

Использование белковых маркеров для оценки полиморфизма популяций

Задание 1. Использование метода белковых маркеров для решения различных селекционно-генетических задач

Белок – первичный продукт гена. Каждая молекула белка кодируется соответствующим геном молекулы ДНК, поэтому наиболее точное понятие о генотипе сорта могут дать спектры соответствующих специфичных для него молекул белка. Белок может служить маркером генотипа сорта и хромосомы, в которой данный ген локализован. Сорта и линии соответствующей культуры могут маркироваться группами полипептидов сложного белка, которые получили название «спектра белка».

Для идентификации сорта, линии, биотипа и отдельного растения наиболее широко используют электрофоретический метод анализа запасного белка зерновки проламина.

Проламины (глиадин пшеницы, гордеин ячменя) экстрагируются из семян и разделяются в полиакриламидном геле (ПААГ) в кислой среде. На компонентный состав электрофоретического спектра проламина не влияют ни условия выращивания сорта, ни сроки хранения его семян.

Электрофоретические спектры проламина специфичны не только для сорта, но и для отдельных линий внутри сорта. Большинство сортов имеет уникальные спектры, но есть сорта с близкими или одинаковыми по компонентному составу спектрами. В основном это сорта, полученные отбором из одной и той же гибридной популяции.

Идентификация сортов электрофоретическим методом, как правило, проводится анализом единичных зерен с растений или в случайной выборке из партии семян. Для сортов самоопыляющихся культур, как в нашем случае пшеницы и ячменя, рекомендуется выборка из 100 семян. Размеры выборки и число необходимых повторностей зависит от степени требуемой точности. Очень точное определение сортовой чистоты или детальный анализ на биотипный состав сложного сорта могут потребовать последовательный анализ 2–3 выборок.

Задание 2. Лабораторная работа: электрофоретический анализ проламина семян

Цель работы:

- 1) Отобрать из средней пробы 50–100 зерновок изучаемого сорта, измельчить их и экстрагировать проламин.
- 2) Овладеть методикой приготовления полиакриламидного геля (ПААГ).
- 3) Провести электрофоретическое разделение белка в ПААГ.
- 4) Окрасить и сфотографировать спектры проламина.
- 5) Идентифицировать компоненты проламина и составить белковую формулу изучаемого сорта.

Материал и оборудование:

- 1) 50–100 зерен каждого изучаемого сорта;
- 2) 5 г/моль водного раствора мочевины для извлечения проламина;
- 3) плексигласовые пластины с лунками для извлечения проламина;
- 4) фарфоровая ступка;

- 5) кассета с пластинами геля размером 120×120×1мм;
- 6) гелевый раствор;
- 7) электродный буфер;
- 8) прибор для электрофореза и источник питания;
- 9) раствор для фиксирования и окрашивания белков;
- 10) фотоустановка;
- 11) эталонные спектры.

Ход работы.

- 1) Выделение проламина.

Проламины извлекают из эндосперма отдельных зерновок или даже из небольшого кусочка одной зерновки массой 15 мг. В этом случае из оставшейся части зерновки с зародышем можно вырастить растение.

Тщательно измельчают зерновки и переносят их в отдельную лунку плексигласовой пластины.

Глиадин пшеницы экстрагируют 5М водным раствором мочевины, гордеин ячменя – 6М раствором мочевины. Время экстракции 2 ч. при комнатной температуре, но для удобства выделения белка проводят в течение ночи на холоде (4°C).

- 2) Приготовление геля.

Электрофорез глиадины проводят в полиакриламидном геле, имеющем довольно сложный состав. Для приготовления 100 мл раствора 24 г мочевины смачивают небольшим количеством дистиллированной воды, добавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты и перемешивают. Затем в раствор последовательно вносят 6,5 г акриламида, 0,17 г биоакриламида и 0,32 г персульфата аммония. Все тщательно перемешивают до полного растворения и доводят объем до 100 мл дистиллированной водой. Полученный раствор содержит 6,5 %-ный акриламид, 30 %-ную уксусную кислоту, 4М мочевину. К нему приливают 0,5 мл ТЕМЕДа, раствор фильтруют.

