

# 青海不同生态环境下 蚕豆蛋白亚基差异性研究

石建斌<sup>1,2</sup>, 侯万伟<sup>2,3</sup>, 刘玉皎<sup>2,3\*</sup>, 马晓岗<sup>2\*</sup>

(1. 青海大学, 青海 西宁 810016; 2. 青海省农林科学院 作物所, 青海 西宁 810016; 3. 青海省高原作物种质资源  
创新与利用国家重点实验室培育基地, 青海 西宁 810016)

**摘要:**以青海不同生态环境条件下的青海 13 号蚕豆为材料, 利用 SDS-PAGE 电泳技术分离清蛋白和球蛋白各主要亚基, 通过 Band Scan 5.0 软件得出各亚基的相对含量。结果表明, 蚕豆清蛋白和球蛋白亚基构成具有差异性, 发现 2 个 99 ku、61 ku 的清蛋白特异亚基和 3 个 94 ku、64 ku、39 ku 的球蛋白特异亚基, 57 ku、47 ku 等 2 个清蛋白亚基和 61 ku、51 ku 等 2 个球蛋白亚基具有一定的缺失现象。各亚基在含量上也各不相同, 存在一定差别, 可以看出, 蚕豆蛋白亚基的增失及含量随生态环境的不同存在一定的变异。本研究对蚕豆制品育种具有一定的参考价值。

**关键词:**蚕豆; 蛋白亚基; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 生态环境

中图分类号: S643.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)06-1056-06

## A Study on the Difference of Protein-subunit in Faba Bean under Different Eco-types in Qinghai

SHI Jian-bin<sup>1,2</sup>, HOU Wan-wei<sup>2,3</sup>, LIU Yu-jiao<sup>2,3\*</sup>, MA Xiao-gang<sup>2\*</sup>,

(1. Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Crops Research Institute, Qinghai Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Xining 810016, China; 3. The Cultivating Base of National Key Lab-Plateau Crop Gene Innovated and Utilized in Qinghai Province, Xining 810016, China)

**Abstract:** In order to investigate the effects of different ecological environments in Qinghai on the protein subunits in faba bean, the variety of Qinghai 13 under different eco-types in Qinghai Province was analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Based on the analysis above, various main subunits of albumin and globulin were separated and their relative contents were acquired by Band Scan 5.0. The result showed that there were differences in the formation of the albumin and globulin subunits in faba bean. Albumin contained 20 subunits of 18 bases and 2 specials, globulin contained 13 subunits of 10 bases and 3 specials. The special subunits were 99 ku, 61 ku of albumin and 94 ku, 64 ku, 39 ku of globulin. The lacking subunits were 57 ku, 47 ku of albumin and 61 ku, 51 ku of globulin. The quantities of subunits were different from each other because of the different ecological environments.

**Key words:** faba bean; protein subunit; SDS-PAGE; ecological environment

收稿日期: 2011-09-04 修回日期: 2011-09-28

基金项目: 国家 973 项目(2010CB134408)、现代农业产业技术体系建设专项(CARS-09-G4)和青海省高校“135 高层次人才培养工程”项目

作者简介: 石建斌(1986—), 男, 硕士生, 主要从事种质资源评价与利用研究, E-mail: shijanbin@163.com; \* 通讯作者: 马晓岗 研究员 E-mail: mxg5988@sina.com; 刘玉皎 研究员 E-mail: Lyujiao2000@yahoo.com.cn.

