条为公共条带, 2~5 条为多态性谱带, 醇溶蛋白 A-PAGE 谱带可以作为谷子品种鉴定评价的依据。结果说明, 和玉米、小麦等禾谷类作物相比, 不同生态区谷子栽培品种蛋白质变异较小, 遗传背景变化较小, 因此需要不断丰富谷子品种的遗传基础, 为谷子品种选育提供更加丰富的材料。

关键词: 谷子; 籽粒贮藏蛋白; 蛋白质多态性; A-PAGE

Polymorphism Analysis of Seed Storage Proteins in Foxtail Millet (*Setaria italica* L. Beauv.) with A-PAGE

YANG Yan-Bing, ZHANG Hua-Wen, QIN Ling, WANG Hai-Lian, GUAN Yan-An*, DUAN Nai-Bin, and ZHANG Han

Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China

Abstract: The polymorphism of water-soluble protein, salt-soluble protein, acid-soluble protein and prolamin was analyzed by A-PAGE in 24 foxtail millet varieties from different ecological zones. The results revealed that the banding patterns of the water-soluble protein in different millet varieties were similar to those of the acid-soluble protein. There existed over twenty bands of the salt-soluble protein in each millet variety, and only four varieties contained polymorphic bands, showing that bands of the water-soluble protein, the salt-soluble protein and the acid-soluble protein obtained by A-PAGE are not available to use in millet varieties identification. There existed a certain degree of heterogeneity in millet prolamin bands. Seven to ten prolamin bands appeared in tested varieties, five of which were the common ones, two to five of which were polymorphic, so prolamin patterns of millet varieties can be used in variety identification and evaluation. The results showed that there was less variance for proteins in tested millet varieties from different ecological zones compared with other major cereal crops like wheat and corn, which implies that only a limited heterogeneity in the genetic background of millet varieties. Therefore, it is very important to enrich the genetic basis of millet genetic stocks to develop elite varieties.

Keywords: Foxtail millet (*Setaria italica* L. Beauv.); Seed storage protein; Protein polymorphism; A-PAGE

谷子起源于中国, 在长期的栽培和驯化过程中, 积累了丰富多样的生态类型, 其形态性状和农艺性状差异较大。研究不同类型谷子籽粒贮藏蛋白谱带有利于明确不同生态类型品种遗传背景的差异, 从而为谷子育种提供科学依据。

禾谷类作物种子贮藏蛋白电泳图谱呈等显性遗传,

不受环境条件的影响, 并且具有丰富的遗传变异, 被广泛应用于物种的多样性研究^[1]。小麦、玉米等主要作物种子贮藏蛋白有较多研究, 其贮藏蛋白也有较大的多态性^[2-3]。小麦籽粒醇溶蛋白 A-PAGE 是国际种子检验协会推荐的用于品种鉴定和纯度测定的标准方法。玉米水溶蛋白、盐溶蛋白、醇溶蛋白、酸溶蛋白的 A-PAGE 图谱常

本研究由国家科技支撑计划项目(2006BAD02B02), 山东省农业良种工程项目(2007LZ006-04), 山东省农业科学院青年科研基金(2005YQ051)项目资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 管延安, E-mail: yguan65@yahoo.com.cn

第一作者联系方式: E-mail: ybyang_666@163.com; Tel: 0531-83178115

Received (收稿日期): 2008-12-05; Accepted (接受日期): 2009-03-20.

用于类群划分和遗传多样性分析^[4-7]。和其他禾谷类作物一样，谷子籽粒贮藏蛋白也主要含有水溶(清)蛋白、盐溶(球)蛋白、醇溶蛋白和酸溶(谷)蛋白，对谷子贮藏蛋白电泳研究也有相关报道。Yang 等^[8]研究表明不同生态区谷子醇溶蛋白 A-PAGE 电泳图谱存在异质性，Vincent 等^[9]和 Kumar 等^[10]利用 SDS-PAGE 研究了谷子的贮藏蛋白，结果表明清蛋白、球蛋白品种之间有较大的变异性，而作为谷子贮藏蛋白主要成分的醇溶蛋白谱带差异较小或没有，而对于谷蛋白电泳谱带两者研究结果不一致。Li 等^[11]用 SDS-PAGE 不连续缓冲系统研究谷子及其近缘种的蛋白质变异，结果表明谷子品种内总的贮藏蛋白变异较小，Zhang 等^[12]也曾对谷子盐溶蛋白进行过一定的探索，品种间盐溶蛋白存在一定的差异。关于谷子的贮藏蛋

