

# 青海蚕豆清蛋白与球蛋白 分级提取 SDS - PAGE 比较分析

李萍, 侯万伟, 严清彪, 刘玉皎\*

(青海省农林科学院, 青海 西宁 810016)

**摘要:** 利用改进的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对 2 种青海蚕豆品种 2005 - 00 和青海 13 号的清蛋白、球蛋白进行研究, 并采用微量凯氏定氮法测得相应的蛋白质含量。结果表明: 球蛋白含量比清蛋白含量高, 是总蛋白含量的主要成分。用含有 NaCl 的球蛋白提取液 I 提取 5 次蛋白质后, 清蛋白和球蛋白被同时提取出来; 而用不含 NaCl 的清蛋白提取液 II 提取 4 次蛋白质后, 再用提取液 I 提取, 可得到球蛋白组分, 而且和清蛋白一样也有相同迁移位置的谱带存在。表明对球蛋白进行提取操作时, 总有清蛋白相伴随; 而对清蛋白进行提取分析时一般不会有球蛋白的存在。

**关键词:** 青海蚕豆; 清蛋白; 球蛋白; SDS - PAGE

中图分类号: Q946.1 文献标志码: A 文章编号: 1000 - 2286(2011)01 - 0168 - 05

## An Analysis of Albumin and Globulin of Qinghai Faba Bean Varieties with SDS - PAGE

LI Ping, HOU Wan-wei, YAN Qing-biao, LIU Yu-jiao\*

(Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining 810016, China)

**Abstract:** The albumin and globulin of 2005 - 00 and Qinghai 13, two varieties of Qinghai Faba bean were studied by improved SDS - PAGE. At the same time by using micro - Kjeldahl Method the appropriate protein content were measured. The result showed that the content of globulin was twice that of albumin. Therefore globulin was the main component of the total protein content. Almost all the albumin and globulin were extracted after extraction for five times with extract solution I which included NaCl. But only the globulin were obtained with extract solution I for one time after with extraction for four times extract solution II which didn't include NaCl, and the globulin had the same mobility as the albumin. The result indicated that albumin was also extracted while extracting globulin, but globulin was not extracted while extracting albumin.

**Key words:** Qinghai Faba bean; albumin; globulin; SDS - PAGE

蚕豆是一种富含蛋白质、维生素、脂肪、碳水化合物及多种矿物质的豆科植物, 其蛋白质含量为 25% ~ 30%<sup>[1]</sup>, 是豆类中仅次于大豆的高蛋白作物<sup>[2]</sup>。所含 1.5% 脂肪中含有 88.6% 的不饱和脂肪酸和 11.4% 的饱和脂肪酸, 另外还含有 48.5% 的碳水化合物, 维生素含量超过大米和小麦, 每 100 g 蚕豆籽粒含有 VB<sub>1</sub> 0.39 mg, VB<sub>2</sub> 0.27 mg<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2010 - 09 - 09 修回日期: 2010 - 10 - 26

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项 (2010CB134408)、现代农业产业技术体系建设专项 (nycytx - 18 - G2) 和青海高原作物种质资源创新与利用国家重点实验室培养基金

作者简介: 李萍 (1980—) 女, 研究实习员, 主要从事蚕豆育种栽培研究, E-mail: pingpen2008@sohu.com; \* 通讯作者: 刘玉皎, 副研究员, E-mail: lyujiao2000@yahoo.com.cn。

豆科植物中除少量粗蛋白和极少量非水溶性蛋白外,水溶性蛋白中主要是清蛋白和球蛋白。Osborne<sup>[4]</sup>根据蛋白质溶解性不同,将种子蛋白质分为4大类:即溶于水的清蛋白(白蛋白);溶于100 g/L NaCl溶液的球蛋白(盐溶蛋白);溶于体积分数70%~90%乙醇的醇溶蛋白和仅溶于稀酸或稀碱溶液的谷蛋白。豆科植物和很多双子叶植物主要种子蛋白是清蛋白和球蛋白,清蛋白是酶和酶的抑制剂;球蛋白占绝大部分,是种子贮存蛋白供种子萌发及幼苗生长用<sup>[5]</sup>。豆科植物中的球蛋白根据沉降系数的不同分为11S大豆球蛋白(glycinin)和7S的副大豆球蛋白(conglycinin)及一个小量成分,而蚕豆和豌豆的11S和7S都叫做legumin(豆球蛋白)和vicilin(豌豆球蛋白)<sup>[6-8]</sup>。李雪琴等<sup>[9]</sup>利用SephacroseCL-6B柱层析洗脱出蚕豆清蛋白有2个组分,球蛋白有3个组分;并利用SDS-PAGE分析表明清蛋白有5种亚基,其相对分子量为18 600~59 000 ku,球蛋白有7种亚基,其相对分子量为16 700~54 000 ku。但对蚕豆样品在提取一种蛋白质中是否有其他蛋白的存在问题尚未见报道。本研究通过对2种青海蚕豆品种的球蛋白和清蛋白采取分别分级提取若干次后,再提取另一种蛋白的方法进行电泳比较,以期揭示蛋白质提取时是否有另类蛋白相伴随,为今后进行青海蚕豆蛋白质亚基的差异性研究做前期指导性工作。

