

野生大豆与栽培大豆种子贮藏蛋白含量的 PAGE 分析

韩琳娜, 郭庆梅, 周凤琴

(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘 要:对黄河三角洲野生大豆与栽培大豆贮藏蛋白进行比较分析,用不同溶剂系统高速离心提取野生大豆和栽培大豆鲁豆1号、鲁豆10、河豆12和中黄20种子中的贮藏蛋白,采用紫外分光光度法比较贮藏蛋白质含量,聚丙烯酰胺电泳法分析贮藏蛋白谱带差异。结果发现:野生大豆种子贮存蛋白总含量稍低于栽培大豆种子;栽培大豆种子中醇溶蛋白和水溶蛋白明显高于野生大豆;野生大豆种子中盐溶蛋白的含量高于其它4种栽培大豆。PAGE谱带表明,不论是水溶蛋白还是盐溶蛋白,在高分分子量处,野生大豆有两条蛋白谱带不同于栽培大豆,说明在贮藏蛋白水平野生大豆与山东普通栽培大豆之间存在一定的差异。

关键词:野生大豆;栽培大豆;贮藏蛋白;蛋白含量;PAGE

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)02-0321-04

PAGE Analysis of Storage Protein Content in *Glycine soja* and *Glycine max*

HAN Lin-na, GUO Qing-mei, ZHOU Feng-qin

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China)

Abstract: To compare the difference of the storage protein in the wild soybean (*Glycine soja*) and the cultivated soybean (*Glycine max* L.) of the yellow river delta, one accession of wild soybean and four soybean cultivars were adopted, and the storage protein were determined with different solution system and electrophoresis analysis. Results showed that the difference of total storage protein content was not distinct among cultivars, alcohol-soluble protein and the water-soluble protein was distinctly higher than that in wild soybean, while salt-soluble protein content were lower in cultivated soybean. Based on the PAGE, there were two special protein bands at the high molecular weight location in the wild soybean, which indicate the difference on the storage protein between wild soybean and cultivated soybean.

Key words: Wild soybean; Cultivated soybean; Protein content; PAGE

大豆(*Glycine max*(Linn.) Merr.)是我国重要粮食作物之一,已有五千年栽培历史,通常被认为是由野生大豆(*Glycine soja* Sieb. et Zucc.)驯化而来^[1]。野生大豆是国家二级野生保护植物,除新疆、青海和海南外,遍布全国^[1],是唯一主要分布在我国的重要作物的野生资源^[2]。野生大豆具有耐盐碱、抗寒、抗病等许多优良性状,潜在应用价值丰富^[3-4]。

野生大豆种子富含蛋白质^[5]。国内外研究者对不同区域内的栽培大豆贮藏蛋白质进行了深入系统的研究,但对野生大豆研究较少,而黄河三角洲野生大豆与栽培大豆贮藏蛋白的比较分析尚未见报道。野生大豆在黄河三角洲有大面积分布,垦利县大汶流最多,常形成单一的野生大豆群落^[6],仅自

然保护区内就有野生大豆7 000余hm²。为了充分了解该地区野生大豆资源的蛋白质品质特性,进一步开发利用野生大豆中蕴含的丰富蛋白质,对东营市河口区的野生大豆和山东4个栽培大豆品种贮藏蛋白含量和蛋白谱带进行了初步分析,为野生大豆蛋白资源的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

野生大豆呈扁圆球形,黑褐色,长2.5~3 mm。采自黄河三角洲东营市河口区滨海湿地。鲁豆1号、鲁豆10、河豆12和中黄20均呈卵圆形至近球形,黄色,长6~10 mm。均购自山东省农业科学院。

