

半野生大豆7S贮藏蛋白的提取及某些特性的研究*

陈建南 刘纪华 李海民

(中国科学院遗传研究所)

摘 要

我们采用 Thanh 的方法获得了中国半野生大豆 (*Glycine gracilis*) 和栽培大豆 (*Glycine max.*) “早熟二号” 7S 贮藏蛋白 (Conglycinin)。测定了它的三个主要亚基分子量, 它们是: α' : 81000, α : 77000, β : 57000 道尔顿。比较了半野生种和栽培种 7S 蛋白的氨基酸组成, 发现半野生种的蛋氨酸含量比栽培种高出两倍多。同时, 研究了 7S 蛋白在种子中积累的过程, 半野生种 7S 蛋白从种子单粒重 (鲜重) 为 23.3mg 时开始出现, 以后逐渐增加, 至 86.9mg 时趋于稳定。栽培种从种子单粒重 (鲜重) 为 32.2mg 时开始出现, 以后逐渐增加, 至 170.9mg 时趋于稳定。

前 言

大豆贮藏蛋白是食用植物蛋白的重要来源, 它的营养成份相当丰富。大豆种子中贮藏蛋白含量很高, 栽培种一般为 38—50%, 而中国半野生豆及野生豆比栽培豆含量高, 可高达 50—55%。贮藏蛋白在植株开花受精后开始在种子中积累, 它在内质网上合成, 经高尔基体进入液泡, 它以不溶性蛋白体的形式存在, 其外围被一层光滑的膜包圍着^[3,5]。贮藏蛋白很稳定, 只有在种子萌发时才被分解, 供给种子萌发所需的氨基酸。

大豆贮藏蛋白主要成份为 7S (Conglycinin) 和 11S (glycinin), 它们占贮藏蛋白 70% 左右^[16]。Thanh 等发现 7S 贮藏蛋白至少有六种亚基组成, 其主要亚基为 α' , α 和 β 三种, 并分析了这三种亚基的氨基酸组成^[7,14,2]。7S 贮藏蛋白在不同的离子强度的缓冲溶液中存在形式不同。在离子强度为 0.5μ 时, 它以 7S 形式存在, 在离子强度为 0.1μ 时, 它就以 9S 的形式存在了^[15]。所以 7S 蛋白是比较难以提纯的。许多研究者对栽培种的 7S 蛋白的氨基酸组成的研究表明: 氨基酸组成很不平衡, 某些人们必需的氨基酸如蛋氨酸含量极低, 因而降低了 7S 蛋白的营养价值^[8]。人们正在试图通过遗传工程的手段来提高 7S 蛋白中人类必需氨基酸的含量。Meinke 分析了 7S 和 11S 以贮藏蛋白在种子中积累的过程^[9]。Beachy 发现大豆贮藏蛋白的合成是在转录水平上控制的^[1]。Goldberg 和 Sun 等研究了大豆贮藏蛋白基因的结构^[6,10,11]。

本文于 1984 年 9 月 24 日收到

* 本研究是中国科学院科学基金资助的课题。

材 料 和 方 法

供试材料*: 栽培种大豆为“早熟二号”。半野生豆为“中国半野生²⁸”，它的种皮黑色，有泥膜，百粒干重为8.14g，植株有蔓性。裂荚。

1. 7s 蛋白的提取

我们采用了 Thanh 等电点沉淀和凝胶过滤法^[12]提纯了 7s 蛋白，过程如下：
成熟的种子去皮，用 Tris—Hce buffer I 浸泡 (5℃) 过夜。

↓
匀浆，四层纱布过滤。

↓
乙醚去脂

↓
溶液用 2NHCl 调 pH 到 6.6，并在 Tris—HCl buffer I 透析 3 小时 (2—3℃)

↓
离心 10000 转/分 20 分钟 (5℃)

↓
取上清，用 2NHCl 调 pH 至 4.8

↓
离心 10000 转/分 30 分钟 (5℃)

