

MALINORM

M.N – 01-03/001 : 2000

Пшеница: идентификация сортов электрофорезом

Дескрипторы : сельскохозяйственный продукт, зерновые, пшеница, растительный белок, тест, определение, виды растений, метод электрофореза.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА

Секретариат: Национальное управление промышленности

ВР. 278 Бамако - Тел. (223) 22.57.56 Fax. (223) 22.61.37 E-mail. dnind@datatech.toolnet.org

ПРЕДИСЛОВИЕ

Национальный совет по стандартизации и контролю качества «CNNCQ», созданный в Республике Мали по закону № 92-013 P-RM, возглавляется министром промышленности для управления всеми национальными проблемами в области стандартизации. Его организационные и оперативные условия установлены Декретом № 92-235 / P-PM от 1 декабря 1992 года.

Приказ № 0642 / MICT-DNI от 14 февраля 1994 года определяет его состав. Список его членов закреплён Решением N ° 99-007 / MICA-SG от 02 апреля 99.

Национальное управление промышленности «DNI» представляет секретариат «CNNCQ» и отвечает за координацию работы по стандартизации с техническими комитетами.

Технический комитет «Зерновые и производные» был создан приказом № 94 - 0643 / MICT-DNI от 14 февраля 1994 года для проведения всех работ по стандартизации в этой области. Под председательством Национального управления сельского хозяйства «ДНА» в него входят 25 членов, представляющих администрацию, Университет Мали, профессионально-технические училища, экономических операторов и профессионалов сектора, научно-исследовательские институты, исследовательские лаборатории анализ, потребители и т. д. ...).

В соответствии со своей программой работы, принятой Национальным советом по стандартизации и контролю качества в ходе сессии 14 октября 1999 года, Технический комитет, основанный на международном стандарте ИСО, разработал и принял проект MALINORM, который был утверждён общественным голосованием «DNI». Замечания и предложения, собранные для этой цели, были использованы для обогащения проекта MALINORM, который был представлен в CNNCQ для принятия в качестве необязательного или обязательного стандарта.

Принятие этого стандарта в качестве дополнительного стандарта делает его образцом для профессионалов отрасли, потребителей и аналитических и контрольных учреждений, каждого из них в своей области, для обеспечения соответствия требованиям качества.

ВВЕДЕНИЕ

Белковый состав пшеницы непосредственно контролируется генами и обычно не зависит от условий окружающей среды (место и год роста). Более того, в случае пшеницы оплодотворение происходит, по существу, путем самоопыления, а состав белка стабилен в течение нескольких поколений. Поэтому его можно использовать для характеристики и, следовательно, для идентификации сортов, из диаграмм белка, которые могут быть получены путем разделения глиадинов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. После разделения происходит окрашивание гелей, которые определяют различные компоненты белка, и полученные образцы белка относятся к различным разновидностям пшеницы. Следует определить стандартные диаграммы всех сортов, которые могут встречаться в данной ситуации (создание каталога сортов). Сравнение электрофореграммы, полученной для неизвестного сорта со стандартными схемами каталога, позволяет идентифицировать сорта. Этот метод полностью разработан и широко используется во многих странах.

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Этот стандарт содержит метод идентификации разновидностей пшеницы в заданной партии в виде измельченных зерен, взятых отдельно, муки, крахмала путем разделения белков глинадина.

2 ПРИНЦИП

Разделение глиадинов пшеницы электрофорезом на полиакриламидном геле в гелевых планшетах, содержащих лактат алюминия с pH 3,1.

3 РЕАГЕНТЫ

Если не указано иное, используйте только реактивы признанного аналитического качества. Используемая вода должна быть деионизированной водой с сопротивлением более 10MΩ.

3.1 Экстракционный раствор, этанол, 70% -ный раствор (V/V)

Разбавляют 700 мл этанола (абсолютного) с 300 мл воды.

3.2 Буферный раствор, лактат алюминия, раствор при 2,5 г / л.

Растворите 15,0 г лактата алюминия в 5,5 литрах воды. Отрегулируйте pH до 3,1 с помощью молочной кислоты. Доведите до 6 литров водой. Используйте вакуумный фильтр с пористостью 0,45 мкм.

Держать при 4 °C

ПРИМЕЧАНИЕ 1. Проводимость раствора составляет приблизительно 950μS/m

3.3 Буфер для разбавления образца Растворяют 60,0 г сахарозы в 50 мл буферного раствора (3.2).

Держать при 4 °C.

