

SDS-PAGE 电泳法鉴定进口香米纯度方法的研究

荣德福, 徐 颖, 何 阳, 李翠凤, 周 强

(北仑出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315800)

摘要: 采用醇溶蛋白电泳法对进口香米的品种纯度进行鉴定, 首先需要构建一个进口香米品种的标准图谱来做为品种鉴定的基准。本试验收集了宁波口岸进口的香米、大米以及白糯米 3 种样品, 用 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 鉴定方法开展了具体的试验工作。通过对香米、大米以及白糯米 3 种样品的筛选与电泳分析, 确定了上述样品醇溶蛋白的电泳图谱, 并在此基础上构建了各样品醇溶蛋白在 B, C 两组区间的电泳图谱。同时, 本试验还对影响电泳图谱的若干因素进行了研究和探索, 为今后具体香米品种鉴定工作的开展提供了一定的试验依据。

关键词: 香米纯度; 电泳图谱; 鉴定方法

中图分类号: S511 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2007) 增刊- 0081- 04

The Research of Identification the Purity of Thai Hom Mali Rice by SDS-PAGE

RONG De-fu, XU Ying, HE Yang, LI Cui-feng, ZHOU Qiang

(Beilun Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of The People's Republic of China, Ningbo 315800)

Abstract: To identify the purity of import Thai Hom Mali Rice by the method of electrophoresis, we need to build a standard electrophoretogram of import rice as a benchmark. So we collected three kinds of import rice which are Thai Hom Mali Rice, normal rice and sticky rice from Ningbo Port in recent years. Then, we gained some electrophoresis pattern of the prolamine which extracted from these three kinds of samples by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Based on it, we worked out the three samples' electrophoresis pattern of prolamine between B and C section. In addition, we also investigated some factors which can probably affect the result of electrophoresis pattern and all of these will provide some reference for the future experiments of the identification of the purity of the import Thai Hom Mali Rice.

Key words: The purity of Thai Hom Mali Rice; SDS-PAGE; Identification

泰国香米以其优良的品质享誉世界, 随着大量进口香米进入我国市场, 质量问题也就愈加显得突出。因此, 对于进口香米的纯度检验问题就愈加显得重要, 本课题便是基于此背景下而提出。

长期以来, 鉴定进口香米品种纯度的方法主要是以感官鉴别为主。由于同一品种香米籽粒的营养生长状况、结实的部位和气候环境条件等不同, 部分籽粒在外形上存在较大的差异。同时, 香米与非香米之间的籽粒由于存在一定的亲缘关系而在外形上存在许多相似之处, 所以用感官方法鉴别香米的品种纯度存在着较大的偏差和难度。随着现代生物化学与分子生物学技术的迅猛发展, 许多分子生物学技术也被引入了种子纯度鉴定中^[1]。迄今为止, 蛋白质电泳法以其准确可靠、经济简便、重现性好的特

点, 成为目前种子纯度检验中广泛适用的方法^[2-4]。电泳法鉴定品种纯度作为一种准确和有效的手段, 可以弥补感官鉴别的不足和验证感官鉴别的正确与否。

醇溶蛋白(Hordein) 是指能溶解于醇类物质的一类混合型蛋白, 可以用丙醇等化学试剂来提取, 不同的醇溶蛋白在电泳图谱上具有不同数目的蛋白质谱带, 谱带的位置和密度均有所不同^[5]。根据醇溶蛋白的分子量大小和氨基酸组成的差异, 可将它们分为 A、B、C、D 四组多肽。由于 A、D 两组多肽在醇溶蛋白中所占比例较少, 并且几乎没有遗传变异或变异较少, 所以在香米品种鉴定中, 主要是根据 B、C 两组多肽的差异进行判定, 即在分子量 35 000~ 75 000 Da(SDS-PAGE) 区间内多肽形成的图谱的差异来

进行鉴定。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用进口香米 香米样品从宁波口岸近一年进口的检验样品中筛选。

