

29794



**POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS PROCEDURES
FOR CULTIVAR IDENTIFICATION OF FIELD BEAN
CASSAVA AND PASTURE LEGUMES**

A HUSSAIN W BUSHUK H RAMIREZ W M ROCA

Polyacrylamide gel electrophoresis procedures for cultivar identification of field bean(Phaseolus vulgaris) cassava(Manihot esculenta) and the pasture legumes(Centrosema macrocarpum C pubescens C acutifolium Desmodium ovalifolium Stylosanthes capitata)

A Hussain W Bushuk

Food Science Department
University of Manitoba
Winnipeg Canada R3T 2N2
(Publication No 115)

and

H Ramirez W M Roca

Biotechnology Research Unit
Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT
A A 6713 Cali Colombia S A

INTRODUCTION

Morphological descriptors of plant cultivars often present problems in clearcut identification because morphological differences within species are too ambiguous to discriminate. Ideally the differences between cultivars should be based on direct comparison of genes but this approach is still expensive and time consuming. However these differences can be measured indirectly by comparing the products of the gene activity i.e. by using proteins as genotype markers.

Electrophoretic techniques outlined in the following pages are based on the differential separation of protein molecules varying in net charge and size through polyacrylamide gel matrix under the influence of an applied electric field. Proteins encoded by different genes may have different molecular charge or molecular size and thus may have different mobilities in a given electrical field.

It should be noted that a particular electrophoregram does not reveal all the elements of actual genetic structure. The absence of a particular protein band does not necessarily mean that the genetic information required for its synthesis is also absent. It is possible that such information is blocked or switched off in a particular species or tissue. Nevertheless it is now well established that electrophoretic analyses can contribute useful information where morphological diversities are hard to establish.

Field Bean (Phaseolus vulgaris)

Procedure

Preparation of Sample

- 1 Remove seed coat with a scalpel
- 2 Grind individual seed into a fine powder using mortar and pestle
- 3 Weigh 0.1g of seed meal using sensitive balance to nearest milligram
- 4 Add 0.325 ml of extraction solution* and vortex for 2-3 min
- 5 Incubate the mixture at 40°C for 2h
- 6 Centrifuge at 27 000 Xg for 20 min at 10°C
- 7 Remove 100 uL of supernatant into a vial
- 8 Add 100 uL of dye solution** and mix

Preparation of gel

- 9 Weigh

Acrylamide	10 g
Sucrose	5 g
Bis-acrylamide	0.5 g
Ascorbic acid	0.1 g
Ferrous sulphate	0.0015 g
- 10 Add 95 ml of Aluminum lactate buffer pH 3.1 ***
- 11 Mix with magnetic stirrer and filter collect filtrate in a conical flask and degas for 5 min
- 12 Stand filtrate in freezer compartment of a fridge for 10 min
- 13 Add 175 uL of 3% Hydrogen peroxide solution swirl few times and pour into Bushuk's apparatus as directed (CIAT Working Document No. 19 1986-Spanish Polyacrylamide gel electrophoresis method for wheat variety identification I S O standard reference method-English)

* Extraction solution= 0.1M acetic acid containing 0.1% 2-mercaptoethanol

** Dye solution= 0.5% methyl green dye in 40% sucrose solution

*** Aluminum lactate buffer= Dissolve 2.5g Aluminum lactate in 950 ml of distilled water mix and adjust to pH 3.1 with lactic acid Finally adjust volume to 1L with dist water

Electrophoresis

Apparatus	Bushuk s Vertical Unit
Acrylamide concentration	10%
Running buffer	Aluminum lactate pH 3.1
Running current	30 mA/gel
Running time	5 h
Running temperature	20 °C

Staining

- 14 After electrophoresis stain the gel for at least 8 h or overnight with Coomassie Blue R-250 *
- 15 Rinse the stained gel with distilled water and then wash excess stain with soapy water rinse again and then destain with 12% Trichloro acetic acid solution
- 16 After 5-6 h of destaining wash twice with distilled water and allow the gel(in water) to cool for 20 min in the freezer This treatment improves the band quality as the gel shrinks a little at cold temperatures