白不同的研究者之间结果存在一定的差异。中国地域辽阔，生态类型多样，在不同的生态区形成了丰富的谷子品种类型，而有关不同生态区栽培品种贮藏蛋白组分的研究则少有报道。本研究参照玉米纯度和小麦醇溶蛋白 A-PAGE 鉴定方法分别对来自不同生态区谷子籽粒的水溶蛋白、盐溶蛋白、酸溶蛋白和醇溶蛋白谱带进行了分析，以期明确不同生态区谷子栽培品种遗传基础存在的差异，为谷子新品种选育和鉴定评价提供有效的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

夏玉米品种：浚单 20 和郑单 958。不同生态区有代表性的谷子品种 24 份见表 1。

表 1 24 份谷子品种名称和来源
Table 1 Names and source of 24 foxtail millet varieties used in the study

编号 Number	品种 Variety	来源 Source	编号 Number	品种 Variety	来源 Source
1	鲁谷 8 号 Lugu 8	山东 Shandong	13	豫谷 5 号 Yugu 5	河南 Henan
2	鲁谷 9 号 Lugu 9	山东 Shandong	14	豫谷 11 Yugu 11	河南 Henan
3	鲁谷 10 号 Lugu 10	山东 Shandong	15	太选 2 号 Taixuan 2	山西 Shanxi
4	济谷 12 Jigu 12	山东 Shandong	16	晋谷 21 Jingu 21	山西 Shanxi
5	济谷 13 Jigu 13	山东 Shandong	17	龙谷 31 Longgu 31	黑龙江 Heilongjiang
6	菠菜根 Bocaigen	山东 Shandong	18	长农 38 Changnong 38	山西 Shanxi
7	冀谷 14 Jigu 14	河北 Hebei	19	东路阴天旱 Dongluyintianhan	山东 Shandong
8	冀谷 19 Jigu 19	河北 Hebei	20	青丰谷 Qingfenggu	河北 Hebei
9	冀谷 21 Jigu 21	河北 Hebei	21	WR1	河北 Hebei
10	冀谷 25 Jigu 25	河北 Hebei	22	公谷 70 Gonggu 70	吉林 Jilin
11	豫谷 1 号 Yugu 1	河南 Henan	23	郑 737 青 Zheng 737 qing	山东 Shandong
12	豫谷 2 号 Yugu 2	河南 Henan	24	矮 88 Ai 88	河北 Hebei

1.2 蛋白质提取

玉米籽粒蛋白质提取液含 12%冰乙酸、18%尿素和 0.5%甲基绿。选 1 粒玉米籽粒，捣碎，加入 1 mL 提取液，60 ℃水浴提取 30 min，10 000×g 离心 3 min 取上清液，用于酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

谷子酸溶蛋白提取液为 12%冰乙酸+18%尿素；水溶蛋白提取液 3 种为去离子水、0.1 mol L⁻¹ 尿素、1% 2-巯基乙醇+0.1 mol L⁻¹ 尿素；盐溶蛋白提取液为 2.5%氯化钠；醇溶蛋白提取液为 50%异丙醇+1% 2-巯基乙醇。在各提取液中加入 0.5%甲基绿做电泳指示剂。从每品种谷子中选取 10 粒，捣碎，加入 1 mL 离心管，分别加入以上提取液 200 μL，60℃水浴提取 30 min，10 000×g 离心 3 min，上清液用于酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.3 电泳方法

仪器设备为北京六一仪器厂 DYY-6B 型稳压稳流电泳仪和 DYY-III 型垂直型电泳槽。

谷子籽粒酸溶蛋白、水溶蛋白和盐溶蛋白电泳以张春庆等^[13]玉米品种纯度鉴定的AU-PAGE(醋酸尿素-聚丙烯

酰胺凝胶电泳)系统改进而来。用含有 12.5%丙烯酰胺、0.25%甲叉双丙烯酰胺、2%冰醋酸、10%尿素、0.05%甘氨酸、0.02%硫酸亚铁的凝胶溶液，加 1 滴 3.5%过硫酸铵催化剂制备 1 mm 厚凝胶，在上样口加 15 μL 蛋白质提取液，以 2%的冰醋酸为电极液，在 85 mA 稳流条件下电泳 80 min。