收稿日期:2008-12-25

基金项目:国家海洋局黄河三角洲湿地专项。

作者简介:韩琳娜(1978-),女,讲师,主要承担生物化学、细胞生物学和分子生物学的教学科研工作。

通讯作者:周凤琴,教授,博士生导师。E-mail:zfqsdzy@yahoo.com.cn。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质提取 将5个样品粉碎后分别称取0.7 g,置于10 mL离心管中,4次重复。分别取蛋白提取液(纯净水、2.5% NaCl、50% 异丙醇和0.2% NaOH)7 mL加入各离心管。60℃水浴40 min。取出冷却后,于4℃下,12 000 r·min⁻¹,离心15 min,吸取上清至1.5 mL离心管,-20℃保存。加入样品处理液(20%甘油,0.1%溴酚蓝,20%浓缩胶缓冲液)等体积混合后用于电泳分析^[7]。

1.2.2 蛋白质含量测定 分别取50% 异丙醇、2.5% NaCl、蒸馏水作对照;取各提取蛋白样品,分别稀释后依次于260 nm和280 nm波长下测定吸光度值^[8]。平行测定3次,计算蛋白质含量。

1.2.3 电泳方法 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对贮藏蛋白进行电泳分析。DYI-8B型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂),采用垂直板凝胶电泳。凝胶为30% 丙烯酰胺、1% 甲叉双丙烯酰胺,分离胶7%,浓缩胶3%,以TEMED和过硫酸铵为催化系统,以Tris-甘氨酸为电极缓冲液。取10 μL等体积充分混匀的上样品缓冲液和提取样品的混合液,注入点样孔。10 mA稳流使样品进入凝胶,10 min后,调至20 mA,待指示剂到达分离胶与浓缩胶界面时,调电流至40 mA,继续电泳至指示剂到达距前沿1 cm处,关闭电泳仪。

1.2.4 染色 胶板剥离后,放入固定液中固定40 min。更换考马斯亮蓝染色液(0.08% 考马斯亮蓝,10% 三氯乙酸),染色2 h。

1.2.5 脱色 种子贮藏蛋白电泳胶放至25% 甲醇,10% 乙酸溶液中脱色直到看到电泳条带,拍照。

2 结果与分析

2.1 蛋白质含量测定

根据1.2.2方法测定野生大豆与栽培大豆各溶剂系统提取蛋白的紫外吸光度,根据公式:蛋白质(mg·mL⁻¹) = (1.45 × 280 nm - 0.74 × A₂₆₀ nm) × 稀释倍数,计算不同溶剂系统提取的蛋白质含量。见图1。

从图1可以看出:野生大豆种子贮存蛋白总含量稍低于栽培大豆种子;栽培大豆种子中醇溶蛋白和水溶蛋白明显高于野生大豆;野生大豆种子中盐溶蛋白的含量高于其它4种栽培大豆。

2.2 PAGE 分析

野生大豆与栽培大豆不同溶剂系统提取蛋白的电泳谱带见图2、3。

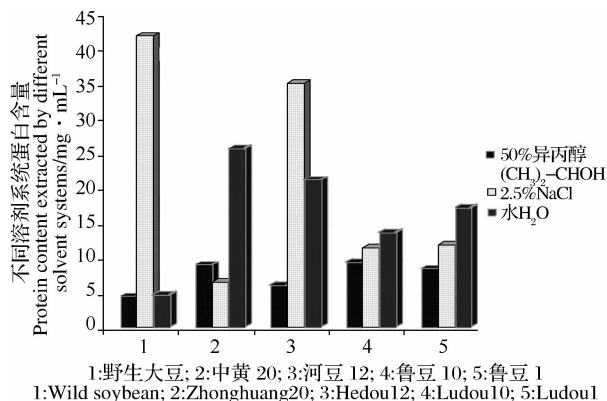


图1 5个样品不同溶剂系统贮藏蛋白质含量比较

Fig.1 Storage protein content extracted by different solvent systems of different soybean cultivars

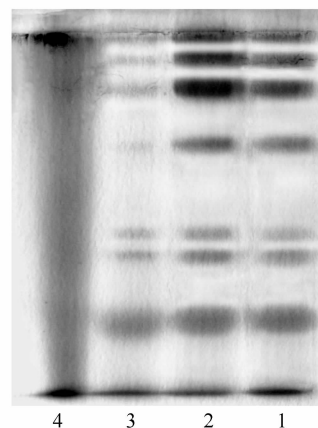


图2 野生大豆不同溶剂系统蛋白电泳谱带

Fig.2 PAGE pattern of wild (*G. soja*) soybeans storage protein extracted by different solvent systems