Photography

- 17 Transfer the gel onto a glass plate apply light from underneath and photograph
- 18 Store the gel in Ziplock freezer bags or dry using commercial gel dryer

Reference

Hussain A H Ramirez W Bushuk and W M Roca 1986

Field bean (*Phaseolus vulgaris* L) cultivar identification by electrophoregrams of cotyledon storage proteins
Euphytica 35 729-732

- * Coomassie Blue Solution
Dissolve 1g Coomassie Blue R-250 in 100 ml ethanol Remove 4 ml of the above solution and add to 100 ml of Trichloro acetic acid Mix and filter

Cassava (Manihot esculenta Crantz)

Procedure

Preparation of material

- 1 Cut stem portions from mature (11 months) plants and plant in sand soil (1 1) mixture in greenhouse
- 2 After 1 month remove plants and wash roots with tap water
- 3 Use root tip as source material for extraction of marker proteins

Preparation of sample

- 4 Weigh 0.5g of root tips
- 5 Grind in porcelain mortar and pestle with 1 ml of the extraction buffer *
- 6 Centrifuge at 27 000 Xg for 15 min at 10°C
- 7 Use 20 uL of the clear supernatant for electrophoresis

Preparation of gel

- 8 Prepare 10% separating gel with 4% stacking as described in CIAT working document No 19 (1986) or as in LKB catalogue

Electrophoresis

Apparatus	Bio Rad Protein II
Acrylamide concentration	10%
Running buffer	Tris borate pH 9.0
Running voltage	250 volts
Running time	5 h
Running temperature	10°C

Staining

- 9 Place gel into a stainless steel tray containing 200 ml of staining buffer** and incubate at 37°C for 10 min

* Extraction buffer Tris HCl 0.05M pH 8.3 containing 5% PVP-40 20% Sucrose 0.5% Triton X 100 and 14 mM 2-mercaptoethanol

** Staining buffer Sodium phosphate 0.15M pH 7.0

- 10 Dissolve 100 mg α -naphthyl acetate and 50 mg β -naphthyl acetate in 5 ml acetone Add little water till it is a bit turbid and pour it over the gel
- 11 Incubate for 10 min at 37°C
- 12 Dissolve 150 mg of Fast Blue RR salt in small volume of water and filter Pour this filterate over the gel already floating in buffer and substrate solution
- 13 Incubate at 37 C for further 1h until the bands become visible
- 14 Stop the reaction by a rinse with water and fix with destaining solution *

References

Hussain A W Bushuk H Ramirez and W M Roca 1987

Identification of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes
Seed Sci & Technol 15 19-22

Ramirez H A Hussain W Roca and w Bushuk 1987

Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava(*Manihot esculenta* Crantz) varieties
Euphytica 36 39-48

-
- * Destaining solution
Methanol Acetic acid Water (6 1 14 v/v/v)

Pasture Legumes
(Centrosema macrocarpum C pubescens and C acutifolium)

Procedure

Preparation of sample

- 1 Remove husks manually or mechanically
- 2 Grind seeds to a fine meal in mortar and pestle
- 3 Weigh 0.1g of seed meal and add 1 ml of extraction solution* and vortex for 5 min
- 4 Incubate at 40 C for 2h
- 5 Centrifuge at 27 000 Xg for 20 min at 10 °C
- 6 Transfer supernatant carefully into a vial and use 6 uL for electrophoresis

Preparation of gel

Preparation of acid gel is similar as described for field beans. Only Sucrose contents were increased from 5 to 10 g per gel and Hydrogen peroxide was reduced from 175 uL to 150 uL

Electrophoresis

Apparatus	Bushuk's vertical unit
Acrylamide concentration	10%
Running buffer	Aluminum lactate pH 3.1
Running current	20 mA/gel
Running temperature	20 °C

Staining/destaining and photography

Same as described for field beans (see above)

Reference

Hussain A H Ramirez W M Roca and W Bushuk

Identification of cultivars of pasture legumes
(Centrosema macrocarpum C pubescens and C sp n) by
acid polyacrylamide gel electrophoresis of cotyledon
storage proteins
Euphytica

- * Extraction solution
- | | |
|--|--------|
| a Sodium acetate 0.5M pH 5.8 | 1 part |
| b Methyl green dye 0.5% in 40%
Sucrose solution | 1 part |