谷子籽粒醇溶蛋白电泳方法在小麦籽粒醇溶蛋白电泳^[13]基础上改进而来，用含有 12.5%丙烯酰胺、0.25%甲叉双丙烯酰胺、6%尿素、0.005%硫酸亚铁、0.1%抗坏血酸、0.1%甘氨酸、2%冰醋酸的凝胶溶液，加 1 滴 3.5%过硫酸铵催化剂制备 1 mm 凝胶，在上样口加 15 μL 醇溶蛋白提取液，以 0.4%甘氨酸+0.8%冰醋酸溶液为电极液，在 85 mA 稳流条件下电泳 100 min。

用 0.08%考马斯亮蓝和 10%三氯乙酸溶液染色 12 h，自来水漂洗浮色，照相。

2 结果与分析

2.1 酸溶蛋白谱带分析

利用玉米品种纯度电泳鉴定方法对玉米、谷子籽粒

的酸溶蛋白同时进行电泳。图 1 从左至右依次为玉米浚单 20 (1、2 泳道)、郑单 958 (3、4 泳道), 谷子济谷 13 (5、6 泳道), 可以看出利用上述电泳方法得到的玉米、谷子蛋白质谱带清晰, 两玉米品种之间酸溶蛋白谱带差异明显, 济谷 13 也可以得到 23 条比较清晰酸溶蛋白谱带。继续对 1~12 谷子品种的酸溶蛋白电泳(图 2), 从图中可以看出 12 个谷子品种都可以得到比较清晰的酸溶蛋白图谱, 且每个品种有 20 多条蛋白质谱带, 但是谷子品种之间谱带差异不明显。因此, 冰醋酸、尿素提取液提取的酸溶蛋白谱带不太适宜对谷子品种做有效鉴定。

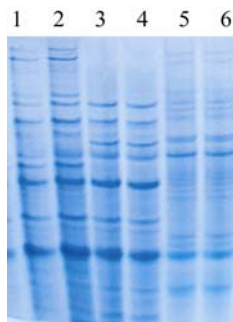


图 1 玉米和谷子酸溶蛋白电泳

Fig. 1 A-PAGE banding pattern for acid-soluble protein of maize and foxtail millet

1, 2: 浚单 20; 3, 4: 郑单 958; 5, 6: 济谷 13。

1, 2: Jundan 20 (maize); 3, 4: Zhengdan 958 (maize); 5, 6: Jigu 13 (foxtail millet).

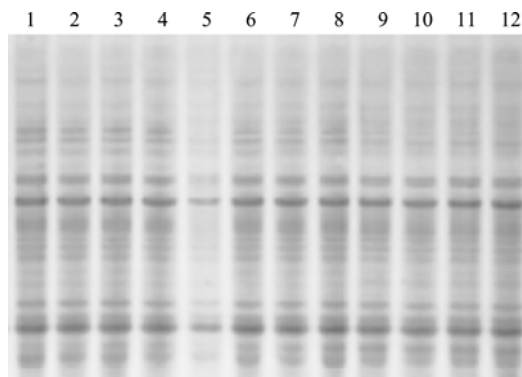


图 2 12 个谷子品种酸溶性蛋白电泳

Fig. 2 A-PAGE banding pattern for acid-soluble protein in 12 foxtail millets varieties

序号同表 1。Numbers as in Table 1.

2.2 水溶蛋白谱带分析

利用 3 种溶液提取种子蛋白, A-PAGE 电泳发现其带型相似, 说明用 1% 2-巯基乙醇和 0.1 mol L⁻¹ 尿素提取的蛋白质主要为水溶性蛋白。巯基乙醇、尿素混合提取液明显比去离子水、尿素提取的蛋白质浓度大、带型深。从 24 个谷子品种 2-巯基乙醇和尿素混合液提取的蛋白 A-PAGE 电泳谱带(图 3)可以看出, 每个品种有 18 条左右谱带, 带型清晰, 但品种之间带型差异较小, 所以水溶蛋白谱带不能对品种做有效的鉴定。

