

棉花种子的品种鉴定及方法探讨

Identification of Cotton Seeds and Discussion of the Methods

崔晋龙, 丁 翠, 付晓燕, 范 黎*

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

棉花种子的蛋白电泳鉴别法速度快、实用性强、准确性高。相关文章国内外报道较少。本试验对山西农业科学院培育的棉花品种进行鉴定, 希望这一试验方法为类似棉花的高油种子品种鉴定提供参考。

1 材料和方法

实验材料来源于山西农业科学院育种所培育的新 11 号、新 147 号、新 150 号种子。每个品种随机选择种子数粒, 分别用钳子夹碎(垫上清洁纸片以防止样品之间的污染), 称重, 记录, 置离心管中, 加乙醚, 振荡, 摇匀, 脱脂, 离心, 弃上清。如此重复 2 次。置于通风橱中风干, 待用。采用分步

提取法依次对水溶、盐溶、醇溶三种蛋白进行提取, 离心, 取上清液加等体积的样品缓冲液之后, 将蛋白样品置 58℃ 水浴 30 min, 冷却, 离心, 上清液即为电泳样液。

依据 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法配制 14% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 分别灌制于美国 Bio-rad 公司生产的电泳槽中, 之后点样电泳, 当指示剂达到胶前沿 0.5 cm 时停止电泳。用考马斯亮蓝 R-250 染色, 用 SDS 脱色液脱色至背景透明为止。拍照, 分析。

2 结果与分析

2.1 水溶蛋白

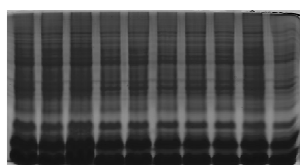


图 1 新 11 号水溶蛋白电泳图
Fig. 1 The result of the new 11th albumin by SDS-PAGE

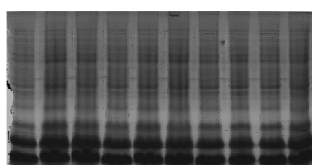


图 2 新 147 号水溶蛋白电泳图
Fig. 2 The result of the new 147th albumin by SDS-PAGE

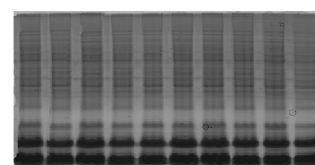


图 3 新 150 号水溶蛋白电泳图
Fig. 3 The result of the new 150th albumin by SDS-PAGE

(说明: 上列所有图片从左到右编为第 1、2、3 泳道、……; 每条泳道内的蛋白带从上到下为第 1、2、3 蛋白带、……)

新 11 号水溶蛋白有 23 条带, 主带 5 条, 大部分是小分子蛋白, 带状和颜色相同, 说明表达量差异小; 新 147 号有 18 条带清晰可见, 主带 5 条, 每粒种子带数一样, 颜色有微弱差异, 因此其中有些蛋白的表达量有差异; 新 150 号有 21 条带, 主带 5 条, 部分次要带颜色有差异, 说明这些蛋白表达量不同。

在实验条件相同的条件下, 新 11 号与新 147、新 150 差异较大。新 11 号的第 1、2、21 蛋白带在新 147、新 150 号的相应位置上没有, 新 150 的 12、13、14 带在新 147 的泳道上没有。三品种的主带位置相同, 说明了它们表达的主要蛋白是一样的(图 1~3)。

2.2 盐溶蛋白

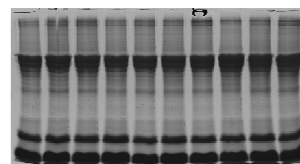


图 4 新 11 号盐溶蛋白电泳图
Fig. 4 The result of the new 11th globulin by SDS-PAGE

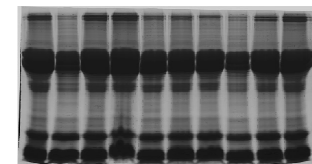


图 5 新 147 号盐溶蛋白电泳图
Fig. 5 The result of the new 147th globulin by SDS-PAGE

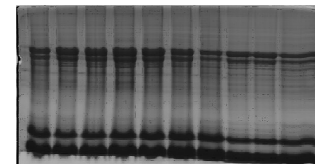


图 6 新 150 号盐溶蛋白电泳图
Fig. 6 The result of the new 150th globulin by SDS-PAGE

新 11 号盐溶带第 1~7 泳道是 12 条, 第 8 泳道是 10 条带, 它的第 2、3 蛋白带缺失, 第 9、10 泳

收稿日期: 2006-03-18

作者简介: 崔晋龙(1976-), 男, 硕士研究生, cjl717@163.com; * 通讯作者, fanli@mail.cnu.edu.cn

道的第2条带消失。主带4条,表达量稳定;新147号盐溶蛋白有12条带,其中主带4条,虽然每粒种子各种蛋白都表达,但是种内盐溶蛋白的表达量差异较大;新150号盐溶蛋白有14条带,其中主带4条,主带较宽,颜色深,其余带较窄,颜色浅,说明它们的表达量主次分明,所检测的种子稍有差异。