## 1 试验材料

本研究选用2种青海蚕豆品种:2005-00、青海13号,经测定其总蛋白质含量分别为:26.31%、27.67%。

仪器: DYY-10C型电泳仪、DYY-25A型单夹芯电泳槽、TGL-20M台式离心机、HS-3垂直混合器。

试剂: 蛋白质提取液 I: 0.5 mol/L NaCl + 150 g/L 蔗糖 + 少量溴酚蓝; 蛋白质提取液 II: 150 g/L 蔗糖 + 少量溴酚蓝; 染色液: 甲醇 500 mL, 乙酸 100 mL, 蒸馏水 500 mL, 考马斯亮蓝 R-250 1 g, 摇匀并过滤; 脱色液: 甲醇 25 mL, 冰醋酸 25 mL, 蒸馏水 450 mL。

## 2 试验方法

### 2.1 蛋白质提取与含量测定

将单粒蚕豆种子去皮研磨成细粉过60目筛后放入离心管用提取液 I 提取5次球蛋白,记号为B;用提取液 II 提取4次清蛋白,记号为A。每次蛋白质提取样品分别4℃保存备用。蛋白质含量测定采用微量凯氏定氮法<sup>[10]</sup>。

### 2.2 电泳与染色

电泳参照 Laemmli<sup>[11]</sup>方法,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶浓度10%,浓缩胶浓度3%。取备用的提取液10 μL与种子裂解液按1:1混合后在沸水中加热3~4 min,冷却后点样,在室温下稳压电泳4~5 h。

电泳后将胶面放入蒸馏水中漂洗1~2次,放入染色液中染色30 min,再放入脱色液中脱色至条带清晰,观察谱带照相。

## 3 结果分析

### 3.1 分级提取的清蛋白、球蛋白及其蛋白质含量

经微量凯氏定氮法对试验材料2005-00、青海13号分级提取的清蛋白、球蛋白的蛋白质含量进行测定(表1)。

从表1可以看出,2种不同基因型蚕豆品种其球蛋白含量均比清蛋白含量高,且随着提取次数的增多,其相应的蛋白质含量呈递减趋势,说明蚕豆蛋白质中主要以球蛋白为主,其结果与文献报道相符。从表1数据看出,第5次提取的球蛋白与5次提取球蛋白后再提取清蛋白其蛋白含量一样,说明第5次加球蛋白提取液已无球蛋白的存在,由于球蛋白提取液中含有大量的水,故提取出来的不是球蛋白而是清蛋白;而第4次提取清蛋白后再提取球蛋白,其球蛋白含量比第4次提取清蛋白含量要高,说明提取清蛋白时不伴随球蛋白,故从清蛋白提取剩余物中加入球蛋白提取液,仍可提取出球蛋白。从图1、图2中可以清晰地看出,青海13号无论是清蛋白还是球蛋白,其蛋白含量均比2005-00高。

### 3.2 分级提取清蛋白、球蛋白 SDS-PAGE 电泳

对同一品种蚕豆粉先分次用提取液 I 提取球蛋白,最后再用提取液 II 提取1次清蛋白;对同一试

表1 分级提取蚕豆清蛋白、球蛋白含量  
Tab.1 Classification distill content of albumin and globulin