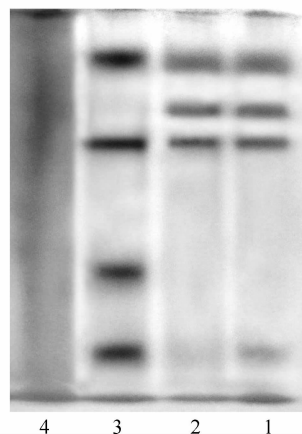


图3 鲁豆1号不同溶剂系统蛋白电泳谱带

Fig.3 PAGE pattern of cultivated (*G. max*) soybeans (Ludou1) storage protein extracted by different solvent systems

从图中可以看出,在相同上样量的条件下,野生大豆盐溶蛋白条带颜色最深,其次为水溶蛋白,再次为醇溶蛋白。从某种程度上说明其盐溶蛋白含量最高,水溶蛋白含量次之,醇溶蛋白含量较低,与蛋白含量测定的结果吻合。栽培大豆鲁豆 1 号的电泳条带结果显示,其醇溶蛋白条带颜色最深,其次为水溶和盐

溶。结合蛋白含量分析,其醇溶蛋白含量最高,其次为水溶蛋白和盐溶蛋白。野生大豆和栽培大豆均显示二者的碱溶蛋白含量甚微,均呈现弥散状。说明在其种子中,碱溶蛋白是痕量的。

