

# 大豆贮存蛋白研究

林 忠 平

尹 光 初

(中国科学院植物研究所)

(黑龙江省农业科学院大豆研究所)

种子贮存蛋白 (storage protein) 是一类非常重要的植物蛋白。它为萌发的幼苗提供氨基酸和氮的来源; 它作为人类的高蛋白食物, 提供了巨大的经济利益。由于植物蛋白在人类生活中的重要性与日俱增, 对贮存蛋白, 尤其是对大豆贮存蛋白的研究, 引起了很大重视。

大豆种子蛋白质含量往往超过 40%。某些野生大豆变种蛋白质含量高达种子干重的 55%。而一般豆类种子含蛋白质 25—35%。大豆的种子如同其它豆科植物的种子一样, 子叶占据了种子的大部分。子叶有两个生长阶段, 即细胞迅速分裂的阶段和细胞膨大的阶段。在后一阶段合成并积累了大量的贮存蛋白及其它贮存物, 如淀粉、油等。贮存蛋白是以不溶性的蛋白体 (protein body) 的形式沉积起来的。蛋白体被一层光滑的膜包围着。从蛋白体产生的过程来看, 蛋白体膜可能来自液泡膜。蛋白质在内质网上合成之后, 经高尔基氏体进入液泡<sup>[9, 10, 24]</sup>。

在蛋白体中占绝对优势的是贮存蛋白。贮存蛋白中主要是球蛋白 (globulin), 约占全部种子蛋白的 60—70%, 还有一定数量 (约 20%) 的白蛋白 (albumin)。蛋白体里还结合着其它一些蛋白质和酶, 如植物凝集素 (phytohemagglutinins)、胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor)、蛋白酶 (proteases) 和磷酸酶 (phosphatases)<sup>[41]</sup>。

干种子的蛋白体中蛋白处于相对稳定的状态。到了代谢上更加活跃的阶段, 种子萌发阶段, 它才发生降解。其绝大部分作为氨基酸和氮源用于合成新的含氮化合物。所以这些蛋白质称为贮存蛋白。贮存蛋白不同于那些有代谢活性的和起结构作用的蛋白质。

早期对豆类贮存蛋白的研究以 Osborne 和 Campbell (1898) 的工作为最重要<sup>[49]</sup>。他们发现豌豆、大豆等种子大部分是盐溶性的蛋白质, 即球蛋白 (globulin), 也就是所谓 legumin (有人译为豆球蛋白) 和 vicilin (有人译为豌豆球蛋白)。用硫酸铵沉淀和等电点沉淀的方法, 可以得到这两种球蛋白。

超速离心和电泳技术的发展, 使得对这两种蛋白的研究更加深入。已经搞清楚 legumin 和 vicilin 的沉降系数近似于 11s 和 7s。它们的分子量大约是 321,000 和 186,000。等电点分别为 pH 4.8 和 pH 5.5<sup>[21]</sup>。这是最主要和研究最多的两种球蛋白。后来在大豆及其它豆类种子中又发现了 2s 球蛋白<sup>[20, 63]</sup>。2s 球蛋白分子量在 27,800—32,500 之间。等电点 pH 5.8—4.3 之间<sup>[37]</sup>。后来发现 2s 部分的球蛋白不完全是贮存蛋白, 其中的主要成分有蛋白酶抑制剂的活性<sup>[36]</sup>。

关于分离和纯化大豆球蛋白的细节和工作要点,可以参阅 Derbyshire 等人<sup>[21]</sup>对豆科植物球蛋白的分离所做详细的评述。制备大豆球蛋白通常以未经贮存的干种子为起始材料,先制成脱脂的干粉<sup>[54]</sup>,再用稀的盐溶液(如 0.4M NaCl)和水进行抽提。而后用适当浓度的  $Mg^{++}$  离子<sup>[1]</sup>和适当饱和度的  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀球蛋白,使各组分分部<sup>[64]</sup>。