3.4 Акриламид, раствор при 60,0 г / л геля.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Акриламидный мономер представляет собой нейротоксическое вещество, которое может абсорбироваться чрескожно. Его следует использовать с осторожностью, будь то порошок или раствор.

Растворите 6,0 г акриламида (для электрофореза) и 0,020 г аскорбиновой кислоты в буферном растворе в мерной колбе на 100 мл. (3.2)

Увеличьте объем с помощью буферного раствора. Держать при 4 °C.

3.5 Иницирующий раствор, гептагидрат геля железа 10 г / л

Растворите 0,1 г гептагидрата сульфата железа (II) в воде в мерной колбе на 10 мл и доведите до объема водой.

Незамедлительно подготовьте раствор.

3.6 Каталитический раствор, пероксид водорода 0,99% раствор (м / м)).

Растворить 0,33 мл пероксида водорода [30% (м / м)] в воде в мерной колбе на 10 мл. Доведите объем водой.

Готовьте новый раствор каждый день и держите его при 4 °С.

3.7 Трихлоруксусная кислота, 9,6% раствор (м / м))

Растворите 96 г трихлоруксусной кислоты в воде в мерной колбе на 1000 мл.

Доведите объем водой.

3.8 R250 E133, исходный раствор при 5,0 г / л

Растворите 5,0 г E133 в 1 л этанола, встряхните в течение 1 часа, затем отфильтруйте на фильтровальной бумаге, чтобы удалить все следы неорганических солей.

3.9 Окрашивающий раствор: раствор E133 0,25 г / л.

Смешайте 5,0 мл исходного раствора (3,8) с 95 мл раствора трихлоруксусной кислоты (3.7).

3.10 Цветной маркер или индикатор, например, пиронин G, метил-зеленый.**4 ОБОРУДОВАНИЕ**

Текущее лабораторное оборудование, и в частности следующее.

4.1 Вертикальный блок электрофореза ¹⁾**4.2 Комбинезоны, подходящие для используемого оборудования.****4.3 Стабилизированный источник электропитания**

Генератор постоянного тока, поддерживающий устойчивое и постоянное напряжение до 1 000 V и постоянную интенсивность до 300 м (мин. 300 W).

4.4 Охлаждающая ванна, терморегулируемая.

Циркуляционная водяная баня для поддержания емкости для электрофореза при 20 ° C ± 1 ° C.

4.5 Система очистки воды

Система деионизации, создающая воду высокой чистоты с сопротивлением более 10 MΩ.

¹⁾ В продаже существует множество вертикальных устройств для электрофореза

4.6 Аналитический баланс

4.7 Измеритель pH, для измерения pH с точностью $\pm 0,05$.

4.8 Проводник (факультативно).

4.9 Вакуумная фильтровальная установка, с нитроцеллюлозными фильтрами, пористость $0,45 \mu\text{m}$.

4.10 Фильтровальная бумага, Whatman no 1, $15,0 \text{ cm}$

4.11 Магнитная мешалка, с магнитными стержнями, покрытыми ПТФЭ², длиной $2,5 \text{ cm}$ и 5 cm .

4.12 Молотковая и стальная плита, для измельчения отдельно взятых зерен.

4.13 Измельчитель проб, для получения частиц размером $500 \mu\text{m}$.

4.14 Пробоотборные трубки, с колпачками.

4.15 Микропипетки

Автоматические пипетки $2,5 \text{ мл}$ одноразовыми конусами, объем которых составляет от 50 мкл до 250 мкл . Микропипетки с регулируемым объемом 10 мкл при 100 мкл и 100 мкл при 1000 мкл .

4.16 Микроцентрифуга, с минимальной центробежной силой $10\,000 \text{ г}$.

4.17 Трубки центрифуги, от $1,5$ до $2,0 \text{ мл}$.

4.13 Вихревой гомогенизатор

4.19 Микро-шприцы, объемом $25 \mu\text{l}$.

4.20 Жесткие полиэтиленовые контейнеры, приблизительно $6 \text{ cm} \times 17 \text{ cm} \times 17 \text{ cm}$.

4.21 Поддоны, $33 \text{ cm} \times 23 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$, для мытья, наблюдения и фотографирования гелей.

4.22 Мешалка с переменной скоростью, для обеспечения скорости перемешивания около 50 об / мин .

4.23 Негатоскоп, с источником флуоресцентного света и минимальной площадью поверхности $30 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ для исследования и фотографирования гелей.

