

# 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定壳斗科 植物种质资源

刘慧娟, 冯志国, 李先文, 彭峰, 袁红雨

(信阳师范学院 生命科学学院, 河南 信阳 464000)

**摘要:** 通过对5个壳斗科植物盐溶蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析, 为壳斗科植物的种质资源鉴定提供科学依据。以栗属(板栗、锥栗、茅栗)和栎属(麻栎)5个壳斗科植物为试验材料, 分别提取种子内盐溶蛋白, 并进行PAGE电泳检测。结果表明, 茅栗(*Castanea seguinii* Dode)的盐溶蛋白种类最丰富, 有19条, 而麻栎(*Quercus acutissima* Carr)最少, 有11条。对每条谱带进行相似性比较, 发现茅栗与板栗(*Castanea mollissima* Bl)的相似程度最高, 其次是锥栗[*Castanea henryi* (Skan) Rehd. et. Wils]和麻栎, 再次是茅栗与锥栗, 而板栗与麻栎的差异性最大。从而推断出它们之间进化关系: 麻栎→锥栗→茅栗→板栗。表明利用SDS-PAGE技术可用于鉴定壳斗科植物之间的进化关系和亲缘关系。

**关键词:** 盐溶蛋白; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 壳斗科; 进化

中图分类号: Q949.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)07-0115-03

## Analysis of the Germplasm Resource of Fagaceae Plants by SDS-PAGE

LIU Hui-juan, FENG Zhi-guo, LI Xian-wen, PENG Feng, YUAN Hong-yu

(College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

**Abstract:** The salt soluble proteins of five sample seeds were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE), to provide scientific basis for the identification of the germplasm resource of Fagaceae. Using five sample seeds(including four species and two genera of the Fagaceae plants) as material, the salt soluble proteins were respectively extracted and detected by SDS-PAGE. The kinds of salt soluble protein of *Castanea seguinii* Dode were most abundant and had 19 strips, but *Quercus acutissima* Carr only had 11 strips. Comparison of the strips each other, the similar degree was highest between *Castanea seguinii* Dode and *Castanea mollissima* Bl, followed by *Castanea henryi* (Skan) Rehd. et Wils and *Quercus acutissima* Carr, *Castanea seguinii* Dode and *Castanea henryi* (Skan) Rehd. et Wils. The great difference was found between *Castanea mollissima* Bl and *Quercus acutissima* Carr. This gave the evolution relation: *Quercus acutissima* Carr→*Castanea henryi* (Skan) Rehd. et Wils→*Castanea seguinii* Dode→*Castanea mollissima* Bl. Also, this showed that SDS-PAGE could identify evolution relation and phylogenetic relation among the Fagaceae plants.

**Key words:** salt soluble protein; SDS-PAGE; Fagaceae; evolution

根据蛋白质的溶解性, 通常将种子贮藏蛋白质分为水溶蛋白、盐溶蛋白、醇溶蛋白和碱(或酸)溶蛋白<sup>[1]</sup>4类。植物种子内盐溶蛋白的种类很丰富, 植

物基因即使发生微小的变化, 可以明显地表现在种子内蛋白质的差异上, 根据这一原理, 利用电泳技术检测植物蛋白质的异质性, 并以此作为分类、进化和

收稿日期: 2012-11-29

基金项目: 信阳师范学院博士科研启动基金项目

作者简介: 刘慧娟(1977-), 女, 河南平顶山人, 讲师, 博士, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: liuhuijuan77@yahoo.com.cn

遗传研究的依据,已得到较广泛的应用<sup>[2]</sup>。

目前,SDS-PAGE 技术在亚基水平上对特定蛋白质的分析取得了较大的进展,其形成的蛋白质谱带具有稳定性、均匀性和可加性,故在水稻<sup>[3]</sup>、玉米<sup>[4]</sup>、小麦<sup>[5]</sup>、烟草<sup>[6]</sup>和花生<sup>[7]</sup>等多种作物的品种鉴定方面取得了显著成效,同时也成为研究植物亲缘关系的有效手段,但在壳斗科植物品种鉴定方面却鲜有报道。本研究采用 SDS-PAGE 电泳技术,对壳斗科植物栗属(板栗、锥栗、茅栗)和栎属(麻栎)种子进行盐溶蛋白分析,研究其进化关系并探讨此法在植物进化方面研究的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

