

大豆属三种球蛋白的比较及其在发育中的积累

雷勃钧 尹光初

(黑龙江省农业科学院大豆研究所)

林忠平

(中国科学院植物研究所)

前言

高蛋白作物——大豆已愈来愈被人类重视,特别是在目前动物蛋白还满足不了人类需要的今天,它作为一种食用植物蛋白来满足人类对蛋白质的摄取就显得尤为重要。因而,对大豆蛋白的研究也就引起了国内外科研人员的兴趣和重视。

我们通常所说的大豆蛋白质含量,栽培大豆 (*Glycine max*) 一般在 40% 左右,野生大豆 (*Glycine soja*) 和半野生大豆 (*Glycine gracilis*) 一般在 50% 左右,是指包括了大豆种子贮藏蛋白在内的,还有结构蛋白、酶蛋白、核酸等含 N 物质的总蛋白而言。其中占绝对优势的是贮藏蛋白。贮藏蛋白中主要是球蛋白 (globulin); 约占全部种子蛋白的 60—70%, 还有一定数量 (约 20%) 的白蛋白 (albumin)^[1]。而对人类营养及其大豆本身生长发育有意义的主要是这部分贮藏蛋白。这部分蛋白只有在种子代谢活跃阶段才开始降解。大部分作为氨基酸和氮源用于合成新的含氮化合物,为萌发的幼苗提供氨基酸和氮的来源,所以才称之为贮藏蛋白。其主要成分球蛋白是由几个不同 S 值 (沉降系数) 的球蛋白 11S、7S、2S 等构成。

几年来,我们对这三种主要球蛋白进行了较为详细的研究。也就是,野生大豆、半野生大豆和栽培大豆中的这三种球蛋白进行分离、提取,作一构成上的比较,探讨与种子蛋白总量之间的关系,进而摸清其在大豆子叶形成发育过程中的积累情况。旨在了解从野生到栽培进化过程中基因活动情况,研究大豆高蛋白品种的特点,为合理利用大豆资源,选育优质高蛋白大豆品种,特别是为采用现代生物技术手段,使野生种的高蛋白等优良性状向栽培种转移,提供理论依据。

本文报道这些研究的部分结果。

材料和方法

供试材料:大豆种子。黑龙江省的八个栽培品种 (*G. max*), 五个野生类型 (*G. soja*) 八个半野生类型 (*G. gracilis*)。其中三份另加黑农 26 号做了积累实验。种子均收获于黑龙江省农科院实验地。

一、球蛋白组分的提取,测定和鉴定

(一) 提取 (分别采用)

1. 修改过的 Appu Rao 和 Narasinga Rao 的方法^[1],称为简略盐析法。过程如下:

1) 取脱脂豆粉 0.5 克加水 30 毫升研磨过滤加 1 滴 β -巯基乙醇。

注:本研究得到王连铮付研究员的指导帮助,品种资源室提供实验材料,罗教芬、王剑、卢翠华、张开旺、周恩君同志参加部分工作,一并致谢。

2)离心 6 千转 20 分钟取上清液加 $MgCl_2$ 达到 0.01M, 冷置 6 小时。

3)离心 1 万转 50 分钟。沉淀部分加标准磷酸缓冲液溶解。加 32 克 $(NH_4)_2SO_4/100ml$ 搅拌后冷置 6 小时或过夜。上清部分加 $MgCl_2$ 使溶液中 Mg^{++} 达到 $5 \times 10^{-2} M$ 。搅拌冷置 6 小时或过夜。

4)离心 1 万转 30 分钟。将两部分溶液离心后的沉淀弃掉,均要上清部分。沉淀部分的上清即为 11S 球蛋白,记体积并做紫外监测。上清部分的上清液为 7S+2S 球蛋白 记体积并做紫外监测。然后在 7S+2S 球蛋白溶液中加入 1 M·NaCl 32 克 $(NH_4)_2SO_4/100ml$, 搅拌冷置 6 小时或过夜。