5 个样品不同溶剂系统提取蛋白的 PAGE 谱带见图 4。

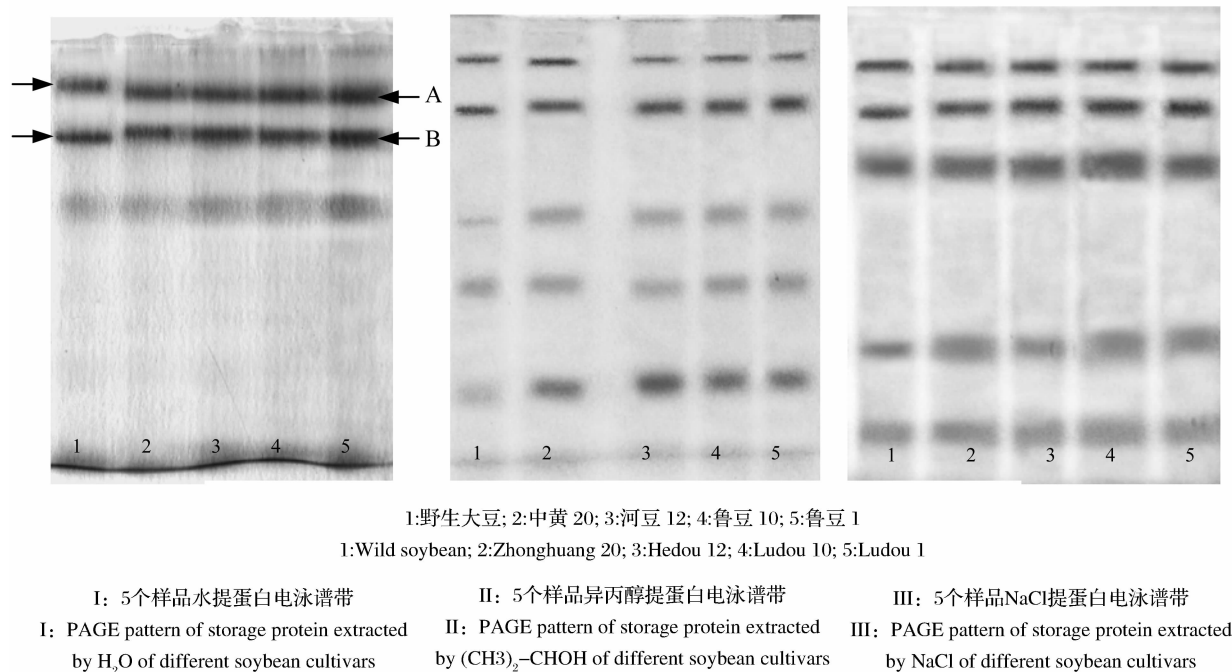


图 4 5 个样品不同溶剂系统提取蛋白电泳谱带

Fig. 4 PAGE pattern of storage protein extracted by different solvent systems of different soybean cultivars

PAGE 谱带表明,不论是水溶蛋白还是盐溶蛋白,在分子量处,野生大豆有两条蛋白谱带不同于栽培大豆,其中一条分子量大于 A 带,另一条分子量小于 B 带。说明在贮藏蛋白水平野生大豆与山东普通栽培大豆之间存在一定的差异。

3 小结与讨论

野生大豆种子贮藏蛋白中的盐溶性蛋白最高,而栽培大豆种子贮藏蛋白中的醇溶蛋白含量较高。电泳分析表明,野生大豆种子和栽培大豆种子蛋白在分子量处各有一条特异的蛋白质谱带。说明二者在贮藏蛋白水平上存在差异,为野生大豆与栽培大豆在生化水平的微观鉴定提供了一定的理论基础。

从蛋白含量来看,野生大豆种子贮藏蛋白含量稍低于普通大豆种子的贮存蛋白,这一点与很多文献述及的野生大豆蛋白含量高有差异^[9-12],而盐溶蛋白含量野生大豆明显高于其他四种栽培大豆,可

能与野生大豆样品取材于黄河三角洲的盐生环境有一定关系。

从电泳结果可以看出野生大豆与大豆有 4 条蛋白谱带是完全一致,说明其在蛋白组成上有较大的相似性。野生大豆作为大豆唯一的野生近缘种,可以作为大豆杂交育种的原始材料。其高蛋白、耐盐碱、耐湿寒、抗病、耐旱等优良性状的基因资源,将会在优良大豆品种的选育中发挥重要作用。野生大豆又因其蔓生性强,覆盖度大,产草量高,适口性好,营养价值高而被视为优质饲料^[6]。野生大豆在黄河三角洲分布广泛,对野生大豆贮藏蛋白质的分析研究将有助于开发利用沿海滩涂资源,推进我国野生大豆产业化发展,提高经济效益。

参考文献

- [1] 林榕,俞德浚,吴征镒,等. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2005. (Lin R, Yu D J, Wu Z Y, et al. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 2005.)