脱油一般用正己烷和乙醚。有的作者认为这并不是必定要做的程序<sup>[31]</sup>。我们在自己的工作中也试过事先不脱油,似乎对于球蛋白的得率没有大的影响。

从最初的样品中抽提贮存蛋白不宜用较高的离子强度。这也是为了避免阳离子和高离子强度会增加蛋白质-肌醇六磷酸(protein-phytate)之间的相互作用。蛋白质与肌醇六磷酸复合物容易在酸性 pH 值(pH4.5-6.6)沉淀。所以抽提缓冲液的 pH 值应高于这个范围<sup>[53]</sup>。但高 pH 值可能促进球蛋白分子之间聚合与解离反应<sup>[42]</sup>。现在许多人采用 Wolf 和 Briggs<sup>[64]</sup>采用过的提取介质。其成分如下: 0.035M 磷酸缓冲液, 0.4M NaCl, 0.01M  $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -mercaptoethanol), pH 7.6,  $\mu=0.5$ 。为了在低离子强度下进行研究,上述标准缓冲液中可以省去 0.4M NaCl<sup>[30]</sup>。

加入低浓度的  $\beta$ -巯基乙醇或二巯基苏糖醇(dithiothreitol)是为了抑制二硫桥(disulphide bridge)形成,减少蛋白质分子之间的聚合作用(polymerisation)因为聚合的结果往往产生不溶性的蛋白。据我们经验,硫、氢基的试剂也往往使球蛋白分解为更小的亚基,从而使得到的球蛋白在聚丙烯酰胺电泳上增加了更多的带。所以 SH-化合物的用量不可过大。

分离蛋白的程序通常在低温下进行,以减少蛋白的水解作用。有的作者提出球蛋白的低温沉淀作用(cryoprecipitation)影响球蛋白的得率<sup>[20, 66]</sup>。还有各类蛋白之间的相互作用也影响分离<sup>[21]</sup>。为了减少那些不良因素的作用,十分重要的一点是尽可能使提取和分离的过程进行得快一些。

用适当饱和度的硫酸铵来沉淀不同的球蛋白是迄今应用最广的方法。也可以用等电点沉淀的方法来分离和纯化球蛋白<sup>[54]</sup>。等电点沉淀一般要重复沉淀几次,每次沉淀都有相当多的蛋白质形成二硫桥的多聚体,不再重溶,损失较大<sup>[17, 63]</sup>。

进一步纯化大豆球蛋白的方法有多种。生物化学的工作中广泛采用凝胶过滤的方法除去低分子量的蛋白及非蛋白的杂质。Hasegawa 等人<sup>[29]</sup>用 Sephadex G200 使大豆 7S 与 11S 球蛋白分开。现在更多地采用 DEAE-纤维素和 DEAE-Sephadex 来纯化大豆球蛋白<sup>[14, 44, 48]</sup>。用专一性的抗体或植物凝集素蛋白,如刀豆球蛋白 A (Concanavalin A) 结合于固相支持物上进行亲和层析,如抗体-Sepharose 和 Con A Sepharose 亲和层析将成为分离纯化蛋白的有力工具,并已在大豆蛋白分离中初步使用<sup>[21, 33]</sup>。但较为方便的还是蔗糖密度梯度离心,它更适于小量样品的纯化。Hill 和 Breidenbach<sup>[30]</sup>用密度梯度离心法分离大豆球蛋白的程序为许多人所采用。

下面介绍几种大豆球蛋白的特性。

Wolf 和 Briggs<sup>[65]</sup>及 Badley<sup>[2]</sup>报导过 11S 大豆球蛋白的物理特性。当时他们称这种

蛋白为 glucinin (曾译为大豆球蛋白)。测得实际沉降系数为 12.2—12.3 S, 扩散系数 (diffusion coefficient) ( $D_{20,w}$ ) 约为  $3 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{S}$ , 分子量在 300,000 到 360,000 之间。