Pasture Legume (Desmodium ovalifolium)

Procedure

Preparation of sample

- 1 Grind seeds alongwith dry ice or using precooled mortar and pestle
- 2 Weigh 0.4g of meal into a centrifuge tube
- 3 Add 2 ml of 1% Sodium dodecyl sulphate solution
- 4 Vortex for 5 min at room temperature
- 5 Centrifuge at 27 000 Xg for 20 min at 5 °C
- 6 Discard residue and heat supernatant in boiling water for 3 min
- 7 Cool and centrifuge at 27 000Xg for 20 min at 5 °C
- 8 Discard residue and add Aluminum lactate buffer pH 3.1 to the supernatant in equal volume (1:1 v/v)
- 9 Mix and centrifuge at 27 000 Xg 20 min at 5 °C
- 10 Discard supernatant and wash residue with distilled water
- 11 Redissolve residue in 0.4 ml of 1% SDS
- 12 Centrifuge at 27 000 Xg for 20 min at 5 °C
- 13 Decant supernatant discard residue and add Sucrose to 10% level
- 14 Add a drop of bromophenol blue and use 6 µL for electrophoresis

Preparation of gel

Same as described in LKB-manual or in CIAT Working Document No 19 Gel does not contain SDS

Electrophoresis

Apparatus	LKB 2001
Acrylamide concentration	15%
Running buffer	Tris borate pH 8.9
Running voltage	250 volts
Running time	7h
Running temperature	10 °C

Staining

After electrophoresis stain gel with Coomassie Blue R-250 and destain with Methanol Acetic acid Water (6:1:14 v/v/v)

Reference

Hussain A H Ramirez W Bushuk and W M Roca

Identification of Desmodium cultivars by electrophoresis
Can J Plant Sci

Pasture Legume (Stylosanthes capitata)

Procedure

Preparation of sample

- 1 Remove seed coat by rubbing seeds against sand paper
- 2 Crush 0.1g of seeds in 3 ml of the extraction buffer* using mortar and pestle
- 3 Centrifuge at 12 000 Xg for 15 min at 10° C
- 4 Use 15 uL of supernatant for electrophoresis

Electrophoresis

Apparatus	LKB 2001
Acylamide concentration	12%
Running buffer	Tris borate pH 9.0 (0.175M Tris + 0.0175M Boric acid)
Running voltage	250 volts
Running time	6h
Running temperature	8° C

Staining and photography

Stain gel overnight with Coomassie Blue R-250 and destain with Methanol Acetic acid Water (6:1:14 v/v/v) Using diffused light from underneath take photographs Gel can be stored in ziplock freezer bags if necessary

Reference

Hussain A H Ramirez W M Roca and W Bushuk

Identification of cultivars of Stylosanthes capitata by polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins
Euphytica

* Extraction buffer

Tris HCl pH 8.3 with 20% Sucrose and 0.002% Dithiothreitol

**PROCEDIMIENTOS DE ELECTROFORESIS EN GELES DE
POLIACRILAMIDA PARA LA IDENTIFICACION
DE CULTIVARES DE FRIJOL YUCA Y
LEGUMINOSAS FORRAJERAS**

A HUSSAIN W BUSHUK H RAMIREZ W M ROCA

Procedimientos de electroforesis en geles de poliacrilamida para la identificación de cultivares de frijol (Phaseolus vulgaris), yuca (Manihot esculenta) y leguminosas forrajeras (Centrosema macrocarpum, C. pubescens, C. acutifolium, Desmodium ovalifolium, Stylosanthes capitata)

A HUSSAIN, W BUSHUK

Food Science Department,
University of Manitoba
Winnipeg, Canada R3T 2N2
(Publication No 115)

y

H RAMIREZ W M ROCA

Unidad de Investigación en Biotecnología
Centro Internacional de Agricultura Tropical
A A 6713 Cali, Colombia S A

INTRODUCCION

Los descriptores morfológicos de cultivares generalmente presentan problemas para una clara identificación debido a que las diferencias morfológicas dentro de una especie son demasiado ambiguas para poder discriminar los cultivares. Idealmente, las diferencias entre cultivares deberían basarse en la comparación directa de genes, pero este enfoque es todavía costoso y toma mucho tiempo. Sin embargo, las diferencias entre cultivares pueden ser medidas indirectamente comparando los productos de la actividad génica, es decir, usando las proteínas como marcadores genotípicos.