5)离心 1 万转 30 分钟。弃沉淀要上清,记体积并做紫外监测。此部分为 7S 球蛋白。然后 $(7S+2S) - 7S$ 可得到 2S 球蛋白含量。

2. 修改过的 Hill 和 Broidenbach^[3]蔗糖密度梯度离心方法来分离提取。

1)样品处理:将干种子浸泡、去皮研磨,以 1:10 W/V 加标准磷酸缓冲液溶解,过滤,1 万转 30 分钟 0℃下离心 弃沉淀,将上清液加饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 搅拌冷置过夜或 6 小时以上,再同样条件离心,弃上清,取沉淀用标准磷酸缓冲液溶解,对无 β -巯基乙醇的磷酸缓冲液透析 2-3 天,再离心弃沉淀取上清液。

2)将上清液做蔗糖密度梯度离心用含有 NaCl 的磷酸缓冲液为溶剂,制备 10-30% (W/W)的线性蔗糖梯度溶液,将制备的大豆球蛋白溶液(即上清液)加在蔗糖梯度溶液的上层,在 $140,000 \times g$, 0℃下离心 15 小时。离心后从管底部开始分层取样。同时用大豆胰酶抑制剂和牛肝过氧化氢酶(前者沉降系数与 2S 球蛋白相当,后者与 11S 球蛋白相当)作为标准蛋白在同样的蔗糖梯度上进行超速离心和紫外监测。

(二) 测定

1. 分部和分离提取的各组球蛋白含量的测定依紫外吸收法进行。用紫外分光光度

计扫描。于 280nm 处记数。按下面公式推算:

蛋白含量 (mg/ml)

$$= (1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260})$$

× 稀释倍数

2. 球蛋白总量的测定:取 1 克种子用 0.4 MNaCl 溶液浸泡、去皮研磨,尼龙布过滤,反复研磨加 0.4 MNaCl 溶液冲洗(溶解)获得 100ml 蛋白稀盐溶液。静置半小时,吸此溶液 10ml 调球蛋白等电点 pH4.3-4.5,离心 1 万转 30 分钟 0℃下进行。弃上清,将沉淀涂于预先称好的干燥清洁玻片上 烘干 24 小时称重。此方法还要校正,去掉 NaCl 的重量。

球蛋白 % 含量

$$= \left[\text{称得的重量} - \text{NaCl 重量} \frac{(0.4 \times 58.44)}{1000} \right]$$

× 100%

(三) 鉴定

1. 沉降系数测定:7S 和 11S 球蛋白溶于 1 MNaCl 中,以 UCA-1A 型超速离心机,在 0℃下进行。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱鉴定将各组球蛋白(2S、7S、11S)分别溶于含有 20% 蔗糖的 0.05M 磷酸缓冲液 pH7.8 中,使用 7.5% 分离胶、3% 浓缩胶。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸(Tris 6 克 + 甘氨酸 28.8 克/1 升中) pH8.3 每柱 5mA 电流下电泳。至指示剂溴酚兰移至柱前沿,停止电泳。染色剂为 0.1% 考马斯亮兰 R-250。脱色液醋酸-甲醇。胶柱用凝胶电泳扫描仪扫描。

二、免疫荧光法观察 11S、7S 球蛋白在种子形成的不同时期的积累

1. 大豆开花后 4 天,10 天,15 天,20 天,26 天,30 天,40 天,50 天等 8 个时期,采样(子叶部分)用戊二醛固定。做成 8 微米厚的石蜡切片。

2. 用已分离提纯的 11S、7S 蛋白分别加福氏佐剂免疫家兔,获得这两种球蛋白的抗血清。

3. 切片脱蜡后进入 PBS 缓冲液中,取出滴加稀释的抗血清(1:16) 37℃温育 30 分

钟。用 PBS 洗去未被吸附的血清。加 FITC-羊抗兔 IgG (1:16 稀释) 温育 37℃30 分钟。用 PBS 洗去多余的荧光抗体。最后加上 50% 甘油封片。在 Olympus 荧光显微镜下观察。FITC 荧光素发黄绿色荧光。