SDS 凝胶电泳分析表明, 大豆 11S 球蛋白含有两种不同的亚基。对于亚基的大小和数量, 不同作者的研究结果并不一致。Catisimpoolas 等人<sup>[13, 14]</sup>的研究表明: 这一蛋白含有六个亚基, 其中三个具碱性的等电点, 分子量为 22,000; 另外三个具酸性等电点, 分子量为 37,000。根据 N-末端氨基酸的分析, 推测出一个亚基排列的模型: 12 个亚基组成一个二聚体。每个单位由六个亚基排成六角形所构成。这两个单体一上一下落在一起。Badley 及其同事<sup>[2]</sup>对大豆 11S 蛋白进行电泳分析, 支持上述这个假设的模型。Badley 认为酸性和碱性亚基的交替排列, 使单体十分稳定。Kitamura 等人<sup>[40]</sup>将 11S 蛋白降解和烷基化后, 用碱性和酸性的尿素凝胶电泳可以分成 4 个酸性亚基和 4 个碱性亚基。碱性亚基 (即  $B_1$ — $B_4$ ) 分子量均为 22,500, 可用 CM-Sephadex 将它们分开。 $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$  四个亚基的分子数目比为 1:1:2:2。四个酸性亚基中  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  分子量为 37,000,  $A_4$  分子量为 45,000。DEAE-Sephadex 层析可将它们分开。 $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$  分子数目比为 1:1:2:2。

Kitamura<sup>[40]</sup>发现酸性和碱性亚基之间有着二硫键。当这种球蛋白用尿素分解时, 形成三种居间的亚基 (IS-1, IS-2 和 IS-3)。IS-1 包含  $A_1$ 、 $A_2$  和  $B_3$ , 分子量为 58,000; IS-2 包含  $A_3$  和  $B_1$  或  $A_3$  和  $B_2$ , 分子量为 63,000; IS-3 包含  $A_4$  和  $B_4$ , 分子量为 63,000。

不久前 Mori<sup>[45]</sup>研究了十八个大豆栽培种中 11S 蛋白的亚基构成。发现它们的酸性亚基和碱性亚基的比例有 5 种形式。

关于 7S 球蛋白的研究也十分深入<sup>[32, 34, 50, 54—57]</sup>。Koshiyama 和 Fukushima 分离出两种不同的 7S 球蛋白, 分别称为  $\beta$ -conglycinin 和  $\gamma$ -conglycinin。 $\beta$ -conglycinin 是主要的存在形式, 它在 0.5M 离子强度的缓冲液中以 7S 形式存在, 在 0.1M 离子强度的溶液中透析则形成 9S 的形式<sup>[57]</sup>。7S 蛋白的分子量为 150,000—170,000, 由三种亚基  $\alpha$ ,  $\alpha'$  (分子量约为 57,000) 及  $\beta$  (分子量为 42,000) 组成。Thanh 和 Shibasaki<sup>[56, 57]</sup>把 conglucinin 分成六种异构体 ( $B_1$ — $B_6$ )。它们的亚基组成是这样的:  $B_1, \alpha' \beta$  (1:2);  $B_2, \alpha \beta$  (1:2);  $B_3, \alpha \alpha' \beta$  (1:1:1);  $B_4, \alpha \beta$  (2:1);  $B_5, \alpha \alpha'$  (2:1) 和  $B_6, \alpha$  (3)。这些异构体在氨基酸比例上和碳氢比例上都稍有不同。他们还发现将提纯的亚基混在一起, 会重新结合成各种不同的异构体<sup>[55]</sup>。

下面介绍球蛋白的研究情况。Koshiyama 等人<sup>[36, 37]</sup>对 2S 球蛋白的分离和鉴定做了不少工作。他们发现 2S 蛋白包括两个免疫学特性不同组分。即二者具有不同的抗原性。2S 球蛋白在圆盘电泳上可分为 6 个带。三个为主带, 占全部蛋白的 80%。这三个主要成分可以用 DEAE-Sephadex 层析进行分离。层析柱上洗脱下来的三个顶峰都具有抗胰酶或抗  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶的活性。其中两个主要成分, 即  $\alpha_3$  和  $\alpha_4$ , 在免疫学性质上是一致的, 但在不同于另外一个称为  $\alpha_2$  的蛋白。 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$  这三个组分的分子量分别为 32,500、21,900 和 27,800。它们 N-末端氨基酸都是天门冬氨酸。这三个组分作

为蛋白酶抑制剂的作用,所适应的 pH 范围及热稳定性等均有所研究。并且发现来自不同地域的大豆栽培种所含  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  和  $\alpha_4$  是不相同的。