- [2] 胡志昂,张亚平. 中国动植物的遗传多样性[M]. 杭州:浙江科学技术出版社出版,1997. (Hu Z A, Zhang Y P. Genetic diversity of animals and plants in China[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997.)
- [3] Doyle J J, Doyle J L. Ribosomal gene variation in soybean (*Glycine*) and its relatives[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1985, 70 (4): 369-374.
- [4] 於丙军,罗庆云,曹爱忠,等. 栽培大豆和野生大豆耐盐性及离子效应的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 101: 25-29. (Yu B J, Luo Q Y, Cao A Z, et al. Comparison of salt tolerance and ion effect in cultivated and wild soybean[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2001, 101: 25-29.)
- [5] 黄仁术. 野大豆的资源价值及其栽培技术[J]. 资源开发与市场, 2008, 24(9): 771-772. (Huang R S. Resources value and cultivation techniques of *Glycine soja* [J]. Resource Development & Market, 2008, 24(9): 771-772.)
- [6] 吴立新. 野大豆栽培技术与利用[J]. 四川草原, 2004, 106(9): 59-60. (Wu L X. Cultivation techniques and utilization of *Glycine soja* [J]. Sichuan Grassland, 2004, 106(9): 59-60.)
- [7] 张春庆,尹燕桦,高荣岐,等. 棉花种子蛋白多态性与品种鉴定方法的研究[J]. 中国农业科学, 1998, 31(4): 16-19. (Zhang C Q, Yin Y P, Gao R Q. Polymorphism of seed protein and identification of cotton cultivar [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1998, 31(4): 16-19.)
- [8] 文树基. 基础生物化学实验指导[M]. 西安:陕西科学技术出版社, 1994, 57-62. (Wen S J. Basic biochemical experiments [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1994, 57-62.)
- [9] 徐豹,郑惠玉,吕景良,等. 中国大豆的蛋白资源[J]. 大豆科学, 1984, 4: 237-331. (Xu B, Zheng H Y, Lu J L, et al. Protein resources of soybean in China [J]. Soybean Science, 1984, 4: 237-331.)
- [10] 陈振家,郝利平. 山西不同品种大豆贮藏蛋白提取及亚基分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2007, 27(1): 80-83. (Chen Z J, Hao L P. The extraction and subunit analysis of storage protein of different soybean cultivars in Shanxi province [J]. Journal of Shanxi Agricultural University, (Natural Science Edition), 2007, 27(1): 80-83.)
- [11] 刘润堂,贾炜珑,温琪汾,等. 栽培大豆、野大豆和半野生大豆酯酶同工酶的研究[J]. 山西农业大学学报, 1995, 15(3): 235-237. (Liu R T, Jia W L, Wen Q F, et al. A study on esterase isozymes of *G. max*, *G. soja* and *G. gracilis* [J]. Journal of Shanxi Agricultural University, 1995, 15(3): 235-237.)
- [12] 李春梅,杨守萍,盖钧镒,等. 野生大豆与栽培大豆种子差异蛋白质组学研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(12): 1296-1302. (Li C M, Yang S P, Gai J Y, et al. Comparative proteomic analysis of wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds progress [J]. Biochemistry and Biophysics, 2007, 34(12): 1296-1302.)

(上接第 320 页)

参考文献

- [1] 谷利伟,谷文英. 大豆胚芽组成成分的分析[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 137-140. (Gu L W, Gu W Y. Analysis of composition in soy germ. [J]. China Oils and Fats, 2000, 25(6): 137-140.)
- [2] Yoshida H, Takagi S, Lenaga H, et al. Regional distribution of Tocopherols and fatty acids within soybean seeds[J]. Journal of American Oil Chemistry Society, 1998, 75(7): 767-774.
- [3] 谢卫国. 米糠油全价开发利用[J]. 精细与专用化学品, 1996, 14. (Xie W G. The full price of the development and utilization of rice bran oil [J]. Fine and Specialty Chemicals, 1996, 14.)
- [4] 孙智敏,李发堂,殷蓉,等. 黄酮类化合物提取工艺研究进展[J]. 河北化工, 2005, (4): 7~8.
- [5] 程康华,高拥军. 超临界 CO₂ 萃取沙棘油的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(4): 91-93. (Cheng K H, Gao Y J. Study on supercritical CO₂ extraction of oil from *hippophae rhamnoides linn* seeds [J]. Chemistry & Industry of Forest Products, 2004, 24(4): 91-93.)
- [6] 詹玉石,段惠茹. 超临界流体萃取技术在中药材提取中的应用[J]. 北京中医, 2004, 23(3): 184-185. (Yan Y S, Duan H R. Supercritical fluid extraction technology in the Chinese herbal extract application [J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2004, 23(3): 184-185.)
- [7] 赵元藩. 沙棘油的精制及其在化妆品中的应用[J]. 云南师范大学学报, 2003, 20(2): 48-49. (Zhao Y P. The refined processes and applications of *hippophae* oil [J]. Journal of Yunnan Normal University, 2003, 20(2): 48-49.)
- [8] 秦玉楠. 茶籽油的精制与食用[J]. 中国油脂, 1995, 20(2): 42-44. (Qin Y N. Tea seed oil of refining and consumption [J]. China Oils and Fats, 1995, 20(2): 42-44.)