4.24 Фотоаппарат

35-мм зеркальная камера с черно-белой пленкой или мелкозернистым цветом.

² РТФЕ = политетрафторэтилен

4.25 Штатив

Любой устойчивый штатив, позволяющий снимать с медленной скоростью затвора.

5 ОТБОР ПРОБ

Важно, в лабораторию приходили репрезентативные, неповрежденный и неизмененные образцы.

Отбор проб не является частью метода, указанного в этом проекте стандарта. Рекомендуемые методы отбора проб будут применяться в соответствии с действующими стандартами.

6 ПРОЦЕДУРА

6.1 6.1 Подготовка образцов для испытаний и экстракции :

6.1.1 Образцы отдельных зерен

ПРИМЕЧАНИЕ 2. Количество отдельных зерен, подлежащих анализу для идентификации, зависит от требуемой точности. Пределы доверительного интервала, основанные на количестве рассмотренных зерен, приведены в Приложении А. Анализ подвыборки позволяет более точно оценивать пропорции..

Поместите зерна в сложенный лист бумаги (5 см x 5 см) на металлическую пластину и измельчите их до порошка молотком (4.12). Перенесите измельченные зерна в пробирку для образцов (4.14).

Добавить 200 мкл экстрагирующего раствора (3.1) с использованием распределителя (4.1.5), гомогенизировать в течение 10 с (4.18) и выдерживать при комнатной температуре (20 ° C) в течение по меньшей мере 1 часа , Добавить 100 мкл буфера для разведения образца (3,3) и снова гомогенизировать. Дайте смеси настояться в течение 10 минут, прежде чем брать образец для анализа.

Хранить при температуре 4 ° C в течение 10 дней.

ПРИМЕЧАНИЕ 3 Указанные объемы подходят для средней массы семян 30 мг. В целом, лаборатории не взвешивают отдельные семена, но это можно сделать, взвешивая семена, а затем добавляя объемы, соответствующие 10 мкл на миллиграмм пшеницы.

Взвешивание зерна позволяет провести более эффективную процедуру электрофореза, но увеличивает время подготовки образца.

6.1.2 Образцы навалом

Измельчите образец в электрической мельнице (4.13). Взвесьте 0,2 г в центрифужной пробирке (4.17) и добавьте 600 мкл экстракционного раствора. Гомогенизируйте в течение 10 секунд (4.18) и выдерживайте при комнатной температуре (20 ° C) в течение по меньшей мере 1 часа или в течение ночи. Центрифугируйте в течение 5 мин при 10000 об. Поместите 200 мкл надосадочной жидкости в пробирку для образца, содержащую 400 мкл буфера для разведения образца (3,3) и закройте трубку. Гомогенизируйте в течение 10 с.

Хранить при температуре 4 ° C в течение 10 дней.

6.2 Подготовка эталона :

Действуйте, как описано в 6.1, но используя семена чистого эталонного сорта (Neeravva)³).

6.3 Подготовка геля

Соберите пресс-формы с прокладками толщиной 1,5 мм в соответствии с инструкциями производителя.

ПРИМЕЧАНИЕ 4 Для облегчения добавления геля и введения гребня прикрепите клейкой бумагой полосу из пластика (например, Plexiglas⁴), 140 мм x 25 мм x 3 мм к верхнему краю одной из пластин.

Чтобы приготовить каждый гель, смешайте 30 г раствора геля (3,4) и 75 мкл иницирующего раствора (3,5) в 125 мл фильтровальной колбе с боковой трубкой.. Обезжирьте смесь в течение 2 мин при давлении ниже или равном 50 мм рт.ст, постоянно перемешивая.

Добавьте 120 гл каталитического раствора.

(3.6). Вручную гомогенизируйте раствор. Если зерновой экстракт нужно хранить более 10 секунд, перемешивая его в течение 24 часов, перенесите его в центрифужную пробирку, чтобы предотвратить образование пузырьков воздуха. Быстро налейте раствор (4,17) и пропустите его 3 минуты в пресс-форме, чтобы поддерживать микроцентрифугу (4.16) при 10 000 г. Декантируйте непрерывный поток, чтобы минимизировать супернатант в пробирке для проб и закройте воздухозаборник. После заполнения формы немедленно поместите гребень (4.2) между пластинами. Время полимеризации составляет от 5 минут до 10 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ 5 Температура отливки от 20 ° C до 22 ° C дает удовлетворительные результаты.