材料名称 Material name	2005-00 2005-00	青海13号 Qinghai No.13	材料名称 Material Name	2005-00 2005-00	青海13号 Qinghai No.13
第1次提球蛋白 Firstly distill globulin	22.65	29.55	第1次提清蛋白 Fistly distill albumin	15.76	18.71
第2次提球蛋白 Secondly distill globulin	7.39	11.33	第2次提清蛋白 Secondly distill albumin	5.42	7.88
第3次提球蛋白 Thirdly distill globulin	1.48	1.97	第3次提清蛋白 Thirdly distill albumin	1.97	2.46
第4次提球蛋白 Fourthly distill globulin	0.98	1.48	第4次提清蛋白 Fourthly distill albumin	1.48	0.98
第5次提球蛋白 Fifthly distill globulin	0.49	0.49	球蛋白 Globulin	1.97	1.48
清蛋白 Albumin	0.49	0.49			

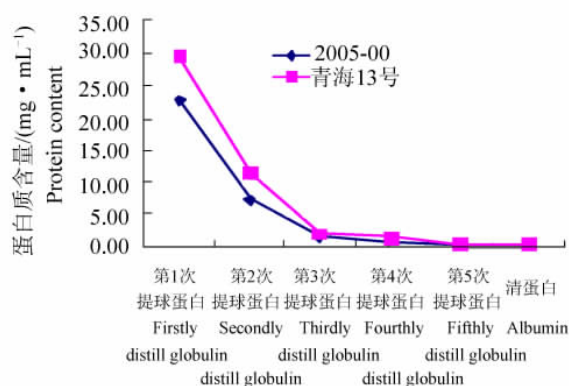


图1 分级提取球蛋白

Fig.1 Classification distill content of globulin

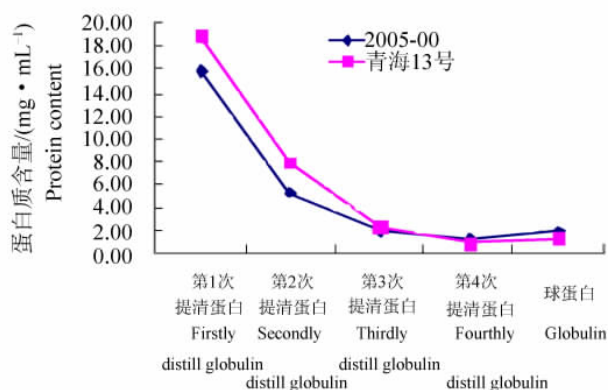
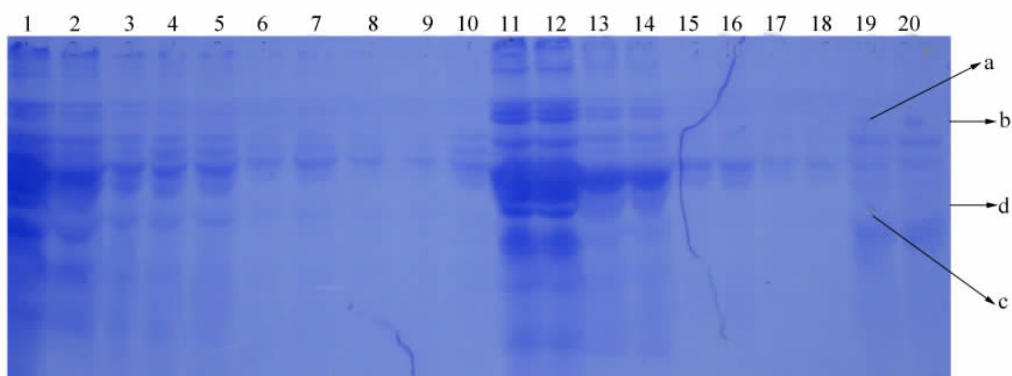