Las técnicas electroforéticas esbozadas en las siguientes páginas están basadas en la migración diferencial de moléculas protéicas que varían en carga y tamaño a través de un gel de poliacrilamida usado como soporte dentro de un campo eléctrico. Las proteínas codificadas por diferentes genes pueden tener distinta carga o tamaño molecular y de esta forma tener movilidades en un campo eléctrico.

Debe tenerse en cuenta que un electroforegrama en particular no revela todos los elementos presentes en el genoma de una planta. De igual forma, la ausencia de una banda protéica en particular no significa necesariamente que la información genética requerida para su síntesis esté ausente. Es posible que tal información haya sido bloqueada o desconectada en ese material en particular. Sin embargo, está bien establecido que los análisis electroforéticos contribuyen con información útil cuando las diversidades morfológicas son difíciles de establecer.

Procedimiento para Frijol (Phaseolus vulgaris)

Procedimiento

Preparación de la muestra

- 1 Remueva la testa con una cuchilla
- 2 Moler en un mortero cada semilla individualmente hasta obtener harina fina
- 3 Pesar 0 1 g de la harina en una balanza de precisión
- 4 Agregar 0 325 ml de buffer de extracción* y agitar en un vortex por dos a tres minutos
- 5 Incubar la mezcla a 40 °C por dos horas
- 6 Centrifugar a 27000 x g por 20 minutos a 10 °C
- 7 Separar 100 uL del sobrenadante en un vial
- 8 Agregar 100 uL del colorante indicador** y mezclar

Preparación del gel para PAGE ácida

- 9 Pese

Acrilamida	10 g
Sucrosa	5 g
Bis-Acrilamida	0 5 g
Acido ascórbico	0 1 g
Sulfato ferroso	0 0015 g
- 10 Agregar 95 ml de buffer de Lactato de aluminio***, pH 3 1
- 11 Mezclar con agitador magnético y filtrar en erlenmeyer para hacer vacío , desairear la solución por 5 minutos
- 12 Enfriar en congelador por 10 minutos
- 13 Añadir 175 uL de peróxido de Hidrógeno al 3/, agitar suavemente y vaciar rápidamente al aparato de Bushuk y Zillman descrito en Documento de Trabajo CIAT No 19, 1986 (en español) y Polyacrylamide gel electrophoresis method for Wheat variety identification I S O standard reference method (en inglés)

-
- * Acido Acético 0 1 M que contiene 0 1/ de 2-Mercaptoetanol
- ** Verde de Metilo al 0 5/ en solución de sucrosa al 40/
- *** 2 5 g de lactato de Aluminio en 950 ml de agua destilada llevar el pH a 3 1 con Acido láctico enrasar a 1000 ml

Electroforesis

Aparato	Unidad Vertical de Bushuk
Concentracion de Acrilamida	10%
Buffer de corrida	Lactato de Aluminio 0.25% pH 3.1
Corriente de corrida	30 mA/gel
Tiempo de corrida	5 horas
Temperatura de corrida	20 °C

Coloración

- 14 Después de la electroforesis, teñir el gel al menos durante ocho horas o toda la noche con Azul de Coomassie R-250*
- 15 Enjuague el gel teñido con agua destilada y luego lave el exceso de colorante con agua jabonosa, enjuague de nuevo y luego destiña con ácido tricloroacético al 12%
- 16 Después de 5-6 horas de destinción lavar dos veces con agua destilada. Poner el gel (sumergido en agua) a enfriar en el congelador por 20 minutos. Este tratamiento mejora la calidad de las bandas ya que el gel se contrae un poco a baja temperatura

Fotografía

- 18 Transferir el gel a un vidrio transparente, poner sobre una fuente de luz blanca y tomar la foto
- 19 Almacenar el gel en bolsas