板栗(大红袍、油光栗)从市场上购得;锥栗、茅栗和麻栎于 2010 年秋季在信阳师范学院对面的贤山上采集。

盐溶蛋白提取液的配制:氯化钠 5.80 g、蔗糖 200.00 g、甲基绿 0.15 g,用去离子水定容到 1 L,在 4℃条件下保存。试剂、药品均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 取此 5 个品种的种子,剥去外种皮和内种皮,保留其黄色(或淡黄色)的果实,各种样品均称取 1 g,加盐溶蛋白提取液 1.5 mL 研磨匀浆,混合,室温过夜,用 12 000 r/min 离心 15 min,温度 4℃,取上清液再离心 1 次。将上清液在去离子水中用玻璃纸透析 24 h,换水 3~4 次,最后用 0.5 mL 的盐溶蛋白提取液将蛋白质沉淀溶解,4℃保存,备用。

1.2.2 SDS-PAGE 电泳 分别取样品 20 μL 加等量的样品缓冲液混合,进行 SDS-PAGE(浓缩胶 3%、分离胶 12%)电泳,用甲基绿作为指示剂,用 4%的磺基水杨酸蛋白固定液固定 20 min,用 Q 25%考马斯亮蓝 R250 染色,对洗脱后的凝胶进行扫描。重复 3 次。

### 1.3 计算方法

1.3.1 迁移率(Rf)的计算  $Rf = \text{凝胶中盐溶蛋白区带的迁移距离} / \text{凝胶中指示剂的迁移距离}$ 。

1.3.2 图谱的排序 根据蛋白质条带间的相似性,按 Nei 氏公式计算品系间的遗传相似性系数(C), $C = 2W / (A + B) \times 100\%$ ,其中,C 为相似系数,即相似值;W 为 A 和 B 两样品相同的蛋白条带数;A 为 A 样品的总蛋白条带数,B 为 B 样品的总蛋白条带数。相异值 = 100 - C。

## 2 结果与分析

栗属(板栗、锥栗、茅栗)和栎属(麻栎)的盐溶蛋白可分出 19 条带谱,其中茅栗的盐溶蛋白谱带最为丰富,包含了其他几个品种的所有谱带类型;2 个板栗品种(大红袍、油光栗)的盐溶蛋白谱带有 17 条,锥栗有 13 条,麻栎最少,只有 11 条(图 1,表 1)。不同样品之间的相似条带着色深浅存在差异,可能与种与种,属与属之间的差异有很大的关系。相同条件下,条带越宽表明蛋白质含量越高;着色越深说明蛋白质活力越大,这些差异较直观地反映了不同品种间的差异。

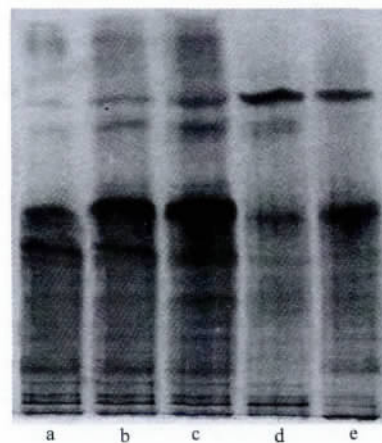


图 1 大红袍(a)、油光栗(b)、茅栗(c)、麻栎(d)和锥栗(e)的 SDS-PAGE 图谱

表 1 不同样品的盐溶蛋白的迁移率

品种	条带数/条																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
大红袍	0.02	0.05	0.07	0.09	0.11	0.15	0.18	0.23	0.32	0.36	—	0.41	0.45	0.49	0.54	—	0.78	0.84	0.90
油光栗	0.02	0.05	0.07	0.09	0.10	0.15	0.18	0.23	0.32	0.35	—	—	0.45	0.49	0.56	0.59	0.77	0.85	0.91
茅栗	0.02	0.05	0.07	0.09	0.10	0.15	0.19	0.24	0.33	0.37	0.39	0.42	0.45	0.48	0.56	0.60	0.78	0.84	0.92
麻栎	0.02	0.05	0.07	0.09	0.11	0.15	—	—	—	—	0.39	0.41	—	—	0.54	0.60	0.77	—	—
锥栗	0.02	0.05	0.07	0.09	0.10	0.15	0.17	—	—	0.36	0.40	0.44	0.46	—	0.55	—	0.78	—	—