结 果

1. 分离出来的 11S、7S 球蛋白经过超速离心分析，其沉降系数为 10.50, 和 7.00 (图 1)。

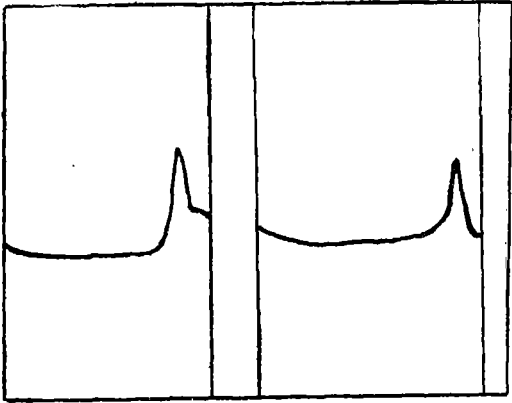


图 1 11S、7S 球蛋白沉降图

2. 凝胶电泳表明所有样品中分离出来的 11S、7S 和 2S 球蛋白均具有这些球蛋白所特有的典型谱带。在我们的实验条件下 11S 球蛋白表现为一条带，但最终的样品在 β -巯基乙醇中解离之后则分成 A、B 两区。每区分布若干不易分清的带。7S 球蛋白在电

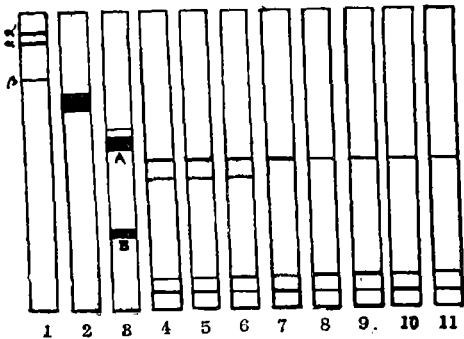


图 2 大豆球蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 7S 蛋白；2. 11S 蛋白；3. 蛋白在 0.1% β -巯基乙醇中解离 24 小时；4-11. 2S 蛋白 (4-5 来自野生大豆蛋白样品；6-8 来自半野生大豆蛋白样品；9-11. 来自栽培大豆蛋白的样品)。

泳后分为相当于 α 、 α' 、 β 三个亚基的三条带。2S 球蛋白的电泳谱带也有一定的分布图式，但各带粗细、染色深浅颇不相同 (图 2)。

3. 三种球蛋白部分分离后各所占比例及种子总蛋白、球蛋白总量百分数 (见表 1)，(采用蔗糖梯度离心法分离) 和表 2，(采用简略盐析法分离) 尽管材料的品种 (品系)

表 1 球蛋白组分在三种类型大豆中的比较

种子类型	材料名称	(去皮) 总蛋白含量 %	球蛋白 占 总蛋白 的 百分比	各 部 分 球 蛋 白 的 比 例 %		
				11S	7S	2S
G-soja	龙79-5404	60.13	63.28	49.23	20.83	29.94
	龙81-5401	53.66	59.65	52.40	23.50	24.10
G-gracilis	龙79-4204-4	52.59	58.02	52.90	23.10	24.00
	龙79-0620	49.02	65.88	69.81	17.80	12.39
	龙79-1802	47.20	60.62	50.30	23.50	26.20
	龙80-4001	46.33	67.28	56.10	21.10	22.80
G-max	四粒黄	43.96	74.18	52.10	23.50	24.40
	合交74-1235	41.81	59.44	54.29	22.90	22.81
	合丰15	39.65	55.45	58.00	20.48	21.52