图2 分级提取清蛋白

Fig.2 Classification distill content of albumin

验等重量的另外蚕豆粉先分次用提取液 II 提取清蛋白,最后再用提取液 I 提取 1 次球蛋白;每次提取的蛋白质样品分别点样,同时进行电泳比较。

图3 是试验材料 2005-00 分别用提取液 I 和提取液 II 分级提取蛋白质的电泳图,其中用 1~9 数字标记的是用提取液 I 共提取了 5 次球蛋白电泳图谱,10 是用提取液 I 完成 5 次提取后,用提取液 II 提取 1 次的清蛋白图谱;11~18 是用提取液 II 分别提取 4 次的清蛋白图谱,19 和 20 是用提取液 II 分别提取 4 次后又用提取液 I 提取 1 次球蛋白的图谱。从图3 可以清晰看出:无论是球蛋白还是清蛋白,第 1 次提取的样品条带颜色最深,说明提取液中蛋白质的浓度最高,每提取 1 次蛋白质浓度都比上一次递减且条带也越来越浅。当提取 5 次球蛋白后再提取 1 次清蛋白,只有 3 条谱带显现,而且这 3 条谱带 在球蛋白的谱带中都有相同迁移位置谱带存在,染色也比第 5 次球蛋白的相应谱带稍浅。表明这 3 条带是第 5 次提取球蛋白后的剩余,提取了 5 次球蛋白后清蛋白已几乎不存在。换言之,即在提取球蛋白的同时,清蛋白也一起被提取出来,这与陈景堂等<sup>[12]</sup>研究玉米种子清蛋白、球蛋白 PAGE 比较分析得出相似的结论。而清蛋白不同,提取 4 次清蛋白后再提取的球蛋白与第 4 次提取的清蛋白相比存在 4 条谱带(a、b、c、d)差异,这 4 条谱带可认为是真正的球蛋白的组分,这一点在表 1 中可得以验证,即第 4 次提取清蛋白后提取球蛋白其蛋白质含量比第 4 次提取的清蛋白高。

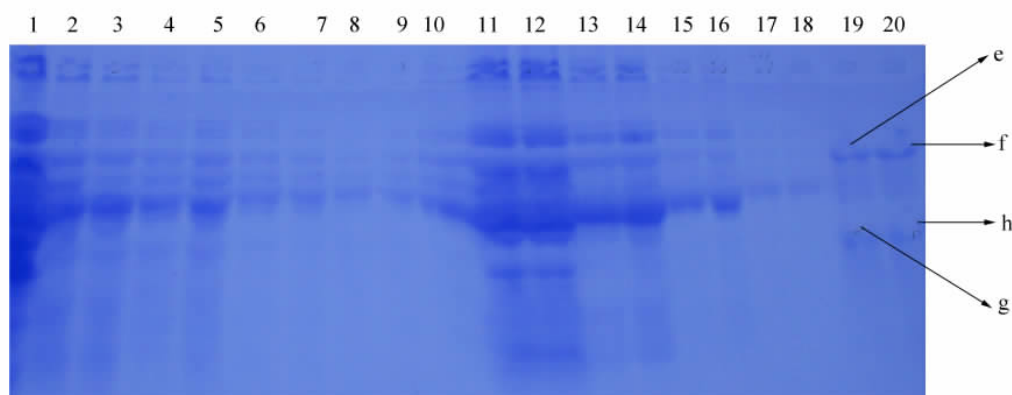


1: 第 1 次球蛋白; 2~3: 第 2 次球蛋白; 4~5: 第 3 次球蛋白; 6~7: 第 4 次球蛋白; 8~9: 第 5 次球蛋白; 10: 清蛋白; 11~12: 第 1 次清蛋白; 13~14: 第 2 次清蛋白; 15~16: 第 3 次清蛋白; 17~18: 第 4 次清蛋白; 19~20: 球蛋白。

1. Firstly distill globulin; 2~3. Secondly distill globulin; 4~5. Thirdly distill globulin; 6~7. Fourthly distill globulin; 8~9. Fifthly distill globulin; 10. Albumin; 11~12. Firstly distill albumin; 13~14. Secondly distill albumin; 15~16. Thirdly distill albumin; 17~18. Fourthly distill albumin; 19~20. Globulin.

图 3 2005-00 分级提取球蛋白、清蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoregram of classification distill content of globulin and albumin of 2005-00



1: 第 1 次球蛋白; 2~3: 第 2 次球蛋白; 4~5: 第 3 次球蛋白; 6~7: 第 4 次球蛋白; 8~9: 第 5 次球蛋白; 10: 清蛋白; 11~12: 第 1 次清蛋白; 13~14: 第 2 次清蛋白; 15~16: 第 3 次清蛋白; 17~18: 第 4 次清蛋白; 19~20: 球蛋白。

1. Firstly distill globulin; 2~3. Secondly distill globulin; 4~5. Thirdly distill globulin; 6~7. Fourthly distill globulin; 8~9. Fifthly distill globulin; 10. Albumin; 11~12. Firstly distill albumin; 13~14. Secondly distill albumin; 15~16. Thirdly distill albumin; 17~18. Fourthly distill albumin; 19~20. Globulin.