蚕豆(broad bean)学名 *Vicia faba* L., 别名胡豆、罗汉豆等, 一年生草本, 是重要的豆科作物。蚕豆含有丰富的蛋白质<sup>[1]</sup>, 含量为 25% ~ 30%, 是水稻的 4.6 倍, 小麦的近 3 倍, 以清蛋白和球蛋白为主。蛋白质的氨基酸组成接近于人体和动物所需要的理想比例, 是人类理想的植物蛋白来源。蛋白质的高级结构决定蛋白质的生物性质和功能, 而亚基是构成蛋白质四级结构的基础。也是影响蛋白质营养价值和功能特性的重要因素之一<sup>[2]</sup>。

李萍等<sup>[3]</sup>采用分级提取法蚕豆清蛋白和球蛋白并进行了 SDS-PAGE 分析, 认为先提取球蛋白时总有一定的清蛋白被提取; 谭洪卓等<sup>[4]</sup>通过研究 20 种中国蚕豆的化学组成、物理特性及其相互关系, 得出了“蚕豆的特性受地域土壤环境影响很大”的结论; 刘玉皎等<sup>[5]</sup>对 153 份青海蚕豆种质资源的形态多样性进行了鉴定, 结果表明, 青海蚕豆种质资源具有丰富的形态多样性。Eckert<sup>[6]</sup>研究表明, 一个物种两种繁殖方式的重要性因环境不同而会发生变化, 青海地处青藏高原, 光照资源丰富, 气候冷凉, 昼夜温差大, 是包括蚕豆、豌豆在内的冷季豆类生产的十分理想的特殊生态区, 与蚕豆原产地中亚高原在纬度、海拔和冷凉高寒的生态环境上有显著的相似性, 发展春蚕豆生产有着优越的自然优势<sup>[7]</sup>。本试验主要通过 SDS-PAGE 技术探讨不同的生态环境对蚕豆蛋白亚基的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试品种为青海 13 号, 试验地点为海南共和、互助林川、互助南门峡和海西德令哈, 因青海 13 号是由海南共和引入, 所以以海南共和为试验对照点(CK)。试验地点与环境状况见表 1。

表 1 采集地点与气候状况

Tab. 1 The location and the climate

编号 No.	品种名称 Cultivar	地点 Locations	海拔/m Elevation	平均温度/℃ Mean temperature	年降水量/mm Annual precipitation
1(CK)	青海 13 号	海南共和	2 850	3.4	311
2	青海 13 号	互助林川	2 700	2.0	450
3	青海 13 号	互助南门峡	2 600	2.5	550
4	青海 13 号	海西德令哈	2 980	4.0	176

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子蛋白的提取 参照陈毓荃<sup>[8]</sup>的方法, 将等测蚕豆去皮, 混匀磨碎后过 80 目筛, 称干粉 0.05 g, 加 0.4 mL 蒸馏水, 振荡混匀, 4℃ 下静置过夜(24 h), 离心(8 000 r/min, 30 min) 取上清液, 作为清蛋白(水溶蛋白); 在沉淀中添加 100 g/L NaCl 0.4 mL, 振荡混匀, 4℃ 下静置过夜(24 h), 离心(8 000 r/min, 30 min) 取上清液, 作为球蛋白(盐溶蛋白), 各提取蛋白组分获得后 4℃ 保存。

1.2.2 电泳样品的制备<sup>[9]</sup> 提取蛋白组分按体积比 1:1 加入种子样品裂解液(3.125 mL 1.0 mol/L, pH=6.8 的 Tris-HCl + 1 g SDS + 5 mL 甘油 + 1.5 mL β-巯基乙醇 + 少许溴酚蓝, 用蒸馏水定容至 50 mL), 于沸水中煮沸 3~5 min, 置 4℃ 冰箱备用点样。