表 2 球蛋白组分在三种类型大豆中的比较

种子类型	材料名称	总蛋白 含量 %	球蛋白 在 总蛋白 中的 百分比	各 部 分 球 蛋 白 的 比 例 %		
				11S	7S	2S
G-soja	龙79-0616-2	60.86	72.48	56.10	22.90	21.00
	龙79-3311	57.22	60.10	52.70	25.00	22.30
	龙79-0606-1	57.71	57.43	62.30	21.60	16.10
G-gracilis	龙79-3433-1	56.10	70.52	65.20	19.80	15.00
	龙79-4204-5	54.86	68.53	58.80	23.60	17.60
	漠河秣食豆	46.85	77.26	67.40	17.30	15.30
	龙80-4703	46.45	70.28	51.40	20.80	27.80
G-max	塞凯-20	51.67	75.51	61.30	22.50	16.20
	北芪217	51.12	74.89	65.30	19.20	15.50
	国育41-2	49.42	68.76	67.60	18.00	14.40
	公492	46.68	68.38	58.30	23.30	18.40
	黑河三号	40.93	53.32	65.60	17.90	16.50

和分离方法不同,但所得结果基本一致。为了进行类型间的比较研究,我们将三种球蛋白和全蛋白总量计算出了各类型的平均数(见表3)。

表3 球蛋白组分在三种类型大豆间的比较

种子类型	去皮全蛋白%	各种球蛋白平均%		
		11S	7S	2S
G-soja	56.72	54.55	22.77	22.69
G-gracilis	50.05	57.44	21.31	21.24
G-max	45.66	60.31	20.97	18.72

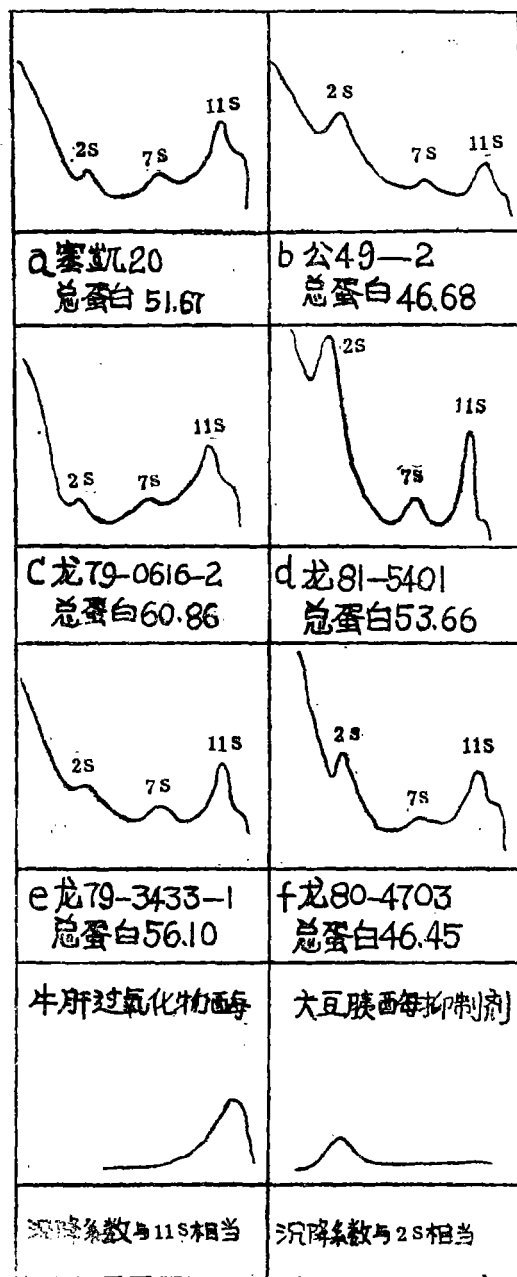


图3 大豆球蛋白组分的小图横座标为离心管从上到下的分部纵座标为280nm的吸收值。

d-b 栽培大豆(G-max) e-d 野生大豆(G-soja)
e-f 半野生大豆(G-gracilis)