6.4 Хранение образцов

Осторожно удалите гребенку и заполните лунки буферным раствором (3,2), чтобы предотвратить обезвоживание геля. С помощью микрошприца (4.19) поместите белковый экстракт (6-1 .1 или 6.1.2) в основание лунок.

Хранение образца зависит от используемого оборудования. (Из-за его плотности белковый экстракт остается внизу, под буферным раствором).

Поместите контрольный препарат (6.2) в любую лунку, за исключением двух крайних скважин.

ПРИМЕЧАНИЕ 6 Например, поместите 2 мкл образца в каждой лунке 30-луночной гелевой пластины толщиной 1,5 мм.

6.5 Сборка блока электрофореза

³ Зерна чистого эталонного сорта (Neerawa) могут быть получены в Канадской комиссии Гаэрина, Лаборатории анализа зерна 1404-303 Main Street, Виннипега, Манитоба, R3C 3G8 Canada

⁴ Эта информация предназначена для пользователей настоящего проекта стандарта и не означает, что ИСО одобряет или рекомендует эксклюзивное использование указанного продукта. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет показано, что они приводят к тем же результатам.

Закрепите верхнюю часть форм до верхней чаши. Соберите компоненты нижней чаши в соответствии с инструкциями производителя. Поместите верхнюю чашу и пресс-форму в нижний резервуар, заполненный буферным раствором (3,2) (или достаточным объемом для погружения форм). Заполните верхнюю емкость буферным раствором, установите крышку на место и подключите электроды к клеммам генератора (4.3). Проверка верхнего бака является анодом и подключается к положительной (+) клемме генератора, а нижняя - катод и подключается к отрицательной (-) клемме генератора.

6.6 Электрофероз

Отрегулируйте водяную баню (4.4), чтобы поддерживать электрофоретический блок при 20 ° C на время перемещения. Проведите электрофорез под током постоянной интенсивности, равным 90 мА. Используйте маркер или плоттер (3.10), чтобы определить оптимальное время перемещения для разных типов оборудования и толщин геля. Когда миграция завершена, остановите генератор, снимите крышку, удалите верхний резервуар с помощью пресс-форм и очистите буферный раствор, который он содержит.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Высокое напряжение может привести к летальному исходу. Убедитесь, что блок электрофореза используется в соответствии с правилами безопасности и инструкциями изготовителя, а также проверьте электрические утечки.

6.7 Окрашивание

Отсоедините пресс-формы от блока электрофореза. Откройте их, разложите гели и поместите их каждый в пластиковый контейнер (4.20), содержащий 100 мл окрашивающего раствора (3,9). Поместите закрытые емкости на мешалку (4.22) и поддерживайте умеренное магнитное перемешивание со скоростью 50 об / мин в течение от 4 ч до 18 ч. Поместите гели в стеклянные банки, содержащие воду, и тщательно протрите их хлопковым тампоном для удаления осевшего красителя.

7 ФОТОГРАФИЯ

Установите камеру (4.24) на подставку (4.25) над негатоскопом (4.23). Поместите очищенный гель в стеклянный бак (4.21) и установите его под прибор. Фотографируйте гель, освещая его только снизу.

8 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ЭЛЕКТРОФОРОГРАММ

8.1 Характеристика диаграмм белка.

Можно визуально охарактеризовать диаграмму белка разновидности (см. Рисунок 1) в зависимости от относительной подвижности компонентов и интенсивности полос в соответствии со способом, описанным в ссылке ^[4]. Стандартная диаграмма (или стандартные диаграммы), полученные для каждого сорта и из анализа 100 зерен, переносятся под этим генератором в каталог сортов. На основании этих характерных данных устанавливается идентификационный ключ, основанный на наличии или отсутствии полос, соответствующих относительным подвижностям и / или заданным интенсивностям.

8.2 Идентификация сортов

Чтобы идентифицировать неизвестный сорт из его электрофореграммы, действуйте следующим образом:

- a) Визуально осмотрите гель или его фотографическую реплику и обратите внимание на положение и интенсивность полос по сравнению с показателями одновременной электрофореграммы для эталонного сорта.
- b) Проконсультируйтесь с ключом, подготовленным в 8.1, чтобы выполнить идентификацию.
- c) Проверьте результат идентификации путем сравнения рассмотренной диаграммы с каталогом.

9. ВЫРАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Когда интерпретация белковой композиции проводится из анализа выделенных зерен, необходимо прибегнуть к статистическому анализу.

Доверительные интервалы приведены в Приложении А.