Кассеты для полимеризации геля (трубочки или пластины) собирают в соответствии с инструкцией, прилагаемой к приборам. Залитый раствор в кассеты помещают в термостат. Полимеризация гелей проходит в течение 1 ч при температуре 50-60°C.

- 3) Проведение электрофореза.

После окончания полимеризации кассеты с гелями охлаждают до комнатной температуры и помещают в прибор. Электродные отсеки прибора заполняют буфером – 0,013 моль/л раствора уксусной кислоты (рН 3,1). Для приготовления 1 л электродного буфера берут 0,75 мл ледяной уксусной кислоты и доводят ее объем дистиллированной водой до 1 л. Перед использованием буфер охлаждают до 4°C.

Для удаления из геля персульфата аммония, препятствующего вхождению белка в гель, проводят предварительный электрофорез при силе тока 20 мА на 1 пластину или 3 мА на 1 трубочку геля в течение 1,5–2 ч. После предварительного электрофореза буфер заменяют на свежий и прибор в собранном виде помещают на ночь в холодильник. Утром, не вынимая кассеты из прибора, буфер сливают. С помощью микрошприца на гель наслаивают белковый экстракт: 10–15 мкл для пшеницы или 25–30 мкл для ячменя. Электродные отсеки заполняют буфером. Прибор подключают к источнику питания. При этом средний электрод служит анодом (+), боковые – катодом (-).

Разделение белка идет 5,5–6 ч с охлаждением. В течение первого часа величина силы тока составляет 20 мА на 1 пластину или 3 мА на 1 трубочку. При этом устанавливается напряжение 220 В для трубочек и 300 В для пластин. В оставшееся время электрофорез идет при 2-кратном увеличении силы тока и напряжения. Повышение силы тока более 50 мА на пластину нежелательно.

4) Фиксация и окрашивание.

После окончания электрофореза кассеты вынимают из прибора, пластину геля снимают со стекла, отделяя осторожно скальпелем.

Гель из трубочек достают с помощью медицинского шприца, подслаивая иглой воду по краям геля.

Извлеченный гель помещают в емкость, содержащую раствор для фиксирования и окрашивания белков: 6 мл 0,25%-ного раствора Кумасси G – 250 в 200 мл 10%-ного ТХУ. Окрашивание проводится в течение ночи.

5) Идентификация компонентов электрофоретического спектра проламина и составление сортовых формул.

В основе идентификации компонентов электрофоретического спектра проламина пшеницы и ячменя и составление сортовых формул лежит эталонный спектр глиаина (рис. 1).

α 123456 β 12345 γ 12345 ω 123456789101112

Рис. 1. Сортовая формула.

Эталонный спектр составлен на основании сравнительного изучения электрофоретических спектров глиаина большого числа сортов и биотипов пшеницы и ее сородичей, полученных в столбиках полиакриламидного геля. Он содержит 30 основных позиций, распределенных по 4 фракциям глиаина следующим образом (рис. 2)

Сортовым признаком в спектре глиаина является и относительная интенсивность компонентов. В формулах проламина интенсивные компоненты подчеркивают, слабые отмечают чертой над номером позиции, очень слабые (следы полос) – двумя чертами.

Результаты электрофоретического анализа проламина семян занесите в табл. 1.

Таблица 1. Белковые формулы сортов мягкой пшеницы, ячменя.

Культура, сорт	Формула глиаина (гордеина)				Частота встречаемости, %
	α	β	γ	ω	
Озимая пшеница Мироновская 808					
Яровой ячмень Сябра:					
биотип 1					
биотип 2					

Сформулируйте выводы о генетической структуре сортов пшеницы и ячменя.