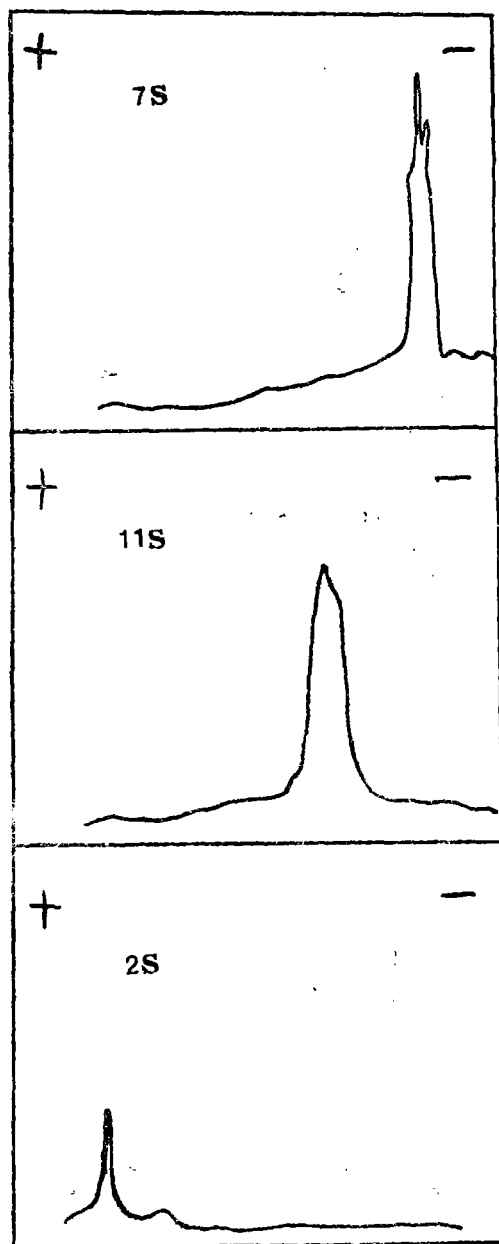


图4 大豆球蛋白各组分的凝胶电泳扫描图谱

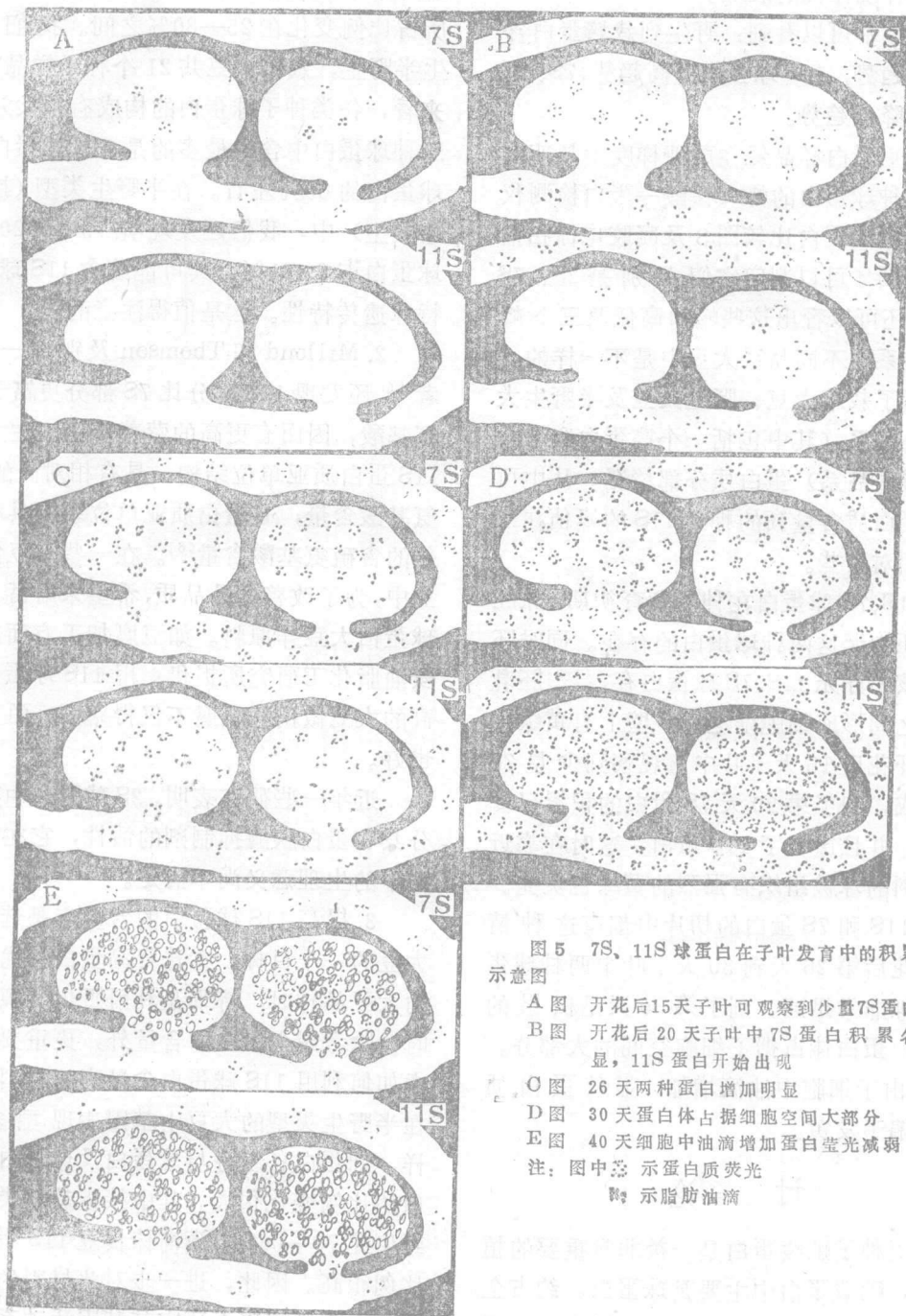


图5 7S、11S球蛋白在子叶发育中的积累示意图

- A图 开花后15天子叶可观察到少量7S蛋白
 B图 开花后20天子叶中7S蛋白积累明显，11S蛋白开始出现
 C图 26天两种蛋白增加明显
 D图 30天蛋白体占据细胞空间大部分
 E图 40天细胞中油滴增加蛋白荧光减弱
 注：图中 \cdot 示蛋白质荧光
 \bullet 示脂肪油滴

从表1、2中可以看到高蛋白种子中球蛋白所占比例也高。然而在半野生类型的大豆中未见这种规律性的表现。

从表3中可以看到：野生到栽培蛋白含量呈降低趋势，11S球蛋白升高趋势，7S、2S球蛋白呈降低趋势。

4. 大豆蛋白样品经在蔗糖梯度中超速离心后，三种球蛋白的峰（核酸-蛋白检测仪扫描）同标准蛋白比较图3及凝胶电泳扫描图谱鉴定图4可以判定它们分别是2S、7S和11S。