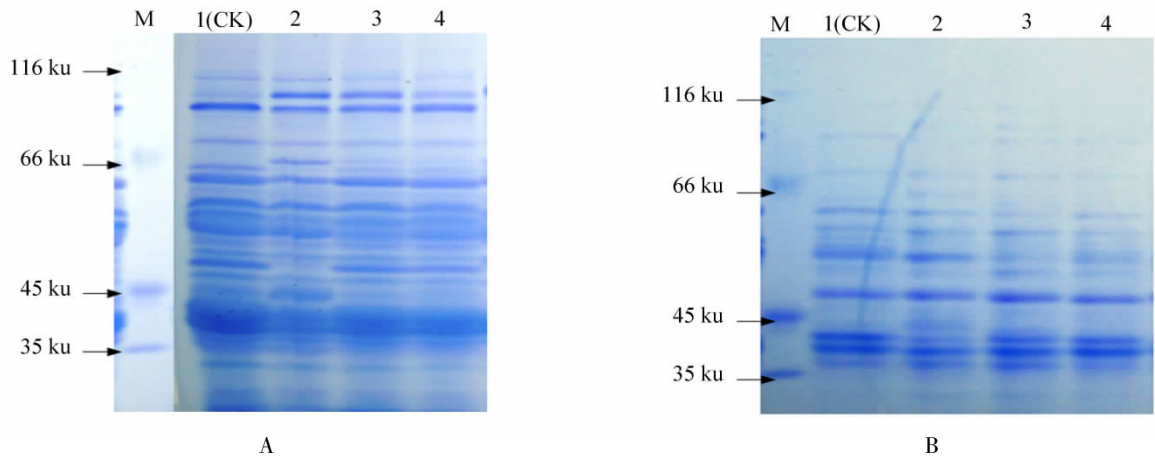
1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用不连续垂直板状凝胶电泳, 参考 Laemmli 法<sup>[9-15]</sup> 并稍作修改, 凝胶厚度 1.5 mm, 浓缩胶浓度 4%, 分离胶浓度 12%, 样品上样量 5 μL, 恒流 30 mA 电泳。采用考马斯亮蓝 R-250 染色<sup>[16]</sup> 1 h, 用蒸馏水漂洗 2~3 次, 再用脱色液 V(无水乙醇):V(冰醋酸):V(水)=4:1:5 在脱色摇床上脱色, 直至各亚基条带清晰, 用蒸馏水漂洗 2~3 次, 电泳完成后用相机拍照。

### 1.3 数据处理

原始数据采用 Excel 统计, 图像处理采用 Hema GSG 核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统(北京六一)。亚基的相对含量定义为其光密度占该泳道总光密度的百分率(不包括带之间的区域), 采用 Band Scan 5.0 软件完成。

## 2 结果与分析

将不同地区的青海 13 号蚕豆采用顺序提取后, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 得电泳图谱(图 1)。



A: 清蛋白亚基电泳图; B: 球蛋白亚基电泳图。

A: Electrophoresis bands of albumin; B: Electrophoresis bands of globulin.

图1 不同生态类型的青海13号蚕豆蛋白亚基电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis bands of protein subunits of Qinghai 13 broad bean of different eco-types

2.1 不同地区蚕豆清蛋白亚基分析

图1中A为清蛋白的电泳图谱,由图可知,蚕豆清蛋白经SDS-PAGE凝胶电泳后,条带比较清晰,所得亚基数量为18~20条,清蛋白亚基条带染色深浅及条带粗细存在明显差异,亚基大小主要分布在32~99ku。为了进一步分析不同生态环境对蚕豆清蛋白亚基的影响,用凝胶成像系统软件对电泳图谱进行了分析,结果见表3、图2。

表2 不同地区清蛋白亚基数量

Tab. 2 The number of albumin protein subunit of different place

青海13号蚕豆 Qinghai13	1(CK)	2	3	4
亚基数量 Subunit number	19	18	20	20

从表2可以看出,在总亚基数量上,不同地区间亦有差别,其中3、4号蚕豆清蛋白亚基数量最多为20条,2号蚕豆清蛋白亚基最少为18条。

表3 青海13号蚕豆清蛋白亚基条带含量

Tab. 3 The quantity contained of albumin protein subunit of faba bean

条带 Bands	分子质量/ku Molecular weight	含量/% Quantity contained			
		1(CK)	2	3	4
1	99	—	6.7	5.8	4.1
2	73	9.5	4.8	3.4	4.5
3	64	3.9	3.3	3.4	3.7
4	61	—	5.1	4.1	2.9
5	60	5.5	1.1	4.4	3.5
6	92	7.6	4.5	5.8	5.7
7	57	3.4	—	2.4	3.2
8	56	7.3	8.1	7.9	5.4
9	49	6.5	6.5	3.1	7.4
10	50	6.5	7.2	6.0	5.1
11	52	5.5	6.3	7.3	6.6
12	53	5.8	5.0	7.6	6.6
13	47	7.0	—	8.2	7.7
14	35	6.9	7.6	7.8	7.0
15	37	2.6	8.4	2.2	7.6