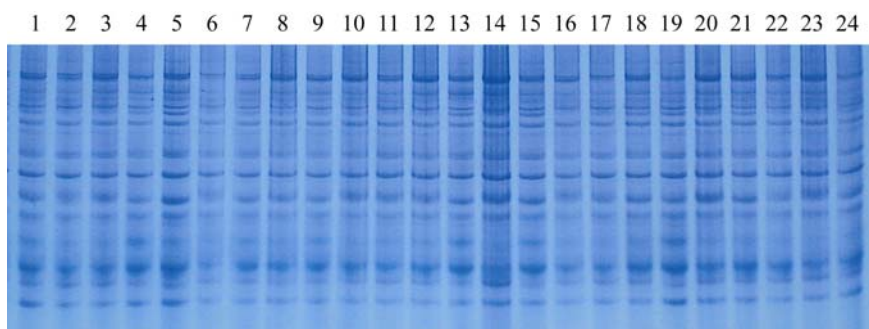


图 3 24 个谷子品种水溶蛋白电泳

Fig. 3 A-PAGE banding pattern for water-soluble protein in 24 foxtail millet varieties

序号同表 1 和图 2。Numbers as in Table 1 and Fig. 2.

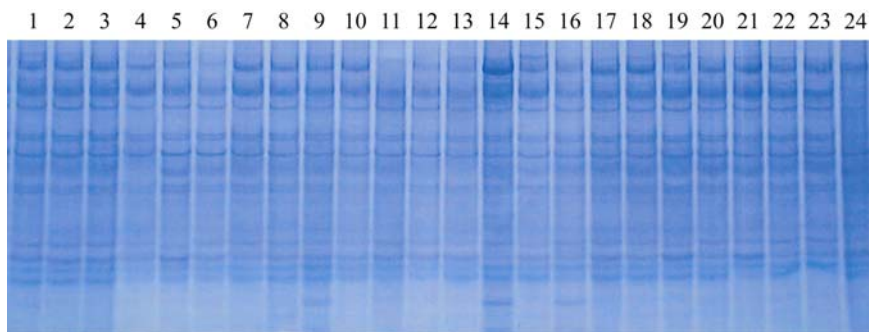


图 4 24 个谷子品种盐溶蛋白电泳

Fig. 4 A-PAGE banding pattern for salt-soluble protein in 24 foxtail millet varieties

序号同表 1 和图 2。Numbers as in Table 1 and Fig. 2.

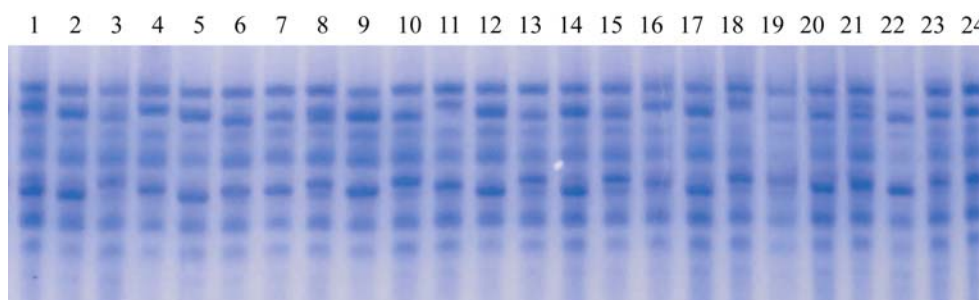


图 5 24 个谷子品种醇溶蛋白电泳
Fig. 5 A-PAGE banding pattern for prolamins in 24 foxtail millet varieties
序号同表 1 和图 2。Numbers as in Table 1 and Fig. 2.

2.3 盐溶蛋白谱带分析

从图 4 可以看出, 每个品种的盐溶蛋白谱带有 20 条左右, 仅 9、14、16、24 泳道谷子品种和其他品种有一定差异, 在凝胶底部多 1~2 条带, 而其他品种没有表现出明显的差异。利用 2.5% NaCl 提取的盐溶蛋白多态性较低, 基于 A-PAGE 方法的盐溶蛋白多态性分析效果较差。