实际上对大豆贮存蛋白物化特性的研究是相当广泛的。例如关于免疫化学的研究<sup>(11、15)</sup>就是十分重要的方面。有的作者用荧光抗体法研究贮存蛋白的细胞定位<sup>(27)</sup>。有的研究种子休眠和萌发时的贮存蛋白<sup>(12)</sup>。笔者研究了某些栽培大豆、野生大豆以及半野生、半栽培的一些大豆中 11S 蛋白、7S 蛋白和 2S 蛋白的比例关系(资料尚未发表)。有的人研究大豆蛋白在超声作用下的凝聚作用(agglomeration)<sup>(62)</sup>。也有从食品工业的角度研究大豆蛋白和香味化合物之间的相互关系<sup>(18、19)</sup>等等。

由于贮存蛋白占种子蛋白的绝大部分。所以大豆的营养价值基本上取决于贮存蛋白的氨基酸组成。这里我们列举一些作者测定的结果供参考(见表 1)。

表 1 表明 7S 比 11S 有更多的赖氨酸。11S 比 7S 含有更多的谷氨酸。7S 和 11S 蛋白在酪氨酸对色氨酸的比例上也存在着差异。7S 蛋白中酪:色=10:1,而 11S 中为 4:1。最值得注意的是贮存蛋白中甲硫氨酸(即蛋氨酸)和半胱氨酸含量很低。其它豆科植物种子也存在类似情况,这是豆子营养价值的一个限制因素。Bliss 和 Hall<sup>(3)</sup>认为,改进豆类种子氨基酸组分的一个办法是选育白蛋白/球蛋白比值高的品种,因为通常白蛋白更富于甲硫氨酸。Romero 等<sup>(51)</sup>在菜豆的一个品系中找到三个高甲硫氨酸的亚基。由于亚基的遗传受单个遗传基因的控制,可以在分离的子代中找到高甲硫氨酸的类型。此外环境因素,如硫肥,也可能影响贮存蛋白的构成和数量,从而氨基酸的组分也跟着发生变化<sup>(7、24)</sup>。

近年来研究大豆贮存蛋白的重点在于研究种子发育过程中各种贮存蛋白的积累进程。涉及到球蛋白基因的转录。Beachy 等人<sup>(3、4、6、43)</sup>在这方面做了许多工作。表 2 为 Meinke<sup>(43)</sup>所概括的 7S 和 11S 蛋白及其 mRNA 的积累进程。

从表 2 我们看到 7S 蛋白的 mRNA 的转录先于 11S 蛋白的 mRNA。当种子进入大量合成贮存蛋白的阶段时,也是 mRNA 最丰富的时候。大豆种子发育期贮存蛋白的合成是在转录水平上控制的,这是最近研究的一个结论<sup>(5、25、26)</sup>。

一些研究者认为,种子发育过程中 7S 蛋白和 11S 蛋白的亚基组分是有变化的<sup>(24、31、43、67)</sup>。Meinke<sup>(43)</sup>还发现大豆胚轴积累贮存蛋白的情况与子叶有所不同,而且在胚轴的 7S 蛋白中还出现了一个附加的  $\alpha^0$  亚基。

标记氨基酸掺入贮存蛋白的实验表明 2S 蛋白的合成在种子发育的早期直至成熟一直维持较高水平<sup>(60)</sup>。

顺便提一下,在许多豆科植物种子中存在着与贮存蛋白有关的长寿 mRNA(long-live mRNA)<sup>(28)</sup>。这种 mRNA 的生物学意义还没有搞得十分清楚。Mori<sup>(46)</sup>和 Beach<sup>(5)</sup>等人发表了从大豆种子中分离 mRNA 的方法,对深入研究大豆蛋白的合成是一个推动。人们希望了解为什么普通豆科植物种子蛋白质含量仅 25—30%。(有的可达 30%),而大豆蛋白质可高达 40—50%。希望从 DNA-RNA-蛋白质的过程中找到差别的原因。我们认为核酸研究的技术进展将使得可以用专门的分子探针(specific molecular probes)来研究种子的发育过程,研究环境因子、营养条件、病理过程对基因表