Referencia

Hussain, A., H. Ramirez, W. Bushuk and W. M. Roca 1986

Field bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivar identification by electrophoregrams of cotyledon storage proteins
Euphytica, 35 729-732

- * Solución de Azul de Coomassie
Disolver 1 g de Azul de Coomassie R-250 en 100 ml de etanol. Tomar 4 ml de esta solución y añadirlo a 100 ml de ácido Tricloroacético al 12%. Mezclar y filtrar

Procedimiento para Yuca (Manihot esculenta Crantz)

Preparación del material

- 1 Tome estacas de plantas maduras (6-12 meses de edad) y plántelas en el invernadero en una mezcla de suelo-arena (1 1)
- 2 Después de un mes, remueva las plantas y lave las raíces con agua de la llave
- 3 Use las puntas de las raíces como material para extracción de proteínas marcadoras

Preparación de la muestra

- 4 Pesar 0.5 g de puntas de raíces
- 5 Macerar en un mortero de porcelana con 1.0 ml de buffer de extracción*
- 6 Centrifugar a 27000 xg por 15 minutos a 10 °C
- 7 Usar 20 µL de sobrenadante claro para la electroforesis

Preparación del gel

- 8 Preparar un gel de separación al 10/ con stacking al 4/ como está descrito en el Documento de Trabajo No 19, CIAT (1986) o en el catálogo LKB

Electroforesis

Aparato	Bio Rad Protein II
Concentración de Acrilamida	10/
Buffer de corrida**	Tris Borato pH 9.0
Voltaje de corrida	250 voltios (máximo)
Tiempo de corrida	5 horas
Temperatura de corrida	10 °C

Coloración

- 9 Ponga el gel en una bandeja de acero inoxidable que contenga 100 ml de buffer de coloración*** e incube a 37 °C por 10 minutos

* Buffer de extracción Tris HCl 0.05M pH 8.3 que contiene 5% de PVP-40 20% de sucrosa 0.5% de Triton x-100 y 14 mM de 2-Mercaptoetanol

** Buffer de corrida Trizma-Base 0.175 M + Acido Bórico 0.0175 M

*** Buffer de coloración Fosfato de Sodio 0.15 M pH 7.0

- 10 Disolver 100 mg de a-naftil acetato y 50 mg de B-naftil acetato en 5 ml de acetona Mezcle y agregue lentamente agua hasta que se vuelva ligeramente lechoso Viertalo sobre el gel
- 11 Incube a 37 °C por 10 minutos
- 12 Disuelva 150 mg de Fast Blue RR salt en poca agua y filtre Viertalo sobre el gel que flota en la solución de buffer y sustrato
- 13 Incube a 37 °C durante una hora hasta que las bandas sean visibles
- 14 Pare la reacción lavando con agua y fije con solución desteñidora*

Referencias

-Hussain,A , W Bushuk, H Ramirez and W M Roca 1987

Identification of cassava (Manihot esculenta Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes
Seed Sci & Technol 15 19-22

-Ramirez,H , A Hussain, W Roca end W Bushuk, 1987

Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (Manihot esculenta Crantz) varieties
Euphytica 36 39-48

* Solución desteñidora
Metanol Acido acético agua (6 1 14 v/v/v)

Procedimiento para Leguminosas Forrajeras
(Centrosema macrocarpum, C pubescens and C acutifolium)

Preparación de la muestra

- 1 Remueva manual o mecánicamente la cáscara
- 2 Macere las semillas hasta obtener una harina fina
- 3 Pese 0.1 g de harina de semilla, ponga en tubo de centrifuga, agregue 1 ml de solución de extracción* y agite en vortex por 5 minutos
- 4 Incube a 40 °C durante dos horas
- 5 Centrifuge a 27000 xg durante 20 minutos a 10 °C
- 6 Transfiera cuidadosamente el sobrenadante a un vial y use 6 µL para la electroforesis

Preparación del gel

La preparación del gel es similar a la descrita para frijol. Solamente el contenido de sucrosa se ha incrementado de 5 a 10 g por gel y el peróxido de Hidrógeno se redujo de 175 a 150 µL.