比较三幅盐溶蛋白图可知,品种内蛋白情况是新11号种内盐溶蛋白数目表达不同(如上所说),新147号、新150号种内盐溶蛋白数目表达相同,但它们盐溶蛋白的表达量不等同;种间蛋白情况是新147号与新11号盐溶蛋白表达相似,新150号种子与另外两种种子内盐溶蛋白表达差异较大,主要表现在蛋白带的位置差异,也就是说,以盐溶蛋白作为比较标准的话,新150与另外两种的盐溶蛋白分子量不同,也就是植株蛋白表达

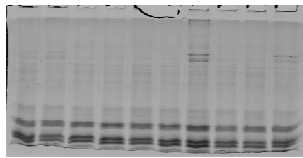


图7 新11号醇溶蛋白电泳图

Fig.7 The result of the new 11th prolamin by SDS-PAGE

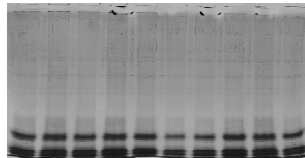


图8 新147号醇溶蛋白电泳图

Fig.8 The result of the new 147th prolamin by SDS-PAGE

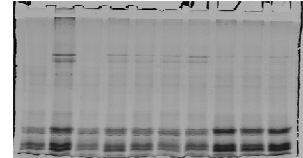


图9 新150号醇溶蛋白电泳图

Fig.9 The result of the new 150th prolamin by SDS-PAGE

综上所述,以三个品种的种内、种间的三种蛋白比较可知,同一品种内各种蛋白表达量稍有差异,总体上是一致的。三种蛋白在不同品种中差异不同,用不同类型的蛋白做标准,品种内或品种间的差异就不同,新11号单粒种子以水溶蛋白做标准看不出什么差异,但以盐溶蛋白做标准差异就很明显。同样,以水溶蛋白为标准比较种间差异,新11号种子水溶蛋白谱带数量多,与新147、新150差异较大;而以盐溶蛋白为标准,则新150号与其余两种棉籽差别较大;以非还原型醇溶蛋白为标准,新147号与另两种棉籽间的差异很明显。因此,笔者认为,采用综合三种主要蛋白进行电泳法鉴定棉花种子品种内、品种间的蛋白差异,而不以其中的一种蛋白为标准来鉴定种子。

3 讨论

文献中有关棉花种子鉴定的报道多以醇溶蛋白或者水溶蛋白作为标志性蛋白,但本文认为,三种蛋白各有特点,在种子鉴定中都可以起到很好的多角度的鉴别作用。这样的结果综合性强,比较可信。

本试验随机选择单粒种子进行试验,而在曾经报道过的文章中,都是以几粒种子的混合物进

差异较大(图4~6)。

2.3 醇溶蛋白

新11号种子醇溶蛋白电泳图谱有14条带,4条主带,种内第1、2条蛋白带颜色差异很大,表达量显著不同;新147号种子有7条蛋白带,4条主带,种内差异较小;新150号种子共13条带,4条主带,也就是说,新150号棉花种子的小分子醇溶蛋白(未还原型)至少有13种蛋白在表达,有4种大量表达,蛋白量稍有差异。

从电泳图谱上看,以未还原型的醇溶蛋白作为判断标准的话,新150号种子与新11号种子相似,新147号与它们差异较大,新147号醇溶蛋白的表达多集中在小分子量即主带处,而新150号种子与新11号种子除这个位置外,还有一些分子量较大的蛋白在表达(图7~9)。

行电泳,前者能真实反映一个品种内种粒的差异或品种的纯度,也能比较种间差异,后者只适用于比较品种间的普遍差异。

蛋白质提取方法分为分步提取和一次性提取两种。分步提取主要研究棉花种子中各类蛋白质的组成及比例,能够在一定程度上避免不同溶解性蛋白之间的污染,需要针对性提取的蛋白纯度更高;一次性提取主要比较在不同提取液的情况下蛋白质谱带的带型,这样使得所要蛋白混合程度增加,干扰性增大。

对酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(A-PAGE)与十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行了试验比较。A-PAGE虽然是近年来国际种子检验协会(ISTA)推荐的方法,但它在有些场合不利于种子的快速、准确鉴定。SDS-PAGE与上者相比则分离性能强,图谱分辨率高,重复性好,易于处理、保存凝胶结果。

棉花种子蛋白的电泳分析,不像小麦、玉米等,它含油量大,必须脱脂处理,方能得到较好的结果。在向日葵、花生、芝麻等品种的鉴定中,脱脂对试验得出较好的结果也应该有很大的帮助,这一点还有待于更多的试验证据。 ●