↓
弃上清，取出沉淀，冰冻干燥

↓
样品溶于磷酸缓冲液 I，上 Sepharose—6B 柱 (柱体积 4×140CM，流速 50ml/小时) 并用磷酸缓冲液 I 洗脱。

↓
用紫外监测仪监测 (280nm)，收集第二个峰

↓
收集液经浓缩，再上 sepharose—6B 柱

↓
回收其主峰，为纯的 7s 蛋白，脱盐，冰冻干燥。

注：Tris—HCl buffer I：63 mM Tris，10mM β—巯基乙醇，pH 7.8

Tris—HCl buffer II：63mM Tris，10mM β—巯基乙醇，pH 6.6

磷酸缓冲液 I：35mM K₂HPO₄，5mM KH₂PO₄，0.4M NaCl，10mM β—巯基乙醇，pH 7.8，
(离子强度为 0.5μ)。

2. 7s 蛋白纯度的测定

以提纯的 7s 蛋白免疫兔子，60 天后取出抗血清。用免疫双扩散电泳测定纯度。在 1.5% 琼脂制成的琼脂板上挖些小孔，中间小孔放上 7s 蛋白抗血清，周围小孔放上全蛋白，室温放置 48 小时后观察结果。

3. 7s 蛋白沉降系数的测定

7s 蛋白 5mg，溶解于 1ml 磷酸缓冲液工中 (离子强度为 0.5μ)，用分析离心机离心测定。

* 本文所用大豆材料系我所林建兴先生提供，特此致谢。

4. 7s 蛋白亚基分子量的测定

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定各亚基分子量。凝胶浓度为 12%。

5. 7s 蛋白氨基酸成份的测定

提纯的 7s 蛋白 1mg, 用 12N HCl 水解 22 小时 (110°C), 抽去 HCl, 用氨基酸自动分析仪测定各种氨基酸的含量。

6. 种子中 7s 蛋白合成过程的测定

收集开花后不同重量的种子, 提取出全蛋白, 用 7s 蛋白抗血清, 通过双向扩散电泳测定 7s 蛋白在种子中出现的时间。

结 果 与 分 析

1. 7s 蛋白的提取

用等电点沉降法提取的 7s 蛋白, 经过 Sepharose—6B 柱分离后可以分出六个峰,

说明粗提的 7s 蛋白还不够纯。

从峰的面积看, 7s 蛋白的量占的比例较大。经过第二次层析, 7s 蛋白与两边的峰都可以分得开 (图一、A、B)。

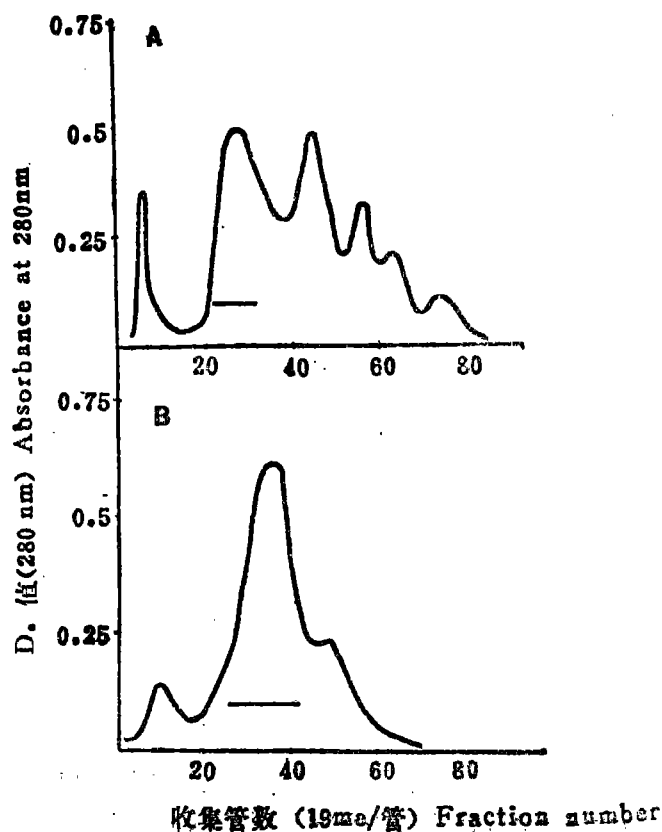


图 1: 用 Sepharose—6B 凝胶层析分离纯化 7s 贮藏蛋白。A: 从粗提的 7s 蛋白中第一次过柱纯化。B: 第二次过柱纯化。柱长 4×140cm, 流速 50ml/hr., 缓冲液: 磷酸缓冲液, pH 7.8 ($\mu=0.5$)

FIG. 1. Purification of the 7s fraction by Sepharose—6B gel chromatography. A: Gel chromatography of 500mg of the crude 7s fraction. B: Rechromatography. Column size: 4×140cm. Buffer: phosphate buffer pH 7.8 ($\mu=0.5$). Flow rate: 30 ml/hr.