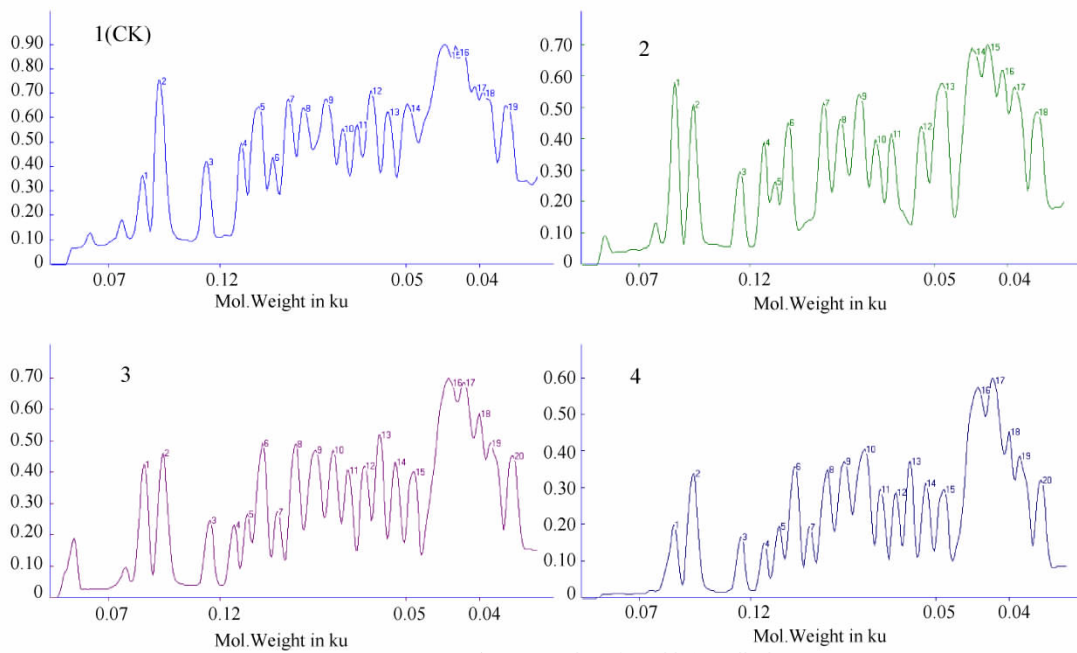


图 2 不同环境下蚕豆清蛋白亚基变化曲线图

Fig. 2 The graph of faba bean albumin subunit in different environment

结合图 1-A、表 3 及图 2 可以看出, 青海 13 号在不同的生态环境下, 清蛋白部分亚基条带发生了变异, 在相对分子质量为 99 ku、61 ku 处, 1(CK) 并未检测出条带, 泳道 2、3、4 均出现条带, 其含量分别为 6.7%、5.8%、4.1% 和 5.1%、4.1%、2.9%; 与对照及 3、4 相比, 泳道 2 分别缺失了 57 ku 和 47 ku 条带。表明 2 增多了一条 61 ku 的条带和缺失了两条 57 ku 和 47 ku 条带, 3、4 分别增多了一条 61 ku 的条带, 与对照相比, 2、3、4 的部分亚基发生了变异。