还可以看出这些峰的高低及三个峰间比例关系在不同品系大豆中是不一样的。图3列举了栽培大豆、野生大豆及半野生大豆各两个品系（其中包括一个高蛋白和一个相对低蛋白品系）蛋白质分部情况。从中可以看出蛋白质含量高的种子11S的峰值在三个峰间相对高些。

5. 11S、7S球蛋白在种子发育初期，原胚和心形胚均无这两种球蛋白的存在。同时胚乳游离核中亦无11S、7S球蛋白存在。当胚乳游离核之间形成细胞壁之后，壁上有黄绿色荧光。开花后15天子叶中可观察到少量7S蛋白形成，到了第20天7S蛋白的积累已经很明显，并且出现了11S蛋白，这时在靠近子叶周围的珠被组织有强烈的黄绿色荧光。在显示11S和7S蛋白的切片中都有这种情况。开花后第26天到30天子叶中两种球蛋白的增加非常迅速。到了第30天是积累的高峰期，蛋白体占据了细胞空间的大部分。40天后由于细胞中油滴增加，显示蛋白质的荧光偏于发黄。

讨 论

大豆种子贮藏蛋白是一类非常重要的植物蛋白，贮藏蛋白中主要是球蛋白，约占全部种子蛋白的60%左右，因而，提高大豆蛋白质的含量、改善其品质，主要应着眼于球蛋白的数量和质量。