达的影响。

最后我们提一下关于大豆贮存蛋白基因改善的问题。1979 年国际原子机构和联合国粮农组织在维也纳召开了《改进禾谷类和豆类种子蛋白的国际学术讨论会》。会议对发展中国家人民营养问题予以很大关注。认为提高种子蛋白的数量和质量有着巨大的潜力。会议论文涉及包括大豆在内的贮存蛋白基因型的改良。

几十种豆科植物种子中存在 11S、7S 球蛋白，从全蛋白 (holoprotein) 看，它们有着很大的变异性。但是从亚基的分析来看，却有着很多共同的地方。Thomason<sup>(59)</sup>分

表 1 大豆贮存蛋白的氨基酸构成 (mol%)

氨基酸	11S			11S酸性亚基	11S碱性亚基	7S		2S	
	{52}	{39}	{47}	{13}	{47}	{57}	{39}	{61}	
Gly 甘(氨酸)	7.24	7.8	7.48	7.74	6.86	4.6	2.9	9.1	9.1
Ala 丙	5.37	6.7	6.20	3.27	6.34	4.9	3.7	4.7	5.6
Val 缬	4.93	5.6	5.22	3.91	6.81	4.0	5.1	7.1	7.3
Leu 亮	6.03	7.2	7.05	5.71	9.24	8.6	10.3	7.1	9.1
Ile 异亮	5.06	4.6	4.14	4.05	4.80	4.6	6.4	9.4	6.4
Phe 苯丙	3.08	3.9	4.63	3.42	5.35	5.9	7.4	5.9	5.1
Pro 脯	5.71	6.3	4.46	7.08	5.85	5.5	4.3	6.2	6.1
Ser 丝	8.50	6.6	5.97	5.92	6.94	7.0	6.8	5.9	5.5
Thr 苏	5.04	4.2	3.82	3.36	4.68	2.3	2.8	4.4	5.0
Tyr 酪	2.69	2.5	2.66	2.15	2.79	2.7	3.6	1.8	2.9
Met 甲硫	1.09	1.0	1.30	0.49	1.10		0.3	0.6	1.9
Cys 半胱	1.50	1.1	0.63		1.62	0	0.3	1.0	1.5
Lys 赖	3.76	4.1	3.93	6.27	3.14	6.4	7.0	5.7	5.1
Arg 精	5.12	5.9	5.64	6.37	5.43	7.0	8.8	5.5	4.2
His 组	1.88	1.8	1.77	2.57	1.51	1.6	1.7		
Asp 天冬	12.01	11.8	11.71	12.66	12.96	11.7	14.1	15.4	13.3
Glu 谷	19.17	18.8	21.43	24.53	14.40	24.1	20.5		
Trp 色	0.83						0.3		
NH <sub>3</sub>							1.7		

表 2 大豆 7S 和 11S 蛋白及其 mRNA<sub>s</sub> 的积累进程

种子长度	开花后天数	发育的种子贮存蛋白基因的表达
mm	天	
5—7	14—18	通过以克隆 cDNA 为探针的 DNA-RNA 杂交，开始检测出 7S 和 11S 蛋白的mRNAs。
8	18—20	7S 蛋白的 $\alpha'$ 和 $\alpha$ 亚基在子叶和胚轴中积累。分子杂交发现 7S 蛋白的 mRNAs 水平提高。
9	19—21	在子叶开始积累 11S 的酸性和碱性亚基。分子杂交发现 11S 蛋白的 mRNAs 水平提高。
12	>28	7S 的 $\beta$ 和 11S 的 A <sub>4</sub> 酸性亚基在子叶中积累。7S 的 $\alpha'$ 亚基开始在胚轴中积累。
14	>50	分子杂交不再检出 7S 和 11S 蛋白的mRNAs。

析了豆科植物的主要贮存蛋白的亚基,研究了这些亚基在分子形式上的多样性,认为贮存蛋白的表现基因活动系统不仅涉及组成这些蛋白的亚基初级序列,也包括对这些亚基的修饰、运输、装配、包装以及几种亚基的比例等。

前面我们已经提到在控制亚基组成的水平上选育更高营养价值的大豆。Chow<sup>[16]</sup>介绍过用射线处理获得高产、高蛋白的大豆突变株。看来通过诱变培育良种有较好的前景。