各蛋白亚基的含量也有所不同, 在相对分子质量为 99 ku 的亚基条带位置处, 对照泳道 1 的条带很淡, 泳道 2、3、4 的蛋白量明显高于泳道 1, 对照泳道 1 的光密度为 2.8%, 而泳道 2、3、4 的含量分别达到了 6.7%、5.8%、4.1%。表明在该位置处, 2、3、4 号蚕豆相对于对照均有一定的变异。

### 2.2 不同地区蚕豆球蛋白亚基分析

蚕豆球蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 所得电泳图谱如图 1-B, 所得亚基数量为 11~13 条, 亚基条带染色深浅及条带粗细存在一定的差异, 亚基大小主要分布在 37~94 ku。为了进一步分析不同生态环境对蚕豆球蛋白亚基的影响, 用凝胶成像系统软件对电泳图谱进行了分析, 结果见表 5、图 3。

表 4 不同地区清蛋白亚基数量

Tab. 4 The number of globulin protein subunit of different place

青海 13 号蚕豆 Qinghai13	1(CK)	2	3	4
亚基数量 Subunit number	12	13	12	11

从表 4 可以看出, 在总亚基数量上, 不同地区间亦有差别, 其中 2 号蚕豆球蛋白亚基数量最多为 13 条, 4 号蚕豆清蛋白亚基最少为 11 条。结合图 1-B、表 5 及图 3 可以看出, 青海 13 号在不同的生态环境下, 球蛋白部分亚基条带也发生了变异, 在相对分子质量为 94 ku 处, 1(CK) 并未检测出条带, 泳道 2、3 均出现条带, 其含量分别为 3.3%、2.5%; 在相对分子质量为 64 ku 处, 1(CK) 并未检测出条带, 泳道 2 出现条带, 其含量为 4.5%; 在相对分子质量为 61 ku 处, 1(CK) 检测出条带, 泳道 2、4 并未出现条带; 在相对分子质量为 51 ku 处, 1(CK) 检测出条带, 泳道 2、3 并未出现条带; 在相对分子质量为 39 ku 处, 1(CK)、3、4 并未检测出条带, 泳道 2 出现条带, 其含量为 7.4%。

以上表明, 与对照相比, 编号 2 增多了相对分子质量分别为 94、64、39 ku 的 3 条亚基条带, 并缺失了一条相对分子质量为 61 ku 的亚基条带; 编号 3 分别增多了一条 94 ku 的亚基条带和缺失了一条 51 ku 的亚基条带; 编号 4 缺失了一条 61 ku 的亚基条带。表明 2、3、4 号蚕豆与对照相比, 在球蛋白水平上均发生了一定的变异。

表5 青海13号蚕豆球蛋白亚基条带含量

Tab.5 The quantity contained of globulin protein subunit of faba bean

条带 Bands	分子质量/ku Molecular weight	含量/% Quantity contained			
		1(CK)	2	3	4
1	94	—	3.3	2.5	—
2	85	6.2	6.2	4.7	4.0
3	70	5.5	5.1	6.2	6.5
4	64	—	4.5	—	—
5	61	3.1	—	3.5	—
6	57	6.3	2.9	2.0	2.8
7	53	5.5	7.5	5.9	3.7
8	51	4.1	—	—	2.8
9	48	10.5	7.7	6.9	9.5
10	43	9.7	9.0	8.1	11.6
11	41	11.2	13.9	13.0	16.9
12	39	—	7.4	—	—
13	37	9.3	9.2	10.8	9.9