图 4 青海 13 号分级提取球蛋白、清蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoregram of classification distill content of globulin and albumin of Qinghai No. 13

图 4 是试验材料青海 13 号分别用提取液 I 和提取液 II 分级提取蛋白质的电泳图(其方法同图 3)。在提取 4 次清蛋白后提取球蛋白也出现了明显的 4 条谱带(e、f、g、h)的差异。由于提取球蛋白时清蛋白也相伴随被提取,而且球蛋白的谱带在清蛋白中也有相应谱带存在,所以用清蛋白和球蛋白分别进行蚕豆种子纯度检验和真实性鉴定可能会得出相同结论。

## 4 讨论

Hudson B J F<sup>[13]</sup>在研究几种豆类蛋白质含量发现蚕豆的水溶性蛋白中清蛋白含量为 17%~21%,球蛋白含量为 60%~70%。从本文结果也可以看出,蚕豆水溶性蛋白中球蛋白占主要成分,第 1 次提取的蛋白质含量最高,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳条带最清晰,且随着提取次数的增多其蛋白质含量逐渐降低。本研究结果表明:提取球蛋白时相应的清蛋白也伴随着被提取,原因可能是球蛋白提取液中除了含有 NaCl 外还含有大量的水,而清蛋白提取液中主要成分是水。由此推断,在提取球蛋白时无疑清蛋白也被提取出来,在进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时,清蛋白也会染色显现出清晰的谱带。而提取

清蛋白却不同,因为提取液中只有水,不含有 NaCl、乙醇、碱等溶剂,所以清蛋白提取样品中含有球蛋白或其他醇溶蛋白、谷蛋白的可能性很小。由此笔者认为在作物种子几种蛋白质中,将清蛋白作为分析对象更可靠一些。由于本研究中采用的提取方法提取的蛋白质样品进行 SDS - PAGE 电泳谱带清晰,可进一步研究青海不同基因型蚕豆蛋白质亚基成分及其相异性。

#### 参考文献:

- [1]吴凯星,李宗菊,施丽萍,等.蚕豆蛋白质抽提液的初步评估与选择[J].食品科学,1999(11):34-37.
- [2]杨海涛,刘军海.蚕豆蛋白质提取工艺的研究[J].食品工艺,2008(2):76-78.
- [3]蒋建基,杨秀科.食品营养与卫生[M].北京:高等教育出版社,1995:248-249.
- [4]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.
- [5]Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage[J]. Nature. 1970(227):680-685.
- [6]Derbyshire E, Wright D J, Boulter D. Legumin and vicilin: Storage proteins of legume seeds[J]. Phytochemistry, 1976(15):3-24.
- [7]Hudson B J F. New and developing source of food proteins[M]. 1994.
- [8]李雪琴,苗笑亮,裘爱泳,等.几种豆类蛋白质组成和结构比较[J].粮食与油脂,2003(6):19-20.
- [9]李雪琴,苗笑亮,裘爱泳,等.蚕豆蛋白的提取分离及相对分子质量的测定[J].无锡轻工大学学报,2003(22):71-74.
- [10]中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [11]郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999:123-131.
- [12]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.
- [13]Hudson B J F. Developments in food proteins[M]. London and New Jersey: Applied Science Publishers, 1991.

#### (上接第99页)

- [10]郭小权,胡国良,曹华斌,等.高锌日粮对断奶仔猪血清锌和粪便排泄锌含量的影响[J].江西农业大学学报,2009,31(5):789-792.
- [11]丁小玲,汤继顺,王希春,等.日粮锌源和锌水平对断奶仔猪血清及组织铜、铁、锌沉积的影响[J].中国兽医学报,2010,30(2):262-265.
- [12]王希春,吴金节,汤继顺,等.高锌日粮对断奶仔猪血清、组织及粪便中铜、铁、锌水平的影响[J].南京农业大学学报,2009,32(4):127-132.
- [13]赵昕红,李德发,田福刚,等.高锌和高铜对仔猪生长性能、免疫功能和抗氧化酶活性的影响[J].中国农业大学学报,1999,17(1):91-96.
- [14]Carlson M S, Hill G M, Link J E. Early and traditionally weaned nursery pigs benefit from phase - feeding pharmacological concentrations of zinc oxide: Effect on metallothionein and mineral concentration[J]. Journal of Animal Science, 1999, 77(5):1199-1207.
- [15]Smith J W, Tokach M D, Goodband R D, et al. Effects of the interrelationship between zinc oxide and copper sulfate on growth performance of early - weaned pigs[J]. Journal of Animal Science, 1997, 75(7):1861-1866.