Electroforesis

Aparato	Unidad vertical de Bushuk
Concentración de acrilamida	10%
Buffer de corrida	Lactato de Aluminio, pH 3.1
Corriente de corrida	20 mA/gel
Temperatura de corrida	20 °C
Tiempo de corrida	5 horas

Coloración, destinción y fotografía

Es igual a lo descrito para frijol (ver páginas anteriores)

Referencia

Hussain, A. H. Ramirez, W. M. Roca and W. Bushuk

Identification of cultivars of pasture legumes
(Centrosema macrocarpum, C pubescens and C sp n)
by acid polyacrylamide gel electrophoresis of
cotyledon storage proteins
Euphytica

* Solución de extracción	
a Acetato de Sodio 0.5 M pH 5.8	1 parte
b Indicador verde de metilo 0.5% en solución de sucrosa al 40%	1 parte

Procedimiento para Leguminosas Forrajeras
(Desmodium ovalifolium)

Preparación de la muestra

- 1 Moler las semillas usando hielo seco o un mortero preenfriado
- 2 Pesar 0.2 g de harina de semillas en un tubo de centrifuga
- 3 Agregar 2.0 ml de una solución al 1% de dodecil sulfato sódico (SDS)
- 4 Agitar en vortex durante 5 minutos a temperatura ambiente
- 5 Centrifugar a 27000 xg por 20 minutos a 5 °C
- 6 Descartar residuos y calentar el sobrenadante por 3 minutos en agua hirviendo
- 7 Enfriar y centrifugar a 27000 xg por 20 minutos a 5 °C
- 8 Descartar residuos y añadir buffer de Lactato de Aluminio pH 3.1 al sobrenadante en igual volumen (1:1 v/v)
- 9 Mezclar y centrifugar a 27000 xg por 20 minutos a 5 °C
- 10 Descartar el sobrenadante y lavar el residuo con agua destilada
- 11 Redisolver el residuo en 0.4 ml de SDS al 1%
- 12 Centrifugar a 27000 xg por 20 minutos a 5 °C
- 13 Decantar el sobrenadante, descartar el residuo. Adicionar sucrosa al 10% y una gota de azul de bromofenol
- 14 Usar 6 µL de este extracto para electroforesis en gel básico

Preparación del gel

Es igual a como está descrito en el manual LKB o en el documento de trabajo CIAT No 19. Los geles no contienen SDS

Electroforesis

Aparato	LKB 2001
Concentración de acrilamida	15%
Buffer de corrida	Tris Borato pH 8.9
Voltaje de corrida	250 V
Tiempo de corrida	7 horas
Temperatura de corrida	10 °C

Coloración

Después de la electroforesis teñir el gel con azul de Coomassie R-250 y desteñirlo con Metanol ácido acético agua (6:1:14 v/v/v)

Referencia

Hussain, A , H Ramirez, W Bushuk and W M Roca

Identification of Desmodium cultivars by
electrophoresis
Can J Plant Sci

Procedimiento para Leguminosas Forrajeras
(Stylosanthes capitata)

Preparación de la muestra

- 1 Remueva la cáscara de la semilla raspándola con papel de lija
- 2 Macere 0.1 g de semilla en 3 ml de buffer de extracción* usando un mortero
- 3 Centrifugue a 12000 xg por 15 minutos a 10 °C
- 4 Use 15 uL de sobrenadante para la electroforesis

Electroforesis

Aparato	LKB 2001
Concentración de acrilamida	12%
Buffer de corrida**	Tris Borato pH 9.0
Voltaje de corrida	250 V
Tiempo de corrida	6 horas
Temperatura de corrida	8 °C

Coloración y fotografía

Tiña el gel toda la noche con azul de Coomassie R-250 y destiña con metanol ácido acético agua (6:1:14 v/v/v) Tome fotografías iluminando el gel desde abajo usando una fuente de luz difusa. Si es necesario, utilice bolsas ziplock para almacenar el gel en la nevera.

Referencia

Hussain A, H Ramirez W M Roca and W Bushuk

Identification of cultivars of Stylosanthes capitata by polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins
Euphytica

- * Extraction buffer
Tris HCl pH 8.3 con 20% de sucrosa y 0.002% de Ditiotretol
- ** Buffer de corrida
Trisma Base 0.175 M + Acido Borico 0.0175 M