2. 7s 蛋白纯度的测定

经免疫双扩散电泳测定, 7s 蛋白抗血清(7s 蛋白抗体)与全蛋白只形成一条沉淀线〔图四、五〕。沉降系数测定为 6.72, 只出现一个峰〔图二〕。说明提取的蛋白是比较纯的。

3. 7s 蛋白各亚基分子量的测定

经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 7s 蛋白分出至少六个亚基, 主要三个亚基是 α' , α 和 β , 它的分子量分别为 81000, 77000 和 57000 道尔顿〔图三〕。这结果与 Thanh 和 Beachy 所报导的结果一致〔2, 13〕。

4. 半野生种和栽培种大豆 7s 蛋白氨基酸组成的比较

表 1 结果表明: 它们的氨基酸组成有些差别, 栽培种的丝氨酸、脯氨酸、丙氨酸、精氨酸含量高于半野生种。而半野生种的半胱氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸的含量高于栽培豆。从表中可以看出, 栽培种的含硫氨基酸(半胱氨酸和蛋氨酸)含量极低, 这两种极限氨基酸在半野生种中却比较高。

5. 7s 蛋白在种子中的积累过程

免疫双向扩散电泳结果(图四、五)说明, 半野生种 7s 蛋白从种子单粒重(鲜重)为 23.3mg 开始出现, 以后逐渐增加, 直到单粒重为 66.9mg 时趋于稳定。栽培种“早熟二号”7s 蛋白从种子单粒重(鲜重)为 32.2mg 时开始出现, 以后逐渐增加, 直至单粒重为 170.9mg 时趋于稳定。该豆百粒干重为 19.8g。

讨 论

我们所提取的 7s 蛋白, 沉降系数测定为 6.72, 接近于 7, 一般说的 7s 蛋白也是指接近 7s 的蛋白〔4〕。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 各亚基图谱与 Beachy〔19〕报导的结果一致。用免疫双扩散电泳测定只出现一条沉淀线。沉降系数测定只出现一个峰。所有这些结果表明, 我们获得的蛋白就是 7s 贮藏蛋白。样品的纯度也高。

在我们的工作中发现用柱层析分离 7s 蛋白时, 柱子的长度是个很重要因素, 柱长 140cm 以上时分离效果良好。同时, 样品及柱平衡液的离子强度, 不管第一次层析或是第二次层析, 都要保持为 0.5M。此外, 层析后获得的样品, 要去盐后冰冻干燥, 才能长期保存。

贮藏蛋白的营养价值决定于它所含的必需氨基酸的量。Larkins〔8〕指出, 大豆种子蛋白中含硫氨基酸量很低, 尤其在 7s 贮藏蛋白中含量更低, 称为极限氨基酸。要提高大豆的营养价值, 提高 7s 蛋白含硫氨基酸尤其是蛋氨酸的量是一个很重要方面。从栽培种与半野生种 7s 蛋白中的氨基酸比较可以看出, 半野生种的蛋氨酸含量比栽培种高出两

倍多。因此, 研究半野生豆 7s 贮藏蛋白进而研究它的基因转移不仅具有理论意义, 而且具有经济意义。

在我们的工作中发现半野生豆与栽培豆 7s 蛋白亚基分子量是一致的。它们的氨基酸含量总的来说差别不大。同时还发现半野生豆与栽培豆、东北野生豆、多年生野生豆、顺义野生豆之间有共同抗原决定簇。联想到 Schuler⁽¹⁰⁾发现大豆 7s 贮藏蛋白亚基 [a' 和 a] 基因的编码序列存在保守区。所有这些情况表明大豆贮藏蛋白在进化过程中是比较稳定的, 也是比较保守的。

表 1 半野生大豆和栽培大豆 7s 贮藏蛋白氨基酸含量比较表 (mg/16mgN)

Table 1. Comparison of amino acids of 7s storage protein
between semi-wild species and cultivated one