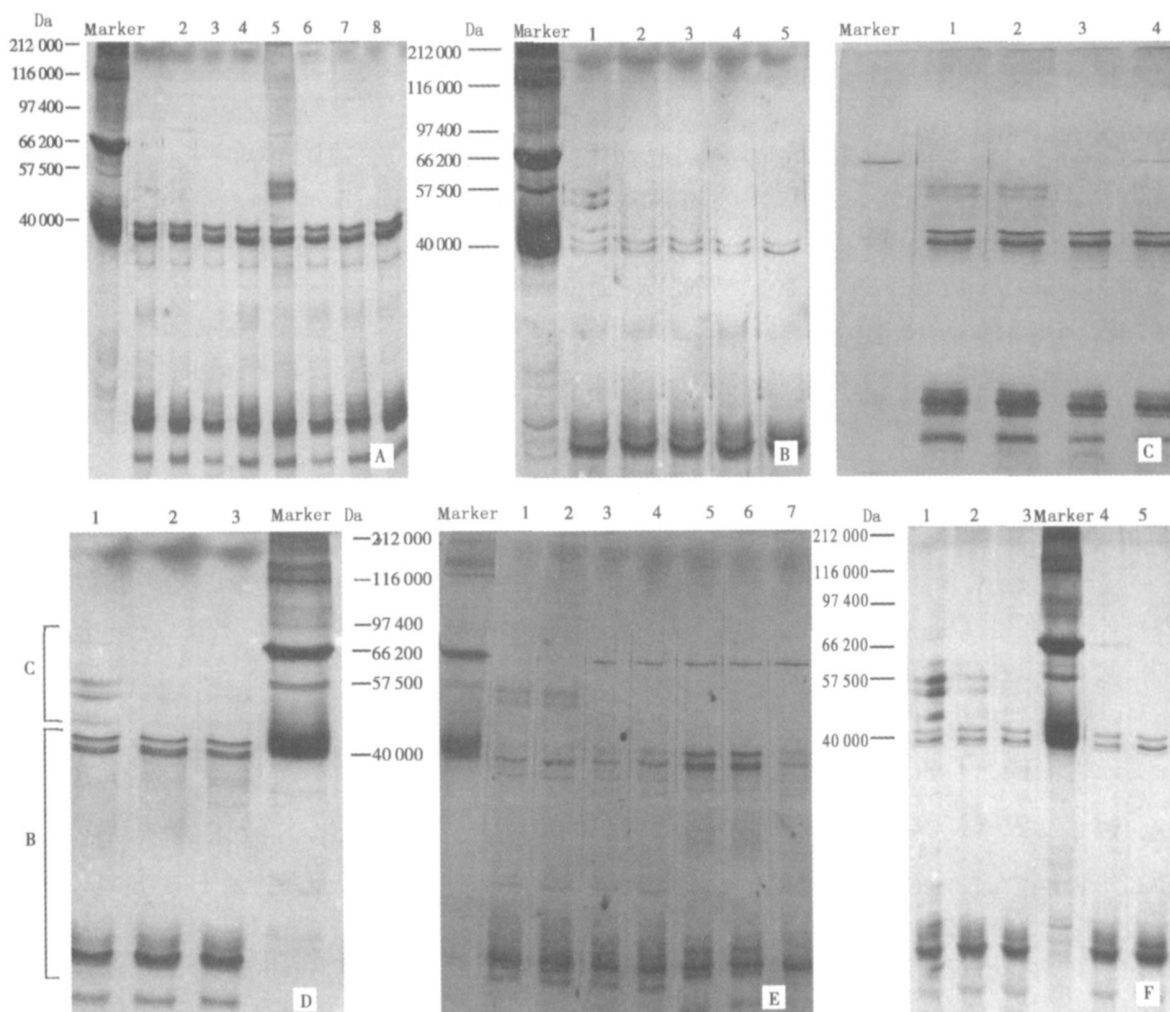
1.1.2 试剂 2-巯基乙醇、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺(Acr)、N,N-甲叉双丙烯酰胺(Bis)、过硫酸铵(AP)、4-乙烯吡啶、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、二硫代苏糖醇(DTT)、N,N,N,N-四甲基乙二胺(TEMED)及溴酚蓝等均为上海生工生物工程有限公司提供的高纯度的进口试剂。

1-丙醇、盐酸、硼酸、甘油、乙醇、冰醋酸、甲醛、硫代硫酸钠、硝酸银和碳酸银均为国产分析纯试剂。标准蛋白(ST),分子量分别为:212 000,

116 000,97 400, 66 200,57 500 与 40 000 Da,购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 试验方法

