

荞麦籽粒蛋白质组分特性研究

高冬丽, 高金锋, 党根友, 冯佰利, 柴 岩

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法研究了荞麦的2个栽培种苦荞与甜荞的总蛋白、清蛋白、球蛋白及谷蛋白特性。试验结果表明,甜荞籽粒总蛋白及蛋白质各组分的谱带具有丰富的多态性,而苦荞籽粒总蛋白及蛋白质各组分谱带的多态性有限;荞麦清蛋白主要由低分子量的亚基构成;甜荞球蛋白组分包含由中等到低分子量范围的5~12种亚基,苦荞球蛋白主要由8种亚基组成;甜荞谷蛋白主要由分子量在43~66.2 kDa之间的3~5种亚基组成,苦荞谷蛋白主要由分子量在31~43 kDa间的2种亚基组成。

关键词:荞麦;蛋白质组分;SDS-PAGE

中图分类号:S517.03 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)02-0068-04

Characterization of Protein Components of Buckwheat Seeds

GAO Dong-li, GAO Jin-feng, DANG Gen-you, FENG Bai-li, CHAI Yan

(College of Agronomy, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) proteins are nutritionally important because of their high and balanced content of essential amino acids making their biological value much higher than that of cereal proteins. In this paper, the subunits composition of albumin, globulin, and glutelin of common and tartary buckwheat, two cultured species, were determined using SDS-PAGE method, whose application has been found in many kinds of major crops. The results showed that high polymorphism was revealed among different common buckwheat cultivars while that among tartary buckwheat was limited. The albumin of buckwheat was composed of subunits with low molecular weight. Common buckwheat globulin was composed of 5-12 subunits from low to middle molecular weight whereas only 8 subunits constituted tartary buckwheat globulin. Common buckwheat glutelin was composed of 3-5 subunits with molecular weight ranging within 43-66.2 kDa. Tartary buckwheat glutelin was composed of 2 subunits whose molecular weight ranged within 31-43 kDa.

Key words: Buckwheat; Protein composition; SDS-PAGE

荞麦属于蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*),主要栽培种有甜荞和苦荞,在我国粮食作物中属小宗作物,由于其产量低,口感差及产品的单一性而未受到重视^[1,2]。近年来,其独特的营养成分及保健功能逐渐被人们所认识并关注,其籽粒蛋白质已成为重要的保健食品资源。

研究表明,荞麦籽粒蛋白质主要由高水平的清蛋白(37%)和球蛋白(14%),低水平的醇溶蛋白(2.0%)和谷蛋白(25%)组成^[3],具有类似膳食纤维作用、抗衰老作用,并且由于其富含精氨酸可降低血液胆固醇^[4]。Bejosano F P等^[5]研究发现,谷蛋白和

球蛋白由几种不同分子量范围的亚基构成,而清蛋白大部分由低分子量的亚基构成。Siu-Mei Choi等^[6]认为荞麦蛋白缺乏高分子量蛋白组分,富含中、低分子量蛋白质,迥异于小麦等其他谷物蛋白,更类似于豆类蛋白。但目前的研究主要集中于荞麦总蛋白的结构及其多态性,对荞麦籽粒蛋白各组分特性及甜荞与苦荞蛋白组分差异的研究较少。本试验运用SDS-PAGE研究了甜荞与苦荞总蛋白、清蛋白、球蛋白、谷蛋白结构的差异,以期荞麦的加工利用、品种鉴定及进化提供理论依据。

收稿日期:2007-12-30

基金项目:科技部科技支撑计划(2006BAD02B06);教育部西部地区特色植物种质资源数据平台建设项目;陕西省科技攻关项目(2006K01-G17-01);西北农林科技大学育种专项资助

作者简介:高冬丽(1983-),女,山西繁峙人,硕士,主要从事作物高效栽培生理生态研究。

通讯作者:柴岩(1951-),男,教授,主要从事小宗粮豆品种资源、遗传育种、栽培技术及产业化开发研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于 2006 年在陕西榆林市西北农林科技大学小杂粮试验基地进行。参试苦荞品种 25 份, 分别为兴苦 2 号、定 99 - 3、西农 9940、九江苦荞、晋苦 2 号、昭苦 2 号、迪庆苦荞、六苦 4 号、凉苦 - 3、凉苦 - 4、西苦 7 - 3、西苦 6 - 14、威苦 02 - 286、广苦 2 号、平 01 - 043, 另外有来自贵州、云南、西藏和陕西等省区地方栽培品种 10 份。参试甜荞品种 19 份, 分别为榆 9002、定荞 1 号、兴甜 1 号、黑小荞、榆荞 - 4、平 01 - 043、威甜 02 - 198, 此外有来自贵州、云南、西藏、甘肃、陕西的品种资源 12 份。