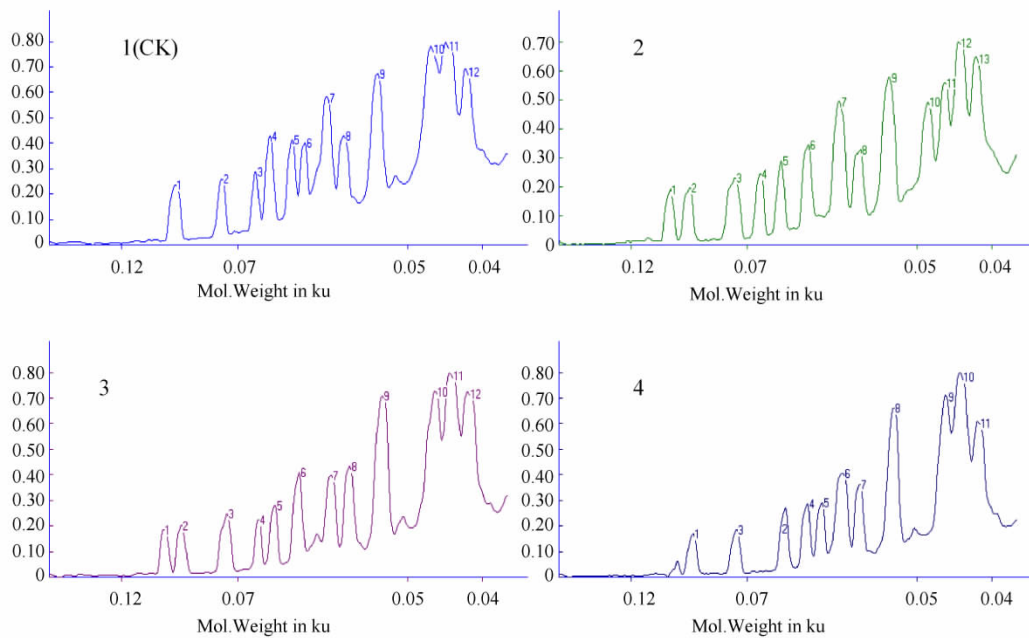


图3 不同环境下蚕豆球蛋白亚基变化曲线图

Fig.3 The graph of faba bean globulin subunit in different environment

### 3 讨论

#### 3.1 不同环境条件下蚕豆蛋白亚基的差异

通过试验,青海13号蚕豆得到清蛋白亚基数量18~20条,大小32~99 ku;球蛋白亚基数量11~13条,大小37~94 ku。在清蛋白方面,在3个地区的蚕豆中均发现99 ku和61 ku的特异亚基,互助林川地区的蚕豆缺失了两条基本亚基条带,分子质量为57 ku和47 ku;各亚基在含量上也有一定差别,尤其在99 ku处,其它3个地区的蛋白含量明显高于对照地区,为6.7%、5.8%、4.1%。在球蛋白方面,发现3条特异亚基条带,分子质量分别为94、64、39 ku,其中互助林川地区的蚕豆含有全部的特异亚基,并缺失了一条分子质量为61 ku的基本亚基条带;互助南门峡地区的蚕豆含有94 ku的特异亚基条带,并缺失了一条51 ku的基本亚基条带;海西德令哈地区的蚕豆缺失了一条61 ku的基本亚基条带。

### 3.2 气候条件对蚕豆蛋白亚基的影响

豆类主要贮藏蛋白亚基受气象因子的影响比较复杂,卢卫国等<sup>[17]</sup>以豫豆25号为材料,分地点播种,考察了日照时数、降水、均温和昼夜温差4个气象因子对11S/7S比值的影响,仅发现幼苗期均温和昼夜温差以及分枝期昼夜温差的影响显著。王燕平等<sup>[18]</sup>以57份大豆种质资源为材料,通过研究蛋白亚基的变异,发现大豆蛋白亚基相对含量随品种和产地变化存在明显的变异,并发现了4份自然变异的特异大豆种质。王红玲等<sup>[19]</sup>以20个大豆品种为材料,考察了营养期和生殖生长期的气象因子对大豆籽粒总蛋白以及亚基相对含量的影响,结果表明,大豆籽粒总蛋白含量以及组分、亚基相对百分含量会随播期的改变而变化,总积温、总日照数和总降水量显著影响大豆总蛋白的含量,整个生育期间气象因子对各组分亚基的影响程度存在差异。