氨基酸名称 Amino acids	半野生种 Semi-wild species	栽培种 Cultivated species
天冬氨酸 Asp	11.61	11.14
苏氨酸 Thr	2.30	2.70
丝氨酸 Ser	4.84	5.90
谷氨酸 Glu	16.86	16.55
甘氨酸 Gly	3.11	3.54
丙氨酸 Ala	2.92	3.73
半胱氨酸 Cys	0.56	0.18
缬氨酸 Val	6.76	4.90
蛋氨酸 Met	2.52	0.88
异亮氨酸 Ile	6.95	6.01
亮氨酸 Leu	8.91	8.51
酪氨酸 Tyr	1.77	2.02
苯丙氨酸 Phe	8.11	7.26
赖氨酸 Lys	6.32	6.40
组氨酸 His	2.37	2.46
精氨酸 Arg	8.18	8.89
脯氨酸 Pro	4.20	6.86
氨基 Amino-	3.40	2.36

参 考 文 献

- [1A] Beachy, R. N.; 1978, Plant physiol. Vol. 61. P139—144.
- [1B] Beachy, R. N.; 1979, The Plant seed Edi. by Rubenstein I. et al. P67—81.
- [2] Beachy, R. N.; 1981, J. mol. Appl. Genet. Vol. 1 P19—27.
- [3] Briarty, L. G.; Goult, D. A.; 1969, J. EXP. Bot. Vol. 20. P258—372.
- [4] Derbyshire, E.; 1976, Phytochemistry Vol. 15. P3—24.
- [5] Gayler, K. R. and sykes, G. E.; 1981 Plant Physiol. Vol. 67 P958—961.
- [6] Goldberg, R. B.; 1982, Coll Vol. 29 P651—360.
- [7] Hasegawa, K.; 1963, Agric. Biol. chem. Vol. 27 P878.
- [8] Larkins, B. A.; 1983, Genetic Engineering of seed storage proteins in "Genetic Engineering of plants" Ed. by T. Kosuge et al. P93—119.
- [9] Mainke, D. W.; 1981, planta. Vol. 153 P130—139.
- [10] Schuler, M. A.; 1982, Nucleic Acid. Res. Vol. 10(24) P8245—3261.
- [11] Sun, S. M.; 1981, Nature Vol. 289, P37—41.
- [12] Thanh, V. H.; 1976, Plant. physiol. Vol. 56, P19—22.
- [13] Thanh, V. H.; 1976, Biochim. Biophys. Acta. Vol. 439, P326—338.
- [14] Thanh, V. H.; 1977, Biochem. Biophys. Acta, Vol. 490, P376—384.
- [15] Thanh, V. H.; 1978, J. Agric. Food. chem. Vol. 26, P692—686.
- [16] Wright, D. J.; and Boulter, D.; 1976, Phytochemistry Vol. 15. P3—24.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF 7S STORAGE PROTEIN IN SEMI-WILD SPECIES OF SOYBEAN

Chen Jian-nan Liu Ji-hua Li Hai-min

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing, China)

Conglycinin (7S storage protein) was isolated from cultivated as well as semi-wild species of soybean (*Glycine gracilis*) and its sedimentation coefficient was determined as 6.72. The 7S storage protein may be separated into at least 6 subunits of which the main subunits were α' , α and β whose molecular weights were 81000, 77000 and 57000 daltons respectively as determined by SDS electrophoresis. Composition of amino acids of 7S storage protein was compared between two species. The remarkable difference was that semi-wild species contained three times more methionine than the cultivated one. This difference between the two species was found at the beginning of accumulation of 7S storage protein immediately after flowering. The antibody prepared from 7S protein in cultivated soybean precipitated with 7S protein in semi-wild soybean suggesting that genes coding for 7S protein may be conserved during evolution.