2.4 醇溶蛋白电泳分析

从图 5 可以看出, 每个品种有 7~10 条蛋白质带, 24 个品种有 5 条公共带, 每个品种有 2~5 条多态性带, 多数品种之间的醇溶蛋白谱带存在较大异质性, 说明谷子醇溶蛋白 A-PAGE 多态性可以作为谷子品种资源研究与鉴定评价的依据之一, 但由于多态性条带较少, 存在两个或两个以上品种共有一种带型的现象。

3 讨论

作物遗传基础的差异多是通过蛋白质的差异来体现, 通过蛋白质谱带的差异, 有利于从 DNA 水平研究谷子遗传多样性, 因此研究谷子籽粒蛋白质谱带多态性有重要的意义。本研究显示谷子品种的水溶蛋白、盐溶蛋白、酸溶蛋白谱带虽然较多, 但多态性较小, 不适于品种鉴定和多样性分析, 只有醇溶蛋白图谱存在一定的多态性, 说明不同品种籽粒醇溶蛋白之间存在差异, 因此谷子醇溶蛋白 A-PAGE 图谱可以作为多样性研究和品种鉴定的依据之一, 这和 Yang 等^[8]研究不同生态区谷子品种的 A-PAGE 的结果基本一致。但和 Vincent 等^[10]利用 SDS-PAGE 研究结果有一定差异, 他们认为不同谷子品种间清蛋白、球蛋白、谷蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱比醇溶蛋白有更大的变异, 醇溶蛋白的 SDS-PAGE 图谱相似。这可能和所选用的材料以及电泳方法的差异有关。

小麦醇溶蛋白、谷蛋白和小麦的烘烤品质有较大的关系^[14-15], 通过选择含有特定蛋白质谱带和谷蛋白亚基的品种, 可以提高选择优良品质小麦的效率。醇溶蛋白是谷子的主要贮藏蛋白, 占谷子总蛋白的 40%~60%^[10]。谷子蛋白质中醇溶蛋白差异是否和谷子品质有一定的关系, 谱带类型和品质之间的对应关系如何, 哪些带型的品种具有良好的品质等问题, 尚需进一步研究。弄清醇溶蛋白 A-PAGE 谱带带型和谷子品质之间的关系, 可以提高谷

子品种选择的效率。

谷子籽粒水溶蛋白、盐溶蛋白和酸溶蛋白可见的 A-PAGE 谱带差异很小或没有, 醇溶蛋白 A-PAGE 虽然有一定的多态性, 但谱带类型也不够丰富, 这和玉米、小麦等作物的情况不同。说明虽然不同生态环境下栽培的谷子品种形态学和农艺性状存在较大的差异, 但现有谷子栽培品种的蛋白质遗传基础较窄, 遗传背景的差异较小, 这和 Li 等^[9]的研究结果基本一致, DNA 分子水平的研究也支持这一结果^[16-17]。因此, 我们必须通过各种手段不断拓宽现有谷子栽培品种的遗传基础, 为育种工作积累更加丰富的遗传材料, 例如有效引入国外材料, 导入野生近缘种有利基因等, 这方面已有把青狗尾草的抗除草剂基因导入谷子的成功例证^[9]。

本研究中谷子蛋白质组分提取使用的是一次性提取方法, 在盐溶蛋白和酸溶蛋白里面含有水溶蛋白, 所以利用以上提取液得到的蛋白质谱带含有水溶蛋白谱带, 但是醇溶性蛋白情况不同, A-PAGE 结果不含有以上其他组分的蛋白质谱带。

References

- [1] Yang T-Y(杨天育), Huang X-G(黄相国), He J-H(何继红), Shen Y-H(沈裕琥), Wu G-Z(吴国忠). Advance in diversity of genetic resource of foxtail millet. *Acta Agric Boreali-Occident Sin* (西北农业学报), 2003, 12(1): 43-47(in Chinese with English abstract)
- [2] Metakovsky E V, Branlard G. Genetic diversity of French wheat germplasm base on gliadin alleles. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 209-218
- [3] Liu H(刘华), Jia J-Z(贾继增). Fingerprint application in crop variety identification. *Crop Genet Resour* (作物品种资源), 1997, (2): 45-48(in Chinese)
- [4] Zhang F(张芳), Chen J-T(陈景堂), Zhu L-Y(祝丽英), Song Z-Q(宋占权), Huang Y-Q(黄亚群), Liu Z-Z(刘志增), Chi S-M(池书敏). Preliminary studies on identification of sweet corn hybrids with technique of polyacrylamide gel electrophoresis of albumins. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2005, 21(8): 46-48 (in Chinese with English abstract)
- [5] Song T-M(宋同明), Zheng D-H(郑大浩), Liu Y(刘岩). Identification of corn varieties using lactate polyacrylamide gel electrophoresis of seed albumins and globulins. *Acta Bot Sin* (植