试验地地力中等, 肥力均匀, 每小区面积 10 m² (2 m × 5 m), 于 7 月 2 日播种, 条播, 行距 0.5 m, 成熟期适时收获种子。

1.2 测试方法

1.2.1 总蛋白的提取 取一粒种子, 去壳后于离心管中砸碎。加入 0.2 mL 样品缓冲液 (Tris - HCl, 甘油, SDS, 巯基乙醇), 混匀, 静置 30 min, 沸水浴 3 ~ 4 min, 10 000 r/min 离心 10 min。上清液用于点样。

1.2.2 蛋白组分提取 取一粒种子, 去壳后于离心管中砸碎。加 1 mL 蒸馏水, 于常温下振荡提取 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为清蛋白, 重复 2 次以除尽清蛋白。然后于沉淀中依次加入 0.5 mL 2.5 % NaCl, 0.5 mL 0.2 % NaOH, 分别提取球蛋白和谷蛋白。取蛋白质提取液 0.1 mL, 样品缓冲液 0.1 mL 混匀后在沸水中加热 3 ~ 4 min, 冷却后点样。

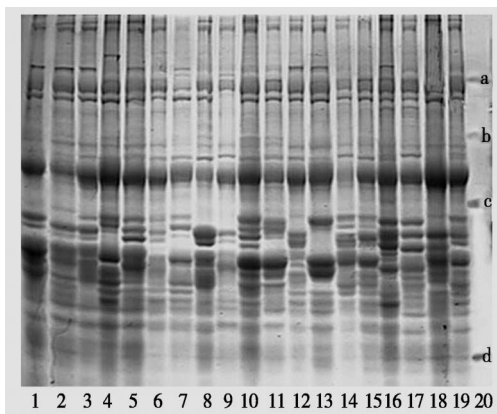
1.2.3 SDS - PAGE 的电泳分析 参照 Lemion 的方法^[7] 进行电泳。总蛋白、清蛋白、球蛋白采用 12.5 % 分离胶和 5 % 浓缩胶, 谷蛋白采用 15 % 分离胶和 5 % 浓缩胶, 在 15 mA 恒压电泳 9 ~ 11 h, 用考马斯亮蓝染色 3 h, 脱色液中脱色 6 ~ 7 h, 拍照保留。标准分子量购于宝生物工程有限公司。

2 结果与分析

2.1 荞麦籽粒总蛋白谱带的差异

由图 1、2 可见, 甜荞品种间籽粒总蛋白质谱带具有十分丰富的多样性, 表现为品种籽粒蛋白质条带较多, 而且不同品种间蛋白质条带差异较大, 其变化范围为 16 ~ 20 条, 变化区域集中于 31 ~ 43 kDa。此外, 甜荞品种蛋白质多态性带的比例很高, 多态性带约占总条带的 65.5 %。与甜荞相比, 苦荞品种间蛋白质谱带则趋于一致, 稳定表达带从低分子量到

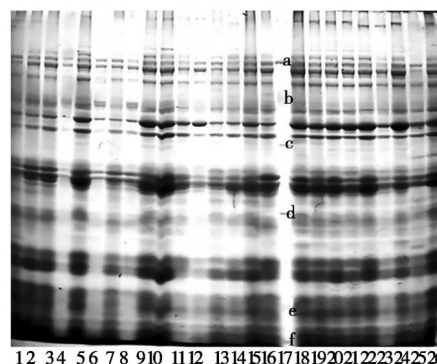
中等分子量都有, 共 12 条。但品种间谱带的强度有明显差异, 表明其蛋白含量的不同差异性。



1. 榆 9002; 2. 定荞 1 号; 3. 兴甜 1 号; 4. 黑小荞; 5. 榆荞 - 4; 6. 平 01 - 043; 7. 威甜 02 - 198; 8. 云南 T150; 9. 云南 T151; 10. 贵州 T144; 11. 贵州 T145; 12. 贵州 T143; 13. 贵州 T142; 14. 贵州 T147; 15. 贵州 T146; 16. 西藏 T158; 17. 西藏 T159; 18. 平荞 2 号; 19. 榆荞 2 号; 20. 标准样 (a. 97.1 kDa; b. 66.2 kDa; c. 43 kDa; d. 31 kDa)
1. Yu9920; 2. Dingqiao 1; 3. Xingtian 1; 4. Heixiaoqiao; 5. Yujiao - 4; 6. Ping01 - 043; 7. Weitiao02 - 198; 8. YT150; 9. YT151; 10. GT144; 11. GT145; 12. GT143; 13. GT142; 14. GT147; 15. GT146; 16. XT158; 17. XT159; 18. Pingqiao 2; 19. Yujiao2; 20. Standard