陈健南等： 半野生大豆 7s 贮藏蛋白的提取及某些特性的研究

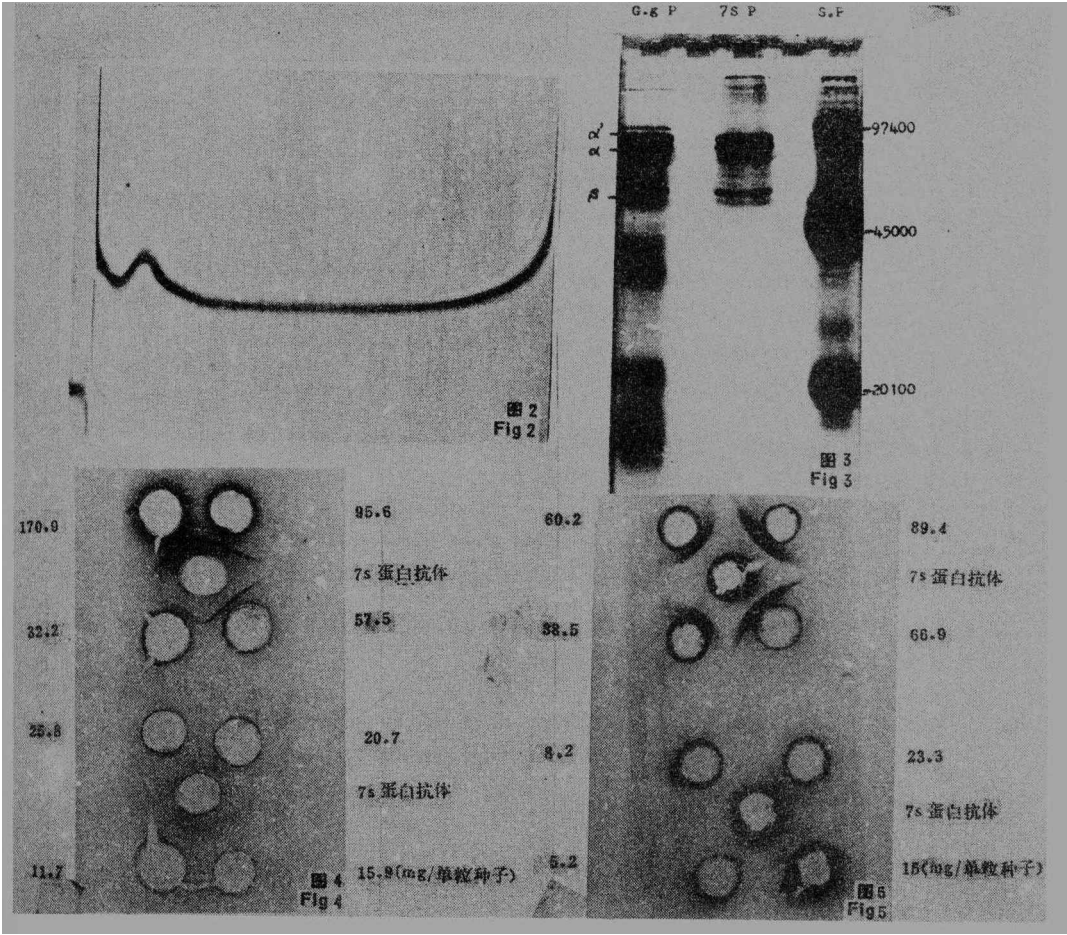


图 2. Sepharose—6B 柱层析收集的第二个峰蛋白沉降系数的测定, 结果为 $6.72 \approx 7$ 。蛋白质浓度 0.5%, 磷酸缓冲液 ($n=0.5$)。

Fig.2. Ul tracentrifugal pattern of purified 7S storage protein. The protein concentration was 0.5% in phosphate buffer ($n=0.5$)

图 3. 7S 贮藏蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

G. gp: 半野生大豆全蛋白 7SP: 纯化的半野生大豆 7S 蛋白, S.P—标准蛋白, 测定结果表明, 7S 蛋白的三个主要亚基分子量分别为: α' , 81000 道尔顿 α , 77000 道尔顿 β : 57000 道尔顿。

Fig.3. SDS gel electrophoretic pattern of semi-wild 7S storage protein. G. gp: supernatant of matured seed protein. 7SP: purified 7S protein. SP: standard protein. The molecular weights of three subunits α' , α and β of 7S storage protein were 81000, 77000 and 57000 daltons respectively.

图 4. , 用免疫扩散电泳测定栽培豆“早熟二号”7S 蛋白在种子中积累的进程。7S 蛋白从单粒种子重 32.2mg 时开始出现, 以后逐渐增加至 170.9mg 时稳定。

Fig.4. Developmental changes in the accumulation of 7S storage protein in cultivated species was determined by immunodiffusion. 7S protein appeared in seed weighted 32.2mg.

图 5. 用免疫扩散电泳测定半野生豆 7S 蛋白在种子中积累的进程 7S 蛋白从单粒种子重 23.3mg 时开始出现, 以后逐渐增加, 至 66.9mg 时趋于稳定。

Fig.5. Developmental changes in the accumulation of 7S storage protein in semi-wild species was determined by immunodiffusion. 7S protein appeared in seed weighted 23.3mg.