青海13号蚕豆的种植区地处青藏高原,海拔高、气温低、昼夜温差大、年降水量少,各生态区的环境条件各不相同,气候条件存在较大的差异,在本试验中,发现有特异亚基的增加和基本亚基的缺失,并且亚基含量也存在差别,表明青海13号蚕豆在不同生态环境条件下,其蛋白质发生了一定的变异,这可能与各生态环境的气候条件有关,包括海拔、气温、年降水量等,这些气象因子均可能导致蚕豆蛋白质的变异。

### 3.3 研究意义及应用前景

亚基是构成蛋白质四级结构的基础。有研究表明,蛋白质的功能特性和制品与蛋白质组分及其亚基密切相关<sup>[20]</sup>,特异亚基的增加与基本亚基的缺失,将直接影响蛋白质的含量,进而影响其加工品质。气象因子对贮藏蛋白的含量及品质都具有较大的影响,通过研究不同生态环境对蚕豆蛋白的影响,可以使我们了解特异亚基的增加或缺失与蚕豆蛋白含量及品质之间有关系,为今后筛选高蛋白含量蚕豆、培育优异种质材料及确定其适合生长的环境条件提供科学支撑。

#### 参考文献:

- [1]叶茵. 中国蚕豆学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 9-10.
- [2]陈海敏, 华欲飞. 品种差异对大豆蛋白功能性的影响[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 178-180.
- [3]李萍, 侯万伟, 严清彪, 等. 青海蚕豆清蛋白与球蛋白分级提取 SDS-PAGE 比较分析[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(1): 168-172.
- [4]谭洪卓, 谭斌, 田晓红, 等. 20种中国蚕豆的化学组成、物理特性及其相互关系[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(12): 153-157.
- [5]刘玉皎, 宗绪晓. 青海蚕豆种质资源形态多样性分析[J]. 植物资源学报, 2008, 9(1): 79-83.
- [6]Eckert C G, Barrett S C. Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae) [J]. *Amer J Bot*, 1993, 80(10): 1175-1182.
- [7]杨菁. 青海不同生态条件不同基因型蚕豆蛋白质含量差异的研究[J]. 北方园艺, 2010(6): 69-71.
- [8]陈毓荃. 生物化学研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 196-198.
- [9]Coligan J E. 精编蛋白质科学实验指南[M]. 李慎涛, 译. 北京: 科学出版社, 2007: 294-297.
- [10]韩锋, 凌以禄. 大豆属多年生野生种及栽培种种子蛋白质电泳分析[M]. 中国油料, 1991(4): 17-21.
- [11]刘伟, 王岩, 吴秀艳. 利用 SDS-PAGE 技术分离高分子量麦谷蛋白亚基及在小麦优质育种上的应用[J]. 黑龙江农业科学, 1995, 3: 37-40.
- [12]QU L Q, Satoh H, Ogawa M. Improved electrophoretic analyses for rice seed storage glutelin [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(8): 730-737.
- [13]梁山山, 杨晓卷, 侯留计. 烟草种子蛋白的 SDS-PAGE 测定[J]. 西南农业学报, 1998, 11(3): 118-121.
- [14]郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(1): 32-37.
- [15]Acrylamide casting handbook [M]. Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden, 1994: 21-28.
- [16]郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 54-87.
- [17]卢为国, 王树峰, 李卫东, 等. 大豆籽粒贮藏蛋白 11S/7S 比值与生态因子相关关系的研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(5): 1059-1064.
- [18]王燕平, 李贵全, 郭数进. 山西不同生态型大豆种质资源蛋白亚基的变异[J]. 生态学报, 2011, 31(1): 203-211.
- [19]王红玲, 陈少光, 向世鹏. 气象因子对大豆主要贮藏蛋白组分及亚基含量的影响[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(4): 431-437.
- [20]刘顺潮, 周瑞宝, 盖钧镒. 大豆蛋白质 11S 和 7S 组分及其亚基分析方法的研究述评[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2007, 28(4): 1-6.