图 1 甜荞总蛋白电泳带型

Fig. 1 Protein patterns of common buckwheat cultivars



1. 兴苦 2 号; 2. 定 99 - 3; 3. 西农 9940; 4. 九江苦荞; 5. 晋苦 2 号; 6. 昭苦 2 号; 7. 迪庆苦荞; 8. 六苦 4 号; 9. 凉苦 - 3; 10. 凉苦 - 4; 11. 西苦 7 - 3; 12. 西苦 6 - 14; 13. 威苦 02 - 286; 14. 广苦 2 号; 15. 平 01 - 043; 16. 贵州 K216; 17. 标准样 (a. 97.1 kDa; b. 66.2 kDa; c. 43 kDa; d. 31 kDa; e. 20.1 kDa; f. 14.4 kDa); 18. 云南 K179; 19. 云南 K332; 20. 西藏 K132; 21. 西藏 K161; 22. 西藏 K120; 23. 西藏 K102; 24. 西藏 K098; 25. 西农 9909; 26. 西农 9920

1. Xingku 2; 2. Ding99 - 3; 3. Xinong 9940; 4. Jiujiang; 5. Jinku 2; 6. Zhaoku 2; 7. Diqing; 8. Liuku 4; 9. Liangku - 3; 10. Langku - 4; 11. Xiku 7 - 3; 12. Xiku 6 - 14; 13. Weiku 02 - 286; 14. Guangku 2; 15. Ping 01 - 043; 16. GK216; 17. Standard; 18. YK179; 19. YK332; 20. XK132; 21. XK161; 22. XK120; 23. XK102; 24. XK098; 25. Xinong 9909; 26. Xinong 9920

图 2 苦荞总蛋白电泳带型

Fig. 2 Protein patterns of tartary buckwheat cultivars

2.2 荞麦籽粒清蛋白谱带变化

荞麦清蛋白主要由低分子量的亚基构成。甜荞品种间清蛋白谱带变化范围为 12 ~ 14 条, 变化区域集中于 20.1 ~ 43 kDa, 第 1, 2, 11, 13, 14, 15, 16, 18 这 8 条带为稳定表达带 (表 1)。与此相反, 苦荞清蛋白谱带较少, 品种兴苦 2 号、定 99 - 3、西农 9940、九江苦荞、晋苦 2 号、昭苦 2 号的清蛋白谱带仅为 4 条,

其他品种均为 7 条。

2.3 荞麦籽粒球蛋白谱带变化

甜荞籽粒球蛋白组分包含由中等到低分子量范围的亚基。品种间谱带变化范围为 5~12 条,变化区域集中于 35~50 kDa。第 7,8,9,10 这 4 条为稳定表达带(表 2)。与甜荞相比,苦荞球蛋白主要由分子量在 16~50 kDa 间的 8 种亚基组成,品种间谱带没有差异。其中分子量在 32~43 kDa,23~25 kDa 间的亚基是 13 S 球蛋白的主要亚基。甜荞籽粒富含赖氨酸和精氨酸,其高含量的赖氨酸主要得益于

高含量的 13 S 球蛋白。

2.4 荞麦籽粒谷蛋白谱带变化

与清蛋白和球蛋白相比,谷蛋白的亚基数量少,分子量大。表 3 表明,甜荞谷蛋白主要由分子量在 43~66.2 kDa 之间的亚基组成,品种间谱带变化范围为 3~5 条,且强度有明显差异。甜荞谷蛋白多态性带的比例很高,为 100%(表 3)。因此,谷蛋白可作为鉴别甜荞品种的一个有效工具。而苦荞谷蛋白主要由分子量在 31~43 kDa 间的 2 种亚基组成,品种间谱带没有差异。

表 1 荞麦籽粒清蛋白不同谱带出现的频率

Tab.1 Frequency of different bands of albumin among common buckwheat cultivars

谱带顺序 Sequence	出现带数 Band number	频率/ % Frequency	谱带顺序 Sequence	出现带数 Band number	频率/ % Frequency
1	19	100.00	10	2	10.53
2	19	100.00	11	19	100.00
3	10	52.63	12	2	10.53
4	11	57.89	13	19	100.00
5	1	5.26	14	19	100.00
6	17	89.47	15	19	100.00
7	9	47.37	16	19	100.00
8	18	94.74	17	1	5.26
9	14	73.68	18	19	100.00