将香米颗粒粉碎后的转移至 1.5 mL 的离心管内加入 400 μ L 抽提液,振荡 2 min,在 60 $^{\circ}$ C 水浴中抽提 30 min,5 500 r/min 离心 15 min;取 50 μ L 上清液于另一个 1.5 mL 的离心管内,并加入含有 4-乙烯吡啶的丙醇缓冲液,振荡 1 min,在 60 $^{\circ}$ C 水浴中混和 15 min。加入 100 μ L 含有溴酚蓝的样品缓冲液,振荡 1 min 在 60 $^{\circ}$ C 水浴中混和 15 min。醇溶蛋白提取液在室温中可保存 2~ 3 d。将提取的醇溶蛋白提取液在分离胶浓度 14%,浓缩胶浓度 3% 的凝胶中进行电泳分离(电泳条件:恒定电流 60 mA,在室温 20 $^{\circ}$ C 条件下进行电泳,电泳时间为 1.5 h),最后银染后并进行图谱扫描。



A: 1, 2, 3, 4. 大米;5. 香米; 6, 7, 8. 白糯米; B: 1. 香米; 2. 大米; 3. 白糯米; 4, 5. 非香米; C: 1- 2. 香米; 3- 4. 非香米; D: 1. 香米; 2. 大米; 3. 大糯米; E: 1, 2. 香米; 3- 7. 国产东北杂交米; F: 1, 2. 香米; 3, 5. 大米; 4. 白糯米

A: 1, 2, 3, 4. Normal rice; 5. Thai Hom Mali Rice; 6, 7, 8. Sticky rice; B: 1. Thai Hom Mali Rice; 2. Normal rice; 3. Sticky rice; 4, 5. Other rice; C: 1, 2. Thai Hom Mali Rice; 3, 4. Other rice; D: 1. Thai Hom Mali Rice; 2. Normal rice; 3. Sticky rice; E: 1, 2. Thai Hom Mali Rice; 3- 7. Hybrid rice of Dongbei; F: 1, 2. Thai Hom Mali Rice; 3, 5. Normal rice; 4. Sticky rice

图 1 样品电泳图谱

Fig. 1 The electrophoresis pattern of some sample

2 结果与分析

2.1 进口香米纯品种的筛选、电泳图谱确认和比较

由图 1 可见, 进口香米、大米、白糯米 3 个品种在 B 组区间内各蛋白条带基本相同, C 组区间内, 在分子量 57 500 Da 左右, 只有纯品种香米有显著的蛋白带。

2.2 纯度鉴定及其计算方法

通过感官检验方法得到的“纯品种”颗粒样品, 有时会由于其外型特征不明显或检验人员的认知差异, 使得纯度检验结果产生较大差异。而通过比较电泳图谱的方法, 可以从根本上解决上述问题。

通过人的眼睛可以从香米中明显分辨出的如: 白糯米、其他大米等外来种子, 相比较由于使用电泳方法很费时, 可以直接进行感官检验, 从结果中扣除是可靠的。剩余的、可能认为是一般香米的颗粒, 通过电泳方法进行鉴别, 是比较科学的方法。它不仅可以鉴别出外型特征不明显的完整颗粒, 也可以鉴别出肉眼根本无法鉴别的不完整颗粒, 使检验结果更加科学准确。

具体方法如下: 从每批样品中随机挑选 100 粒, 从中直接用感官检验挑出白糯米及其他明显不是香米的颗粒(用“Mn”表示), 剩下的颗粒(不完整颗粒的颗粒程度应大于本批样品平均长度的 3/4, 本研究暂不考虑碎米的检验), 按“1.2 试验材料和方法”的试验步骤, 分别进行电泳分析, 得到电泳图谱在分子量 57 500 Da 左右的蛋白带是纯品种香米, 其他为非香米颗粒(用“N”表示)。

按如下公式计算香米纯度:

$$A\% = \frac{100 - Mn - N}{100} \times 100\%$$

A% ——该批香米的纯度

Mn ——白糯米, 其他肉眼能分辨的非香米和其他种籽的总颗粒数

N ——电泳法鉴别出的非香米颗粒数

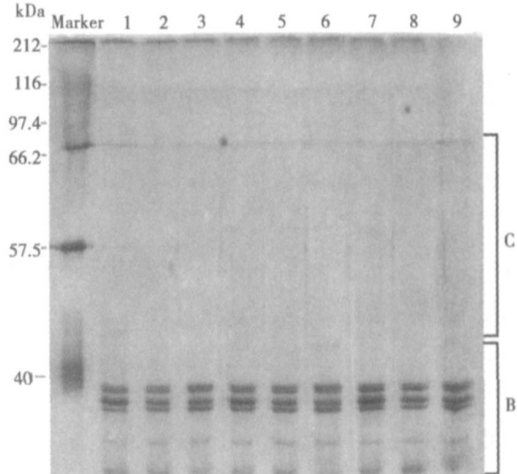
按上述电泳方法得出的检测结果永远会是整数。按此方法制订检验规程时, 应考虑单颗籽粒质量对结果的影响。