大红袍和油光栗分别与茅栗、麻栎、锥栗 3 种之间的相似值均是 94.44、64.28 和 73.33,而大红袍与油光栗之间的相似值为 94.11(表 2),说明大红袍

和油光栗与茅栗、麻栎、锥栗相比较而言是同一种植物,这与事实上大红袍和油光栗同属于板栗种相吻合。再从种间来看,板栗与茅栗之间的相似程度最

大,亲缘关系最近,其次是锥栗,最不相似的是麻栎。若仅考虑茅栗、麻栎、锥栗三者之间的相似性,则麻栎与锥栗的相似值最大,为 83.33,比麻栎与茅栗的相似值(73.33)大得多,而茅栗与锥栗的相似值是 81.25,位于二者之间。据此可以推断出其进化关系,即麻栎是最原始的,其次是锥栗,板栗从茅栗演化而来的。四者的进化关系如图 2。

表 2 不同样品间的相似值和相异值 %

品种	大红袍	油光栗	茅栗	麻栎	锥栗
大红袍	—	94.11	94.44	64.28	73.33
油光栗	5.89	—	94.44	64.28	73.33
茅栗	5.56	5.56	—	73.33	81.25
麻栎	35.72	35.72	26.67	—	83.33
锥栗	26.67	26.67	18.75	16.67	—

注:右上侧的数据为相似值(C),左下侧的是相异值(100-C)。



图 2 板栗(大红袍、油光栗)、茅栗、锥栗、麻栎之间的进化关系

3 讨论

蛋白质亚基的构成严格受基因控制,种子蛋白具有遗传稳定性和种质特异性<sup>[8]</sup>,蛋白质是基因表达的产物,可作为品种鉴定的依据<sup>[9]</sup>。根据这 4 种 2 属的壳斗科植物果实发育情况来看,由壳斗杯形包围到壳斗球形,由单生籽粒到多个籽粒,果实的直径由 1.5~2 cm 到 4~6.5 cm 等,从低级到高级,从

简单到复杂都说明了这一进化关系是正确的。研究表明,电泳谱带法是当前植物品种鉴定中最有效的方法<sup>[10]</sup>,具有准确可靠、经济简便和重演性好等特点。用这种方法进行植物进化方面的研究具有一定的可行性,可直接从电泳后的蛋白质图谱上区分蛋白质分子量的异同,但是这些蛋白质的类型、功能及其所对应的基因在基因图谱上的确切位置,都需要预先知道的标准蛋白和基因图谱作对照,才能发挥其更大的应用潜能。

参考文献:

[1] 阮禹松,赵文明. 种子盐溶球蛋白的结构特征[J]. 西北植物学报,2002,22(4):999-1003.

[2] 陈禅友,宋利平,胡志辉. 菜豆种质盐溶蛋白遗传多态性分析[J]. 江汉大学学报:自然科学版,2011,39(3):86-92.

[3] 凌建群,何祖华,马志超,等. 水稻醇溶蛋白的多态性研究[J]. 中国水稻科学,1997,11(3):129-135.

[4] 宋同明,郑大浩,刘岩. 利用玉米种子白蛋白和球蛋白乳酸聚丙烯酰胺电泳鉴定品种[J]. 植物学报,1996,38(8):599-604.

[5] 孙致良,将家惠,梁永平,等. 小麦品种电泳分类鉴定技术的标准化研究[J]. 植物学报,1997,39(8):731-736.

[6] 梁明山,刘煜,侯留记,等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定烟草品种[J]. 种子,2001(1):9-11.

[7] 黎茵,黄上志,傅家瑞. 不同品种花生种子蛋白质的电泳分析[J]. 植物学报,1998,40(6):534-541.

[8] Valizadeh M. Seed storage protein profile of grain legumes grown in Iran using SDS-PAGE[J]. J Agric Sci Technol,2001(31):287-292.

[9] 孙雁,朱有勇,朱永平,等. 蛋白质电泳在豌豆品种鉴定中的应用[J]. 种子,2004,23(2):25-30.

[10] Fall L,Diouf D,Fall-Ndiaye M A,et al. Genetic diversity in cowpea[Vigna unguiculata (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques[J]. Afr J Biotech,2003(2):48-50.