诚然,贮存蛋白基因的改善还涉及其它基因。例如大豆含油量和蛋白量成负的相关关系。高产、高蛋白、抗病等也往往相互矛盾。近年来一些育种家十分注意选择野生大豆变种做为亲本,使野生大豆的优良性状向栽培大豆转移。

### 参 考 文 献

- [1] Appu Rao, A. G. and Narasinga Rao, M. S.: 1971. *Preparative Biochemistry* 7, 89—101.
- [2] Badley, R. A., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D., Green, J. P. and Stubbs, J. M.: 1975. *Biochem. Biophys. Acta* 412, 214—228.
- [3] Beachy, R. N., Barton, K. A., Thompson, J. F. and Madison, J. T.: 1980. *Plant physiol.* 65, 990—994.
- [4] Beachy, R. N., Jarvis, N. P., and Barton, K. A.: 1981. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 19—27.
- [5] Beachy, R. N., Thompson, J. F. and Madison, J. T.: 1978. *Plant physiol.* 61, 139—141.
- [6] Beachy, R. N., Thompson, J. F. and Madison, J. T.: 1979. in *The Plant Seed Development, Preservation and Dermination*. (I. Rubenstein, R. L. Philips, G. E. Green, and B. C. Gengenbach, eds), pp. 67—84. Academic Press, New York.
- [7] Blagrove, R. J., Gillespie, J. M. and Randall, P. J.: 1976. *Aust. J. Plant Physiol.* 3, 173—184.
- [8] Bliss, F. A. and Hall, T. C.: 1977. *Cereal Food World* 22, 106—113.
- [9] Briarty, L. G., Coult, D. A. and Boulter, D.: 1969. *J. Exp. Bot.* 20, 253—372.
- [10] Burr, F. A.: 1978. in *The Plant Seed: Development, Preservation and Germination*. (I. Rubenstein, R. L. Philips, D. E. Green, and B. G. Gengenbach, eds), pp. 82—84. Academic Press, New York.
- [11] Catsimpoalas, N.: 1969. *Cereal chem.* 46, 369—372.
- [12] Catsimpoalas, N., Kenstam, C. E., Rogers, D. A. and Meyer, E. W.: 1963. *Biochem. Biophys. Acta* 168, 122—131.
- [13] Catsimpoalas, N., Kenney, A., Meyer, E. W. and Szukaj, B. F.: 1971. *J. Sci. Food Agric.* 22, 448—450.
- [14] Catsimpoalas, N., Rogers, D. A., Circle, S. J. and Meyer, E. W.: 1967. *Cereal Chem.* 44, 631—637.
- [15] Catsimpoalas, N. and Meyer, E. W.: 1968. *Agric. Food Chem.* 16, 123—131.
- [16] Chow, K. H.: 1979. in *Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes*, vol. II, p. 67. IAEA, Vienna.
- [17] Circle, S. J.: 1950. in *Soybeans and Soybean Products*. (K. S. Markley, ed.), vol. I, pp. 275—370. Interscience, New York.
- [18] Damodaran, S. and Kinsella, J. E.: 1981a. *J. Agric. Food chem.* 29, 1249—1253.
- [19] Damodaran, S. and Kinsella, J. E.: 1981b. *J. Agric Food Chem.* 29, 1253—1257.
- [20] Danielsson, C. E.: 1949. *Biochem. J.* 44, 387—400.
- [21] Derbyshire, E. Wright, D. J. and Boulter, D.: 1976. *Phytochemistry* 15, 3—24.
- [22] Dieckert, J. W. and Diekert, M. C. 1976. in *Genetic Improvement of Seed Proteins*. pp. 28—51. National Academy of Sciences, Washington, D. C.
- [23] Elleman, T. C.: 1977. *Aust. J. Biol. Sci.* 30, 33—45.
- [24] Gayler, K. R. and Sykes, G. E.: 1981. *Plant Physiol.* 67, 953—961.
- [25] Goldberg, R. B., Hoschek, G. B., Ditta, G. S. and Breidenbach, R. W.: 1981. *Dev. Biol.* 83,