2.3 醇溶蛋白电泳法鉴定香米品种纯度应注意的问题

2.3.1 SDS-PAGE 电泳条件的改良与优化: 通过不同凝胶浓度的比较试验, 我们认为浓度为 14% 的分离胶对香米醇溶蛋白的分离效果最好, 分离胶浓度过高会使凝胶发脆易碎且电泳时间过长。反之, 分离胶浓度过低会导致高分子量蛋白分离效果不佳,

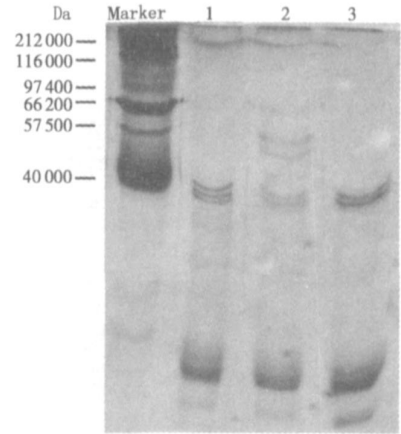
特征条带分离不出来, 不利于品种鉴定(图 2)。

此外, 在用 SDS-PAGE 方法进行进口香米醇溶蛋白分离过程中, 外界温度条件对试验结果和试验的重复性影响较大。在 10℃以下进行制胶和电泳会发生 SDS 的沉淀现象, 电泳时间延长, 重复性不佳, 电泳条带弯曲, 基线不水平(图 3)。因此, 我们认为本试验应在 15~ 20℃范围内进行较好。



Lane 1, 4, 7. 香米; Lane 2, 5, 8. 香米; Lane 3, 6, 9. 白糯米
Lane 1, 4, 7. Thai Hom Mali Rice; Lane 2, 5, 8.
Normal rice; Lane 3, 6, 9. Sticky rice

图 2 分离胶浓度为 10% 时样品电泳图谱
Fig. 2 The electrophoresis pattern of some sample
at the gel concentration of 10%



Lane 1. 白糯米; Lane 2. 香米; Lane 3. 大米
Lane 1. Sticky rice; Lane 2. Thai Hom Mali Rice;
Lane 3. Normal rice

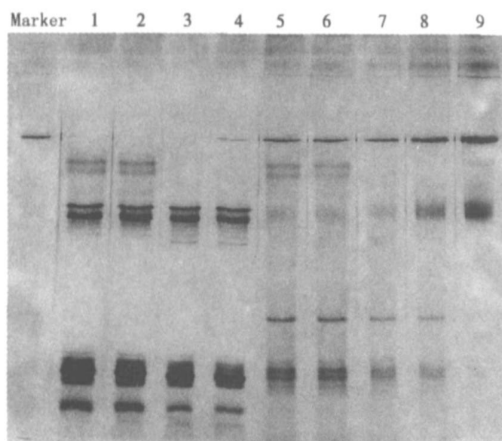
图 3 在 5℃ 时进行的样品电泳图谱
Fig. 3 The electrophoresis pattern of some
sample at 5℃

2.3.2 蛋白质电泳谱带的异常情况: 如果香米进行了改良或杂交, 大多数杂交种电泳谱带会是一致的, 但有些杂交种个别籽粒会出现一些异常情况。这时, 应考虑采用 PCR 技术进行进一步的研究, 找出父系(或母系)及多交种特征谱带, 而实现品种鉴定的目的。

2.3.3 大米蛋白种类很多,一般以其溶解特性进行分类。用水提取大米或米糠中的蛋白质所得到的蛋白组分称为清蛋白;残渣用稀盐溶液提取得到的蛋白组分为球蛋白;再用 75% 乙醇提取的组分为醇溶蛋白,最后残渣中蛋白质只能用酸或碱溶解,分别称为酸溶性蛋白和碱溶性蛋白,二者统称为谷蛋白。