表 2 荞麦籽粒球蛋白不同谱带出现的频率

Tab.2 Frequency of different bands of globulin among common buckwheat cultivars

谱带顺序 Sequence	出现带数 Band number	频率/ % Frequency	谱带顺序 Sequence	出现带数 Band number	频率/ % Frequency
1	14	73.68	7	19	100.00
2	1	5.26	8	19	100.00
3	9	47.37	9	19	100.00
4	7	36.84	10	19	100.00
5	19	100.00	11	5	26.32
6	2	10.53	12	7	36.84

表 3 荞麦籽粒谷蛋白不同谱带出现的频率

Tab.3 Frequency of different bands of glutelin among common buckwheat cultivars

谱带顺序 Sequence	出现带数 Band number	频率/ % Frequency	谱带顺序 Sequence	出现带数 Band number	频率/ % Frequency
1	1	52.6	5	17	89.47
2	4	21.05	6	8	42.11
3	5	26.32	7	18	94.74
4	13	68.42			

3 讨论

本试验研究结果表明,甜荞蛋白质各组分的谱带具有明显多态性,而苦荞蛋白质各组分谱带的多态性则有限,这与 Zeller 等^[8]的研究结果相近。苦荞总蛋白比蛋白组分表现出的多态性丰富。甜荞属异花授粉作物,而苦荞属严格自花授粉作物,这可能是导致蛋白质谱带表现迥异的主要原因。同时,荞麦籽粒蛋白质谱带的多样性也反映了苦荞与甜荞经历不同的进化过程。

在籽粒蛋白质组分的分离提取中,一般多采用连续提取法^[9]。由于清蛋白是水溶蛋白且含量高,所以,如果采用直接提取法或提取清蛋白后依次提取其他蛋白,则各个蛋白组分的谱带都具有相似性。试验发现,经 3~4 次重复提取后球蛋白已不含清蛋白的谱带。此外,进行醇溶蛋白和谷蛋白提取时,难免也会有微量清蛋白被提取,对这样的蛋白质提取样品进行电泳分析,清蛋白会染色显现,而提取清蛋白时,提取液既不加酸或碱等溶剂,也不加乙醇。所以清蛋白提取样品中其他蛋白质成分存在的可能性

很小。在作物种子几种蛋白质中,把清蛋白作为分析对象更可靠也更省时^[10]。

试验研究表明,由于离子化的侧链较少及丰富的亚基组成,甜荞种子贮藏蛋白很难提取^[11]。也可能是选用材料的不同,在本试验中,荞麦籽粒谷蛋白分别由分子量在 31 ~ 43 kDa, 43 ~ 66.2 kDa 间的亚基组成,这表明更专一的提取方法可以被发现并应用,加之谷蛋白的多态性,谷蛋白可成为区分不同荞麦基因型、探讨遗传差异和遗传多样性的有效标记。有关荞麦籽粒蛋白质组分提取工艺及品质特性还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 林汝法,柴岩,廖琴,等. 中国小杂粮[M]. 北京:中国农业科技出版社,2002:39 - 44.
- [2] 柴岩,万富世. 中国小杂粮产业发展报告[M]. 北京:中国农业科技出版社,2007:20 - 26.
- [3] 张美莉,胡小松. 荞麦生物活性物质及其功能研究进展[J]. 杂粮作物,2004,24(1):26 - 29.
- [4] 王定昌,徐达伍. 荞麦蛋白的开发生产[J]. 粮油食品科技,2005,13(2):1 - 2.
- [5] Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, et al. Consumption of buckwheat protein extract retards 7, 12 - dimethylbenzanthracene - induced mammary carcinogenesis in rats[J]. Biosci Biotechnol Bio - chem,1996(63):1837 - 1839.
- [6] Siu - Mei Choi, Yoshinori Mine, Ching - Yung Ma. Characterization of heat - induced aggregates of globulin from Common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2006(39):201 - 209.
- [7] 郭尧君. 蛋白质电泳技术[M]. 北京:科学出版社,2005:85 - 100.
- [8] Friedrich J Zeller, Heidi Weishaeupl, Sai L K Hsam. Identification and genetics of buckwheat seed storage protein [J]. Advances in Buckwheat Research,2004:195 - 201.
- [9] 邓妙,魏益民. 蛋白质组分的连续累进提取分析法[J]. 西北农业大学学报,1989,17(1):110 - 113.
- [10] 陈景堂,祝丽英,宋占权,等. 玉米种子清蛋白和球蛋白 PAGE 比较分析[J]. 玉米科学,2002,10(2):27 - 29.
- [11] Sun - Hee Woo, Min - Hwa Park. Proteome approach as a tool for the efficient separation of seed storage proteins from buckwheat[J]. Advances in Buckwheat Research,2007:205 - 210.