- phoresis of seed albumins and globulins. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1996, 38(8): 599–604(in Chinese with English abstract)
- [6] Du Y-H(杜月红), Yu Y-T(于永涛), Shi Y-S(石云素), Song Y-C(宋燕春), Li Y(黎裕), Wang T-Y(王天宇). Genetic diversity of seed storage proteins in maize germplasm by acid polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE). *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2007, 8(4): 430–435 (in Chinese with English abstract)
- [7] Niu Y-Z(牛应泽), Liu R-S(刘镭山), Li F-A(李方安). Identification of maize varieties by seed protein electrophoresis: Comparison of seed zeins and salt soluble protein. *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 1995, 13(2): 150–153(in Chinese with English abstract)
- [8] Yang T-Y(杨天育), Shen Y-H(沈裕琥), Huang X-G(黄相国), He J-H(何继红), Wu G-Z(吴国忠). Identification of genetic diversity in the foxtail millet (*Setaria italica* L. Beauv.) by A-PAGE. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(1): 131–133(in Chinese with English abstract)
- [9] Kumar K K, Parvathy P K. Characterization of storage protein from selection varieties of foxtail millet [*Setaria italica* (L.) Beauv.]. *J Sci Food Agric*, 1998, 77: 535–542
- [10] Montoiro V P, Virupaksha T K, Rajagopol R D. Proteins of Italian millet: Amino acid composition, solubility fractionation and electrophoresis of protein fraction. *J Sci Food Agric*, 1982, 33: 1072–1079
- [11] Li Y(黎裕), Wang Y-R(王雅儒). Variability for seed protein in foxtail millet and relative varieties. *Crop Genet Resour* (作物品种资源), 1998, (2): 10–12(in Chinese)
- [12] Zhang H-W(张华文), Yang Y-B(杨延兵), Qin L(秦岭), Guan Y-A(管延安), Duan N-B(段乃彬), Ni D-P(倪大鹏), Yu D-A(于东安). Optimization of A-PAGE for isolation foxtail millet (*Setaria italica* L. Beauv.) salt-soluble proteins. *Shandong Agric Sci* (山东农业科学), 2007, (5): 34–37(in Chinese with English abstract)
- [13] Zhang C-Q(张春庆), Yin Y-P(尹燕枰). Theories and Technologies of Seed Quality Test (种子质量检验的理论与技术). Beijing: Chinese Agriculture Science and Technology Press, 1995. pp 105–120(in Chinese)
- [14] Zhang Y-B(张延滨), Xin W-L(辛文利), Sun L-F(孙连发), Xiao Z-M(肖志敏), Qi S-Y(祁适雨). Flour quality differences between near-isogenic lines with HMW glutenin subunits 2+12 and 5+10 in wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(1): 93–96 (in Chinese with English abstract)
- [15] Yang Y-B(杨延兵), Gao R-Q(高荣岐), Yin Y-P(尹燕枰), Guan Y-A(管延安). Dynamic changes of free amino acid, protein and its components in wheat with different quality traits. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2007, 27(5): 864–866(in Chinese with English abstract)
- [16] Yang Y-B(杨延兵), Guan Y-A(管延安), Zhang H-W(张华文), Xu P-P(徐平平), Zhang W-L(张文兰), Chen L-R(陈利容), Qin L(秦岭). Genetic variation among varieties of foxtail millet (*Setaria italica* L. Beauv.) based on RAPD markers. *Acta Agric Boreal-Sin* (华北农学报), 2007, 22(4): 134–136 (in Chinese with English abstract)
- [17] Yang T-Y(杨天育), Dou Q-W(窦全文), Shen Y-H(沈裕琥), Huang X-G(黄相国), He J-H(何继红), Wu G-Z(吴国忠). Genetic variation among varieties of foxtail millet from different regions in China based on RAPD markers. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(5): 765–770 (in Chinese with English abstract)