谷蛋白和醇溶蛋白也叫贮藏蛋白,是大米中的主要蛋白成分^[6],谷蛋白占总蛋白的 80% 以上,醇溶蛋白占 10% 左右;而清、球蛋白含量极少。本研究证实了用醇溶蛋白可以分离出香米的品种特性,而由于清(水溶)蛋白含量极少,不能清晰地用于证实品种纯度特性。醇溶蛋白与水溶蛋白电泳谱图见图 4。

2.3.4 另外,大量的研究表明^[6],大米中的蛋白种类并不是固定不变的。在大米陈化过程中,虽然总蛋白含量不变,但其结构、类型会发生变化,进而也影响了米饭的流变特性,突出的变化是二硫键数量增多,蛋白质分子量增大,蛋白聚体更加致密,蒸煮后蛋白质与淀粉的网络结构致密,限制了淀粉粒的吸水膨胀和柔润,因而米饭的粘性下降而硬度增加。此时若加入适量的还原剂破坏二硫键,则米饭的粘性提高。任顺成等^[7]用 SDS-PAGE 方法也证明了大米陈化前后蛋白质分子量的这种变化,大米中的蛋白质的变化是导致大米流变学性质变化的重要因素。



1, 2, 5, 6. 香米; 3, 4, 7, 8, 9. 非香米

1, 2, 5, 6. Thai Hom Mali Rice; 3, 4, 7, 8, 9. Other rice

图 4 醇溶蛋白与水溶蛋白电泳谱图

Fig. 4 The electrophoresis pattern of prolamine and albumin

大米蛋白不仅在陈化中有更大分子的形成,在加热时也有明显的蛋白分子的聚合。有报道指出^[6],爆炒大米花时,分子量为 24, 34, 68 kDa 的分子可以聚集成 4×10^4 kDa 的特大聚合体,但分子量

为 13~ 16 kDa 的醇溶蛋白不参与这种蛋白体的形成。

由此可见,对大米蛋白质谱带特性进行鉴定时,尤其要注意大米陈化、加热和二硫键的氧化、还原对蛋白质性质的影响。

本研究的香米样品主要是近一年的保留样品,并且储存条件较好,未造成香米陈化。如对陈化粮进行研究时,应考虑蛋白聚合对品种特性的影响。

3 结论

鉴于蛋白质电泳法在大麦、小麦品种纯度鉴定上的成功应用^[8-10],和我们对其在鉴定香米品种纯度方面的可行性进行的长期探索,最终发现,醇溶蛋白电泳法鉴定进口香米品种纯度是一种十分有效和准确的手段,可以弥补感官检验方法的不足之处。本试验完成了 3 种米类醇溶蛋白的电泳图谱筛选、确认,研究结果表明,在此方法下完成的泰国香米蛋白图谱与大米、白糯米这二个品种的蛋白图谱相比具有显著差异,在分子量 57 500 Da 左右有品种特异性蛋白条带,从而可以达到鉴定品种纯度的目的。

参考文献:

- [1] 严莉,谢英维,张亚平,等.现代生物技术在作物品种纯度鉴定上的研究进展[J].种子,2002(6):45-46
- [2] 赖相红,李静,李冰,等.蛋白质电泳技术在品种鉴定和纯度检验上的应用[J].育种技术,2003(4):31-33
- [3] 李常保,张靖.作物品种纯度鉴定技术研究[J].种子,1999(3):33-48
- [4] 严莉,谢英维,颜彤,等.利用种子蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定玉米种籽纯度的研究[J].新疆农业科学,2004,41(2):125-126
- [5] 王景升,王玺,刘国奇,等.电泳谱带法在农作物品种纯度鉴定上的应用研究[J].沈阳农业大学学报,1996,27(3):221-225
- [6] 王章存,申瑞玲,姚惠源.大米蛋白研究进展[J].中国粮油学报,2004(2):12-16
- [7] 任顺成,周瑞芳,李永红.大米陈化过程中谷蛋白与大米质构特性的变化[J].中国粮油学报,2002,17(3):42-46
- [8] 潘良文,陶军,关裕亮.用 SDS-PAGE 方法鉴别进口大麦品种[J].中国粮油学报,1998,13(4):6-10
- [9] 颜启传,黄亚军,徐媛.我国适用的小麦和大麦种子醇溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定品种的标准程序[J].种子,1989(6):55-57
- [10] 郑成超,金锡奎,周容清,等. SDS-PAGE 鉴定小麦品种纯度的研究[J].山东农业科学,1990(4):6-9.