一、在改进谷物和豆类蛋白质质量育种工作中，研究种子蛋白各组分之间的比例关

系是很有意义的。

1. 据 Millend 和 Thomson^[4]报道：在豌豆的各个品系中，11S蛋白在球蛋白总量中所占比例变化在25—80%之间。我们从野生半野生，栽培大豆共21个种子样品分析来看，各类种子球蛋白的构成有很大差别。三种球蛋白中含量最多的是11S球蛋白，占球蛋白的60%左右。在半野生类型（接近栽培类型）中，我们还发现龙79—0620，11S球蛋白占69.81%，其可能蕴含11S球蛋白特殊遗传特性。这是值得注意的。

2. Millend 和 Thomson 及别的一些作者^[4,5]还发现11S部分比7S部分更富于含硫氨基酸，因而有更高的营养价值。在大豆中11S蛋白质亚单位结构，具有相对高的含硫氨基酸含量，7S蛋白质亚单位结构具有相对低的含硫氨基酸含量^[6]。在一些大豆食品工业中，为了改善食品品质，希望采用富于11S球蛋白大豆作原料。如豆腐加工方面，据西安油脂化工研究所提供：用11S球蛋白含量高的大豆做出的豆腐不仅得率高，而且口感也好。

近年一些研究表明，2S球蛋白中某些组分具有蛋白胰酶抑制剂的活性，它在种子发育中的生理意义尚不清楚。

3. 提高11S球蛋白的含量应是选育优质大豆的一个目标。在选育高蛋白和优质蛋白的大豆品种时，特别是利用野生资源来选育时，除考虑全蛋白的含量外，更重要的是考虑如何利用11S球蛋白含量高的材料。尤其在半野生类型的大豆中基因表现型多种多样，球蛋白各组分与总蛋白及球蛋白占总蛋白的比例变化很大。其中接近栽培类型的半野生龙79—0620、漠河秣食豆11S蛋白所占比例很高。因此，进一步对此材料的种子球蛋白在亚基水平上研究其基因活动系统和全蛋白中各组分的遗传调节，对于研究大豆遗传进化和育种是很有意义的^[7]。

4. 为了消除各类型内品种或品系间的差异，尤其是半野生类型内的差异，我们取其

每种类型的平均数,进行三种类型大豆的球蛋白组分比较,可以发现:从野生、半野生到栽培种的演变趋势看,11S蛋白所占比例逐渐增加,7S和2S蛋白所占比例逐渐下降。这似乎反映了在驯化种植过程中基因表现型的一个特点。

二、我们将大豆去皮后进行蛋白分析,目的是撇开皮重这个因素。这样做对于具有较厚种皮的野生种子尤为必要。

三、免疫荧光法没有显示出大豆属三个种间,两种球蛋白积累方式上的差别。但在野生品系中观察到子叶的某些细胞不积累11S蛋白。这可能就从另一角度验证了从野生到栽培类型的演变中,11S球蛋白所占比例是逐渐增加的。

在开花后26天到30天这一时期中,三种类型的大豆材料都显示了强烈的荧光现象,蛋白体占据了细胞间的大部分,是积累这两种球蛋白的旺盛时期,这就启示我们,在大豆生长发育的这一时期,如能采取一些有利的农业措施,将能促进这两种球蛋白的

积累,提高大豆蛋白质含量。

参考文献

- [1] 林忠平、尹光初:大豆贮存蛋白研究概况,1983,大豆科学 Vol.2 №3.
- [2] Appu Rao A G and Narasinga Rao M S: 1977 A method for isolation of 1S 7S and 11S proteins of soybean Preparative Biochemistry.7,89—101.
- [3] Hill,J.H,Breidenbach R.W.Plant Physiol 53 (1974),742-746.
- [4] Millerd, A, Thomson, J, in OSIRO Genetics Report Division of plant Industry Canberra 1975 P58.
- [5] Boulter D Evans I.M Derbyshire E Qualitas Pl Mater Veg 23 (1975) 239.
- [6] N Kaizuma 大豆子粒蛋白质改良的基础研究 1981 大豆第一期.
- [7] Thomson J,A Doll H: 1979 Genetics and evolution of seed storage proteins in Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes Proc symp Nouherbery Vol IPP 231-240.